

**UNESP - UNIVESIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SISTEMAS *DRUG DELIVERY* APLICADOS A NOVOS INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES ESTRUTURALMENTE DERIVADOS DE TOXINAS
BACTERIANAS**

DAVI BARBOSA DELFINO

**INSTITUTO DE QUÍMICA
ARARAQUARA - SÃO PAULO**

2011

DAVI BARBOSA DELFINO

**SISTEMAS *DRUG DELIVERY* APLICADOS A NOVOS INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES ESTRUTURALMENTE DERIVADOS DE TOXINAS
BACTERIANAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientador: Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara- SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

D349s	<p>Delfino, Davi Barbosa</p> <p>Sistemas <u>drug delivery</u> aplicados a novos inibidores de <u>topoisomerases</u> estruturalmente derivados de <u>toxinas bacterianas</u> / Davi Barbosa Delfino. – Araraquara : [s.n], 2011 98 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Reinaldo <u>Marchetto</u></p> <p>Coorientador: Saulo <u>Santesso Garrido</u></p> <p>1. Biotecnologia. 2. Peptídeos. 3. Topoisomerases 4. Lipossomas. 5. Microemulsões. I. Título.</p>
-------	--

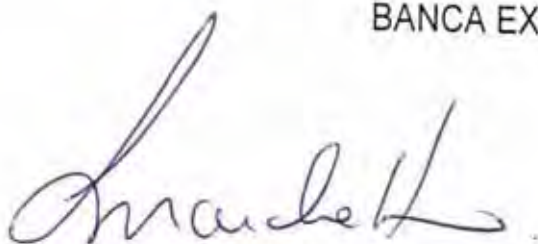
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DAVI BARBOSA DELFINO

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

Araraquara, 14 de março de 2011.

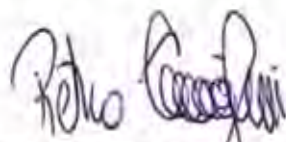
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Reinaldo Marchetto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Marlus Chorilli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pietro Ciancaglini
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Davi Barbosa Delfino.

Nome em citações bibliográficas: DELFINO, D. B.

Filiação: Antônio Delfino Filho.

Aparecida Barbosa Delfino.

Local e Data de nascimento: 24/03/1980, Cajuru-SP.

Estado civil: solteiro.

Endereço: Rua Voluntário Silvano, 55 - Cajuru-SP.

CEP: 14240-000.

Telefone: (16) 3667 1747.

E-mail: davi.barbosa@yahoo.com.br

Resumo das qualificações: Mestrando em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos e sistemas de liberação nanoestruturados. Bacharel em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Unesp (2007).

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2009 – 2011 Mestrado em Biotecnologia
Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho,
Unesp, Instituto de Química de Araraquara.
Título: Sistemas *drug delivery* aplicados a novos inibidores de topoisomerasas estruturalmente derivados de toxinas bacterianas.
Orientador: Prof^o Dr. Reinaldo Marchetto.
Bolsista CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2001 - 2007 Graduação em Farmácia-Bioquímica
Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho,
Unesp, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

4.1. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1. BARBOSA, L. C. B.; BARROS, R. S.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B. MARCHETTO, R.. Easy Bioinformatics Analysis (EBiAn): desenvolvimento de ferramentas online para análises de bioinformática. In: 5º Congresso Extensão Universitária da UNESP, 2009, Águas de Lindóia.

2. BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R.. Initial Studies of the Inhibition of Bacterial Topoisomerases Activity by Peptides Derived from ParE Toxin. In: Workshop IQ 2009, Araraquara.

3. DELFINO, D. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; BARBOSA, L. C. B.; MARCHETTO, R.. Initial Studies of Controlled Release Systems Applied to New Topoisomerase Peptide Inhibitors Structurally Derived from Bacterial. In: Workshop IQ 2009, Araraquara.

4. GARRIDO, S. S.; DELFINO, D. B.; GARCIA, A.; BARBOSA, L. C. B.; MARCHETTO, R.. Initial Studies of Controlled Release Systems Applied in the Transport of Peptides Inhibitors of Bacterial Topoisomerases. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

5. GARCIA, A.; BARBOSA, L. C. B.; DELFINO, D. B.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R.. Topoisomerase Activity Inhibition by Peptides from YacG Protein. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

6. BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R.. Peptides from ParE toxin as Potential Inhibitors of Bacterial Topoisomerases. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

7. DELFINO, D. B.; BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; MARCHETTO, R.. Bioinformatics and Structural Studies of the ParE toxin: a Model for Design of Bioactive Antibiotics. In: XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

4.2. ARTIGOS PUBLICADOS

1. BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R.. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. *Bioinformation.* , v. 4(10), p. 438-440, 2010.
2. BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; GONÇALVES, R.D.; MARCHETTO, R.. Easy Bioinformatics Analysis (EBiAn): a package for manipulating and analyzing of short biological sequences. *Bioinformation* , v.5(2), p.46-48, 2010.
3. MARCHETTO, R. ; GARRIDO, S. S. ; DELFINO, D. B. ; GARCIA, A. ; BARBOSA, L. C. B. . Molecular Modeling, Design and Structural Studies of a new Class of peptide Inhibitors of bacterial Topoisomerases. *Journal of Peptide Science*, v. 16, p. 173-174, 2010.

5. IDIOMAS

1. Inglês: nível básico.
2. Espanhol: nível básico.

**Dedico este trabalho aos meus familiares,
amigos e à minha namorada Tânia.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pela oportunidade a mim oferecida no momento da inscrição do mestrado e nos vários outros durante todo o curso.

Agradeço ao Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido pelas centenas de milhares de dicas e orientações pontuais que foram de fundamental importância para o meu desenvolvimento enquanto pesquisador.

Aos amigos de laboratório Anderson, Luiz, Larissa, Saska, Prof^o Eduardo, Crusca, Lentilha, Wanessa, Esteban, Grazy, Paulo, Ives e Michely pela compreensão e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Zilda, Ademir, Tarcísio, Luíza, Valdenir e Fernandão.

Aos funcionários da SPG e Biblioteca pelo apoio constante e pela paciência.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

**“Quando o relógio despertar,
agradeça a Deus pela oportunidade de acordar mais um dia.
O bom humor é contagiante.
Espalhe-o. Fale de coisas boas, de sonhos, de amor.
Não se lamente. Comece a sorrir mais cedo.
Não viva emoção morna e vazia. Cultive o seu interior.
Extraia o máximo das pequenas coisas.
Seja transparente e deixe que as pessoas
saibam que você gosta e precisa delas.
Repense o seu valor.**

**Tudo o que tem que ser feito merece ser bem feito.
Torne suas obrigações atraentes,
tenha garra e determinação.
Não trabalhe só pela obrigação,
mas pela satisfação da missão cumprida.**

**Transforme os seus movimentos em oportunidades.
Não inveje! Admire! Sinta entusiasmo com o sucesso alheio,
como se fosse o seu.
Ocupe seu tempo crescendo, desenvolvendo habilidades.
Só assim não terão tempo de criticar os outros.**

**Tenha fé, acredite. Você pode tudo que quiser!
Finalmente, ria das coisas à sua volta,
de seus problemas, de seus erros.
Ria da vida. E ame, antes de tudo a você mesmo.
A gente é capaz de ser feliz quando
é capaz de rir da gente mesmo!”**

(Washington Sorio)

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) derivados de toxinas bacterianas, tais como CcdB e ParE, e a produção de sistemas nanoestruturados como lipossomas e microemulsões. As toxinas intracelulares, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PSK) em bactérias são exemplos recentes de agentes inibidores de enzimas fundamentais para a reprodução do microrganismo. Resultados promissores foram obtidos em relação a inibição da atividade da DNA girase, por derivados peptídicos destas duas proteínas. *In vitro*, os valores de concentração inibitória têm sido abaixo de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, porém ensaios *in vivo* não demonstraram reprodutibilidade, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana bacteriana a estes derivados. Desta forma, foram produzidos lipossomas e microemulsões com o objetivo de promover o acesso de moléculas peptídicas sintéticas, derivadas do CcdB e ParE, ao meio intracelular e, conseqüentemente, aos seus alvos: DNA girase ou topoisomerase IV. Lipossomas do tipo SUV (*small unilamellar vesicles*) foram preparados por extrusão a partir de fosfatidilcolina de soja e estearilamina e mostraram uma eficiência de encapsulação de 77% e inibiram o crescimento tanto de bactéria Gram positiva quanto Gram negativa em 58 e 75%, respectivamente. Sistemas microemulsionados a base de fosfatidilcolina de soja, Tween 20, etanol e ácido oléico apresentaram uma incorporação do peptídeo acima de 90% e a formulação com 15% de ácido oléico e CcdBET2 a $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentou uma inibição do crescimento de bactéria Gram negativa de 75,5%. O diâmetro dos lipossomas foi medido por espalhamento dinâmico de luz e as microemulsões foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada e sua viscosidade determinada por reologia. Portanto, lipossomas e microemulsões podem ser utilizados como sistemas de *drug delivery* para análogos peptídicos derivados do CcdB e do ParE.

Palavras-chave: peptídeos, topoisomerases, lipossomas, microemulsões.

ABSTRACT

This work describes the synthesis of peptides derived from bacterial toxins, such as CcdB and ParE, by solid phase peptide synthesis (SPPS) and the production of nanostructured systems such as liposomes and microemulsions. Intracellular toxins produced by systems of killer post-segregational (PSK) in bacteria are recent examples of inhibitors of key enzymes for the reproduction of the microorganism. Promising results were obtained for the inhibition of DNA gyrase activity by peptide derivatives of these proteins. *In vitro*, the IC₁₀₀ values have been below 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, but not demonstrated *in vivo* reproducibility, mainly due to the low permeability of the bacterial cell to these derivatives. Thus, the aim with this work was develop of liposomes and microemulsions to promote access of synthetic peptide molecules derived from the CcdB and ParE, to the intracellular medium and consequently to their targets: DNA gyrase and topoisomerase IV. Liposomes SUV type (small unilamellar vesicles) were prepared by extrusion from soybean phosphatidylcholine and estearilamina and showed an encapsulation efficiency of 77% and inhibited the growth of both Gram positive and Gram negative in 58 and 75% respectively. Microemulsion systems based soybean phosphatidylcholine, Tween 20, ethanol and oleic acid showed an incorporation of the peptide above 90% and the specific formulation with 15% oleic acid and the 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ CcdBET2 incorporate showed a growth inhibition of Gram negative of 75.5%. The diameter of liposomes was measured by dynamic light scattering and microemulsions were characterized by polarized light microscopy and its viscosity determined by rheology. Therefore, liposomes and microemulsions may be used as drug delivery systems for peptide analogues derived from the CcdB and ParE.

Keywords: peptides, topoisomerases, liposomes, microemulsions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo contendo sistema PSK	23
Figura 2	Estrutura primária de CcdB	24
Figura 3	Modelo da estrutura tridimensional da toxina ParE de <i>E. coli</i>	25
Figura 4	Estrutura primária de CcdB e ParE	27
Figura 5	Visualização progressiva de uma resina de Merrifield	29
Figura 6	Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidas	31
Figura 7	Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina	32
Figura 8	Esquema ilustrativo da SPFS	32
Figura 9	Perfis de liberação de fármacos em função do tempo	35
Figura 10	Representação esquemática de lipossomas	36
Figura 11	Metodologia de preparação de lipossomas	37
Figura 12	Estrutura de uma microemulsão	38
Figura 13	Estrutura química do ácido oléico	40
Figura 14	Seqüência idealizada de estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas	41
Figura 15	Estrutura química da fosfatidilcolina de soja	42
Figura 16	Estrutura química da Tween 20 [®]	43
Figura 17	Representação da classificação de Winsor	44
Figura 18	Estrutura primária dos peptídeos sintetizados	54
Figura 19	Cromatogramas obtidos em escala analítica para os análogos peptídicos sintetizados CcdBET1, CcdBET2 e CcdBdp1	69
Figura 20	Cromatogramas obtidos em escala analítica para os análogos peptídicos do ParE: ParEdp1 e ParEdp2	70
Figura 21	Espectros de massas dos análogos de CcdB	70

Figura 22	Espectros de massas dos análogos de ParE	71
Figura 23	Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBET1	71
Figura 24	Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBET2	72
Figura 25	Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBdp1	73
Figura 26	Ensaio de inibição do superenovelamento do DNA por fragmentos de ParE	73
Figura 27	Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBET1	74
Figura 28	Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBET2	75
Figura 29	Ensaio de Inibição do relaxamento do DNA por fragmentos de ParE	76
Figura 30	Lipossoma sem peptídeo encapsulado com diâmetro médio de 169,0 nm	77
Figura 31	Lipossoma com peptídeo encapsulado com aumento de tamanho de 169,0 para 200,9 nm	77
Figura 32	Diagrama de fases mostrando as regiões de sistema opaco emulsionado (EM), sistema transparente gel (STG) e sistema transparente microemulsionado (ME)	79
Figura 33	Incorporação máxima do CcdBET2 nas microemulsões conforme variam as proporções de tensoativos (ST) e de fase oleosa (FO)	82
Figura 34	Fotomicrografias das amostras F1 a F4 (sem peptídeo) e F1p a F4p (com peptídeo) obtidas por microscopia de luz polarizada	83
Figura 35	Reogramas de fluxo (A) e de viscosidade (B) das formulações sem peptídeo	85
Figura 36	Reogramas de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento das formulações com peptídeo	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do meio LB sólido	49
Tabela 2	Composição do meio LB líquido	49
Tabela 3	Padrão de lavagem e desproteção	53
Tabela 4	Classes e componentes específicos utilizados na SPFS e na CLAE	55
Tabela 5	Proporção dos componentes das microemulsões sem peptídeo	62
Tabela 6	Proporção dos componentes das microemulsões com peptídeo	62
Tabela 7	Valores das intensidades médias de fluorescência das soluções de CcdBET2 em metanol	84
Tabela 8	Composição das microemulsões utilizadas para avaliar a incorporação do CcdBET2	85
Tabela 9	Inibição do crescimento bacteriano por lipossoma contendo CcdBET2 a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$	89
Tabela 10	Influência do ácido oléico (AO) na inibição do crescimento bacteriano	90
Tabela 11	Inibição do crescimento bacteriano por microemulsões contendo CcdBET2 a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

Abreviaturas

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
AO	-	Ácido Oléico
Boc	-	<i>t</i> -Butiloxicarbonila
CcdA	-	Antitoxina (<i>control cell division A</i>)
CcdB	-	Toxina (<i>control cell division B</i>)

DCM	-	Diclorometano
DIC	-	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	-	N- diisopropiletilamina
DMF	-	N,N - Dimetilformamida
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
Girase	-	DNA-girase
EDT	-	1, 2-etanoditiol
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetraácetico
EtOH	-	Etanol
Fmoc	-	9- Fluorenilmetiloxicarbonila
FO	-	Fase Oleosa
FS	-	Fosfatidilcolina de Soja
HOBt	-	N-Hidroxibenzotriazol
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LC-MS	-	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MPLC	-	Cromatografia Líquida de Média Eficiência
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NMP	-	N-metilpirrolidona
Pmc	-	2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
RP-HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
SDS	-	Dodecil Sulfato de Sódio
SPFS	-	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
ST	-	Sistema de tensoativos/co-tensoativo
STEB	-	Carregador de DNA - Sacarose, Tris, EDTA e Azul de Bromofenol
TA	-	Sistema Toxina-Antitoxina
TBE	-	Tampão Para Eletroforese Tris/Boro/EDTA
<i>t</i> Bu	-	<i>terc</i> -butila
TFA	-	Ácido Trifluoroacético
TFE	-	Trifluoroetanol
TIS	-	Triisopropilsilano
Topo IV	-	Topoisomerase IV
Tw20	-	Tween 20 [®]

SÍMBOLOS

α	-	Ângulo do cone
η	-	Viscosidade do meio
ω	-	Velocidade angular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
1.1.	Sistemas de morte pós-segregacional (PSK) ou toxina-antitoxina (TA)	22
1.1.1.	As toxinas CcdB e ParE	23
1.2.	DNA topoisomerasas: DNA girase e topoisomerase IV (topo IV)	27
1.3.	Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)	28
1.3.1.	Purificação e caracterização dos peptídeos	33
1.4.	Sistemas <i>drug delivery</i>	33
1.4.1.	Lipossomas	33
1.4.2.	Microemulsões	38
2.	OBJETIVOS	47
3.	MATERIAIS	49
3.1.	Reagentes e solventes	49
3.2.	Material biológico	50
3.3.	Equipamentos	51
4.	MÉTODOS	54
4.1.	Síntese de peptídeos em fase sólida	54
4.2.	Purificação por cromatografia líquida em fase reversa	55
4.3.	Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida	56
4.4.	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase	56
4.5.	Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase IV	57
4.6.	Preparo de lipossomas	57
4.6.1.	Metodologia de preparo	58
4.6.2.	Diâmetro dos lipossomas por Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)	58

4.6.3.	Determinação da encapsulação do CcdBET2 em lipossomas	59
4.7.	Desenvolvimento de microemulsões	59
4.7.1.	Diagrama de fases	60
4.7.2.	Avaliação da incorporação de peptídeo nas microemulsões	60
4.7.2.1.	Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de peptídeo por fluorescência	60
4.7.2.2.	Determinação da incorporação de peptídeo nas microemulsões	61
4.7.3.	Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	62
4.7.4.	Reologia	63
4.8.	Ensaio de inibição de crescimento bacteriano	63
4.8.1.	Ensaio de inibição com lipossomas	63
4.8.2.	Ensaio de inibição com microemulsões	64
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1.	Desenho e síntese das seqüências peptídicas	67
5.2.	Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados	68
5.3.	Ensaio de inibição enzimática	71
5.3.1	Ensaio de inibição da atividade da DNA girase	71
5.3.2	Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV	74
5.4.	Preparo de lipossomas	76
5.4.1.	Diâmetro dos lipossomas por Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)	76
5.4.2.	Determinação da encapsulação do CcdBET2 em lipossomas	78
5.5.	Desenvolvimento de microemulsões	78
5.5.1.	Diagrama de fases	78
5.5.2.	Avaliação da incorporação de peptídeo nas microemulsões	80
5.5.2.1.	Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de	80

peptídeo por fluorescência	
5.5.2.2. Determinação da incorporação de peptídeo nas microemulsões	81
5.5.3. Microscopia de Luz Polarizada	82
5.5.4. Reologia	83
5.6. Ensaio de inibição de crescimento bacteriano	86
5.6.1. Ensaio de inibição com lipossomas	86
5.6.2. Ensaio de inibição com microemulsões	87
6. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	94

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Sistemas toxina-antitoxina (TA)

O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes (de amplo espectro ou mais específicos) constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia. Peptídeos com atividade antimicrobiana são produzidos por plantas, animais (vertebrados e invertebrados) e microrganismos (fungos e bactérias), como mecanismo de auto-proteção e, atualmente, estão sendo utilizados como modelos para o desenho e síntese de novos fármacos com aplicações na área da saúde (TROVATTI et al., 2008). Contrastando com antibióticos secretados no ambiente, as toxinas intracelulares, produzidas pelos sistemas de morte pós-segregacional (PSK) ou sistemas toxina-antitoxina (TA), atuam atacando a célula internamente (HAYES, 2003). Esses sistemas constituem entidades genéticas de plasmídeos que matam seletivamente as células que não os possuem, mediando, dessa forma, a herança estável em bactérias. Células que carregam tais plasmídeos sobrevivem porque eles codificam, além da toxina, um segundo produto que age como um antídoto (JENSEN & GERDES, 1995).

A expressão dos genes TA é auto-regulada em nível transcricional. A antitoxina age como um repressor e a toxina geralmente como um co-repressor, contribuindo assim, com a estabilidade do plasmídeo por um mecanismo denominado morte pós-segregacional. A antitoxina é uma proteína instável degradada por uma protease ATP-dependente, enquanto a toxina é uma proteína estável que inibe o ciclo celular do microrganismo. Essa diferença de estabilidade, e a meia vida das duas proteínas é a chave para a funcionalidade dos sistemas TA (DAO-THI et al., 2000). Após a divisão celular, cada célula filha herda um complexo toxina-antitoxina característico do plasmídeo. Quando uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível (WILBAUX et al., 2007). A degradação da antitoxina levará à liberação da toxina, acarretando, com isso, a morte do microrganismo (Figura 1).

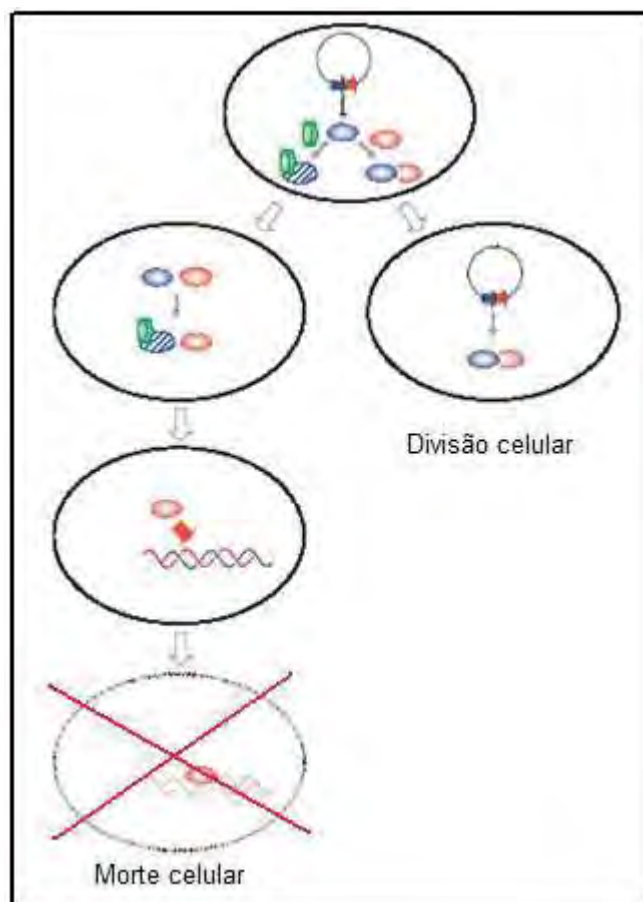


Figura 1. Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo contendo sistema PSK. Em vermelho está a toxina; em azul a antitoxina; em verde, uma protease, que degrada mais rapidamente a antitoxina que a toxina. (HAYES, 2003).

1.1.1. As toxinas CcdB e ParE

As sequências derivadas do CcdB sintetizadas foram projetadas com base na estrutura cristalina de CcdB proposta por Loris e colaboradores (1999). Foram consideradas as regiões de importância significativa na interação com a DNA girase, além da região envolvida na formação de dímeros, bem como um segmento N-terminal da toxina, responsável por apresentar uma estrutura β -sheet (S1).

Segundo Loris e colaboradores (1999), os três resíduos da extremidade C-terminal (W^{99} , G^{100} e I^{101}), desempenham um papel fundamental na formação do complexo CcdB-GyrA. Mutantes identificados com substancial perda de atividade *killer* e, portanto, com menor habilidade de formar um complexo com GyrA, apresentam mutações localizadas nesta região. Além disso, o resíduo W^{99} ,

juntamente com outros doze resíduos da extremidade C-terminal (E⁸⁷ a F⁹⁸), fazem parte da composição da única α -hélice presente na estrutura do CcdB (Figura 2).

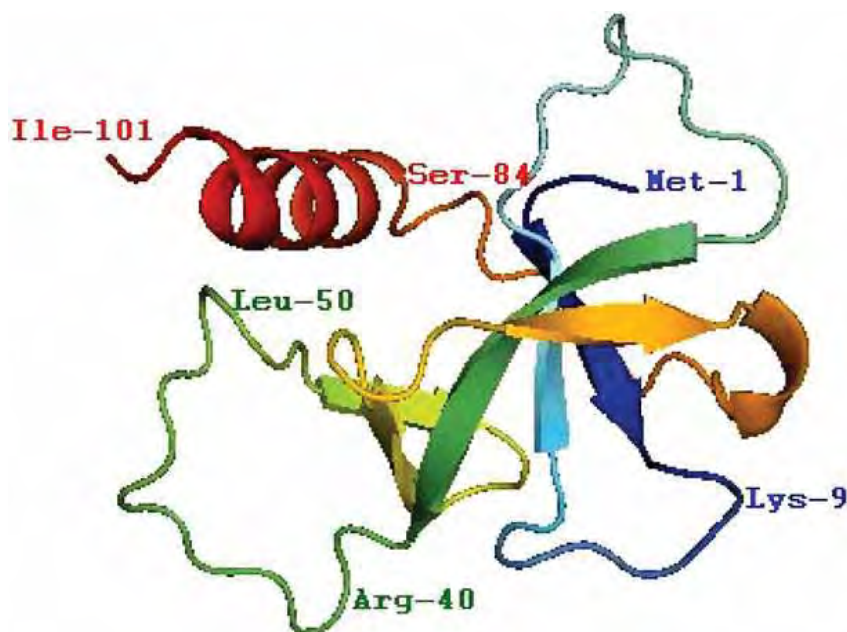


Figura 2. Estrutura do CcdB. Em vermelho está indicado a α -hélice da extremidade C-terminal; em verde, os três segmentos em forma de folha e, em azul, as estruturas β -sheet da extremidade N-terminal. (TROVATTI et al., 2008).

Além da α -hélice e das estruturas β -sheet principais, a molécula de CcdB também apresenta, entre os segmentos S6 e S3a da estrutura β -sheet principal, 3 segmentos menores em forma de folha, as quais se projetam para fora da molécula como uma “asa”. Esta “asa” envolve os resíduos 41-50 que formam um *loop* e permanecem protegidos da ação de proteases, na presença da anti-toxina CcdA. Isso indica que este segmento forma um local de reconhecimento provável para o a antitoxina CcdA (VAN MELDEREN et al., 1996).

O monômero CcdB consiste de cinco principais estruturas antiparalelas denominadas β -sheet. Entre elas, o segmento S6, que é formado pelos resíduos M⁶⁸ a P⁷² e desempenha papel importante na formação da estrutura do dímero de CcdB. A interface do dímero é formada pelos resíduos que compõem o fragmento S6, além dos três resíduos C-terminais da α -hélice. No dímero, o segmento S6 de um monômero interage com o segmento S6 do monômero oposto, de maneira antiparalela. A cadeia lateral do resíduo W⁹⁹ forma uma fraca ligação de hidrogênio

com N⁹⁵, além de contatos hidrofóbicos com K⁹¹, ambos do monômero oposto, estabilizando, assim, o dímero formado.

A toxina ParE de *E. coli* apresenta estrutura tridimensional muito semelhante a estrutura geral da superfamília RelE, caracterizada por um cerne de 4 ou 5 folhas β paralelas uma a outra, exceto a primeira e a última que são anti-paralelas entre si (BARBOSA et al., 2010). As folhas β são flanqueadas em um lado por duas α -hélices N-terminal e por outro lado pela α hélice C-terminal a qual junto com a alça que conecta as folhas β 1 e β 2 (ou α 2 e β 2) forma uma fenda profunda que correspondente ao sítio ativo para atividade RNase característica da grande maioria das toxinas estudadas até o momento nesta superfamília (Figura 3).

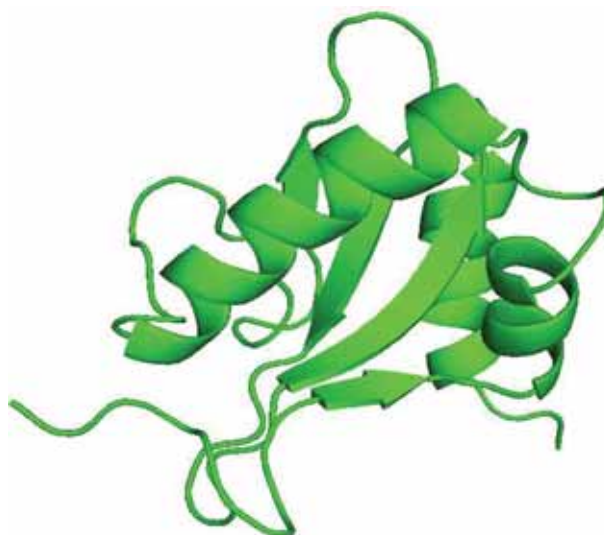


Figura 3. Modelo da estrutura tridimensional da toxina ParE de *E. coli*. Um modelo 3-D foi construído a partir da estrutura primária da toxina ParE de *E. coli* (105 aminoácidos) adotando uma abordagem de modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais (BARBOSA et al., 2010)

Apesar de o modelo gerado por modelagem comparativa possuir uma região com estrutura semelhante à fenda catalítica C-terminal característica da superfamília, nenhum trabalho até o momento mostrou alguma atividade nucleásica de toxinas da família ParE e apenas um trabalho, com abordagem *in vitro*, mostrou que o alvo intracelular desta toxina é a DNA girase (JIANG et al, 2002). Desta forma, apesar de uma origem comum e considerável similaridade, ParE pode ter divergido evolutivamente culminando em uma atividade citotóxica particular. Situação

semelhante ocorre com a toxina CcdB. Dentro de sua superfamília, CcdB é a única toxina cuja atividade citotóxica é a inibição da DNA girase, sendo que todas as outras famílias de toxinas já estudadas atuam na inibição da tradução clivando RNA mensageiro no ribossomo.

Considerando a toxina ParE como um inibidor da replicação, algumas evidências indicam que a região C-terminal desta toxina é também a região de maior probabilidade de ser a envolvida na interação com a DNA girase. As toxinas estudadas até o momento, tanto as com atividade de clivagem de RNA como CcdB com inibição sobre a DNA girase, possuem a região C-terminal como a responsável pela atividade citotóxica. A recente elucidação da primeira e única estrutura cristalográfica de ParE (DALTON e CROSSON, 2010), de *Caulobacter crescentus*, mostra que a antitoxina ParD bloqueia a região C-terminal da toxina ParE. Além disso, um trabalho, também recente, produziu diferentes proteínas ParE recombinantes truncadas na região C-terminal e estas tiveram sua atividade citotóxica muito reduzida ou extinta (FIEBIG et al., 2010).

Diante do exposto, a região C-terminal de ParE de *E. coli* foi considerada como um ponto de partida para o desenho dos peptídeos derivados desta toxina (Figura 16).

Apesar da falta de homologia entre as seqüências de aminoácidos de ParE e da proteína CcdB (Figura 4), extensivamente estudada, há um número de propriedades que essas duas toxinas compartilham. Ambas apresentam-se como dímeros relativamente de baixo peso molecular, em solução (STEYAERT et al., 1993; JOHNSON et al., 1996). Um DNA linear é gerado como produto da inibição da DNA girase por ambos ParE (JIANG et al., 2002) e CcdB (BERNARD e COUTURIER, 1992) após tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS). O mecanismo da atividade tóxica de ambas, CcdB e ParE, envolve a retenção da DNA girase no interior de um complexo denominado “clivável”.

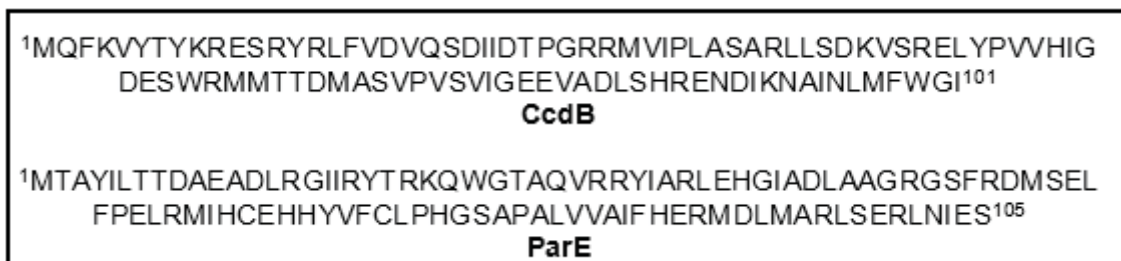


Figura 4. Estrutura primária de CcdB e ParE.

1.2. DNA topoisomerasas: DNA girase e topoisomerase IV (Topo IV)

DNA girase (GELLERT et al., 1976) e Topoisomerase IV (Topo IV) (KATO et al., 1990), são enzimas classificadas como DNA topoisomerasas, cujo primeiro membro foi descoberto em *E. coli* por James Wang em 1971. As DNA topoisomerasas estão presentes em todas as células (tanto procariótica quanto eucariótica), apresentando funções essenciais à viabilidade dos microrganismos, sendo responsáveis por catalisar, no DNA, mudanças topológicas essenciais ao metabolismo genético. DNA girase e Topoisomerase IV são exemplos de topoisomerasas do tipo II, que compartilham significativa similaridade na seqüência de aminoácidos e apresentam essencialmente o mesmo mecanismo de catálise. Elas agem formando uma quebra nas duas fitas do DNA e catalisando a passagem do DNA duplex, antes de religá-las. A DNA girase é a única capaz de introduzir superhélices negativas no DNA (GELLERT et al., 1976; REECE e MAXWELL, 1991). Em contraste, a Topo IV tem a habilidade de relaxar superhélices negativas e positivas do DNA (CRISONA et al., 2000).

DNA girase e Topo IV são constituídas por duas subunidades. As subunidades da DNA girase são denominadas GyrA e GyrB e as correspondentes subunidade da Topo IV, ParC e ParE. Para cada enzima, essas subunidades combinam-se para formar um complexo heterotetramérico (DNA girase GyrA₂GyrB₂ ou A₂B₂ e Topo IV ParC₂ParE₂ ou C₂E₂). Esse complexo é a forma funcional das enzimas. A subunidade ParE e a correspondente subunidade GyrB da DNA girase contém o sítio de hidrólise do ATP no domínio N-terminal e um domínio C-terminal envolvido com a interação com a outra subunidade (ParC ou GyrA, respectivamente) e o DNA. As subunidades GyrA e ParC compreendem um domínio N-terminal (64

kDa) envolvido na clivagem/religação do DNA e um domínio C-terminal que envolve a molécula de DNA (33 kDa).

Tem sido demonstrado que o alvo da toxina CcdB é a subunidade A da DNA girase (BERNARD e COUTURIER, 1992). Já no caso de ParE, não se sabe ao certo qual das subunidades da DNA girase lhe serve de alvo, tampouco do seu mecanismo de ação. Por outro lado, a escassez de dados relacionados a inibidores específicos para a ação da Topo IV, particularmente em relação ao efeito das toxinas CcdB e ParE, além do fato de que os inibidores conhecidos para DNA girase somente fazem efeito na inibição de Topo IV em concentrações muito superiores às convencionais (HASHIMI et al., 2007), levou-nos a considerar esta enzima como foco de pesquisa.

Neste sentido, fragmentos peptídicos específicos, derivados do CcdB (TROVATTI et al., 2008) e de ParE, foram sintetizados e empregados em estudos estruturais e de interação envolvendo análogos da DNA girase e Topo IV. Resultados promissores têm sido obtidos em termos de inibição da atividade destas enzimas. *In vitro*, os valores de concentração para inibição total (IC_{100}) foram bastante satisfatórios, porém ensaios *in vivo* não têm sido reprodutíveis, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana a estes miméticos.

1.3. Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)

A SPFS se fundamenta na formação de polipeptídios através da reação entre um grupo carboxila ativado de um aminoácido com o grupo amina de outro aminoácido, levando a formação de uma amida. O crescimento da cadeia polipeptídica ocorre em um suporte sólido polimérico, o que caracteriza a síntese em fase sólida.

O grupo carboxílico C-terminal do peptídeo encontra-se unido covalentemente ao polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese (MERRIFIELD, 1985). Assim, o excesso de reagentes e uma grande maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por simples filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Este fato influencia favoravelmente para que se possam utilizar grandes excessos de reagentes, conseguindo em muitas etapas, rendimentos elevados. As vantagens

adicionais são que se minimizam as perdas por manipulação e que todo processo sintético pode ser automatizado. A metodologia da fase sólida em sua estratégia seqüencial e atualmente a mais utilizada para a síntese de peptídeos que contem até 60 resíduos de aminoácidos. Para a síntese de seqüências maiores, costuma-se empregar a estratégia convergente (ALBERICIO et al.,1997). Nesta estratégia, o que se faz é a união de dois fragmentos de peptídeos de tamanhos variados, seja totalmente em fase sólida ou em solução, ou mediante uma combinação de ambas: síntese dos peptídeos protegidos em fase sólida e posterior acoplamento dos mesmos em solução.

Os polímeros utilizados na SPFS apresentam-se como partículas de tamanho e forma adequados a manipulação e filtração (Figura 5). Como propriedade característica, estes polímeros possuem um alto grau de solvatação em solvente apolar, permitindo a entrada de reagentes através das partículas, certificando a acessibilidade de sítios reativos aos reagentes. Possuem grupos funcionais passíveis de sofrerem modificações químicas para permitir que o primeiro aminoácido possa ser prontamente atacado e ocorra entre ambos, a formação de uma ligação covalente.

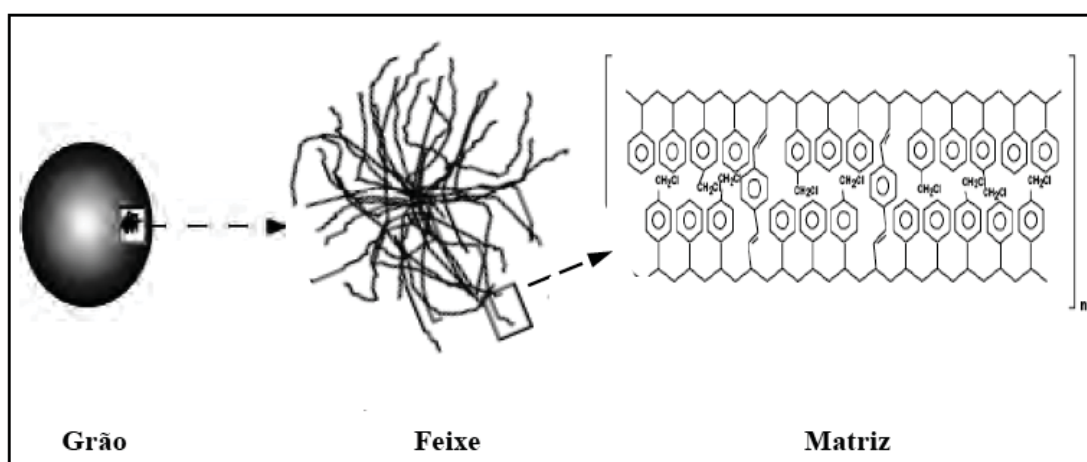


Figura 5. Visualização progressiva de uma resina de Merrifield a partir de uma unidade macroscópica e as cadeias poliméricas que a compõem (GARRIDO, S. S., 2007).

Como citado anteriormente, para que o processo de síntese desenvolva-se de maneira dirigida, é necessária a proteção adequada dos grupos funcionais que não estão diretamente envolvidos na reação de formação da ligação peptídica (ou amida). A reação de formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos é denominada condensação. Por serem removidos a cada acoplamento, os protetores

das funções amina são ditos protetores temporários, enquanto os protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais, que devem permanecer até o final da síntese, são ditos permanentes.

As duas principais estratégias de SPFS baseiam-se na proteção temporária do grupamento α -amínico dos aminoácidos, *t*-Boc ou Fmoc, os quais se diferenciam, principalmente, quanto à estabilidade em meio ácido ou básico. O grupamento protetor *tert*-butiloxicarbonila (*t*-Boc) é eliminado mediante acidólise com ácidos de força moderada (TFA 30% em DCM), o que implica na utilização de protetores permanentes estáveis nestas condições. Protetores tipo benzila (Bzl) são bastante utilizados para esta função, os quais requerem para sua eliminação, o emprego de ácidos fortes como o ácido fluorídrico anidro. Neste caso, em seguida ao tratamento ácido, deve-se realizar uma neutralização (normalmente com DIEA 5% em DCM) para que a função amina fique em sua forma desprotonada.

O grupamento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) é eliminado com bases de força moderada (geralmente piperidina 20% em DMF), permitindo a utilização de protetores baseados no grupo *tert*-butila (tBu), lábeis ao TFA. Os aminoácidos trifuncionais necessitam de proteção para suas cadeias laterais por serem também reativas, enquanto para os demais, a decisão de tê-las protegidas depende da estratégia a ser empregada e do tamanho do peptídeo a ser sintetizado.

Durante a síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes, é necessário que o componente eletrófilo (C carbonílico do ácido) esteja ativado, pois caso contrário, seria formado um sal de amônio. Esta ativação do ácido carboxílico, que é a base da formação da ligação peptídica, tem sido uma das etapas da síntese de peptídeos que mais evoluiu nos últimos anos, justamente pelo interesse em obter bons rendimentos na formação da ligação peptídica, mantendo a integridade da cadeia em crescimento, em particular do centro estereogênico em α do grupo carboxílico ativado. Desta forma, ele pode sofrer ataque pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado a resina e, assim, formar a ligação amida.

Os chamados reagentes de acoplamento têm a função de reagir com o grupo carboxila livre de um aminoácido e gerar espécies reativas. Os mais comumente empregados são as carbodiimidias. O mecanismo envolve a formação da orto-acilisouréia, a qual sofre aminólise por parte da amina, para produzir a ligação amida. Se for empregado um segundo equivalente de ácido carboxílico, será

formado o anidrido simétrico. Do mesmo modo, na presença de hidroxilaminas, por exemplo, N-hidroxibenzotriazol (HOBt) ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt), será obtido um éster ativo. Qualquer uma das três espécies reativas, orto-acilisouréia, anidrido simétrico ou éster ativo são bons agentes acilantes (Figura 6).

O processo de acoplamento dos aminoácidos é monitorado através do teste de ninidrina ou teste de Kaiser (KAISER et.al., 1970). A ninidrina reage com aminas primárias levando a formação de um produto de coloração púrpura. Desta forma, após acoplamento de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de aminas livres, pois o grupamento amina apresenta-se protegido e, após desproteção do grupamento amina, deve apresentar coloração púrpura (Figura 7).

Ao final da síntese, os grupos protetores temporários e permanentes devem ser removidos e o peptídeo deve ser clivado da resina. Na síntese *t*-Boc isto é feito através do tratamento com um ácido forte, como o ácido fluorídrico anidro e na síntese Fmoc, através de tratamento com ácido de força moderada, como o ácido trifluoroacético.

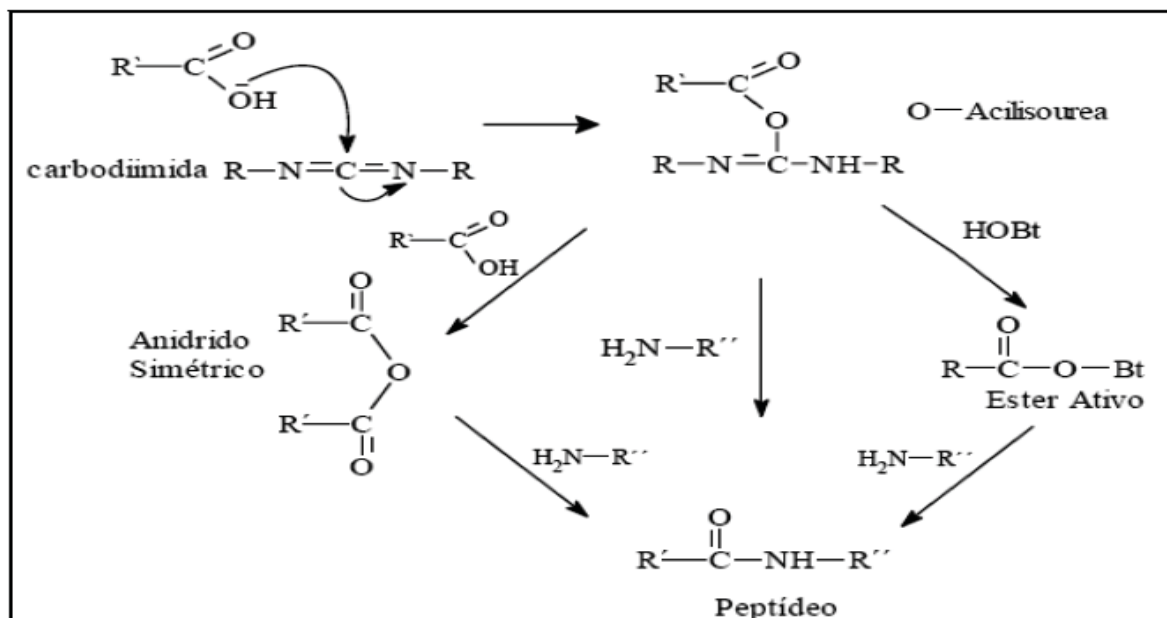


Figura 6. Mecanismo de formação de ligação peptídica empregando carbodiimidas (GARRIDO, S. S., 2007).

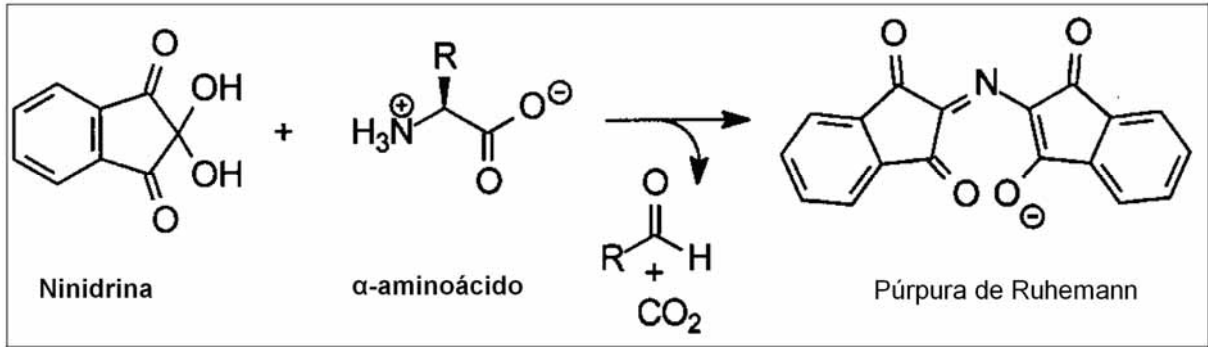


Figura 7. Esquema da reação envolvida durante o teste de ninidrina.

Um esquema geral da SPFS utilizando a estratégia Fmoc está representado na Figura 8. Vale ressaltar que a SPFS destaca-se em relação à síntese enzimática e a síntese via DNA recombinante pela facilidade de purificação do produto e também por ser uma técnica muito eficiente na obtenção de peptídeos com até 60 resíduos de aminoácidos, principalmente quando estes contêm modificações químicas: fosforilação, sulfatação, acetilação ou ciclização.

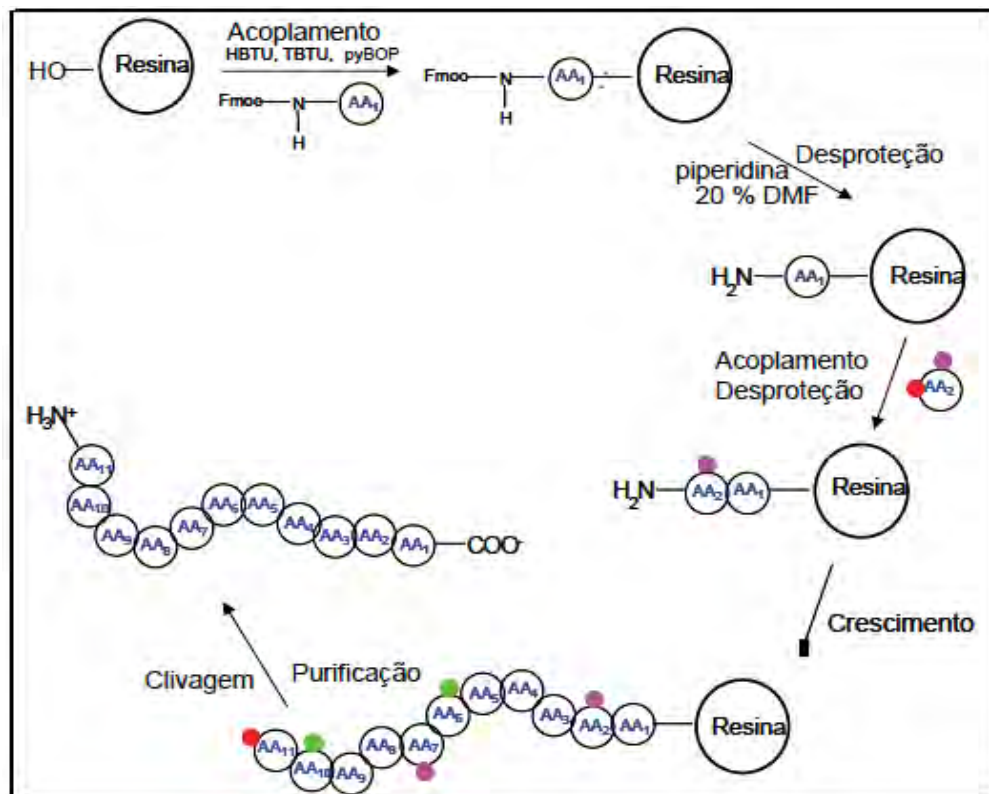


Figura 8. Esquema ilustrativo da SPFS. Os círculos verdes ou lilases representam as diferentes cadeias laterais reativas dos aminoácidos (AA), com seus respectivos protetores. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina (GARRIDO, S. S., 2007).

1.3.1. Purificação e caracterização dos peptídeos

Para uso clínico, consumo alimentar, realização de testes biológicos e estudos estruturais ou que explorem a relação estrutura-atividade, são requeridos peptídeos com purezas iguais ou superiores a 95%. Independentemente do método de síntese empregado, os peptídeos são invariavelmente obtidos em sua forma bruta, isto é, apresentando uma série de contaminantes peptídicos indesejados, gerados durante o próprio procedimento sintético. Assim, tornou-se muito comum combinar técnicas cromatográficas de baixa, média e alta resolução para obter peptídeos sintéticos com grau de pureza ideal (MACHADO et al., 2004).

As cromatografias líquidas de fase reversa, troca iônica, exclusão por tamanho e de afinidade são as técnicas mais utilizadas na purificação e caracterização dos produtos brutos obtidos a partir da síntese química ou enzimática. Nas últimas décadas, a cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) tornou-se a técnica de maior destaque para este tipo de procedimento.

A RP-HPLC baseia-se na adsorção dos peptídeos sintéticos a uma matriz estacionária hidrofóbica [sílica derivatizada pela introdução de cadeias alquílicas, tais como *n*-butila (C4), *n*-octila (C8), *n*-octadecila (C18), fenila, ciclohexila e outros], bem como na partição destes solutos entre esta matriz e a fase móvel. A fase móvel geralmente empregada é ácida e com baixa força iônica. São utilizados gradientes de dois eluentes, sendo geralmente um deles a água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA), e o outro, acetonitrila (ACN). Para a detecção em UV recomenda-se o uso dos comprimentos de onda de 220 ou 280 nm (MACHADO et al., 2004).

É importante ressaltar que o monitoramento da purificação pode ser obtido via RP-HPLC acoplada à espectrometria de massas com ionização por “electrospray” (LC/ESI-MS). Neste caso, determina-se simultaneamente a qualidade e a identidade das diferentes frações a serem analisadas (CAVALIER et al., 1998).

1.4. Sistemas *drug delivery*

1.4.1. Lipossomas

A tecnologia de liberação de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros sistemas de liberação convencional. De fato, os trabalhos aplicados a este tipo de sistema de liberação modificada de fármacos fornecem inúmeras evidências para o que segue:

- i. Maior eficácia terapêutica, devido a liberação ocorrer de acordo com as necessidades clínicas e farmacocinéticas do fármaco;
- ii. Natureza e composição variada dos veículos e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- iii. Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- iv. Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- v. Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas;

Estas novas estratégias para a veiculação incluem aplicações importantes da ciência de colóides, nas suas mais variadas formas (emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas). O empenho por parte de pesquisadores do mundo todo se justifica, pois sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, drágeas) a concentração do fármaco na corrente sangüínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina, quando a solubilidade não for fator limitante. Desde que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima da dose tóxica.

O objetivo principal dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco na faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única administração. A diferença de concentração plasmática efetiva em

função do tempo entre sistemas convencionais e sistemas de liberação controlada, pode ser mais bem visualizada na Figura 9.

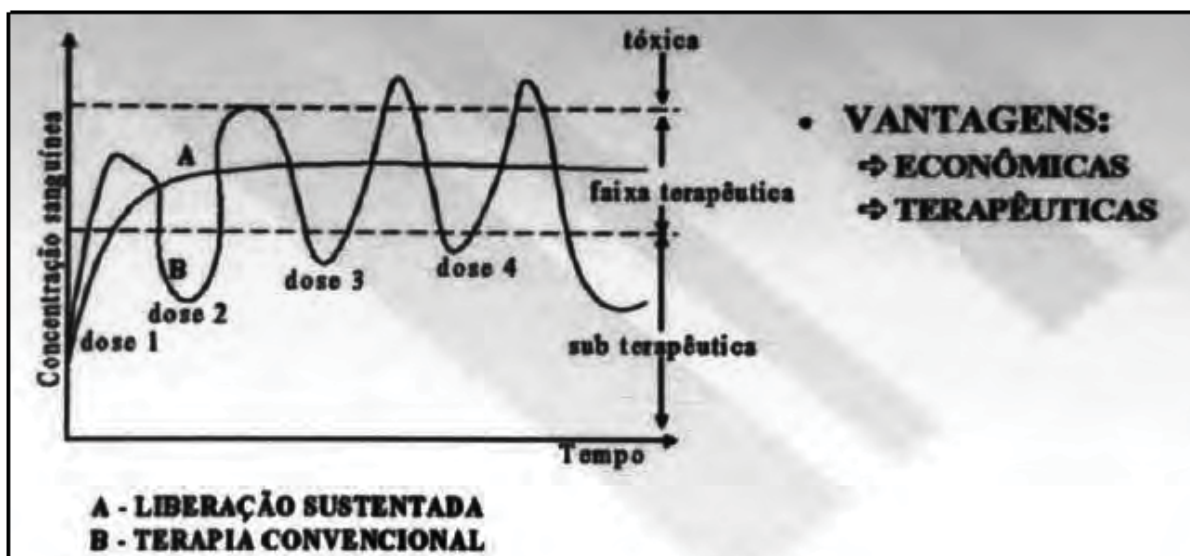


Figura 9. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional vs. Controlada (GARRIDO, S. S., 2007).

As primeiras tentativas para obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos (CHANG, 1964). No entanto, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto que estas vesículas produzidas a partir de material artificial se acumulavam no organismo.

O primeiro grande passo nesta área ocorreu em 1965, com o trabalho desenvolvido por Alec Bangham e colaboradores, onde foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas as quais, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas.

Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez, a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área (GREGORIADIS et al., 1971). Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios 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 lipídios 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. A partir da década de 80, foi adotada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho. Assim, para os lipossomas de preparação mais imediata, ficou consagrado o nome de vesículas multilamelares ou MLV (*multilamellar vesicles*). Como o nome indica, estas vesículas são constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, podendo o seu diâmetro variar entre 400 e 3500 nm. Dentre os lipossomas, os mais utilizados são as vesículas unilamelares grandes ou LUV (*large unilamellar vesicles*), de diâmetro superior a 200 nm, bem como as vesículas unilamelares pequenas ou SUV (*small unilamellar vesicles*), com diâmetros entre 20 e 200 nm.

Existem ainda as vesículas unilamelares gigantes ou GUV (*giant unilamellar vesicles*), com dimensões superiores a 1 μm , podendo chegar a dezenas de micrômetros, tamanho comparável ao de uma célula de eucarioto, e as vesículas unilamelares médias ou MUV (*medium-sized unilamellar vesicles*), com dimensões compreendidas entre os SUV e os LUV (LICHTENBERG & BARENHOLZ, 1988). De menor importância, mas também caracterizados, encontram-se os lipossomas multivesiculares ou MVL (*multivesicular liposomes*) e as vesículas oligolamelares ou OLV (*oligolamellar vesicles*) que, a semelhança das unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes ou gigantes (SOV, LOV e GOV). A Figura 10 representa de maneira esquemática os vários tipos de lipossomas.

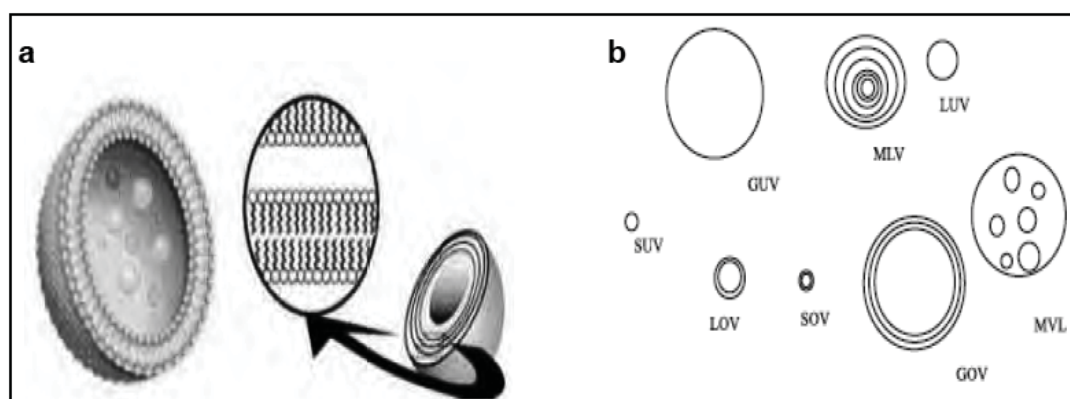


Figura 10. Representação esquemática de lipossomas. Em (a) modelo de lipossomas unilamelar e multilamelar. Em (b) mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa.

A larga aceitação da utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos preparativos eficientes, reproduzíveis e com a simplicidade possível para aplicação em escala laboratorial e industrial.

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, a composição química, número de camadas, distribuição de tamanhos, número de lamelas e o volume encapsulado influenciam consideravelmente na aplicação dos lipossomas. Um esquema geral de preparação de lipossomas está representado na Figura 11.

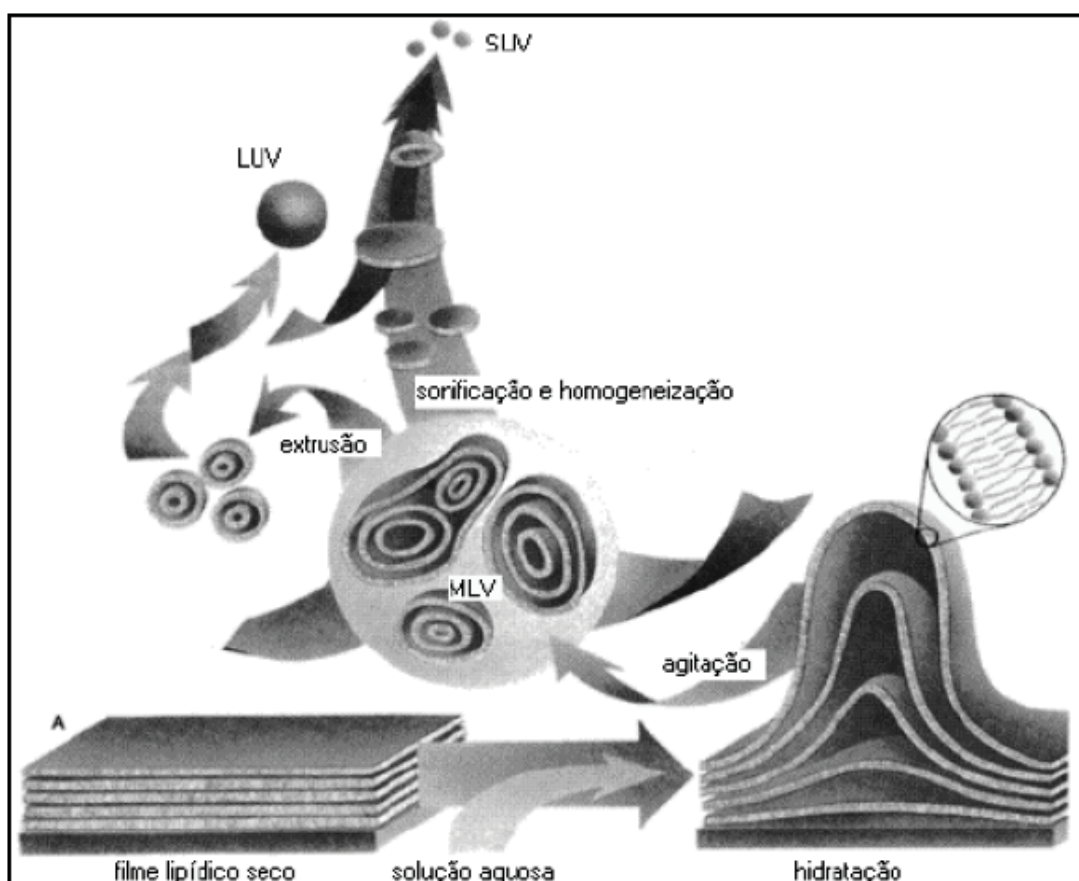


Figura 11. Metodologia de preparação de lipossomas tipo vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV).

De um modo geral, a preparação de vesículas lipídicas é realizada através da dissolução da fase lipídica em um solvente orgânico, evaporando-se em seguida este solvente para a formação de um fino filme lipídico. Posteriormente ocorre a hidratação do lipídio com uma fase aquosa. Nesta etapa, ocorre a formação de vesículas multilamelares grandes. Na maioria dos sistemas, um processamento secundário como extrusão ou sonicação é necessário para a obtenção de um produto final com tamanho de partícula menor e bem definido. Neste trabalho, optou-se pela utilização de lipossomas como estratégia para estabilizar de peptídeos em meio de cultura e para torná-los, com isso, permeáveis à célula bacteriana.

1.4.2. Microemulsões

Microemulsões (MEs) podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável, Figura 12 (OLIVEIRA et al, 2004).

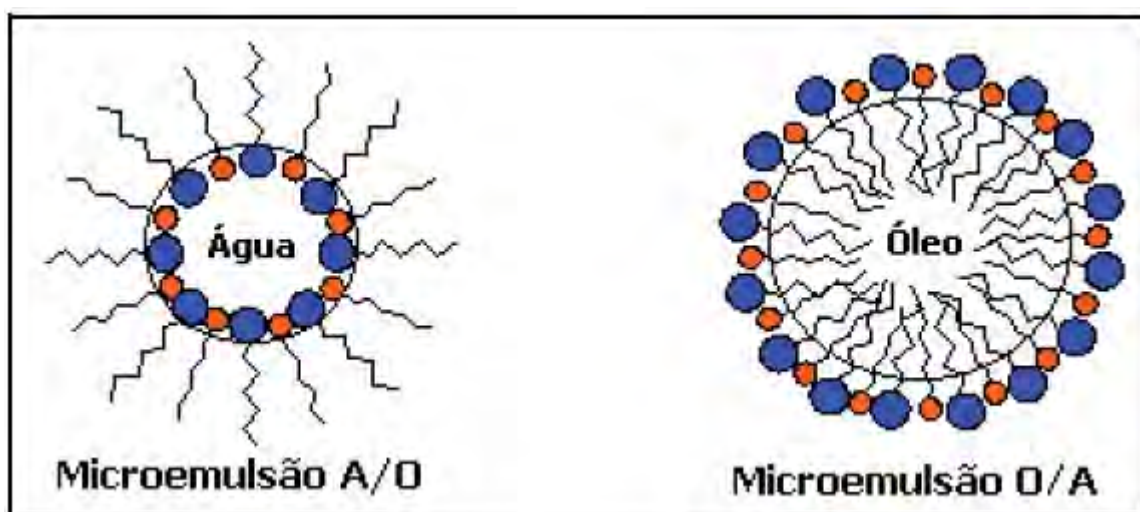


Figura 12. Estrutura de uma microemulsão (MOLLET et al., 2001).

Na prática, as diferenças importantes entre microemulsões e emulsões (EM) é que estas são opacas enquanto microemulsões são transparentes ou semitransparentes (LAWRENCE et al., 2000). A literatura denomina sistemas semitransparentes de miniemulsões ou subemulsões como sendo emulsões com tamanho de gotículas em escala nanométrica (20 a 200nm) finamente dispersas com longo tempo de estabilidade contra sedimentação quando comparado à emulsões. Podem ser chamadas de emulsões ultrafinas ou emulsões submicrônicas.

As duas questões fundamentais quando se trata de microemulsões são as relacionadas aos seus prováveis mecanismos de formação e sua estabilidade termodinâmica em comparação a emulsões convencionais (ou macroemulsão). Uma macroemulsão coalesce e chega a se separar em fases aquosa e oleosa devido à sua falta de estabilidade termodinâmica. Apesar disso, as emulsões podem exibir estabilidade em longo prazo, para algumas finalidades, sendo este comportamento referido como estabilidade cinética. Isso ocorre porque o sistema apresenta uma alta

barreira de energia para a coalescência entre as gotículas. A estabilização de microemulsões requer baixa solubilidade de tensoativo nas fases aquosa e oleosa, resultando na adsorção do tensoativo na interface óleo-água para provocar abaixamento da tensão interfacial.

As microemulsões são sistemas reservatórios, nos quais a fase interna constitui um microambiente de dimensões restritas, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades. A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos componentes da fórmula. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizada por tempo muito mais amplo (OLIVEIRA et al., 2004).

Medicamentos desenvolvidos no campo das microemulsões têm permitido a ampliação das possibilidades terapêuticas de fármacos potencialmente tóxicos como quimioterápicos antineoplásicos, com a conseqüente redução dos efeitos tóxicos severos desses fármacos (OLIVEIRA et al., 2004).

As microemulsões permitem administração por vias diversas como parenteral, ocular, percutânea, pulmonar, intravaginal e oral e freqüentemente apresentam grande capacidade solvente para fármacos, tornando-as formulações mais atrativas na área farmacêutica além de oferecerem vários benefícios para administração oral, incluindo aumento na absorção, maior potência terapêutica e redução da toxicidade. Microemulsões foram propostas para a liberação oral de fármacos, tais como esteróides, hormônios, diuréticos, antibióticos e peptídeos.

Ácidos graxos saturados e insaturados têm sido utilizados como fase oleosa na preparação de microemulsões com o intuito de promover aumento da permeabilidade de fármacos em administrações tópicas. Nesses sistemas, os tensoativos utilizados como agentes de permeabilidade são de natureza anfifílica como é o caso dos fosfolipídios fosfatidilcolina de ovo e de soja. Outros tensoativos como o Tween 20, o Tween 80 e o Span 20 também podem ser utilizados para a mesma finalidade. Os alcoóis de cadeia pequena como o etanol e os de cadeia média como o butanol podem ser utilizados como co-tensoativos para também aumentar a permeabilidade.

Os ácidos graxos saturados e insaturados podem ser utilizados como promotores de permeação para uma variedade de fármacos como naloxona,

hidrocortisona, estradiol e peptídeos como o LHRH e o CCK-8 (HADGRAFT, 2001). Aungst e colaboradores (1986) indicam como agentes de permeação os compostos de cadeia alquila saturada com 10 a 12 carbonos e o ácido oléico (Figura 13) como o composto mais apropriado insaturado para aumentar a permeabilidade.

Uma explicação para a atuação do ácido oléico é que a configuração cis da insaturação da molécula perturba a estrutura lipídica da membrana mais do que os compostos com configuração trans. O ácido oléico entra na bicamada lipídica da membrana e acaba por formar domínios separados em seu interior, criando com isso, vias de acesso para os fármacos (TANOJO et al, 1997).

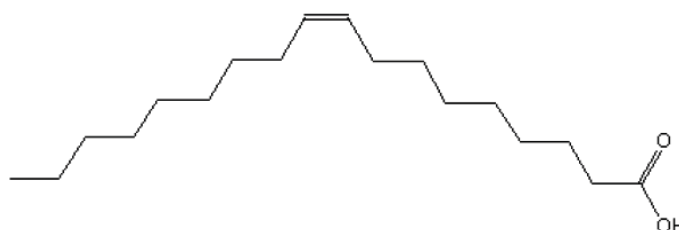


Figura 13. Estrutura química do ácido oléico.

Em relação à preparação de microemulsões é necessário conhecer as características dos tensoativos utilizados, assim como suas propriedades e avaliar quais tensoativos são mais adequados para determinadas aplicações (CONSTANTINIDES, 1995). O tensoativo pode ser puro, uma mistura ou uma combinação com outros componentes, cuja função é a estabilização da microemulsão através da redução da tensão interfacial (CRUZ et al., 2001).

Tensoativos podem associar-se na presença de excesso de água produzindo vários tipos de agregados supramoleculares tais como microemulsões O/A, A/O, estruturas bicontínuas onde a quantidade de água e óleo é praticamente igual, e estruturas lamelares, onde existe grande quantidade de tensoativos (Figura 12). As microemulsões O/A ou A/O podem ser invertidas variando as condições de emulsificação. As estruturas bicontínuas se formam provavelmente nesse processo de inversão de fases (LAWRENCE et al., 2000). A relação entre o comportamento de fase de uma mistura e sua composição pode ser observada com a construção de um diagrama de fases, que compreende óleo; água e tensoativo e no caso de microemulsões, um co-tensoativo, no qual cada ápice representa 100% de cada componente em particular.

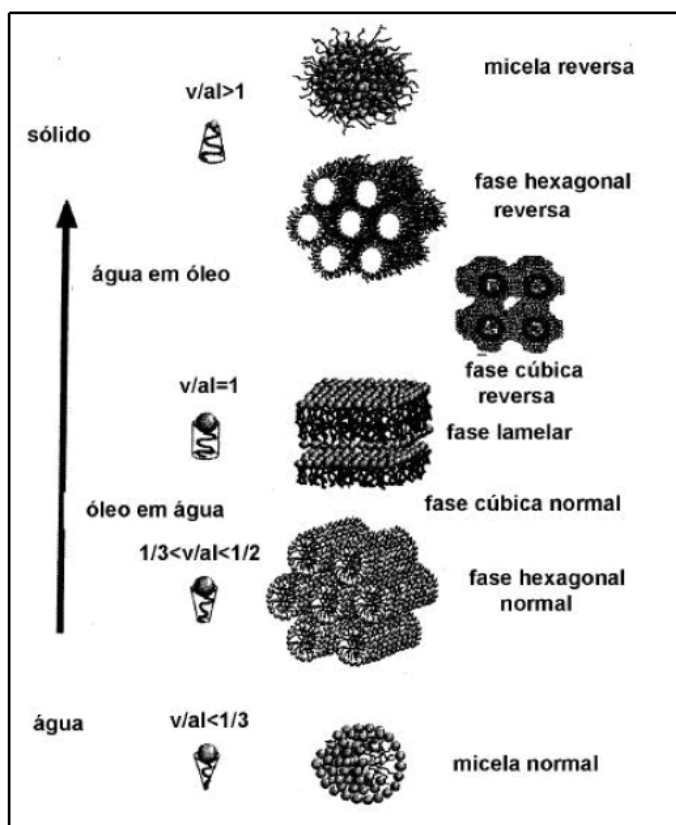


Figura 14. Seqüência idealizada de estruturas líquido-cristalinas, micelares e microemulsionadas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento (ditado pela geometria da molécula), teor de água e temperatura, em que v/al é o fator de empacotamento.

Aquecimento e sonicação são freqüentemente utilizados, particularmente em sistemas contendo tensoativos não-iônicos, para acelerar o processo de formação de microemulsões.

Os fosfolipídios como a fosfatidilcolina de soja são muito utilizados. A fosfatidilcolina de soja (Figura 15) é um tensoativo que possui grande biocompatibilidade, independente da via de administração, e não apresenta problemas com toxicidade, sendo bastante utilizada para medicamentos via oral. É um tensoativo natural, e devido a esta característica é rapidamente difundida na interface óleo-água. E microemulsões compostas de fosfolipídio tem mostrado melhorar as lesões gástricas induzidas por fármacos antiinflamatórios não esteroidais (CRUZ et al., 2001).

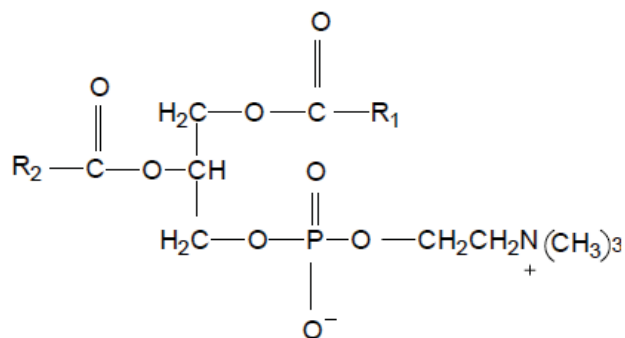


Figura 15. Estrutura química da fosfatidilcolina de soja. R1 e R2 são ácidos graxos idênticos ou diferentes.

Sua categoria funcional é emoliente, agente emulsificante e agente solubilizante. A fosfatidilcolina de soja apresenta cadeia fortemente hidrofóbica em sua composição, devido às duas cadeias de hidrocarbonetos e apresenta também características hidrofílicas devido à cabeça de grupos zwitteriônicos polares, os quais têm momentos dipolo. A fosfatidilcolina de soja é muito lipofílica para formar espontaneamente a camada lipídica de tensão interfacial suficientemente necessária para a formação de microemulsões. Um co-tensoativo, neste caso, é necessário para a formação de sistemas microemulsionados (PARK et al., 1999).

Nos últimos anos, além dos fosfolípidios, polímeros anfifílicos têm sido muito utilizados como tensoativos. São moléculas grandes que podem ser combinadas covalentemente ou não com fármacos para vencer problemas como a baixa solubilidade e estabilidade. São aplicados para direcionar fármacos para sítios específicos no corpo, e ainda são ideais para desenvolver sistemas que permitam liberação sustentada e controlada do fármaco para o sítio de ação. Possuem ainda a capacidade de interagir ou modificar a atividade de vários sistemas endógenos transportadores de fármacos afetando então sua liberação.

Entre eles, são muito comuns os polissorbitatos ou ésteres etoxilados do sorbitano como o Tween 80[®] e o Tween 20[®] (Figura 16), que podem ser empregados para acelerar a permeação de hidrocortisona, lidocaína e 5-flourouracil (KOGAN e GARTI, 2006).

Resultados recentes mostram que o Tween 20[®] aumenta a permeabilidade, permitindo que uma molécula polar de um fármaco passe para o outro lado mais facilmente. E experimentos já realizados mostraram que a formação de micelas em

meio aquoso, a partir do emprego de Tween 20[®], favoreceram a permeação de compostos hidrofílicos (FANG et al, 2001).

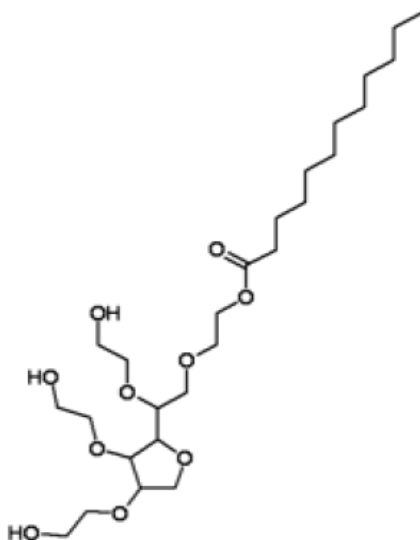


Figura 16. Estrutura química da Tween 20[®].

Para aumentar o domínio de existência da região de microemulsão, um quarto componente que atua como co-solvente (ou co-tensoativo) para ambos, água e óleo é freqüentemente adicionado. Geralmente co-solventes hidrofílicos são mais indicados para produzir uma grande região isotrópica e opticamente clara (TROTTA et al., 1999). Atualmente, a incorporação de co-tensoativos se justifica pelo expressivo aumento da extensão da região isotrópica da solução, especialmente naquelas em que se tem tensoativos iônicos. Uma possível explicação para isso é que o co-tensoativo interage com a cauda apolar do tensoativo, possibilitando a formação de uma curvatura adequada da interface que separa a fase oleosa da fase aquosa. Essa curvatura se dá pela fluidez interfacial por penetrar no filme do tensoativo e ocupar lacunas existentes entre suas moléculas. Além de aumentar a extensão da região de microemulsão, a quantidade e tamanho do co-tensoativo apresenta influência significativa na estrutura da microemulsão. A adição de um co-tensoativo apropriado pode causar um maior abaixamento da tensão interfacial, podendo conduzir a valores transientes negativos, no qual a interface se expande para formar gotículas dispersas, e subseqüentemente adsorver mais tensoativo e co-tensoativo até um ponto em que a tensão interfacial se torna positiva outra vez. Este processo, denominado emulsificação espontânea, forma as microemulsões.

Os alcoóis de cadeia curta são amplamente utilizados como agentes promotores de permeação e podem ser classificados como co-tensoativos. É muito comum a aplicação de etanol em formulações transdérmicas e esta adição aumenta a entrada de muitos fármacos como o estradiol e diclofenaco ionizado. Vários mecanismos foram sugeridos para explicar o aumento da permeabilidade promovida pelo o etanol: há aumento da solubilidade do fármaco no veículo e isso altera a estrutura da membrana plasmática, o que resulta em aumento da permeabilidade ao fármaco (KOGAN e GARTI, 2006).

No que se refere à classificação dos vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa foram estabelecidos quatro tipos de sistemas (WINSOR, 1948):

1) *Winsor I* - É representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da emulsão, a fase oleosa posiciona-se acima da emulsão;

2) *Winsor II* - Representa o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da fase aquosa, a emulsão posiciona-se na parte superior à fase aquosa;

3) *Winsor III* - Existem três fases em equilíbrio, óleo, emulsão e água, em que o óleo é a fase superior, a emulsão a fase intermediária e a água, a fase inferior;

4) *Winsor IV* - É um sistema em que apenas existe a fase microemulsão, isto é, um sistema visualmente monofásico. A Figura 15 mostra detalhes do sistema de Winsor.

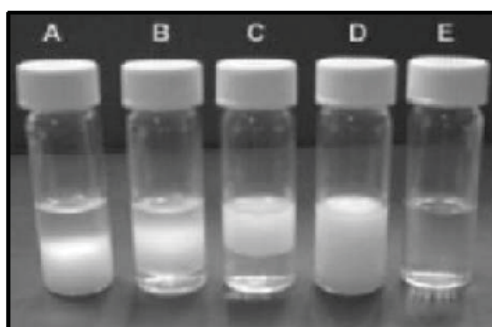


Figura 17. Representação da classificação de Winsor. A) Winsor I. B) Winsor III. C) Winsor II. D) Emulsão homogênea. E) Winsor IV.

A caracterização da microestrutura desses sistemas, ao contrário da facilidade de sua preparação, requer a aplicação de técnicas sofisticadas de análise,

diferentes das utilizadas rotineiramente (LAWRENCE e REES, 2000). Algumas propriedades físicas são de obtenção relativamente simples, em que se utilizam medidas de densidade, viscosidade, espalhamento de luz, índice de refração, condutividade e tensão superficial. Entretanto, para caracterização da natureza isotrópica, são utilizadas técnicas de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), ressonância magnética nuclear (RMN), dispersão dinâmica, estática e eletroforética da luz, difração de raios-X, microscopia eletrônica de criofratura, difração de nêutrons, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica, técnicas nem sempre disponíveis com facilidade (CUNHA-JÚNIOR et al., 2003; FORMARIZ et al., 2005).

2. *Objetivos*

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de liberação a fim de verificar a ação de peptídeos sintéticos como inibidores de crescimento bacteriano. De maneira específica, objetivou-se:

1. Projetar e sintetizar novos análogos peptídicos das toxinas bacterianas CcdB e ParE;
2. Avaliar os peptídeos sintetizados quanto à capacidade de interação e inibição da atividade da DNA girase e Topoisomerase IV bacteriana;
3. Incorporar peptídeos em lipossomas por extrusão;
4. Desenvolver um novo sistema de encapsulação microemulsionado para peptídeos sintéticos;
5. Estudar a atividade de inibição de crescimento microbiano por estes análogos, empregando os sistemas de encapsulamento desenvolvidos;

3. Materials

3. Materiais

3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados durante a síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos estão relacionados abaixo:

- Resinas (suporte polimérico): Fmoc-Ile-Wang e Rink amida AM, com grau de substituição inicial de 0,40 mmol/g e 0,68 mmol/g, respectivamente, ambas 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 da Advanced Chem Tech[®].
- 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 Mallinchröd[®] e água ultrapura, obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.
- 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[®], Mallinchröd[®], Baker[®] e Fluka[®].
- Insumos para preparação de lipossomas: fosfatidilcolina de soja, esterilamina e clorofórmio; todos adquiridos da Sigma[®].

- Insumos para preparação de microemulsões: fosfatidilcolina de soja, Tween 20, etanol PA e ácido oléico, também comprados da Sigma®.

3.2. Material biológico

As enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, foram adquiridas comercialmente da *Inspiralis Ltd. Norwick, UK*, e foram fornecidas 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 1,2 mmol.L⁻¹; espermidina 1,8 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 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mM; glicerol 40% (v/v); pH = 7,6.

Tampão de ensaio (concentrado 5x): HEPES-KOH 50 mmol.L⁻¹; 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 µg/mL; pH = 7,6.

As linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios de susceptibilidade antimicrobiana foram:

- *Streptococcus agalactiae*. Gram positiva.

- *Salmonella sp.*. Gram negativa.

Meios de cultura: meio Luria Broth (LB) sólido e líquido (Tabelas 1 e 2, respectivamente).

Tabela 1. Composição do meio LB sólido.

Materiais	Composição
Triptona	1%
Extrato de levedura	0,50%
NaCl	1%
Ágar bacteriológico	2%
H ₂ O Ultra-pura	qsp

Tabela 2. Composição do meio LB líquido.

Materiais	Composição
Triptona	1%
Extrato de levedura	0,50%
NaCl	1%
H ₂ O Ultra-pura	qsp

3.3. Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em modo analítico: cromatógrafo Varian ProStar, equipado com coluna C18 Jupiter Phenomenex 5 µm, 300 Å, de dimensões 250 x 4,6 mm. O equipamento é composto por duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, todo controlado por uma Workstation para manipulação e tratamento dos dados.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em modo semipreparativo: cromatógrafo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa C18, Delta Pak, Waters, 15 µm, 300 Å, de dimensão 300 x 19 mm. O equipamento é composto por duas bombas modelo 116 e detector UV/Visível, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.
- Eletroforese: sistema de eletroforese GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301.

- Espectrômetro de massas: sistema CL/ESI-MS Waters, constituído por um módulo automático com capacidade de 120 amostras e um espectrômetro de massa Micromass modelo ZMD. O sistema é controlado por uma Workstation Compaq modelo AP200.

- Sonicador Sonics Vibra cell.

- Aparelho Beckman Coulter N5 Submicron Particle Size Analyzer do Departamento de Química da FFCLRP-USP, Ribeirão Preto.

- Microscópio de Luz Polarizada, Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Unesp/Araraquara.

- Reômetro Carri Med, modelo CSL100, instalado no departamento de Físico-Química, Instituto de Química-Unesp/Araraquara.

- Outros equipamentos como banho termostático, estufa, centrífuga, autoclave, câmera fotográfica, transiluminador de luz ultravioleta, micropipetas e vidrarias comuns de laboratório, foram utilizados para os ensaios enzimáticos e bacterianos.

4. Metodologia

4. Metodologia

4.1. Síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS)

Baseado na estrutura primária do CcdB natural e em estudos sobre a estrutura e atividade da proteína ParE, foram projetadas e sintetizadas 3 sequências peptídicas envolvendo os principais sítios de interação do CcdB com a enzima DNA girase e 2 sequências peptídicas análogas do ParE para teste de atividade sobre a DNA girase e sobre a Topo IV (Figura 16).

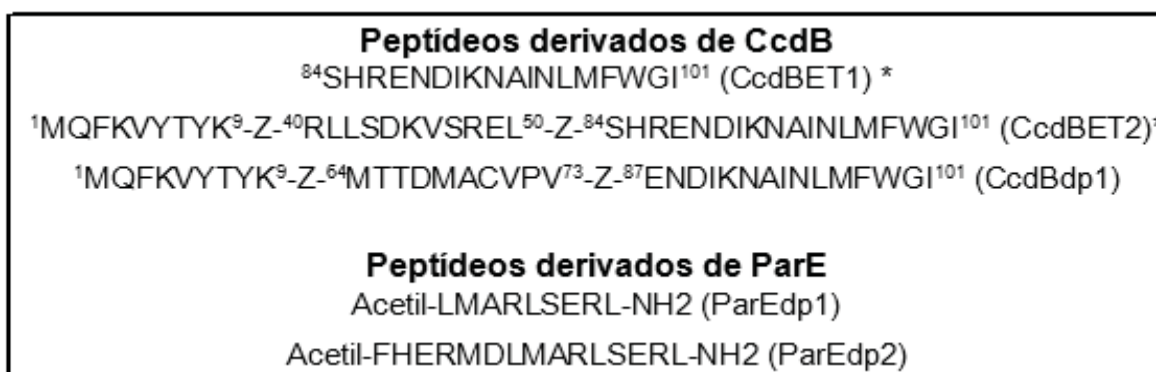


Figura 16. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados
*Peptídeos com estudo prévio executado

Os peptídeos foram sintetizados manualmente pela metodologia da fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS et al., 1997; AMBLARD et al., 2005), mediante síntese linear, empregando a estratégia Fmoc (FIELDS & NOBLE, 1990; CHAN & WHITE, 2000), que emprega o grupo base-lábil Fmoc como protetor dos grupos α -amínicos, bem como grupos lábeis ao ácido trifluoracético (TFA), como protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais.

A resina de partida para a síntese dos derivados do CcdB foi uma Fmoc-Ile-Wang resina (0,40 mmol/g) e para aquelas sequências derivadas do ParE, uma Rink amida AM resina (0,68 mmol/g), empregando DIC/HOBt como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes, em relação à quantidade de resina de partida, tanto para os Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, inicialmente em DCM:DMF (1:1), por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi

realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF. Após desproteção, a remoção da piperidina do meio foi feita através de ciclos de lavagens alternadas com DMF e DCM (Tabela 3).

Tabela 3. Padrão de lavagem e desproteção.

Solvente/Reagente	Operação	Ciclos	Tempo (min)
DCM	lavagem	2	2
DCM:DMF (1:1)	lavagem	2	2
DMF	lavagem	2	2
Piperidina 20%	desproteção	1	20
DMF	lavagem	2	2
DCM:DMF (1:1)	lavagem	2	2

A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (condensação incompleta), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Ao final procedeu-se com a acetilação do grupo amino terminal, empregando 10 eq. de anidrido acético em DMF.

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. Peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados (seis vezes), dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 5 a 10% e liofilizados.

4.2. Purificação por cromatografia líquida em fase reversa

- Analítica

A cromatografia líquida de alta eficiência, em escala analítica, foi efetuada em um cromatógrafo Varian ProStar. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

Condições cromatográficas foram:

- Coluna: fase reversa C18, Phenomenex Jupiter (250 x 4,6 mm); d = 5 µm; 300 Å.
- 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: 1,5 mL/minuto.
- Comprimento de onda do detector: 220 nm.

- Semipreparativa

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

As condições cromatográficas foram:

- Coluna: fase reversa C18, Waters Delta Pack (300 x 19 mm); d = 15 µm; 300 Å.
- Solventes: A: água contendo 0,045% de TFA.
B: acetonitrila contendo 0,036% de TFA.
- Gradiente: de 30 a 42% de B em 120 minutos.
- Fluxo: 5 mL/minuto.
- Comprimento de onda do detector: 220 nm.

4.3. Espectrometria de massas

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS) foram realizadas no Departamento de Biofísica da UNIFESP, utilizando amostras dos peptídeos, dissolvidos em AcOH/H₂O 5% (v/v), na concentração de 1 mg/mL.

As condições experimentais utilizadas foram:

Coluna: Waters Nova-Pak C₁₈ (150 x 2,1 mm), 60 Å, 3,5 µm;

- solventes: A: H₂O contendo 0,1% de TFA
B: Acetonitrila 75% em água, contendo 0,1% TFA;
- gradiente: 5% a 95% de B em 20 minutos;
- fluxo: 0,4 mL/minuto;
- comprimento de onda: 190-300nm;

4.4. Ensaio de inibição da atividade da DNA girase

Os ensaios de inibição da atividade da DNA girase foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de DNA girase com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado em um volume final de reação de 30 µL, a 37 °C por 30 minutos em tampão de ensaio, contendo os análogos peptídicos estudados neste trabalho, em concentrações variadas. A reação foi interrompida pela adição de 15 µL de STEB (sacarose 20%, Tris.HCl 0,05 mmol.L⁻¹, EDTA 0,05 mmol.L⁻¹, azul de bromofenol 50 µg.ml⁻¹) e 60 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e posteriormente centrifugadas.

Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE (Tris 89 mmol.L⁻¹ / ácido bórico 89 mmol.L⁻¹ / EDTA 2 mmol.L⁻¹, pH 8,2). As amostras foram aplicadas uma a uma nos poços do gel e submetidas a tensão constante de 60 V ou 4V/cm, a temperatura ambiente, por 2 horas. Ao término da corrida, corou-se o gel durante 30 minutos em tampão de corrida (TBE), contendo brometo de etídio (50 µg/mL).

Examinou-se o gel em transiluminador de luz ultravioleta (Germetec LTDA.), o qual foi fotografado sob luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmera fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

4.5. Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase IV

Os ensaios para avaliação da inibição da atividade da Topoisomerase IV, isto é, inibição do relaxamento do DNA superenovelado, foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de Topoisomerase IV com 0,3 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado contendo cada um dos análogos peptídicos (exceto para o análogo CcdBdp1) em concentrações variadas, em um volume de reação de 30 µL, a 37 °C por 30 minutos em tampão de ensaio.

Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1%, nas mesmas condições descritas para os ensaios com DNA girase (Item 4.4).

4.6. Preparo de lipossomas

Os lipossomas desenvolvidos neste trabalho foram preparados a base de fosfatidilcolina de soja por evaporação de solvente (clorofórmio) seguida de extrusão

com membrana de 200 nm de diâmetro para a obtenção de partículas do tipo SUV (*small unilamellar vesicles*). O peptídeo escolhido para teste foi o análogo CcdBET2, que demonstrou o melhor resultado de inibição da atividade enzimática entre os demais.

4.6.1. Metodologia de preparo

O procedimento utilizado na preparação dos lipossomas foi baseado em métodos descritos por Breukink e colaboradores (2000), e modificados de acordo com a composição lipídica mais adequada para a fusão do lipossoma na membrana plasmática das bactérias.

Deste modo, 120 mg de fosfatidilcolina de soja e 1 mg de esterilamina, foram dissolvidas em 1 mL de clorofórmio, e a solução resultante adicionada a um tubo de centrifuga de 4 cm de diâmetro. O solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, para possibilitar a formação de um fino filme lipídico nas paredes do tubo. Posteriormente, o excesso de solvente foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 h.

Em seguida, preparou-se dois tipos de amostras: um branco contendo 4 mL de tampão Tris.HCl, 10 mmol.L⁻¹, pH 7,0, necessário para promover a hidratação da fase lipídica; e uma amostra contendo CcdBET2 preparado de forma a se obter, após extrusão, uma concentração final de 200 µmol.L⁻¹.

Para conseguir o desprendimento total do lipídio das paredes do tubo, foram feitas agitações suaves (manualmente), alternadas com agitações vigorosas (mecanicamente), 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 sob aquecimento, utilizando extrusor equipado com membrana de policarbonato com poros de 400 nm e 200 nm. A primeira membrana (de 400 nm) foi utilizada para tornar homogêneo o tamanho das vesículas e, com isso, facilitar a extrusão com a membrana de 200 nm. Foram realizados 30 ciclos de extrusão para cada tipo de membrana utilizada.

4.6.2. Diâmetro dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*)

A análise do tamanho dos lipossomas foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*). A técnica fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, a partir do qual é possível calcular o coeficiente de difusão das gotículas pela equação de Einstein-Stokes (Eq. 1) através da variação do espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano das gotículas.

$$D = kt/6\pi\eta Rh \quad (\text{Eq.1})$$

onde **k** é a constante de Boltzmann, **t** a temperatura absoluta, **η** a viscosidade do meio e **Rh** o raio hidrodinâmico.

Os lipossomas foram caracterizados empregando-se o 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 de 520 nm.

4.6.3. Determinação da encapsulação do CcdBET2 em lipossomas

Um volume de 500 μL de uma amostra de lipossomas com CcdBET2 a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-50 média com a finalidade de separar peptídeo livre em solução da fração de peptídeo efetivamente encapsulado. Como branco, foi utilizado uma suspensão de lipossomas em solução tampão na ausência de peptídeo.

Foram liofilizados 5 mL das frações contendo lipossomas com CcdBET2 eluídas da coluna de cromatografia e quantitativamente dissolvidas em metanol de forma a se obter a mesma concentração de fosfatidilcolina presente na suspensão de lipossomas utilizadas como branco. A concentração do CcdBET2 encapsulado foi determinada por espectrofotometria de UV-vis em 220 nm, usando o branco de lipossomas vazios como referência.

4.7. Preparo de microemulsões

4.7.1. Diagrama de fases

O ácido oléico (fase oleosa) foi adicionado na mistura de tensoativos (fosfatidilcolina de soja e Tween 20[®]) e co-tensoativo (etanol) e uma mistura semi-sólida foi obtida. Sob agitação constante, quantidades crescentes de fase aquosa foram sendo adicionadas a essa mistura e cada formulação foi submetida a sonicação. Os sistemas obtidos foram separados em três grupos: sistema opaco do tipo emulsão (EM), sistema transparente do tipo gel (STG) e sistema transparente do tipo microemulsão (ME).

Os tensoativos fosfatidilcolina de soja (FS) e Tween 20[®] (Tw20) e o co-tensoativo etanol foram utilizados na proporção 1:1:1 suficiente para a formação de sistemas transparentes. O ácido oléico (AO) foi adicionado a essa mistura de tensoativos de modo a se obter formulações de proporções de 1:9 a 9:1 (w/w) entre tensoativos/co-tensoativo e ácido oléico. A cada uma dessas misturas, a fase aquosa foi adicionada aos poucos (de 500 em 500 µL) e as proporções dos componentes determinantes de cada tipo de sistema formado (emulsão ou sistema transparente) entraram na construção do diagrama de fases. As titulações foram realizadas a temperatura de 25 °C e as microemulsões ficaram mantidas sob as mesmas condições em completo equilíbrio até a realização de cada experimento.

4.7.2. Avaliação da incorporação do CcdBET2 nas microemulsões

4.7.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do CcdBET2 por fluorescência

A determinação do análogo peptídeo CcdBET2 nas microemulsões foi determinada com o emprego de uma curva de calibração obtida através de fluorescência, em que foram medidas as intensidades de emissão, a 350 nm, relativa à fluorescência intrínseca do peptídeo CcdBET2. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro Varian, cujo modelo foi descrito anteriormente.

- Curva de calibração

Foi conduzida utilizando como solvente o metanol e uma solução estoque de CcdBET2 1 mg/mL. Excitação a 280 nm e varredura entre 300 e 500 nm. A partir da solução estoque prepararam-se soluções padrões na faixa de concentração de 0,04375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 22,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

- Linearidade

A linearidade para a determinação do peptídeo incorporado nas microemulsões foi determinada da mesma forma que a descrita para os testes com lipossomas, conforme descrito no item 4.6.3.1.

4.7.2.2. Determinação da incorporação do CcdBET2 nas microemulsões

O análogo peptídeo CcdBET2 foi incorporado aos sistemas microemulsionados como componente da fase aquosa, a partir de uma solução estoque a 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão. A fim de obter uma solução contendo um volume final de 1,0 mL de microemulsão (preparada conforme descrito no subitem 4.7.1), 120 μL da solução estoque do peptídeo foram adicionados à fase aquosa e esta, por sua vez, adicionada à mistura de tensoativos/co-tensoativo e fase oleosa. O volume adequado da fase aquosa com o peptídeo foi obtido a partir do diagrama de fases previamente estabelecido.

Após a adição dos componentes, os sistemas foram mantidos sob agitação até a formação do sistema transparente característico de uma microemulsão. Os sistemas foram centrifugados a 9400 g por 5 minutos. Aos sobrenadantes obtidos (500 μL), adicionou-se metanol a fim de resultar ao final uma concentração de peptídeo de 22,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por amostra.

Microemulsões sem peptídeo também foram preparadas da mesma maneira, constituindo o sistema branco do ensaio. Foram feitas leituras de fluorescência dos sobrenadantes das microemulsões sem e com peptídeo. A diferença de leitura entre cada amostra com e sem peptídeo indica a intensidade de emissão correspondente à concentração de peptídeo no sobrenadante, ou seja, a que não foi incorporada. Esta concentração não incorporada, descontada da concentração inicial, resulta na concentração efetivamente incorporada à microemulsão.

Foi planejado determinar a influência da proporção dos tensoativos e da proporção da fase oleosa para a incorporação do peptídeo. Para isso, foram preparadas microemulsões com 32, 35 e 70 % de tensoativos/co-tensoativo e 8 % de fase oleosa para as três formulações, as quais foram indicadas, respectivamente, por 32ST, 35ST e 70ST. Mais duas formulações foram preparadas, porém, dessa vez, foi mantido constante a proporção de tensoativos/co-tensoativo a 60 % e variou-se a proporção da fase oleosa em 25 e 30 %; essas microemulsões foram denominadas 25FO e 30FO, respectivamente.

4.7.3. Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

Essa técnica foi utilizada para caracterizar a morfologia e a evolução das características estruturais das microemulsões após a incorporação do peptídeo no sistema.

As formulações utilizadas estão representadas nas Tabelas 5 e 6. Elas foram recentemente preparadas na presença ou ausência de peptídeo (CcdBET2 $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena) sob luz polarizada.

Tabela 5. Proporção dos componentes das microemulsões sem peptídeo

Composição (%)	F1	F2	F3	F4
AO	15	20	25	30
FS/Tw20/EtOH	65	65	65	65
Tampão	20	15	10	5

Tabela 6. Proporção dos componentes das microemulsões com peptídeo.

Composição	F1p	F2p	F3p	F4p
AO (%)	15	20	25	30
FS/Tw20/EtOH (%)	65	65	65	65
Tampão (%)	20	15	10	5
Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	4	4	4	4

4.7.4. Reologia

A quantidade de amostra utilizada foi de 800 μL para cada microemulsão e o equipamento empregado foi o reômetro AR 2000ex, com geometria cone (1.59°) e placa, com espaçamento de 52 μm na região central e com um diâmetro de 40 mm. Durante o ensaio a temperatura foi mantida constante em 25°C . Os dados do segmento ascendente do gradiente de cisalhamento foram fitados em um modelo de leis de potência utilizando o software Rheology Solutions (dados V1.1.7 da versão, TA instrumentos) para descrever as características de fluxo das microemulsões.

A determinação do comportamento reológico foi realizada para as microemulsões selecionadas e apresentadas nas Tabelas 5 e 6, em função das quantidades crescentes de fase oleosa, no caso o ácido oléico.

Para determinação das propriedades reológicas, as leituras foram feitas no intervalo de 0 a 500 s^{-1} para a curva ascendente e de 500 a 0 s^{-1} para curva descendente.

4.8. Ensaio de inibição de crescimento bacteriano

A atividade antimicrobiana foi avaliada por um ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, descrito por EHRET-SABATIER e colaboradores (1996). Para o ensaio de inibição de crescimento microbiológico, considera-se para ajuste de densidade óptica (D.O.) o índice 0,5 McFarland que corresponde a 0,132 de absorvância (10^8 UFC/mL). O objetivo desse teste foi avaliar a capacidade dos sistemas nanoestruturados, lipossomas e microemulsões, de promover a entrada do CcdBET2 na célula bacteriana. O teste foi realizado com o CcdBET2, derivado mimético que apresentou maior atividade em testes de inibição enzimática (TROVATTI et al, 2008).

4.8.1. Ensaio de inibição com lipossomas

Foram adicionados 30 μL de uma solução de CcdBET2 encapsulado em lipossoma a 30 μL de uma suspensão de bactérias em 240 μL de meio de cultura contidas em microplaca para leitura a 595 nm.

A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano de cada uma das diferentes amostras foi determinada através de uma análise comparativa com amostras controles presentes na mesma placa, sendo o controle negativo composto de 240 μL de meio de cultura com 30 μL de solução 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ciprofloxacina mais 30 μL de suspensão de bactérias; e o controle positivo composto por 30 μL de suspensão bacteriana e 270 μL de meio de cultura; amostras de cada formulação com CcdBET2 a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ mais solução salina de cada linhagem bacteriana.

As suspensões de bactérias utilizadas nos testes foram preparadas inoculando *Streptococcus agalactiae* (Gram positiva) e *Salmonella typhimurium* (Gram negativa). Após crescimento, as colônias bacterianas foram suspendidas em 3,0 mL de solução de NaCl 0,9% e as leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas para posterior diluição das amostras e ajuste de D.O. para 0,5 MacFarland.

4.8.2. Ensaio de inibição com microemulsões

Com a finalidade de promover aumento da permeabilidade da membrana celular da bactéria ao CcdBET2, foram utilizados os sistemas microemulsionados (Tabela 6) a base de ácido oléico como agente promotor de permeabilidade (KOGAN e GARTI, 2006)

Repique: as linhagens bacterianas *Streptococcus agalactae* (Gram positiva), *Salmonella typhimurium* (Gram negativa) foram transferidas para um meio Luria Broth (LB) sólido, em um fluxo laminar sob chama do bico de Bunsen e colocadas em estufa a 37°C para crescimento overnight. Após crescimento, as colônias bacterianas foram suspendidas em 3,0 mL de solução de NaCl 0,9% e as leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas para posterior diluição das amostras e ajuste de D.O. para 0,5 MacFarland.

Plaqueamento: foi realizado em microplaca com um volume final de 300 μL , tendo como controle positivo de crescimento 270 μL de meio LB líquido mais 30 μL de solução salina de cada linhagem bacteriana; controle negativo de crescimento com 30 μL de ciprofloxacina (CFX) a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 240 μL de meio LB líquido e 30 μL de solução salina de cada linhagem bacteriana; controle negativo de crescimento com 30 μL de etanol a 25%, 240 μL de meio LB líquido e 30 μL de solução salina de cada linhagem bacteriana; a fim de se descontar a leitura de absorbância de cada

formulação, foi realizado também, na mesma placa, 4 brancos referentes a cada uma das formulações sem adição do peptídeo (Tabela 5).

A incubação foi feita em *shaker*, sob agitação a 37 °C overnight. Após plaqueamento, a determinação do número de células que tiveram seu crescimento inibido foi feita por espectrofotometria na região do visível a 595 nm em leitor de placas EPOCH.

5. Resultados e Discussão

5. Resultados e discussão

5.1. Desenho e síntese das seqüências peptídicas

O análogo CcdBET1 (Figura 16), foi composto pela seqüência de resíduos de aminoácidos de I¹⁰¹ a S⁸⁴ da molécula de CcdB bacteriano. Esta seqüência inicial foi mantida no análogo CcdBET2 devido à sua importância estrutural e a possibilidade de interação com GyrA além da ausência de interação com CcdA.

Para compor a estrutura primária do segundo análogo peptídico do CcdB, uma seqüência maior foi projetada, incluindo, além do fragmento que contém a α hélice C-terminal (S⁸⁴ a I¹⁰¹), a seqüência de reconhecimento do antídoto CcdA (R⁴⁰-L⁵⁰) e uma terceira seqüência contendo o segmento N-terminal (M¹ a K⁹). Estes três fragmentos foram conectados por um *linker* flexível (ácido ϵ -amino-capróico), em substituição aos 63 resíduos de aminoácidos da seqüência nativa. Estes dois análogos, já haviam sido sintetizados anteriormente em projetos desenvolvidos pelo grupo (TROVATTI et al., 2008), porém foram sintetizados novamente neste trabalho, para aplicação, em estudos com nanossistemas.

O análogo CcdBdp1 possui, assim como os demais análogos de CcdB, os resíduos de aminoácidos fundamentais para a interação com a DNA girase (W⁹⁹, G¹⁰⁰ e I¹⁰¹), incluindo os resíduos que constituem a α -hélice (S⁸⁷-F⁹⁸), um segmento importante para a formação da estrutura do dímero de CcdB (M⁶⁸-P⁷²) e uma extremidade N-terminal com uma β -sheet (M¹-K⁹). A exemplo do CcdBET2, os três fragmentos foram conectados por um *linker* flexível (ácido ϵ -amino-capróico).

Em relação à síntese dos peptídeos, derivados do CcdB e do ParE (Figura 16), todos foram sintetizados pela metodologia da síntese da fase sólida (SPFS), empregando o protocolo padrão da estratégia Fmoc.

Na etapa de montagem dos análogos peptídicos de CcdB sobre a resina, utilizou-se 3,4 g de uma resina tipo Wang, com o aminoácido C-terminal já acoplado à mesma (Fmoc-Ile), com grau substituição de 0,40 mmol.g⁻¹. Para a síntese dos peptídeos derivados de ParE foi utilizada a Rink amida AM resina, com grau de substituição de 0,68 mmol.g⁻¹. A solvatação foi realizada através de ciclos de lavagem com os solventes DCM, DMF e a mistura destes na proporção 1:1. A desproteção (remoção do grupo base lábil Fmoc amino-protetor do primeiro aminoácido) foi realizada através do uso de solução de piperidina 20% (v/v) em

DMF. Após desproteção, a remoção da piperidina do meio, foi realizada através ciclos de lavagens alternadas com DMF e DCM.

Após acondicionamento da resina e desproteção do primeiro aminoácido, foi iniciado o acoplamento dos demais aminoácidos à resina, seguindo sempre os passos de lavagem e desproteção apresentados na Tabela 3.

Na etapa de acoplamento, o excesso molar dos reagentes foi de 3 equivalentes em relação ao grau de substituição de cada uma das resinas. Os agentes de condensação foram DIC/HOBt e os solventes DCM:DMF (1:1). Houve a necessidade de um método alternativo utilizado em reacoplamentos quando o método principal não foi totalmente eficiente, embora, poucas vezes utilizado. Neste, o agente de condensação foi o HBTU na presença de DIEA, em N-metilpirrolidona (NMP).

A síntese foi monitorada através do Teste de Ninidrina (KAISER et al., 1970) a cada etapa de acoplamento dos aminoácidos e em alguns casos na etapa de desproteção dos grupamentos amino-terminal. A ninidrina é um reagente que indica a presença de aminas primárias livres em solução. Este teste apresenta resultados rápidos e altamente confiáveis. Quando o teste indica sinais de grupamentos amino-terminais livres após a etapa de acoplamento de algum resíduo de aminoácido, há necessidade, então, de fazer reacoplamento do aminoácido, o qual é realizado utilizando-se um excesso molar de reagentes de 1,5 equivalentes.

5.2. Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados

Após a clivagem, uma fração da massa de extrato bruto de cada peptídeo liofilizado de aproximadamente 1 mg, foi dissolvido em 1 mL de solvente A (água + TFA 0,036%) e submetida à análise qualitativa em CLAE, sob as condições apresentadas no item 4.2.

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 preparativa. Os cromatogramas obtidos antes e após purificação dos análogos do CcdB estão representados na Figura 19 e os análogos peptídicos do ParE estão representados na Figura 20.

A identidade química destes peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas em electro-spray quadrupolo (ESI-Q), em modo positivo, e posteriormente

usados em ensaios funcionais de inibição enzimática. Os espectros de massas obtidos dos peptídeos puros são mostrados nas Figuras 21 e 22.

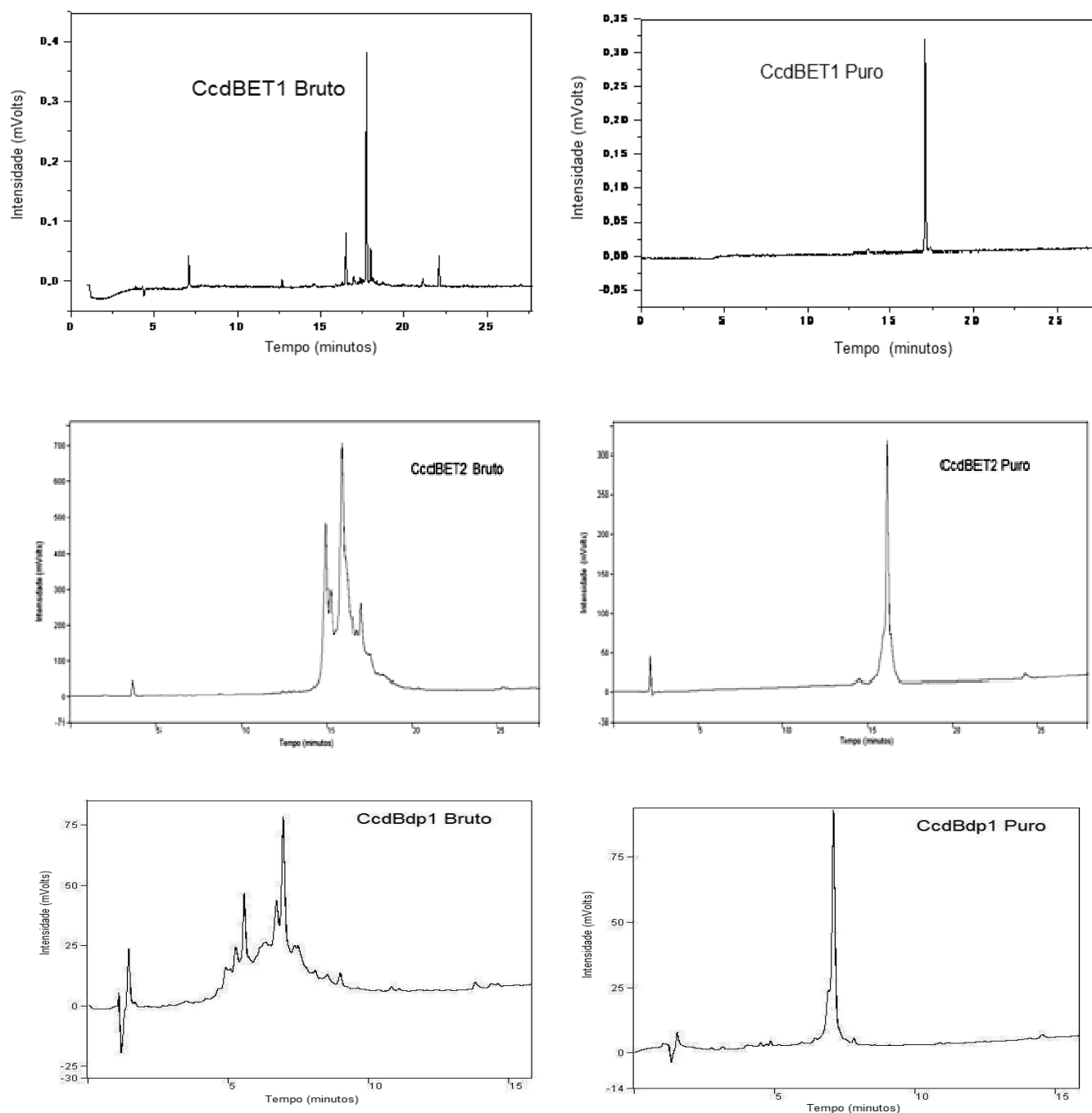


Figura 19. Cromatogramas obtidos em escala analítica para os análogos peptídicos sintetizados CcdBET1, CcdBET2 e CcdBdp1. Antes e após purificação como mostrado.

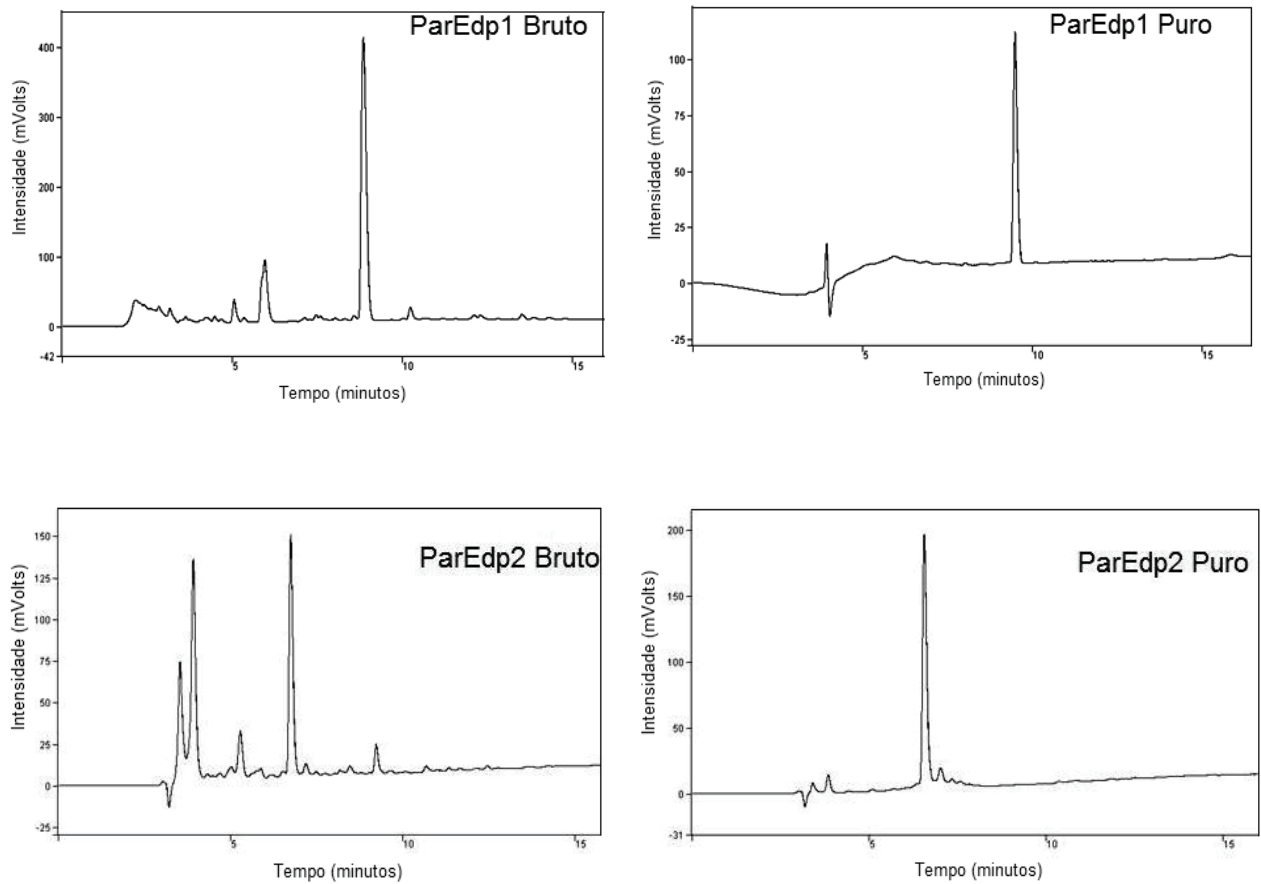


Figura 20. Cromatogramas obtidos em escala analítica para os análogos peptídicos do ParE: ParEdp1 e ParEdp2. Antes (amostra bruta) e após purificação (amostra pura).

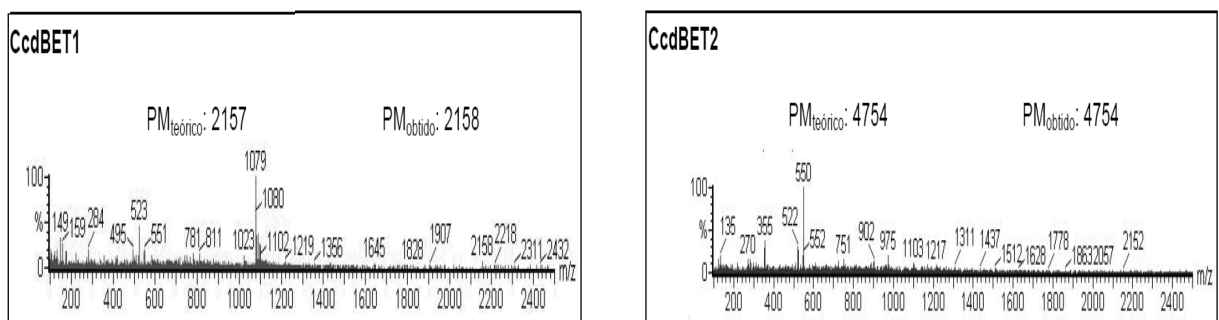


Figura 21. Espectros de massas dos análogos de CcdB.

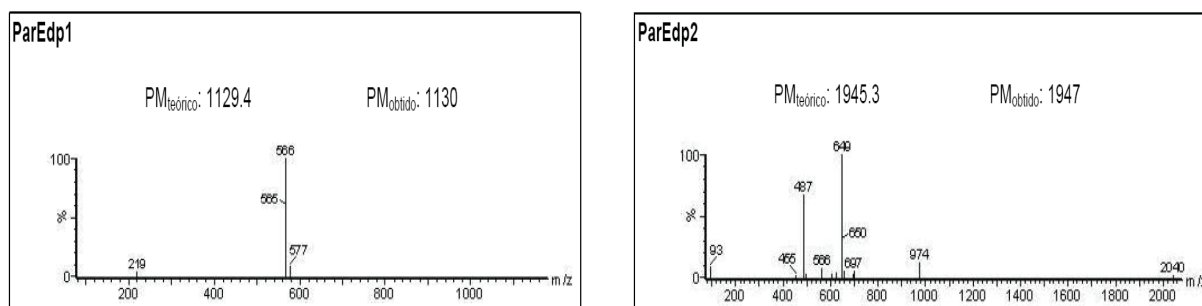


Figura 22. Espectros de massas dos análogos de ParE.

5.3. Ensaios de inibição enzimática

Para testar a ação inibitória dos peptídeos na atividade de topoisomerasas, os peptídeos foram avaliados em relação à atividade inibitória sobre o superenovelamento do DNA catalisado pela DNA girase e ao relaxamento do DNA pela Topo IV.

5.3.1. Ensaios de inibição da atividade da DNA girase

Foram testadas, inicialmente, a atividade inibitória dos derivados de CcdB, mespecificamente CcdBET1, CcdBET2 e CcdBdp1. Partiu-se de concentrações decrescentes a fim de se determinar a concentração mínima inibitória que produz completa inibição enzimática (IC_{100}). A Figura 23 representa o perfil de eletroforese correspondente à inibição da DNA girase frente ao análogo CcdBET1.

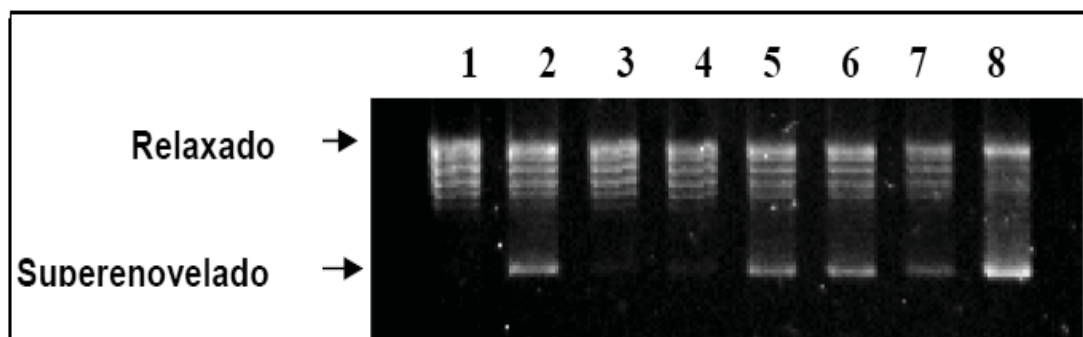


Figura 23. Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBET1. Linha 1, plasmídeo pBR322 relaxado, linha 2, pBR322 relaxado e DNA girase na ausência do CcdBET1; linhas 3 a 8, pBR322 relaxado, DNA girase e CcdBET1 nas concentrações de 100, 80, 50, 30, 20 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

O CcdBET1 é um análogo peptídico que possui a região C-terminal como sendo de importância significativa na interação com a DNA girase.

Através dos resultados obtidos nesta eletroforese observou-se na linha 2 a atividade da DNA girase (controle positivo), que promove o superenovelamento do DNA relaxado. Nas linhas 3 e 4 observou-se a inibição da atividade de enzima na presença de CcdBET1 nas concentrações de 100 e 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, pois não houve o superenovelamento do DNA, porém em concentrações menores, o análogo CcdBET1 não foi capaz de inibir a atividade da enzima, permitindo o superenovelamento do DNA. Sendo assim, o IC_{100} para o CcdBET1 situa-se na faixa entre 50 e 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

O mesmo ensaio foi realizado para o análogo CcdBET2 e o perfil de eletroforese pode ser observado na Figura 24.

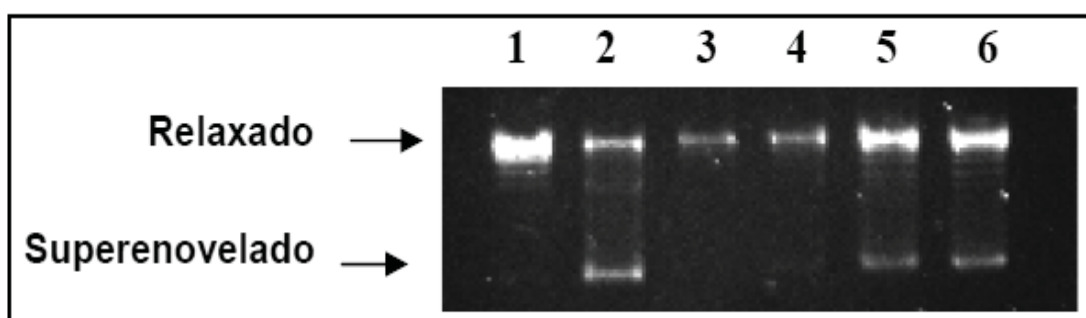


Figura 24. Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBET2. Linha 1, plasmídeo pBR322 relaxado, linha 2, pBR322 relaxado e DNA girase na ausência do CcdBET2; linhas 3 a 6, pBR322 relaxado, DNA girase e CcdBET2 nas concentrações de 30, 20, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Nas linhas 3 e 4 da Figura 24 é possível notar a inibição da atividade da enzima na presença de CcdBET2 nas concentrações de 30 e 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, pois não houve o superenovelamento do DNA, porém em concentrações menores, o análogo CcdBET2 não foi capaz de inibir totalmente a atividade da enzima. Ainda pela análise da Figura 24 é possível determinar que IC_{100} para o CcdBET2 está entre 10 e 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Estes resultados de inibição a baixas concentrações tornam este análogo ideal para a realização dos ensaios de inibição de crescimento bacteriano com os sistemas de lipossomas e de microemulsão propostos.

A IC_{100} para o análogo CcdBdp1 foi determinada a partir de uma concentração relativamente alta em comparação com os demais análogos peptídeos derivados do CcdB. De acordo com a Figura 25, a inibição total somente foi

observada a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (linha 3), evidenciando a baixa atividade inibitória desse peptídeo, cuja IC_{100} está no intervalo de concentração de 200 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

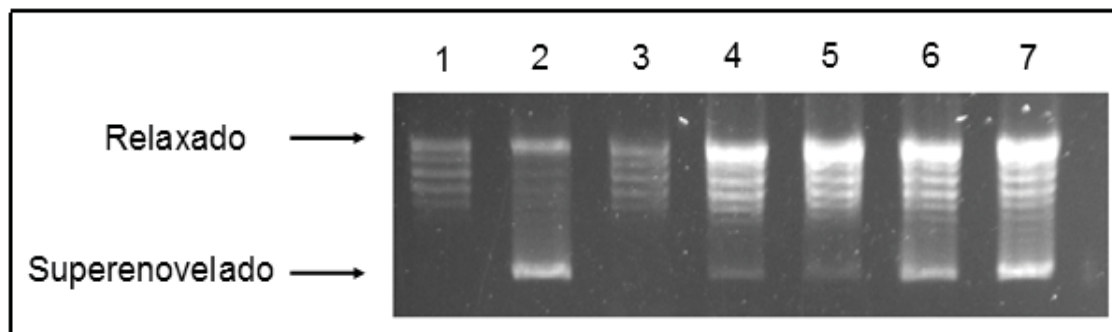


Figura 25. Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBdp1. Linha 1, plasmídeo pBR322 relaxado, linha 2, pBR322 relaxado e DNA girase na ausência do CcdBdp1; linhas 3 a 7, pBR322 relaxado, DNA girase e CcdBdp1 nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Os peptídeos derivados da toxina ParE, ao contrário dos análogos CcdBET1, CcdBET2 e CcdBdp1, não apresentaram atividade inibitória da DNA girase bacteriana. Na Figura 26 é possível observar o superenovelamento do plasmídeo pBR322, mesmo na presença de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada um dos peptídeos. Com este resultado pode-se descartar estes dois peptídeos derivados (ParEdp1 e ParEdp2), como inibidores da atividade da DNA girase, e conseqüentemente dos estudos com lipossomas e microemulsões.

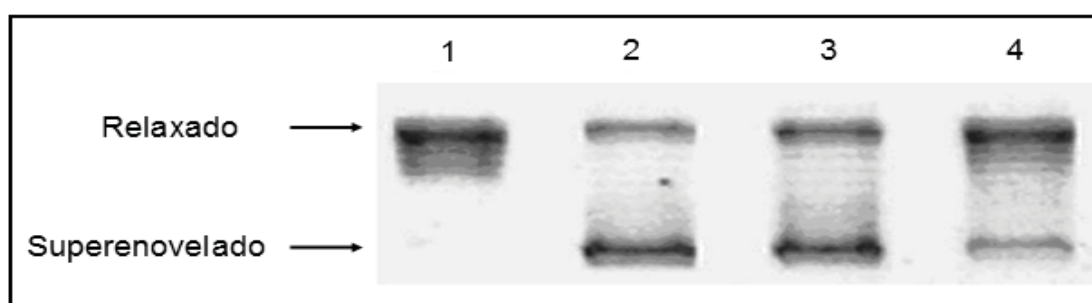


Figura 26. Ensaio de inibição do superenovelamento do DNA por fragmentos de ParE. Linha 1, plasmídeo pBR322 relaxado, linha 2, pBR322 relaxado e DNA girase na ausência de peptídeo; linha 3, pBR322 relaxado, DNA girase e ParEdp1 $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$; linha 4, pBR322 relaxado, DNA girase e ParEdp2 $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.3.2. Ensaios de inibição da atividade da Topoisomerase IV

Os ensaios realizados nesta fase tiveram como objetivo avaliar o efeito inibitório dos peptídeos sobre a atividade da Topo IV, ou seja, no relaxamento do DNA plasmidial superenovelado (pBR322)

Poucos trabalhos até o momento citam inibidores específicos para a ação de Topo IV e, particularmente, quase nada se conhece em relação ao efeito da toxina CcdB ou ParE frente à essa classe de enzimas, já que os inibidores conhecidos para girase somente faziam efeito na inibição da Topo IV em concentrações muito superiores.

Baseado nessas informações, iniciaram-se os ensaios de inibição da Topo IV, usando os análogos peptídicos CcdBET1 e CcdBET2. A inibição foi analisada por eletroforese em gel de agarose de acordo com o procedimento já descrito (item 4.5). O perfil de eletroforese da Topo IV com o análogo CcdBET1 pode ser observado na Figura 27.

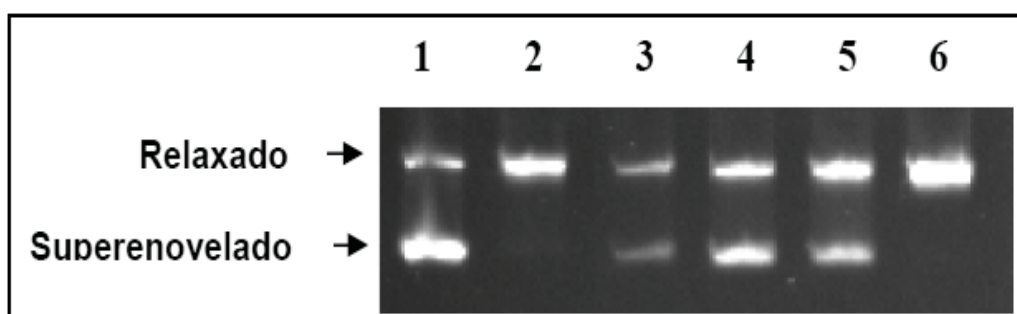


Figura 27. Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBET1. Linha 1, plasmídeo pBR322 superenovelado, linha 2, pBR322 superenovelado e Topo IV na ausência do CcdBET1; linhas 3 a 6, pBR322 superenovelado, Topo IV e CcdBET1 nas concentrações de 50, 30, 20 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Através dos resultados obtidos nesta eletroforese observou-se na linha 2 a atividade da Topo IV devido ao relaxamento do DNA superenovelado. Nas linhas 3, 4 e 5 observou-se a inibição da atividade de enzima na presença de CcdBET1 nas concentrações de 50, 30 e 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente pois não houve o relaxamento do DNA. Neste caso, o IC_{100} entre 20 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, valor bem inferior àquele determinado para a DNA (80 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

O mesmo ensaio foi realizado para o análogo CcdBET2 e o perfil de eletroforese pode ser observado na Figura 28. Através dos resultados obtidos nesta eletroforese observou-se a inibição da atividade de enzima na presença de CcdBET2 nas concentrações de 50 a 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, pois não houve o relaxamento do DNA. Novamente, a eficiência inibitória foi maior frente a Topo IV, quando comparada à atividade da DNA girase. Neste caso o IC_{100} , na faixa de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, remete este peptídeo para a classe dos bons inibidores de topoisomerases.

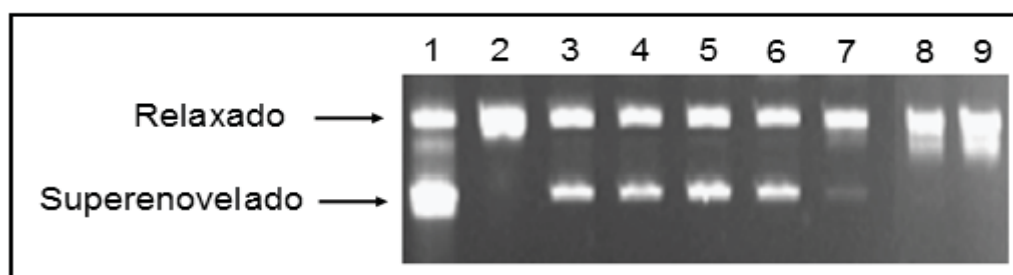


Figura 28. Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBET2. Linha 1, plasmídeo pBR322 superenovelado, linha 2, pBR322 superenovelado e Topo IV na ausência do CcdBET2; linhas 3 a 9, pBR322 superenovelado, Topo IV e CcdBET2 nas concentrações de 50, 20, 15, 10, 5, 3 e 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Este resultado de inibição aliado àquele de inibição da DNA girase, permite estipular em relação à dupla atividade deste peptídeo, capaz de inibir as duas topoisomerases em concentrações relativamente baixas. Esta propriedade, faz deste peptídeo um candidato promissor, a ser empregado como fármaco, no combate à ação bacteriana.

Para os peptídeos derivados da toxina ParE (ParEdp1 e o ParEdp2), o resultado do ensaio de inibição da Topo IV não foi diferente dos resultados do ensaio de inibição da DNA girase, ou seja, eles também não apresentaram atividade inibitória, mesmo em concentrações elevadas, como mostra a Figura 29.

Os ensaios de inibição da atividade das enzimas DNA girase e Topo IV mostraram que os peptídeos derivados de ParE aqui estudados, não são capazes de inibir as enzimas, resultando em peptídeos sem atividade inibitória frente às topoisomerases bacterianas.

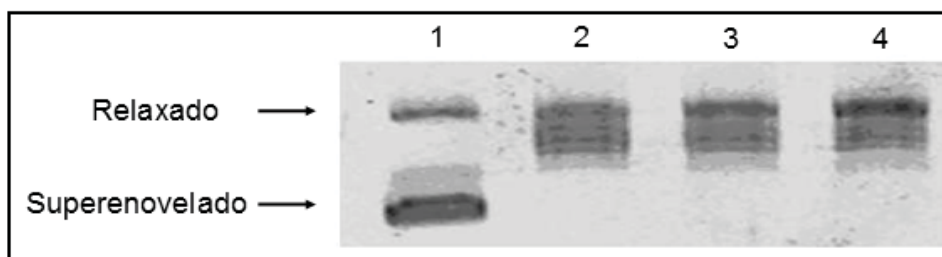


Figura 29. Ensaio de Inibição do relaxamento do DNA por fragmentos de ParE. Linha 1, plasmídeo pBR322 superenovelado, linha 2, pBR322 superenovelado e Topo IV na ausência de peptídeo; linha 3, pBR322 superenovelado, Topo IV e ParEdp1 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; linha 4, pBR322 superenovelado, Topo IV e ParEdp2 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.4. Preparo e caracterização de lipossomas

Foram preparados lipossomas do tipo SUV por evaporação de solvente seguida de extrusão, conforme descrito no item 4.6.1. Após sua preparação, o diâmetro dos lipossomas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz e, posteriormente, foi avaliada a eficiência de encapsulação do peptídeo CcdBET2, por cromatografia de exclusão de tamanho. Este peptídeo foi escolhido por ter apresentado o maior poder de inibição sobre as topoisomerases ensaiadas.

5.4.1. Diâmetro dos lipossomas por Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*)

A técnica consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes espalhem a luz. A luz espalhada é captada e o sinal gerado é enviado ao correlator, onde é realizado o processamento dos dados. Um software processa os dados e fornece, assim, os valores de tamanho médio, índice de polidispersividade, etc.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz fornece o tamanho de gotículas de esferas monodispersas diluídas, porém quando o sistema é concentrado ou polidisperso ou ambos, a interpretação fica dificultada devido a interações interpartículas (LYKLEMA, 1991; LAWRENCE et al., 2000; ABOOFAZELI et al., 2000). A elevada viscosidade de alguns sistemas também pode conduzir a erros experimentais na determinação do tamanho de gotículas (ABOOFAZELI et al.,

2000), em razão de que a técnica é fundamentada no movimento Browniano das gotículas em dispersão (ORTHABER e GLATTER, 2000). Logo, para uma melhor análise das amostras é necessário realizar diluições a fim de evitar que a concentração das gotículas interfira na difusão, uma vez que o coeficiente de difusão diminui quando o raio hidrodinâmico aumenta. É importante controlar também temperatura e viscosidade, pois uma pequena variação em qualquer um destes parâmetros pode causar erro na determinação do tamanho das partículas (HASKELL, 1998; ABOOFAZELI et al., 2000). As amostras foram diluídas com água Milli-Q ultra-pura.

Os gráficos representados nas Figuras 30 e 31 mostram o diâmetro dos lipossomas com e sem peptídeo encapsulado, respectivamente. As figuras indicam um ligeiro aumento no diâmetro dos lipossomas após a adição do peptídeo. Isso pode significar que o peptídeo interagiu com o lipossoma e, com isso, provocou um aumento de diâmetro.

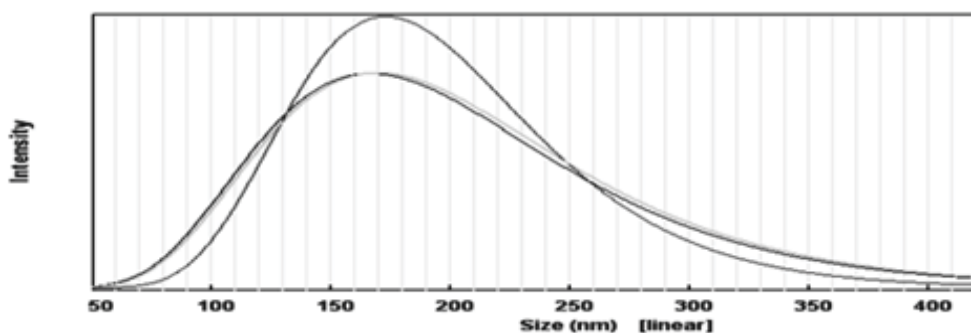


Figura 30. Lipossoma sem peptídeo encapsulado com diâmetro médio de 169,0 nm.
*As diferentes curvas representam repetições do mesmo ensaio; desvio padrão de 0,01%

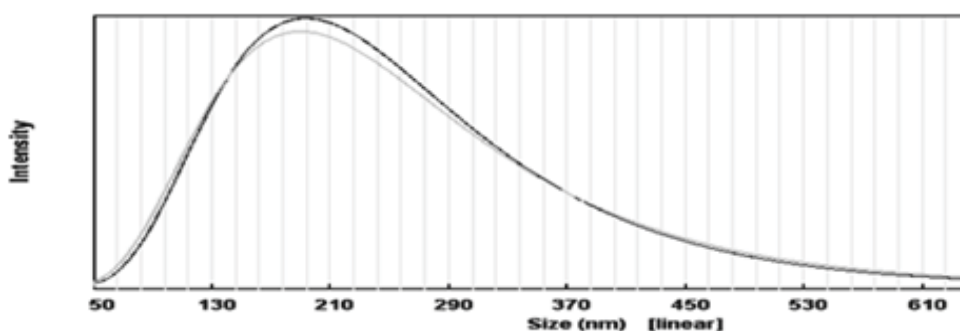


Figura 31. Lipossoma com peptídeo encapsulado com diâmetro médio de 200,9 nm.
*As diferentes curvas representam repetições do mesmo ensaio; desvio padrão de 0,03%

5.4.2. Determinação da encapsulação do CcdBET2 em lipossomas

Após as medidas, as amostras eluídas contendo lipossomas foram reunidas e liofilizadas, pesando-se a massa total obtida após liofilização. Desta massa, 10 mg foram adicionadas a 5 mL de metanol para determinação da absorção. Este procedimento foi realizado para os lipossomas contendo peptídeo encapsulado e para lipossomas vazios (controle). O valor obtido a partir da diferença de absorção entre lipossomas controle e lipossomas contendo peptídeo forneceu a concentração máxima de peptídeo presente no volume de 500 µL de vesículas.

Para os lipossomas do tipo SUV, observou-se uma eficiência de encapsulação na ordem de 77%, indicando uma melhora na metodologia em relação aos resultados obtidos anteriormente pelo grupo em que a eficiência de encapsulação foi de apenas 15%. Estes resultados possibilitam, então, um melhor aproveitamento dos peptídeos, visto que, quando livres em solução, os mesmos não apresentam nenhum efeito inibitório no crescimento bacteriano (GARRIDO, S. S., 2007).

A metodologia trabalhada por GARRIDO 2007 consistiu em utilizar a sonicação para a obtenção de lipossomas do tipo SUV a partir de vesículas MLV. Esta técnica apresenta o inconveniente de obrigar que a amostra seja centrifugada para a retirada do titânio residual oriundo do próprio sonicador. Este procedimento acarreta em uma perda significativa de peptídeo, uma vez que sua concentração para teste deve ser baixa.

Para contornar este problema foi deixada de lado, então, a etapa de sonicação com sonicador com ponta de titânio. Após a hidratação do filme lipídico, foi realizada a extrusão diretamente. Pelos dados de espalhamento dinâmico de luz obtidos demonstram claramente que a sonicação não é necessária para a obtenção de lipossomas do tipo SUV (Figuras 30 e 31).

5.5. Desenvolvimento de microemulsões

5.5.1. Diagrama de fases

O diagrama de fases da Figura 32 mostra a região de sistemas opacos do tipo emulsão (EM), sistema transparente gel (STG) e a região de sistema transparente do tipo microemulsão (ME) e as respectivas proporções da fase oleosa, da mistura tensoativos/co-tensoativo e da fase aquosa. A diferença entre STG e ME está na viscosidade apresentada pelo STG enquanto que ME são mais líquidas.

O ácido oléico foi utilizado como fase oleosa por ser um agente promotor de permeabilidade, assim como os tensoativos fosfatidilcolina, Tween 20[®] e o co-tensoativo etanol (KOGAN e GARTI, 2006). Como fase aquosa, foi utilizado o tampão Tris. HCl a 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2.

Levando-se em conta a região de formação de microemulsões do diagrama de fases, foram selecionados 4 sistemas microemulsionados para os testes de inibição de crescimento microbiano em que apenas a proporção de ácido oléico foi modificada. Foi escolhido trabalhar variando apenas o ácido oléico por ser ele o principal agente de permeabilidade em estudo. As formulações estão representadas nas tabelas 5 e 6.

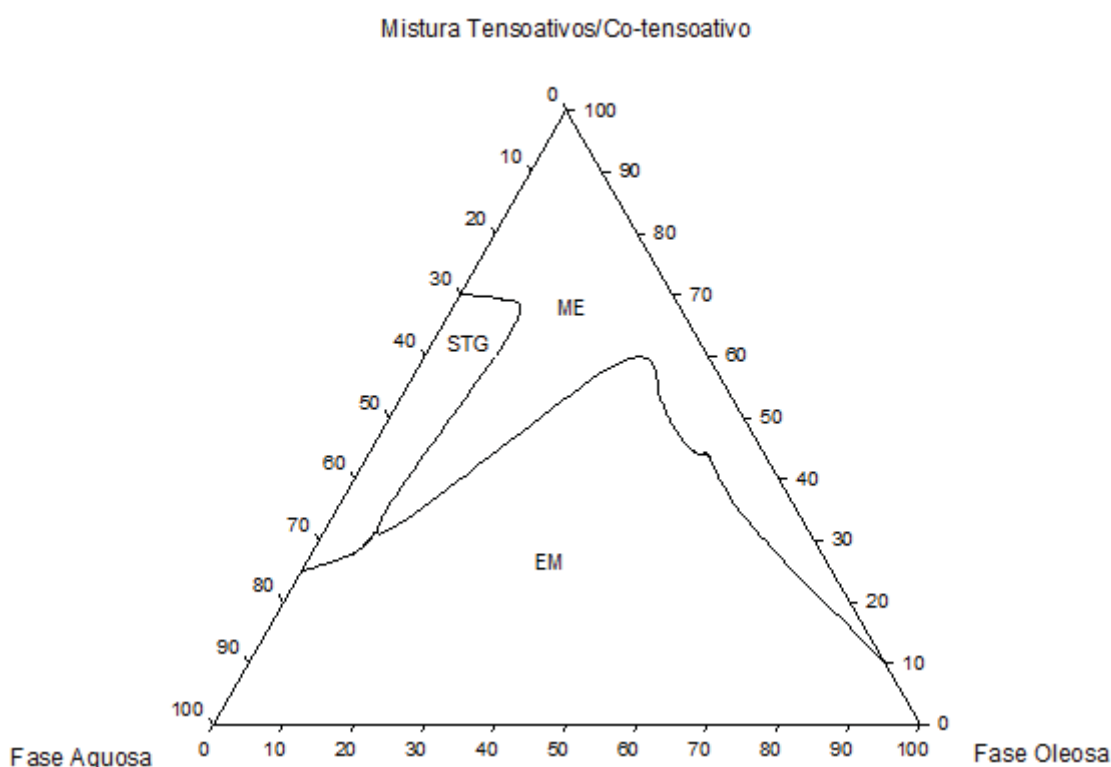


Figura 32. Diagrama de fases mostrando as regiões de sistema opaco emulsionado (EM), sistema transparente gel (STG) e sistema transparente microemulsionado (ME).

5.5.2. Avaliação da incorporação de peptídeo nas microemulsões

5.5.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de peptídeo por fluorescência

A metodologia para quantificação do peptídeo CcdBET2 presente nas microemulsões foi desenvolvida a partir de ensaios de espectroscopia de fluorescência. Optou-se por ensaios de fluorescência neste caso porque é um método de análise mais sensível que a metodologia de espectrofotometria de UV no que diz respeito à detecção de peptídeos que possuem o aminoácido triptofano responsável pela fluorescência intrínseca do peptídeo CcdBET2. Compostos aromáticos, como o triptofano, apresentam maior fluorescência, pois têm estados excitados de energia relativamente baixa, o que determina a emissão por fluorescência quando seus elétrons voltam para o estado fundamental após passarem por absorção. As leituras de emissão obtidas correspondentes a cada concentração analisada estão listadas na Tabela 7.

Com os dados apresentados na Tabela 7, elaborou-se um gráfico relacionando a intensidade de emissão, a 350 nm, em função da concentração do CcdBET2. Com os valores experimentais, calculou-se a equação da reta e o coeficiente de determinação, representados por $y = 7,8257x + 17,589$ e $r^2 = 0,99$. A linearidade pode ser observada no intervalo de concentração utilizado (0,04375 – 22,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), constatada pelo coeficiente de determinação (r^2), garantindo confiança no uso da equação da reta obtida.

Tabela 7: Valores das intensidades médias de fluorescência de diferentes soluções de CcdBET2 em metanol

CcdBET2 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Intensidade de emissão a 350 nm*	Desvio padrão
22,4	182,9	4,06
11,2	121,6	2,95
5,6	69,3	0,34
2,8	41,3	0,3
1,4	26,1	0,46
0,7	19,8	0,75
0,35	16,7	0,37
0,175	16,5	0,31
0,0875	16,3	0,05
0,04375	15,9	0,07

* média de 3 determinações, com excitação a 280 nm

5.5.2.2. Determinação da incorporação de peptídeo nas microemulsões

A partir da curva de calibração e dos valores de fluorescência obtidos, calculou-se a quantidade máxima de peptídeo incorporada nas formulações 32ST, 35ST, 70ST, 25FO e 30FO. A composição de cada microemulsão está representada na Tabela 8, sendo o volume final de 1 mL e a concentração de partida do CcdBET2 foi de $44,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para cada uma.

Pela composição das microemulsões representadas na Tabela 8 é possível verificar que foram realizados dois tipos de estudo com as microemulsões. As microemulsões 32ST, 35ST e 70ST, selecionadas a partir do diagrama de fases, apresentam a mesma quantidade de fase oleosa (8%), porém apresentam variação na proporção de tensoativos/co-tensoativo. Por outro lado, os sistemas 25FO e 30FO possuem a mesma proporção de tensoativos/co-tensoativo (60%), mas diferem na proporção de fase oleosa.

Tabela 8. Composição das microemulsões utilizadas para avaliar a incorporação do CcdBET2.

Composição (%)	32ST	35ST	70ST	25FO	30FO
AO	8	8	8	25	30
FS/Tw20/EtOH	32	35	70	60	60
Tampão	60	57	22	15	10

O objetivo de se trabalhar nessas condições foi o de avaliar a influência da composição dos tensoativos/co-tensoativo e da composição de fase oleosa na incorporação do peptídeo em cada sistema. O gráfico da Figura 33 mostra que, para praticamente todos os sistemas, a incorporação do CcdBET2 foi elevada, chegando a valores acima dos 90 %, o que indica uma grande interação do peptídeo com todos os sistemas microemulsionados.

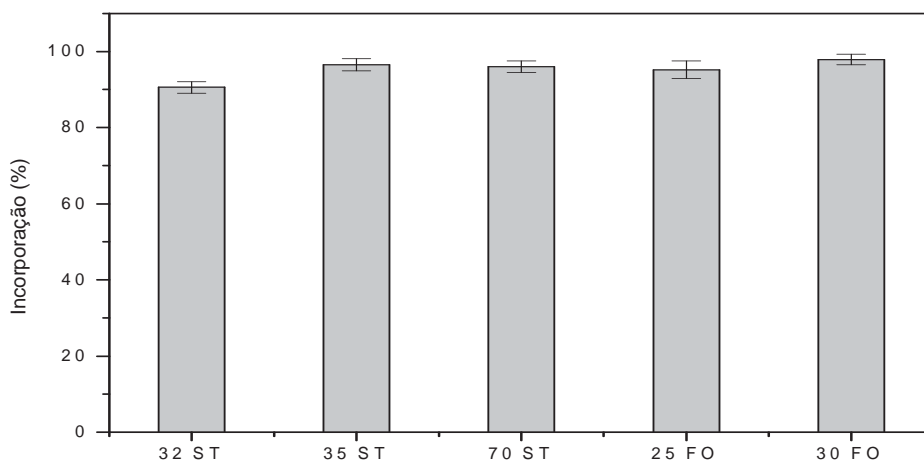


Figura 33. Incorporação máxima do CcdBET2 nas diferentes microemulsões

5.5.3. Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

A microscopia de luz polarizada (MLP) é uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas a partir da determinação de sua isotropia óptica. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e microemulsões são isotrópicas.

O microscópio de luz polarizada é um microscópio comum, no qual a luz atravessa um sistema polarizador, que direciona as ondas luminosas para um único plano. O emprego de um feixe de luz polarizada permite estudar estruturas anisotrópicas e birrefringentes, quando apresentam dois índices de refração diferentes, conforme a incidência da luz, e isotrópicas, quando as estruturas não modificam o plano de polarização.

Na Figura 34 estão representadas as fotomicrografias obtidas através da observação das amostras F1 a F4 (Tabela 5) e F1p a F4p (tabela 6) sob a luz polarizada, logo após o preparo.

Tanto as formulações sem peptídeo quanto as com peptídeo mostraram ser isotrópicas, ou seja, sob o plano de luz polarizada, não desviaram a luz, resultando em campo escuro. Os objetos presentes nessas figuras são bolhas de ar, mostrando que as imagens foram igualmente focalizadas e nenhuma estrutura anisotrópica,

característica de cristal líquido, como “cruzes de malta” (fase lamelar) ou “estrias” (fase hexagonal) foi obtida.

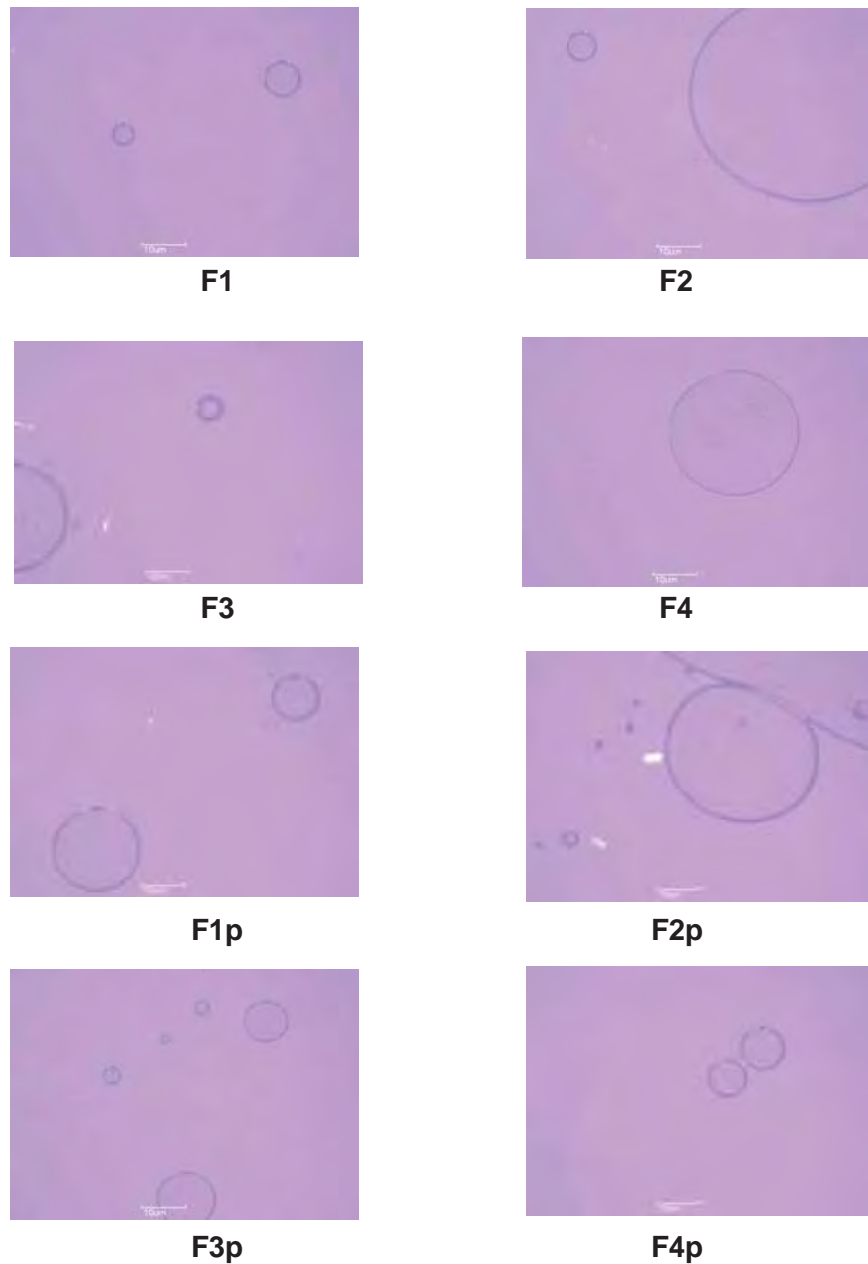


Figura 34. Fotomicrografias das amostras F1 a F4 (sem peptídeo) e F1p a F4p (com peptídeo) obtidas por microscopia de luz polarizada. *Campo escuro e sistema isotrópico para todas amostras.

5.5.4. Reologia

A reologia é um método aplicável na caracterização de sistemas microemulsionados, dado que o comportamento do fluido está relacionado com o

tipo e grau de organização do sistema (interações entre seus componentes). Também pode ser empregada para avaliar o efeito de aditivos na formulação.

O reômetro funciona pelo princípio de rotação, nos quais a amostra é cisalhada entre paredes interna e externa da porta-amostra cuja geometria usual compreende cone e placa. Nessa geometria, a amostra colocada sobre a placa é submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pela ação do movimento de rotação do cone. Dessa forma é possível construir o reograma tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento, a partir dos quais se torna possível o cálculo da viscosidade dinâmica dos materiais.

As relações que descrevem a tensão e velocidade de cisalhamento são (DICKINSON, 1992):

$$\dot{\gamma} = \omega / \alpha \tau = 3M / 2\pi R^3 \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo, **M** o torque, ω a velocidade angular ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) e **R** e α são respectivamente o raio e o ângulo do cone.

A vantagem desta geometria é que não ocorre variação na tensão de cisalhamento através da amostra, porque a distância entre o cone e a placa é muito pequena, fazendo com que a tensão de cisalhamento seja praticamente uniforme.

A Figura 35A mostra a relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento para microemulsões preparadas com ácido oléico como fase oleosa sem a presença do peptídeo. Foi estudado o comportamento reológico das microemulsões a partir da variação da proporção de ácido oléico em 15 (F1), 20 (F2), 25 (F3) e 30% (F4). Pela análise das curvas da Figura 35A, conclui-se que as formulações comportam-se como sistemas não-newtonianos, uma vez que não há uma perfeita linearidade entre a tensão e a velocidade de cisalhamento (WOOD, 1986; SCOTT, 2000). A Figura 35B mostra com maior nitidez que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de cisalhamento indicando, portanto, que estes sistemas apresentam as características de fluídos pseudoplásticos. Este comportamento resulta do alinhamento das gotículas coloidais formadas pelos componentes do sistema na direção do escoamento com o aumento da tensão ou velocidade de cisalhamento, o que reduz a resistência interna do sistema e, com isso, a viscosidade diminui (TOKUMOTO, 1996).

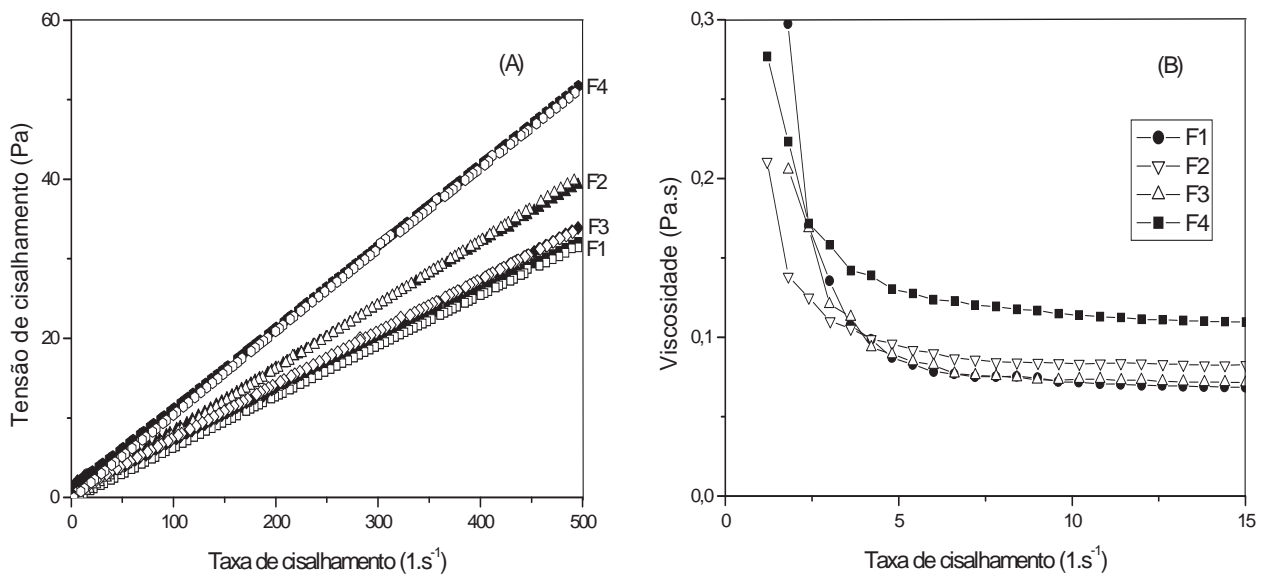


Figura 35. Reogramas de fluxo (A) e de viscosidade (B) das formulações sem peptídeo F1, F2, F3 e F4 a 25°C. Em (A), os símbolos fechados representam as curvas ascendentes, e os símbolos abertos representam as curvas descendentes.

A Figura 36 mostra como a adição do peptídeo interferiu na viscosidade de cada uma das formulações. Uma solução de CcdBET2 foi adicionada na fase aquosa da cada formulação a fim de se obter uma concentração final, por formulação, de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do peptídeo.

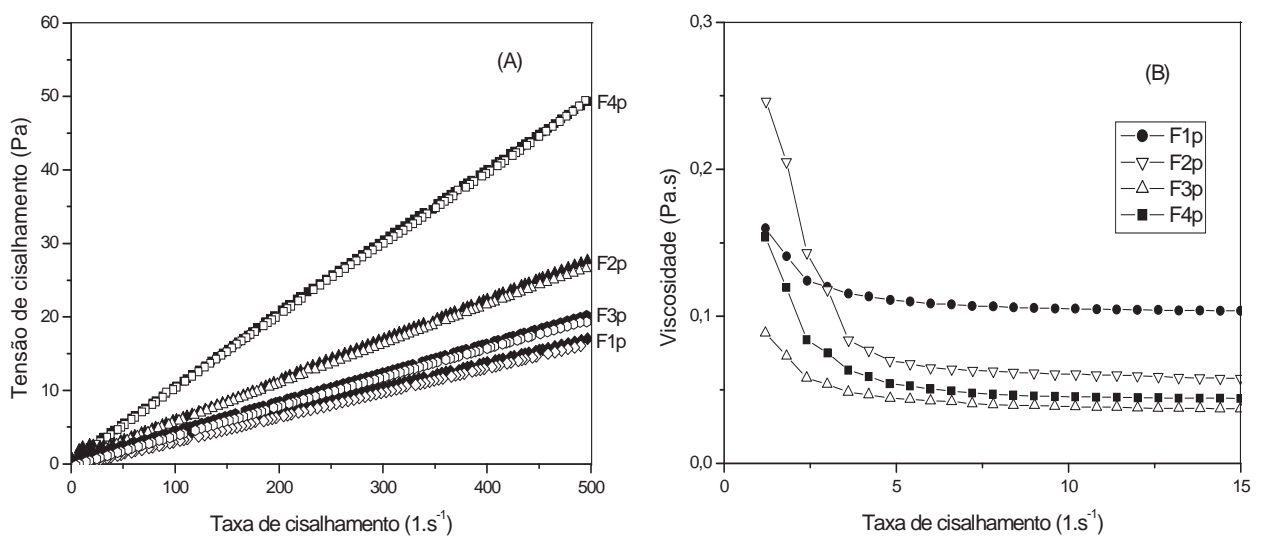


Figura 36. Reogramas de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento das formulações com peptídeo F1p, F2p, F3p e F4p a 25°C. Em (A), os símbolos fechados representam as curvas ascendentes, e os símbolos abertos representam as curvas descendentes.

Pela análise comparativa das Figuras 35A e 36A é possível notar que, a introdução do peptídeo nos sistemas não altera a estrutura de nenhum dos 4 sistemas. Em contrapartida, a Figura 35B já indica que a presença do peptídeo acarreta um aumento no tempo de diminuição da viscosidade em função da taxa de cisalhamento dos quatro sistemas, mostrando que o peptídeo foi incorporado aos 4 sistemas.

5.6. Ensaio de inibição de crescimento bacteriano

5.6.1. Ensaio de inibição com lipossomas

Os ensaios de inibição de crescimento bacteriano foram feitos de acordo com o método descrito no item 4.8.1 e os resultados referentes a esses experimentos estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Inibição do crescimento bacteriano por lipossoma contendo CcdBET2 $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Lipossoma		Inibição (%)	
Tipo	Diâmetro (nm)	Gram +	Gram -
SUV	200,9	58	75

Os resultados de inibição de crescimento de *Streptococcus agalactiae* (Gram positiva) e de *Salmonella typhimurium* (Gram negativa) mostram que o CcdBET2 a $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ encapsulado em lipossoma SUV é capaz de transpor a célula tanto de bactéria Gram positiva quanto de bactéria Gram negativa e promover, com isso, a morte do microrganismo, o que não ocorre com o peptídeo livre em solução.

É possível notar que a bactéria Gram negativa apresentou-se mais sensível do que a Gram positiva. Isso provavelmente é devido à diferença de estrutura e composição do revestimento desses dois tipos de bactérias, tanto em relação à

parede celular quanto em relação à membrana plasmática. As bactérias Gram positivas possuem uma parede celular bastante espessa formada de peptidoglicano e que atua como barreira, dificultando a entrada do peptídeo mesmo encapsulado em lipossoma. É possível também que os lipossomas não apresentem uma eficiente adesão à parede celular das bactérias Gram positivas, o que também pode diminuir a entrada do CcdBET2.

Em relação às bactérias Gram negativas, elas apresentam uma membrana externa e uma interna, separadas por uma delgada parede celular de peptidoglicano, ambas de natureza lipídica semelhante ao lipossoma, o qual possui em sua composição fundamental o fosfolípido fosfatidilcolina. Sua composição, inclusive, o torna uma vesícula mimética de membrana celular. A presença de uma membrana externa e um lipossoma a base de fosfolípido seguramente facilita sua adesão na célula bacteriana e, conseqüentemente, acaba facilitando a entrada do CcdBET2, o que pode explicar porque a inibição do crescimento da Gram negativa foi maior em relação à Gram positiva.

5.6.2. Ensaio de inibição com microemulsões

O ensaio de inibição de crescimento microbiológico foi realizado para testar a capacidade das microemulsões contendo ácido oléico em aumentar a permeabilidade ao CcdBET2. A conformação cis da molécula do ácido oléico modifica a bicamada lipídica de membrana, criando regiões descontínuas o que pode promover um aumento de permeabilidade (KOGAN e GARTI, 2006).

Apesar de promover aumento de permeabilidade, o ácido oléico também pode acabar matando a bactéria dependendo da proporção do composto em cada formulação. Para verificar se o ácido oléico é capaz de inibir o crescimento e em que proporção isto ocorre, foi realizado, na mesma placa, um ensaio contendo as quatro formulações sem peptídeo e as quatro formulações com peptídeo.

Foi utilizado para o teste de inibição de crescimento microbiológico um exemplo de bactéria Gram positiva (*Streptococcus agalactiae*) e um exemplo de bactéria Gram negativa (*Salmonella typhimurium*). Isso foi feito, para verificar o efeito da parede celular na inserção do peptídeo, bem como o efeito da quantidade de ácido oléico como inibidor de crescimento ou como agente facilitador na entrada do CcdBET2, nas diferentes bactérias.

O estudo limitou-se em aplicar o mimético CcdBET2 apenas na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, concentração inibitória mínima obtida nos testes de inibição de topoisomerasas. A intenção foi determinar se mesmo a esta baixa concentração, por ação do sistema microemulsionado, ocorreria a entrada do peptídeo e consequente morte do microrganismo. Os dados das Tabelas 10 e 11 mostram o comportamento inibitório de microemulsões isentas de peptídeo e com peptídeo, respectivamente

Tabela 10. Influência do ácido oléico (AO) na inibição do crescimento bacteriano.

Formulações	Composição	Inibição (%)	
		Gram +	Gram -
CcdBET2 ausente	Ácido oléico (%)		
F1	15	-	-
F2	20	12,9	25,5
F3	25	100	100
F4	30	100	100

Gram + : *Streptococcus agalactiae*; Gram - : *Salmonella typhimurium*;
(-) indica que não houve inibição do crescimento.

Tabela 11. Inibição do crescimento bacteriano por microemulsões contendo CcdBET2.

Formulações	Composição	Inibição (%)	
		Gram +	Gram -
CcdBET2 $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	Ácido oléico (%)		
F1p	15	-	75,5
F2p	20	15,8	100
F3p	25	100	100
F4p	30	100	100

Gram + : *Streptococcus agalactiae*; Gram - : *Salmonella typhimurium*;
(-) indica que não houve inibição do crescimento.

Os dados da Tabela 10 mostram que microemulsões contendo quantidades acima de 20% de ácido oléico inibem o crescimento bacteriano, chegando à inibição total já aos 25%, independentemente do tipo de bactéria, Gram positiva ou Gram negativa. Logo, microemulsões contendo ácido oléico a partir desta concentração, aparentemente atuam como agentes bactericidas. Por outro lado, microemulsões contendo até 15% de ácido oléico podem servir como sistemas transportadores de fármacos que possam atuar como antimicrobianos. Corroboram esta afirmação os dados obtidos na presença de CcdBET2 (Tabela 11). A incorporação deste

peptídeo, um agente bacteriostático (inibidor de topoisomerases bacteriana), à microemulsão contendo 15% de ácido oléico, resultou em inibição de crescimento bacteriano de 75,5% em bactéria Gram negativa, porém não exercendo qualquer efeito em bactéria Gram positiva.

Essa diferença de perfil inibitório de crescimento nos diferentes tipos de bactérias, pode ser explicada pela diferença da composição externa entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. As bactérias Gram positivas possuem uma parede celular mais espessa e muito mais complexa, o que pode ter impedido a entrada do análogo CcdBET2. Em contrapartida, as bactérias Gram negativas apresentam dois tipos de membranas, uma interna e outra externa, separadas por uma fina parede celular de peptidoglicano. Uma vez que o ácido oléico é capaz de perturbar a membrana e formar, com isso, espaços em sua estrutura, as bactérias Gram negativas ficam mais susceptíveis a um aumento de permeabilidade ao CcdBET2. Logo, microemulsões com ácido oléico a 15 % aumentam a permeabilidade de bactérias Gram negativas ao peptídeo CcdBET2, levando o microrganismo à morte.

A exemplo dos lipossomas, as microemulsões com ácido oléico a 15%, foram mais eficientes na inibição de crescimento de bactérias Gram negativas, inclusive com percentuais muito próximos, fato que fortalece a idéia de interação-permeação facilitada pelos próprios constituintes da membrana externa deste tipo de bactéria. Independentemente dos valores obtidos, a inibição de crescimento, não observada em ensaios empregando CcdBET2 livre em solução, obtida empregando diferentes sistemas de transporte, sinaliza para um estudo mais detalhado destes sistemas de transporte, no intuito de se obter uma composição capaz promover um transporte eficiente, liberação controlada e adequada deste peptídeo, potencializado assim sua atividade antimicrobiana.

6. Conclusões

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível elencar as seguintes conclusões:

- O novo análogo derivado da toxina CcdB, o CcdBdp1, sintetizado pela metodologia SPFS e purificado por RP-HPLC, não foi um bom inibidor, apresentando atividade inibitória da enzima DNA girase a uma concentração entre 200 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.
- Os análogos miméticos do ParE estudados neste trabalho, ParEdp1 e ParEdp2, não apresentam atividade inibitória da DNA girase e da Topo IV.
- A metodologia empregada na preparação de lipossomas do tipo SUV aumentou a eficiência de encapsulação de 15 para 77% para o CcdBET2 a 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.
- O análogo CcdBET2 incorporado em lipossomas é capaz de impedir o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, sendo que a inibição é mais proeminente para bactérias Gram negativas o que demonstra que lipossomas podem ser utilizados como agentes de internalização de peptídeos em bactérias.
- A partir dos dados obtidos com o diagrama de fases, as formulações contendo fosfatidilcolina de soja e Tween 20 como tensoativos, etanol como co-tensoativo, ácido oléico como fase oleosa e tampão Tris.HCl 10 mmol.L^{-1} pH 7,2 como fase aquosa formaram sistemas líquidos e transparentes do tipo microemulsão A/O na região do diagrama de fases caracterizado por apresentar sistemas com uma alta concentração de tensoativos.
- As fotomicrografias dos sistemas microemulsionados obtidos, indicam a ocorrência de campo escuro, característico de sistemas isotrópicos como microemulsões e/ou fases cúbicas.

- As microemulsões foram capazes de incorporar mais de 90 % do CcdBET2 em solução adicionado como parte da fase aquosa do sistema da microemulsão.
- As microemulsões com uma proporção de ácido oléico até 15 % não são capazes de inibir o crescimento bacteriano, mesmo contendo etanol em sua composição.
- O ensaio de inibição de crescimento envolvendo as microemulsões mostrou que a proporção do ácido oléico é fator determinante de inibição. A partir de 20 % de ácido oléico, o próprio sistema torna-se agente de inibição.
- Para os sistemas contendo até 15 % de ácido oléico e CcdBET2, foi possível, mesmo a uma baixa concentração de peptídeo, inibir o crescimento bacteriano, tanto para gram-positiva quanto para gram-negativa. Logo, é possível concluir que esses sistemas podem ser empregados como agentes promotores de permeabilidade para peptídeos

Referências

REFERÊNCIAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci**, v. 2, n. 3, p. 398-400, 2000.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. Resolucao – RE N° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 12 ago. 2010.

ALBERICIO, F.; LLOYD-WILLIAMS, P.; GIRALT, E. Convergent solid-phase peptide synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 289, p. 313-336, 1997.

AMBLARD, A.; FEHRENTZ, J.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. In How, J. (Ed.). **Methods in Molecular Biology: Peptide Synthesis and Applications**. Totowa: Humana Press, 2005. vol. 298, p. 3-24.

AUNGST, B. J.; ROGERS, N. J.; SHEFTER, E. Enhancement of naloxone penetration through human skin *in vitro* using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 33, p. 225-234, 1986.

BAHASSI, E. M.; SALMON, M. A.; VAN MELDEREN, L.; BERNARD, P.; COUTURIER, M. F plasmid CcdB killer protein: ccdB gene mutants coding for noncytotoxic proteins which retain their regulatory functions. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 1031-1037, 1995.

BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B.; MARCHETTO, R. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. **Bioinformatics** ^{JCR}, v. 4, n. 10, p. 438-440, 2010.

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.

BHARGAVA, H. N.; NARURKAR, A.; LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, v. 11, n. 3, p. 45-54, 1987.

BREUKINK, E.; GANZ, P.; KRUIJFF, B.; SEELIG, J. Binding of nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. **Biochemistry**, v. 39, p. 1024-1054, 2000.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed. Whitehouse Station, 1996.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000.

CRISONA, N. J.; STRICK, T. R.; BENSIMON, D.; CROQUETTE, V.; COZZARELLI, N. R. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. **Genes & Development**, v. 14, p. 2881-2892, 2000.

CUNHA JÚNIOR, A.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, p. 285-391, 2003.

DALTON, K. M.; CROSSON, S. A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex. **Biochemistry**, v. 49, p. 2205-2215, 2010.

DAO THI, M. H.; MESSENS, J.; WYNS, L.; BACKMANN, J. The thermodynamic stability of the proteins of the ccd plasmid addiction system. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 5, p. 1373-1386, 2000.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 29537-29544, 1996.

FANG, J. Y.; YU, S. Y.; WU, P. C.; HUANG, Y. B.; TSAI, Y. H. *In vitro* skin permeation of estradiol from various proniosome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 91-99, 2001.

FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO E ADITIVAÇÃO DE PRODUTOS PARENTERAIS. **Nutrição parenteral**: emulsões lipídicas TCM/TCL. 2008. Disponível em: <<http://www.famap.com.br/lipides.asp>>. Acesso em: 10 jan., 2008.

FIEBIG, A.; CASTRO ROJAS, C. M.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. **Molecular Microbiology**, v.77, p. 236-251, 2010.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

FORMARIZ, T. P. **Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *in vitro* através de cultura de células**. 2004. 199 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, p. 54-61, 2006.

FROKJAER, S.; HJORTH, E. L.; WORTS, O. Stability testing of liposomes during storage. In: GREGORIADIS, G. **Liposome technology**. Boca Raton: CRC, 1989. v.1, p. 241-243.

GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína Ccdb**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. DNA Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 11, p. 3872-3876, 1976.

GLATTER, O. **Small-angle-X-rays scattering**. London: Academic Press, 1982.

GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, v. 13, p. 6964-6971, 1997.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

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 and Chemotherapy**, v. 51, p. 181-187, 2007.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron system via optical methods. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 125-129, 1998.

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

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.

JENSEN, R. B.; GERDES, K. Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 205-210, 1995.

JIANG, Y.; POGLIANO, J.; HELINSKI, D. R.; KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of Escherichia coli gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 971-979, 2002.

JOHNSON, E. P.; STROM, A. R.; HELINSKI, D. R. Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 5, p.1420-1429, 1996.

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.

KAISER, E.; COLESCOT, R. 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, p. 595–598, 1970.

KENT, S. B. H. Chemical synthesis of peptides and proteins. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 5, p. 957-989, 1988.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Boca Raton: CRC, 1997.

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 *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 1667-1677, 1999.

LYKLEMA, J. **Fundamentals of interface and colloid science**. London: Academic Press, 1991. v.1.

MARANHÃO, R. C.; GARICOHEA, B.; SILVA, E. L.; LLACER, P. D.; PILEGGI, F. J. C.; CHAMONE, D. A. F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for treatment of the disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p.1033-1037, 1992.

NEW, R. R. C. Preparations of liposomes. In: **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990. p. 33-104.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, p.131-138, 2004.

ORTHABER, D.; GLATTER, O. Syntetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 107, p. 179-189, 2000.

PARK, M. K.; LEE, K. M.; HWANG, J. K.; KIM, K. C. Phosfolipid-based microemulsions flubiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 145-154, 1999.

REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 335-375, 1991.

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.

STEYAERT, J.; VAN MELDEREN, L.; BERNARD, P.; THI, M. H.; LORIS, R.; WYNS, L.; COUTURIER, M. Purification, circular dichroism analysis, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the F plasmid CcdB killer protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, p. 513-515, 1993.

TANOJO, H.; BOUWSTRA, J. A.; JUNGINGER, H. E.; BODDE, H. E. *In vitro* human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 42-49, 1997.

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

VAN MELDEREN, L.; BERNARD, P.; COUTURIER, M. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 1151-1157, 1994.

VAN MELDEREN, L.; THI, M. H. D.; LECCHI, P.; GOTTESMAN, S.; COUTURIER, M.; MAURIZI, M. R. ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease - Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 27730-27738, 1996.

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

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

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Vista Academies**, v. 3, p. 13-18, 2002.