

CAIO SILVEIRA FERMIANO DE PROFT

**SÍNTESE, ESTUDOS ESTRUTURAIS E DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE METALOPEPTÍDEOS
ESTRUTURALMENTE DERIVADOS DA TOXINA CcdB.**

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

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P962n Proft, Caio Silveira Fermiano de
Síntese, estudos estruturais e de atividades biológicas de
metalopectídeos estruturalmente derivados da toxina CcdB /
Caio Silveira Fermiano de Proft. – Araraquara : [s.n.], 2019
93 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Saulo Santesso Garrido

1. Bioquímica. 2. Peptídeos. 3. Inibidores enzimáticos.
4. Toxinas bacterianas. 5. Proteínas. I. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese, estudos estruturais e de atividades biológicas de metalopeptídeos estruturalmente derivados da toxina CcdB"

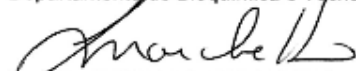
AUTOR: CAIO SILVEIRA FERMIANO DE PROFT

ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO

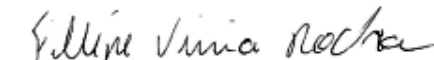
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. PHILLIPE VIEIRA ROCHA
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 27 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: Caio Silveira Fermiano de Proft

Nome em citações bibliográficas: PROFT, C.S.F.

Endereço: Av: Martinho Gerhard Rolfsen, nº 1027, casa 34 – Araraquara – SP
CEP 14801-070

Telefone: (16) 3331-6877 / (16) 98218-0541

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2017 - 2019** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Instituto de Química de Araraquara.
Título: Síntese de novos metalopeptídeos baseados na
estrutura da proteína CcdB com atividade antimicrobiana.
Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido.
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- 2011 - 2016** Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO, UNESP, BRASIL

- 2015 - 2016** Projeto de extensão “Inovação Tecnológica: Ferramenta
de Integração Ensino-Pesquisa. Interação AUIN-
Empresas Júnior.”
- 2013 - 2014** Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência
(PIBID).

- 2013 - 2015** Estagiário no Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis (CEMPEQC).
- 2012 - 2013** Monitor no Centro de Ciências de Araraquara (CCA) pelo projeto Ciência Viva.

Escola Cooperativa de Araraquara, COEDUCAR, Brasil

- 2016 - 2017** Professor estagiário nas disciplinas de Matemática, Física e Química para turmas do Ensino Fundamental II (6º ao 9º ano).

4. PRODUÇÕES

4.1 APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

- 1.** SPIANDORELLO, F. M.; RIBEIRO, S. J. L; **PROFT, C. S. F.**; ALMEIDA, L. M. C. G. Elaboração de perfis de tecnologia: uma ferramenta voltada para o marketing tecnológico. 2015.
- 2.** **PROFT, C. S. F.**; SOARES, P. D. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; TOZETTI, S. A. O. Relação dos estudantes com a Disciplina Escola Química. 2013.
- 3.** **PROFT, C. S. F.**. Uso da experimentação no ensino de Física: uma cadeira giratória explicando o conceito de momento angular. 2012.

4.2 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- 1.** 8º Congresso de Extensão Universitária da UNESP. Elaboração de perfis de tecnologia: uma ferramenta voltada para o marketing tecnológico. 2015.
- 2.** II Mostre UNESP. Elaboração de perfis de tecnologia: uma ferramenta voltada para o marketing tecnológico. 2015.
- 3.** XI Evento de Educação em Química (EVEQ) – Educação inclusiva: uma nova maneira de ensinar química. Relação dos estudantes com a Disciplina Escolar Química. 2013.
- 4.** II Congresso Paulista de Extensão 1º Congresso de Extensão Universitária da UNIFESP. Uso da exp experimentação no ensino de Física: uma cadeira giratória explicando o conceito de momento angular. 2012.

5. X Evento de Educação em Química (EVEQ). 2012.

5. IDIOMAS

1. Inglês: Intermediário
2. Espanhol: Intermediário

“Tente uma, duas, três vezes e, se possível, tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida e amada mãe Fernanda, por ter me proporcionado o dom da vida, por sempre fazer o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui e por sempre acreditar e apoiar os meus sonhos e decisões desde sempre. Você foi muito mais do que só mãe, você foi pai, mãe e uma guerreira que sempre buscou o melhor para os seus filhos, sem você eu não seria nada, te amo!!

À minha querida irmã Bruna, obrigado por sempre me apoiar e ajudar em todas as situações, agradeço a Deus por ter me concedido você como irmã e por sempre nossos caminhos estarem ligados, você é um grande exemplo para mim.

À minha amada noiva Ariane, obrigado por caminhar ao meu lado sempre, apoiando todas as minhas decisões, sendo sempre minha companheira e muitas vezes confidente. Obrigado por tudo que fez por mim durante todos estes anos, você é parte essencial de quem eu sou hoje. A vida é bem melhor ao seu lado!!

Aos meus amados avós Tereza e Osmar, sem vocês hoje eu não seria nada, obrigado por todos os cuidados e ensinamentos, especialmente a você meu avô, que sempre foi um pai para mim. Infelizmente você não está presente neste momento da minha vida, mas saiba que devo tudo isso a você, jamais existirá alguém como o senhor nesta vida, eu te amo!!

Ao meu querido tio Sérgio, que infelizmente não tive o prazer de viver muito tempo ao seu lado, mas que sempre foi um grande exemplo em minha vida e fonte de inspiração. Você estará eternamente em meu coração e em minhas lembranças!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido por todos os ensinamentos compartilhados nesses anos, por toda a compreensão e por proporcionar minha iniciação à vida científica e de pesquisa, sem dúvidas você possui papel importante nesta caminhada.

Aos meus amigos e parceiros de grupo de pesquisa por toda a ajuda nessa caminhada, agradeço por tudo que me ensinaram e compartilharam de conhecimentos comigo.

Aos meus amigos e irmãos de coração, Felipe, Rafael, Vitor e Douglas, que estão ao meu lado desde a infância ou desde a entrada no Instituto de Química, agradeço por toda a convivência e apoio em todas as circunstâncias.

A todos os funcionários da Seção técnica de Pós-Graduação pelo apoio e auxílio nessa caminhada.

A CNPq pela bolsa concedida nesse período.

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo de um mimético da proteína CcdB, o CcdBSG-2, para verificar a possibilidade de formação de um complexo metálico com o lantanídeo Tértio (III) e com o íon metálico Cobre (II), bem como avaliar o potencial dos complexos em inibir a atividade das enzimas bacterianas DNA-girase e Topoisomerase IV. Este peptídeo foi sintetizado pela metodologia de síntese em fase sólida (SPFS), purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e identificado por espectrometria de massas (LC/ESI-MS). Posteriormente o peptídeo foi complexado com 3 equivalentes molares de Cu(II) e Tb(III) e acompanhou-se as alterações nos espectros de absorção e emissão de fluorescência do peptídeo e espectroscopia de luminescência após a adição dos metais. Estes mesmos estudos espectroscópicos foram realizados em função do tempo para verificar o intervalo necessário para a formação de cada complexo metal-peptídeo. Foram realizados também estudos de caracterização estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular, avaliando o peptídeo na presença e ausência dos metais. Para avaliar o potencial de inibição dos peptídeos, utilizou-se ensaios de eletroforese em gel de agarose frente as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV e ensaios de crescimento bacteriano em meio líquido frente as bactérias *Escherichia coli* enterohemorrágica e *Staphylococcus aureus*. Ambos os testes para avaliar o potencial de inibição mostraram que os metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2 apresentam uma atividade cerca de três vezes maior que o peptídeo CcdBSG-2 na ausência do metal. Estes resultados importantes indicam que o aumento do potencial inibitório está relacionado com um sinergismo criado entre os metais e CcdBSG-2.

Palavras-chave: CcdB, DNA girase, Inibidores peptídicos de topoisomerases, Metalopeptídeos.

ABSTRACT

The present work describes the study of a mimetic of the protein CcdB, the CcdBSG-2, to verify the possibility of formation of a metallic complex with the lanthanide Terbium (III) and with the metallic ion Copper (II), as well as to evaluate the potential of the complexes in inhibiting the activity of bacterial enzymes DNA-gyrase and Topoisomerase IV. This peptide was synthesized by the methodology of solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by mass spectrometry (LC / ESI-MS). Later the peptide was complexed with 3 molar equivalents of Cu (II) and Tb (III), followed by changes in the spectra of absorption and emission of fluorescence of the peptide and luminescence spectroscopy after the addition of the metals. These same spectroscopic studies were performed as a function of time to verify the interval required for the formation of each metal-peptide complex. Structural characterization studies were also performed by circular dichroism spectroscopy, evaluating the peptide in the presence and absence of metals. To evaluate the inhibition potential, electrophoresis and bacterial growth assays were used in liquid medium against the peptides produced. Both tests to assess the inhibition potential showed that the Tb (III) -CcdBSG-2 and Cu (II) - CcdBSG-2 metallopeptides exhibit about three times greater activity than the CcdBSG-2 peptide in the absence of the metal. These important results indicate that the increase in inhibitory potential is related to a synergism created between the metals and CcdBSG-2.

Keywords: CcdB, DNA-gyrase, Peptide inhibitors of topoisomerases, Metallopeptides.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo da reação entre topoisomerase e DNA para quebra transitória e restauração da fita de DNA.....	22
Figura 2 - Esquema das subunidades A e B pertencentes à DNA girase.....	24
Figura 3 - Representação esquemática da formação do complexo estável toxina-antitoxina em um sistema TA do tipo II. Sob condições normais de crescimento o complexo é formado. Já em condições de estresse proteases celulares degradam a antitoxina permitindo que a toxina exerça sua toxicidade.	28
Figura 4 - Estrutura primária do CcdB e do CcdA.....	29
Figura 5 - Estrutura Cristalina do complexo girase-CcdB. A estrutura da esquerda representa GyrA em sua conformação fechada. A estrutura da direita representa as mudanças conformacionais em GyrA após ligação do CcdB. A abertura na interface superior do dímero propicia um amplo espaço para que o dímero de CcdB possa se acomodar. A α -hélice C terminal do CcdB encontra-se próxima ao resíduo Arg462 de GyrA. A ligação de CcdB à GyrA previne seu fechamento e consequentemente a religação ao DNA, resultando num complexo bloqueado.....	31
Figura 6 - Sequência de aminoácidos do CcdB alinhado com sua estrutura secundária. As setas em vermelho representam as cinco folhas- β principais da estrutura, enquanto as setas em azul representam as três fitas menores que formam uma “asa” para fora da molécula. Já a área em destaque amarelo representa a única α -hélice da estrutura.	32
Figura 7 - Sequência primária dos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo CcdB-SG2.....	32
Figura 8 - Reação dos aminos grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.....	35
Figura 9 - Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina, enquanto os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais.	37
Figura 10 - Protocolo utilizado para Síntese em Fase Sólida (SPFS).	44
Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo CcdBSG-2, antes (A) e após (B) o processo de purificação.....	60
Figura 12 - Espectro de massas do peptídeo CcdBSG-2 obtido após purificação.....	61
Figura 13 - Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo CcdBSG-2 20 μ M após adição de quantidades crescentes de Tb(III).	62
Figura 14 - Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo CcdBSG-2 20 μ M após adição de quantidades crescentes de Cu(II)	62
Figura 15 - Espectros de absorção na região UV-Vis do peptídeo CcdBSG-2 20 μ mol.L ⁻¹ e dos complexos formados com adição de três equivalentes molares dos metais Tb(III) e Cu(II).....	63
Figura 16 - Espectros de fluorescência em função do tempo para o complexo (A) Tb(III)-CcdBSG-2 e (B) Cu(II)-CcdBSG-2	64
Figura 17 - Interação do CcdBSG-2 com Cu(II) (▪) e Tb(III) (□) a 25 °C. Cu(II) ou Tb(III) (0.5 a 5 equivalentes) foram adicionados a uma solução 20 μ M de CcdBSG-2 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, após cada adição.	65
Figura 18 - Efeito da temperatura na interação do CcdBSG-2 com Cu(II). Cu(II) (0,5 a 5 equivalentes molares) foi adicionado a uma solução de 20 μ M de CcdBSG-2 e a	

fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a 25°C (□) e 45°C (▪)..... 67

Figura 19 - Efeito da temperatura na interação do CcdBSG-2 com Tb(III). Tb(III) (0,5 a e 5 equivalentes molares) foi adicionado a uma solução de 20 µM de CcdBSG-2 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a 25°C (□) e 45°C (▪)..... 68

Figura 20 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e o peptídeo CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µmol/L, respectivamente. 69

Figura 21 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e o peptídeo CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µmol/L, respectivamente. 69

Figura 22 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo complexo Cu(II)-CcdBSG-2 em (A) e pelo complexo Tb(III)-CcdBSG-2 em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e os complexos de CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µmol/L, respectivamente. 70

Figura 23 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo complexo Cu(II)-CcdBSG-2 em (A) e pelo complexo Tb(III)-CcdBSG-2 em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e os complexos de CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µmol/L, respectivamente. 71

Figura 24 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo metal Tb(III) em (A) e pelo metal Cu(II) em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e os metais Tb(III) e Cu(II). Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos equivalentes molares utilizados nas concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µmol/L, respectivamente. 72

Figura 25 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo metal Tb(III) em (A) e pelo metal Cu(II) em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 µL, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e os metais Tb(III) e Cu(II). Os

números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos equivalentes molares utilizados nas concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.	72
Figura 26 - Resultados obtidos utilizando <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).Cada agrupamento de barras representa uma concentração diferente utilizada no ensaio microbiológico.	76
Figura 27 - Resultados obtidos utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> . Cada agrupamento de barras representa uma concentração diferente utilizada no ensaio microbiológico.	77
Figura 28 - Espectro de CD característicos das estruturas secundárias α -hélice, folha β e estrutura randômica.	80
Figura 29 - Espectros de CD do peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em (A) tampão HEPES 1 mmol.L^{-1} , (B) TFE 60% e (C) SDS 15 mmol.L^{-1}	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos tampões de diluição e de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática frente a DNA girase.....	48
Tabela 2 - Composição dos tampões de diluição e de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática frente a Topoisomerase IV.....	49
Tabela 3 - Composição dos tubos para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios de inibição enzimática. Para as frações envolvidas na complexação utilizou-se as soluções de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ e $CuCl_2$, respectivamente.	50
Tabela 4 - Composição dos peptídeos utilizados para o ensaio de crescimento bacteriano em diferentes concentrações, considerando o volume final de 400 μ L e realizando as diluições a partir da solução inicial passada por extrusão com lipossomas.....	55
Tabela 5 - Massas obtidas após o processo de síntese, clivagem e purificação do peptídeo CcdBSG-2.....	59
Tabela 6 - Porcentual da atividade hemolítica para o peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2.....	73
Tabela 7 - Resultados das absorvâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizando CcdBSG-2 e seus complexos.....	75
Tabela 8 - Resultados das absorvâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando CcdBSG-2 e seus complexos.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A) – Alanina

Arg (R) – Arginina

Asn (N) – Asparagina

Asp (D) – Ácido Aspártico

Cys (C) – Cisteína

Gln (Q) – Glutamina

Glu (E) – Ácido Glutâmico

Gly (G) – Glicina

His (H) – Histidina

Ile (I) – Isoleucina

Leu (L) – Leucina

Lys (K) – Lisina

Met (M) – Metionina

Phe (F) – Fenilalanina

Pro (P) – Prolina

Ser (S) – Serina

Thr (T) – Treonina

Trp (W) – Triptofano

Tyr (Y) – Tirosina

Val (V) - Valina

2. Outras

ACN - Acetonitrila

CD – Dicroísmo circular

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCM - Diclorometano

DIC - Diisopropilcarbodiimida

DMF - Dimetilformamida

EDT - 1,2-Etanoditiol

Fmoc - 9-Fluorenilmetiloxycarbonila

HOAt - N-Hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt - N-Hidroxibenzotriazol

ESI-MS - Eletron Spray ionization-Mass spectrometry

MLV - Multilamellar Large Vesicles

PEG - Polietilenoglicol

PSK - Morte pós-segregacioal

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

SUV - Small Unilamellar Vesicles

TA - Toxina/Antitoxina

tBu - terc-Butila

TFA - Ácido Trifluoracético

TIS - Triisopropilsilano

UV-vis - Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

Sumário

1	Introdução.....	19
1.1	DNA topoisomerases.....	20
1.2	Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)	25
1.3	Sistema toxina-antitoxina tipo II	27
1.4	A toxina natural CcdB.....	28
1.5	O análogo peptídico CcdBSG-2.....	32
1.6	Síntese de peptídeos.....	34
1.7	Incorporação de metais em fármacos.....	37
2	Objetivos	41
3	Material e Métodos.....	43
3.1	Síntese do peptídeo CcdB-SG2.....	43
3.2	Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado	45
3.3	Preparo e caracterização dos metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdbSG-2	47
3.4	Ensaio de inibição enzimática.....	48
3.5	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica	51
3.6	Ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizando peptídeos encapsulados em lipossomas.....	52
3.7	Dicroísmo Circular	56
4	Resultados e Discussões.....	59
4.1	Síntese, purificação e caracterização do peptídeo CcdBSG-2.....	59
4.2	Preparo e caracterização dos metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdbSG-2	61
4.3	Ensaio de inibição enzimática.....	68
4.4	Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica	73
4.5	Ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido.....	74
4.6	Dicroísmo Circular	79
5	Conclusões.....	84
6	Referências.....	87

Introdução

1 Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes para a sociedade, pois muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes (LOUREIRO, 2016). O processo de resistência bacteriana pode ser considerado um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (GUIMARÃES, 2010), mas que vem sendo drasticamente acelerado pelo uso inadequado e intensivo dos mesmos. Estima-se que aproximadamente metade dos antibióticos consumidos no mundo são desnecessários, sendo que em muitos países a venda destes medicamentos é feita sem a necessidade de uma receita médica ou por pessoas sem a formação profissional adequada (WHO, 2005). Além das consequências clínicas causadas pela resistência aos antibióticos, como o aumento da morbidade e mortalidade, há ainda as consequências econômicas, já que os custos com os cuidados da saúde acabam se tornando maiores e algumas vezes superam os recursos destinados a essa área, situação indesejada diante da crise econômica vivida pelo nosso país e por tantos outros ao redor do mundo. Para se ter uma ideia, segundo Novaretti, Aquino e Piscopo (2014, p. 27) nos EUA a resistência bacteriana aos antibióticos custa de 4 a 5 bilhões de dólares ao ano e na Europa 9 bilhões de euros para o mesmo período.

Diante dessa problemática torna-se fundamental a busca por novos compostos no combate às doenças infecciosas, principalmente aqueles com menor suscetibilidade à resistência bacteriana (LOHNER & STAUDEGGER, 2001) e que tenham novos mecanismos de ação antibiótica (GARRIDO, 2007), pois, como afirma Mills (2006, p.1096), dos dez antibióticos aprovados desde 1998, apenas dois apresentaram novos mecanismos.

Uma alternativa que vem sendo considerada como uma promessa para superar esses problemas citados acima são as toxinas naturais encontradas em organismos vivos, pois atuam em uma grande variedade de agentes

antimicrobianos e possuem diversos mecanismos de ação, tornando-os assim uma boa opção para o desenvolvimento de novas classes de antibióticos (LIBARDO e col., 2014).

No mundo invisível dos microrganismos, a busca por nutrientes e a superpopulação formada por diferentes bactérias, conduz a várias estratégias para assegurar a sobrevivência de uma espécie e do seu domínio sobre outras, sendo uma delas a secreção de antibióticos para matar, ou inibir o crescimento de outras espécies de bactérias. A elucidação das estruturas desses antibióticos, além dos seus mecanismos de ação, ao longo desses anos, tem revelado aspectos fascinantes de bioquímica e regulação genética em células procarióticas e, também, facilitando a produção de novas drogas mais efetivas.

Como exemplo dessas novas drogas que vem sendo estudadas, destacam-se os peptídeos miméticos da toxina bacteriana CcdB que estão sendo utilizados para o “design” e síntese de novos fármacos com aplicação na área da saúde, sendo esta toxina componente do sistema toxina-antitoxina (TA) ccd.

1.1 DNA topoisomerases

As DNA topoisomerases são um grupo de enzimas presentes tanto em células procarióticas, quanto eucarióticas, capazes de gerar mudanças topológicas no DNA e que atualmente vem sendo estudadas como alvo de agentes terapêuticos no combate a diversas doenças (CHAMPOUX, 2001).

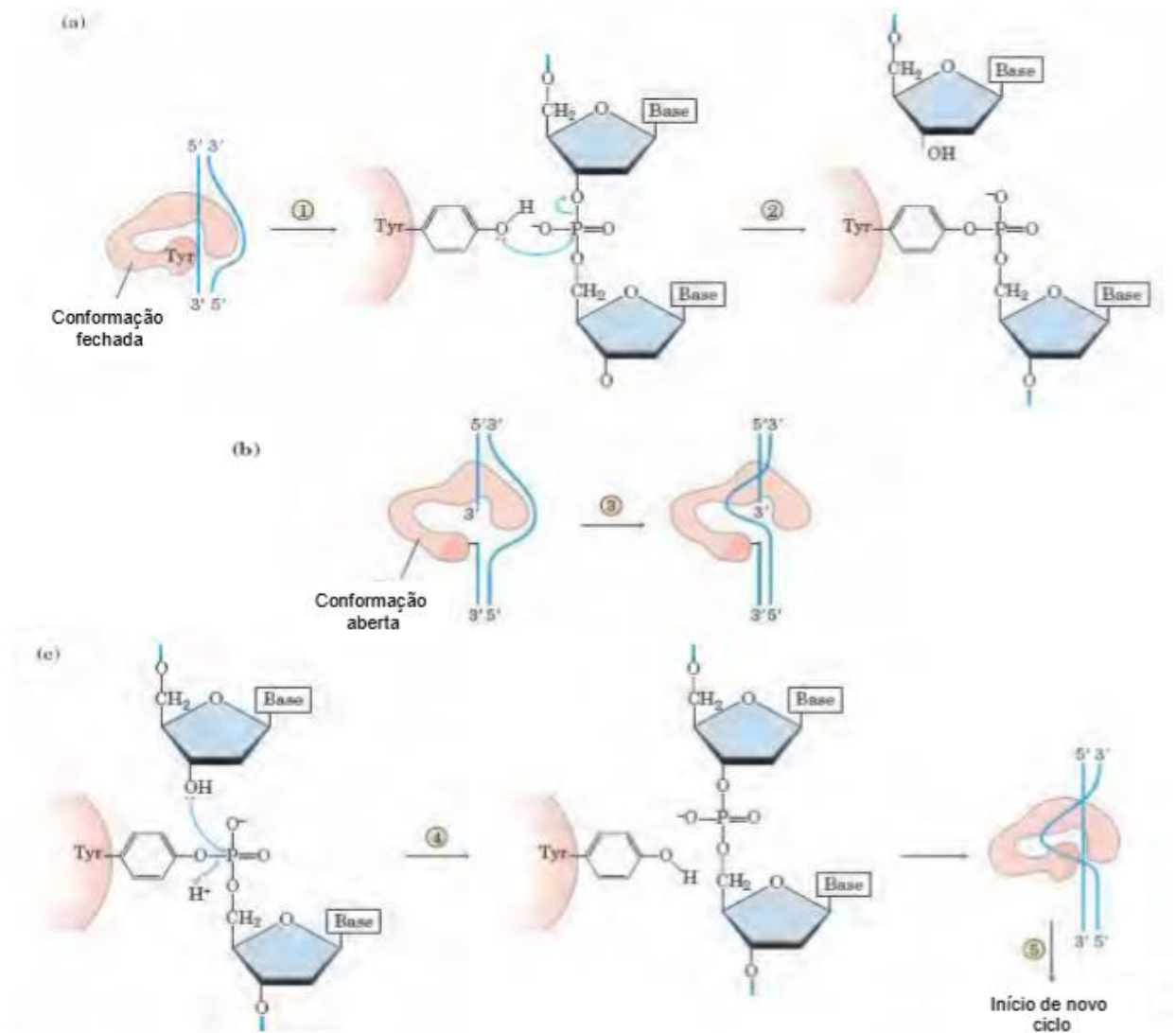
Estas enzimas participam de diversos processos celulares, como replicação, transcrição, recombinação e segregação dos cromossomos através de um processo de clivagem e ligação de uma ou ambas as fitas do DNA (CHAMPOUX, 2001). Além disso, são responsáveis por catalisar diversas reações essenciais ao DNA, como o relaxamento, superenovelamento negativo e positivo e seu encadeamento e desencadeamento (WANG, 2002).

Por serem capazes de clivar uma ou ambas as fitas de DNA, as topoisomerases podem ser divididas em duas categorias: topoisomerases do tipo I e topoisomerases do tipo II. As topoisomerases do tipo I promovem a

clivagem de apenas uma fita do DNA permitindo que a fita intacta passe por esta quebra e sejam então religadas. Já as topoisomerases do tipo II promovem a clivagem das duas fitas complementares do DNA duplex, permitindo a passagem de um outro segmento de DNA duplex e seu posterior religamento (WANG, 1996).

Independente de qual a categoria da topoisomerase, seu mecanismo de ação se baseia em uma reação de transesterificação entre enzima e DNA. Na reação de quebra da fita do DNA, o par de elétrons livre do oxigênio fenólico do resíduo de tirosina presente na enzima ataca o átomo de fósforo do DNA, formando uma ligação covalente com ele e levando a quebra da ligação fosfodiéster do DNA simultaneamente (**Figura 1**). O religamento da fita de DNA acontece através de uma segunda transesterificação, que é basicamente o inverso da primeira reação. Nesta etapa o par de elétrons livres presente no grupo hidroxila do DNA, gerado na primeira reação, ataca o átomo de fósforo da ligação covalente fósfo-tirosina levando a quebra desta e restaurando a ligação da estrutura original de DNA (WANG, 2002).

Figura 1 - Mecanismo da reação entre topoisomerase e DNA para quebra transitória e restauração da fita de DNA.



Fonte: Garrido (2007).

Dentre as diversas topoisomerases existentes, destacam-se duas enzimas encontradas em *Escherichia coli*, DNA girase e Topoisomerase IV, ambas classificadas como topoisomerases do tipo II.

A DNA girase é a única topoisomerase conhecida capaz de gerar superenovelamento negativo à custa da hidrólise de ATP e é responsável pela geração global de superenovelamento negativo em cromossomos bacterianos (CHAMPOUX, 2002). Além disso, por estar presente apenas em organismos procariotos apresenta grande importância como alvo de agentes antimicrobianos (GARRIDO, 2007), podendo-se destacar as drogas dos tipos quinolonas e

cumarinas que atuam inibindo a reação de superenovelamento do DNA (ALI e col., 1992).

A estrutura da DNA girase é formada por duas subunidades A e duas B, ambas proteínas e codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente (SWANBERG; WANG, 1987). Estas subunidades se organizam de forma a estabelecer uma estrutura de heterotetrâmero, A_2B_2 , que representa a forma ativa desta enzima (KLEVAN; WANG, 1980; WIGLEY, 1995).

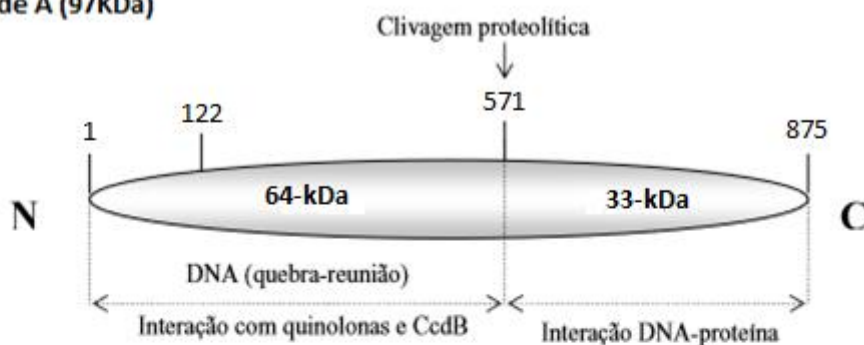
A subunidade A da DNA girase possui massa molecular de 97KDa e é formada por dois domínios, um domínio N-terminal com peso molecular de 64KDa e um domínio C-terminal com massa molecular de 33KDa (REECE; MAXWELL, 1989).

O domínio N-terminal apresenta o resíduo Tyr-122 que é responsável pelo ciclo quebra-união do DNA realizando uma ligação covalente à extremidade 5' do DNA quando a DNA girase cliva o DNA (HOROWITZ; WANG, 1986). Além disso, este domínio é responsável por auxiliar no superenovelamento do DNA e possui resíduos envolvidos na interação com as drogas quinolonas e o CcdB (REECE; MAXWELL, 1989; REECE; MAXWELL, 1991). Já o domínio C-terminal é responsável pela interação com o DNA durante a ação enzimática (REECE; MAXWELL, 1989).

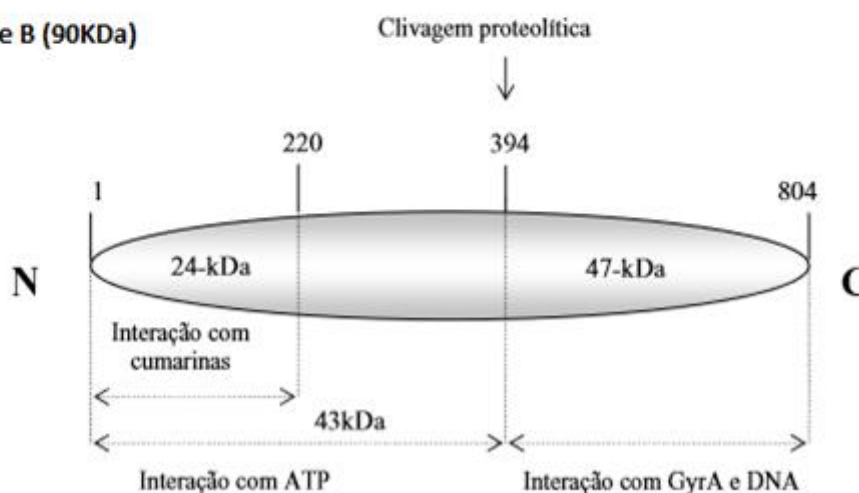
A subunidade B da DNA girase possui massa molecular de 90KDa e assim como a subunidade A, apresenta dois domínios, um domínio N-terminal de 43 KDa que apresenta a função de ATPase e o sítio de ligação com as drogas cumarinas (MAXWELL; GELLERT, 1984; ALI e col., 1992), e um domínio C-terminal de 47KDa responsável pela interação com a subunidade A e o DNA (BROWN e col., 1979; ALI e col., 1992).

Figura 2 - Esquema das subunidades A e B pertencentes à DNA girase.

Subunidade A (97KDa)



Subunidade B (90KDa)



Fonte: Adaptado de Marchetto (2006).

Já a Topoisomerase IV é uma enzima homóloga a DNA girase, descoberta por Kato e colaboradores em 1990 (DRLICA; ZHAO, 1997). Assim como a DNA girase, a topoisomerase IV é composta por quatro subunidades, duas chamadas ParC e duas chamadas ParE, sendo estas subunidades homólogas as subunidades A e B da DNA girase, respectivamente (KATO e col., 1990).

Como ambas as topoisomerases são do tipo II, é evidente que elas apresentem características bioquímicas semelhantes, porém, o mecanismo de ligação dessas duas enzimas ao DNA mostra-se diferente. Enquanto a DNA girase se liga ao DNA envolvendo-o em si mesma, a topoisomerase IV não o faz (PENG; MARIANS, 1995).

Uma outra diferença importante que pode ser ressaltada entre essas duas topoisomerases é o fato da topoisomerase IV apresentar atividade apenas no relaxamento do DNA e não em seu superenovelamento, como apenas a enzima DNA girase apresenta. Além disso, a topoisomerase IV se mostra como a única enzima presente em *Escherichia Coli* capaz de relaxar o DNA superenrolado positivamente (KATO e col., 1992).

Dessa forma, ambas as topoisomerases apresentadas se mostram como alvos intracelulares efetivos de agentes terapêuticos, como as drogas cumarinas e quinolonas (ALI e col., 1992) e alguns peptídeos produzidos por microrganismos, como o CcdB e seus derivados (BERNARD & COUTURIER, 1992; GARRIDO, 2007; TROVATTI e col., 2008). Assim sendo, torna-se de grande importância o estudo e compreensão do mecanismo de ação dessas drogas, bem como o desenvolvimento de novas drogas que possam atuar sobre esses alvos.

1.2 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)

Os sistemas TA são amplamente difundidos em procariotos, sendo encontrados nos plasmídeos e nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias (PANDEY; GERDES, 2005). Como o próprio nome sugere, sistemas TA são compostos por uma toxina, que é sempre uma proteína, e por uma antitoxina, podendo ser um RNA ou uma proteína, formando juntos um complexo estável que previne a toxina de exercer sua toxicidade em células que crescem normalmente (YAMAGUCHI e col., 2011). Entretanto, por serem mais suscetíveis a degradação por proteases e RNases, as antitoxinas possuem sua estabilidade substancialmente menor que as toxinas, sendo necessário a síntese constante de antitoxinas para que a função das toxinas seja inibida nas células com crescimento normal (YAMAGUCHI e col., 2009).

Tais sistemas são importantes, pois participam do controle de crescimento e morte celular, mas também atuam em importantes eventos na fisiologia das células, como a formação de células persistentes (MAISONNEUVE e col., 2011), resistência a situações de estresse (AIZENMAN e col., 1996), proteção contra

bacteriófagos (FINERAN e col., 2009) e formação de biofilme (WANG; WOOD, 2011).

Quase todas as bactérias possuem um gene que codifica pequenas toxinas proteicas com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos em seu comprimento. Tais toxinas podem inibir o crescimento celular por atuarem especificamente em uma molécula chave responsável por um processo celular crucial, como a inibição da DNA-girase, a estabilidade do mRNA, a síntese proteica, a biossíntese da parede celular e a síntese de ATP (PANDEY & GERDES, 2005; SHAO e col., 2011).

Atualmente são conhecidos milhares de sistemas TA, sendo estes sistemas divididos em seis classes que se baseiam no mecanismo utilizado pela antitoxina para a inibição da toxina (PAGE; PETI, 2016). Nos sistemas do tipo I, a antitoxina é um RNA antisense que se liga ao RNA mensageiro (mRNA) da toxina e inibe a sua translação (FOZO e col., 2010). Já nos sistemas do tipo III, a antitoxina também é um RNA, mas não um RNA antisense. Neste tipo de sistema a antitoxina forma um “pseudoknot” e se liga diretamente a toxina inativando-a (PAGE, 2016).

Nos sistemas do tipo II, IV, V e VI, tanto toxina quanto antitoxina são proteínas, mas cada um desses sistemas apresenta um mecanismo de inibição da toxina diferente. Enquanto nos sistemas do tipo II a toxina é inibida pela formação de um complexo com a antitoxina (BERNARD e col., 1993), nos sistemas do tipo IV, toxina e antitoxina não interagem, a inibição da toxina acontece pela interação da antitoxina com seu alvo (MASUDA e col., 2012). Por fim, nos sistemas do tipo V a antitoxina cliva o RNA mensageiro (mRNA) da toxina impossibilitando sua expressão (WANG, 2012), enquanto nos sistemas do tipo VI a antitoxina atua como um adaptador para que a protease ClpXP degrade a toxina (AAKRE e col., 2013).

1.3 Sistema toxina-antitoxina tipo II

Os sistemas toxina-antitoxina do tipo II, descobertos nos anos 1980, são os maiores e mais estudados sistemas TA, sendo tipicamente formados por dois pequenos genes organizados em um único operon que codifica tanto toxina quanto antitoxina (LEPLAE, 2011).

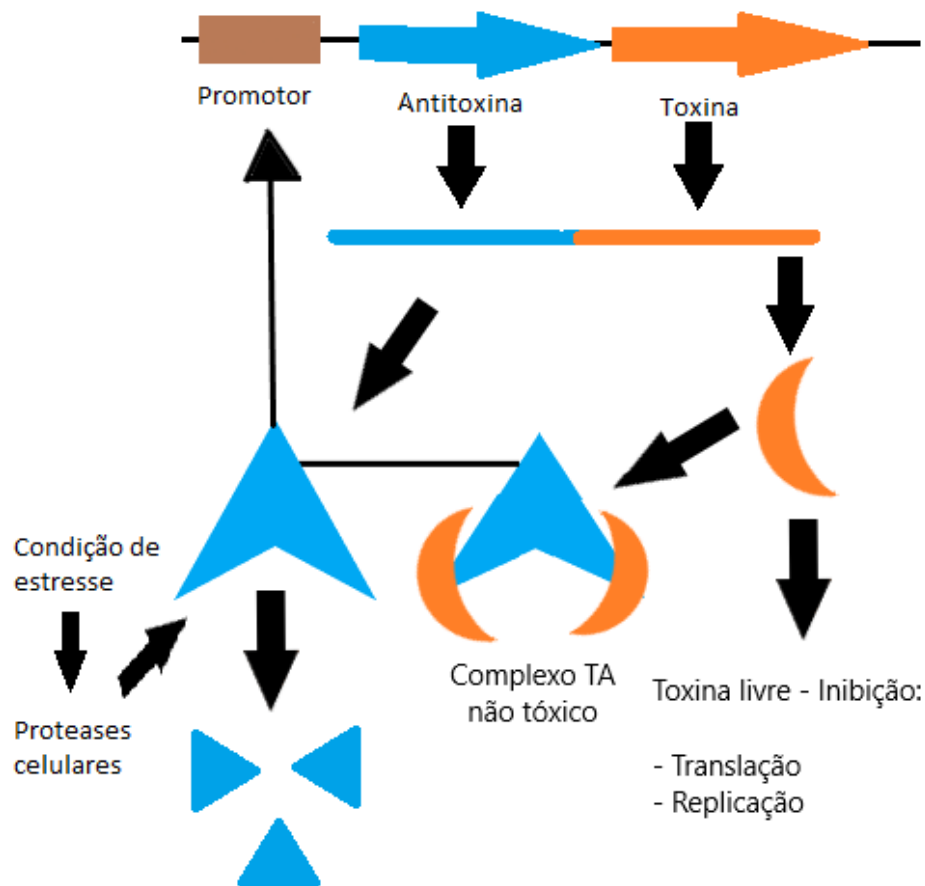
Em geral, as antitoxinas são formadas por dois domínios, um domínio N-terminal responsável pela ligação com o DNA e um domínio C-terminal responsável pela interação e inibição da toxina. Já as toxinas são proteínas pequenas e estáveis que inibem a replicação através da interação com a DNA girase, ou então a translação pela clivagem do RNA mensageiro (mRNA) (LEPLAE, 2011).

A toxina e sua antitoxina formam um complexo estável sob condições normais de crescimento impedindo a toxina de exercer sua função, porém, sob condições de estresse, as antitoxinas são degradadas por proteases e liberam a toxina do complexo permitindo que ela ataque seu alvo celular resultando na interrupção do crescimento celular ou então à morte celular (BARBOSA, 2014; PAGE, 2016).

Os sistemas toxina-antitoxina do tipo II estão diretamente ligados com a manutenção dos plasmídeos (LEPLAE, 2011). Para garantir que não sejam produzidas células sem plasmídeo, estes sistemas desenvolveram um mecanismo chamado morte pós-segregacional (PSK), o qual garante que apenas as células filhas que receberam uma cópia do plasmídeo durante a divisão celular sobrevivam, uma vez que apenas essas células são capazes de sintetizar a toxina e a antitoxina (YARMOLINSKY, 1995; LEPLAE, 2011).

Segundo Leplae (2011, p. 13) os sistemas toxina-antitoxina do tipo II estão ainda divididos em 12 superfamílias de toxinas e 20 superfamílias de antitoxinas, sendo a toxina CcdB, alvo de estudo desde trabalho, pertencente a superfamília CcdB/MazF.

Figura 3 - Representação esquemática da formação do complexo estável toxina-antitoxina em um sistema TA do tipo II. Sob condições normais de crescimento o complexo é formado. Já em condições de estresse proteases celulares degradam a antitoxina permitindo que a toxina exerça sua toxicidade.



Fonte: Adaptado de Page (2016).

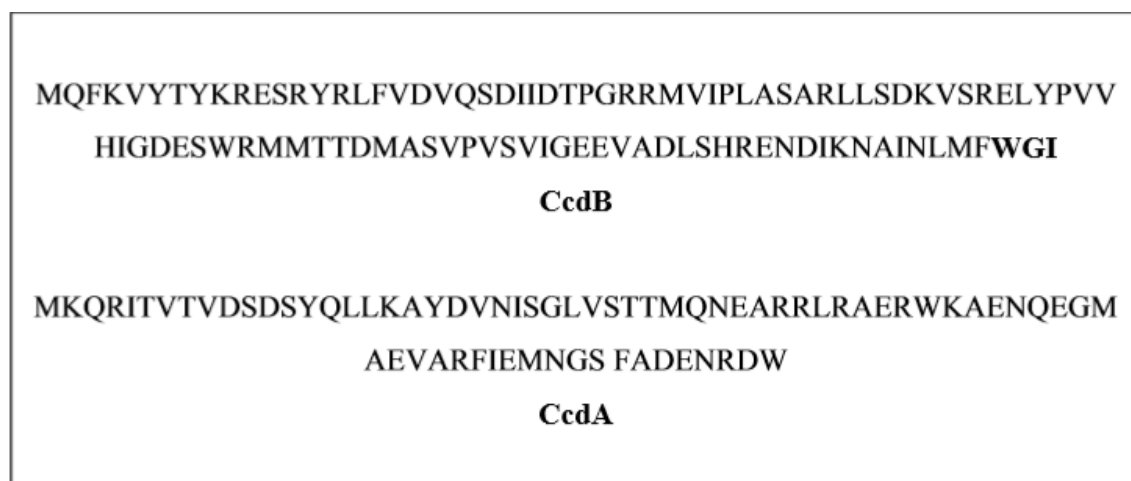
1.4 A toxina natural CcdB

A toxina natural CcdB é uma proteína de 11,7 kDa, composta por uma sequência de 101 resíduos de aminoácidos, a qual é codificada a partir do *locus ccd* presente no Plasmídeo F de algumas linhagens de *Escherichia coli* (HIRAGA e col., 1986; GARRIDO, 2007;). O mecanismo de síntese da toxina CcdB é controlado pelos genes *ccdA* e *ccdB* (HIRAGA e col., 1986), os quais sintetizam a proteína CcdB, que é a toxina, e também a proteína CcdA, a qual é a antitoxina, constituindo juntas, um sistema toxina/antitoxina (TA) conhecido como CcdB/CcdA.

Este sistema está presente em um número pequeno de células, mas se mantém conservado nas linhagens bacterianas por possuir um sistema que permite sua distribuição entre as células filhas durante a divisão celular e por codificar um sistema de morte celular programada que causa a morte das células que não o recebem.

Neste mecanismo, enquanto o CcdB atua como uma toxina capaz de inibir a divisão celular, o CcdA, uma proteína de 8,7 kDa composta por uma sequência de 72 resíduos de aminoácidos, atua como uma antitoxina suprimindo a função tóxica do CcdB (HIRAGA e col., 1986). Quando o CcdA não está presente, por ser rapidamente degradado devido a sua estabilidade, o CcdB pode matar a bactéria através de um mecanismo que envolve a enzima DNA girase (GARRIDO, 2007).

Figura 4 - Estrutura primária do CcdB e do CcdA.



Fonte: Garrido (2007).

Bernard e Couturier (1992), descreveram o isolamento, localização, sequenciamento e propriedades de bactérias mutantes resistentes a atividade citotóxica do CcdB, levando assim às primeiras evidências do modo de ação do CcdB sobre a DNA girase.

A ação da toxina CcdB se dá pela formação do complexo ternário estável entre CcdB-Girase-DNA, o qual inibe a atuação da enzima DNA girase induzindo a clivagem do DNA, além de formar uma espécie de barreira que impede a transcrição pela T7 RNA polimerase (CRITCHLOW e col., 1997). Esse modo de

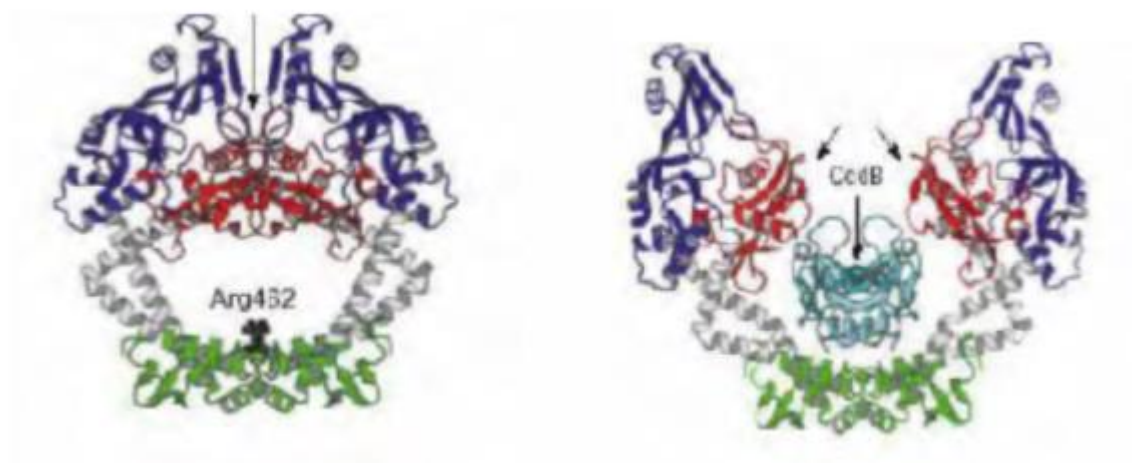
ação se assemelha muito aos antibióticos da classe das quinolonas por formar o complexo ternário estável citado acima, mas se diferencia principalmente pelo local de interação com a enzima, a necessidade de ATP para a clivagem de DNA que não apresenta torção (linear ou relaxado) pelo CcdB e o tamanho mínimo do fragmento de DNA para que ocorra a clivagem (CRITCHLOW e col., 1997).

Um fato interessante que se deve notar entre o CcdB e as drogas quinolonas é que mutações na subunidade A da girase conferem resistência as drogas quinolonas, mas não afetam o CcdB, sugerindo que por mais que ambas se liguem a subunidade A da girase, o sítio de interação destas com a subunidade é diferente (BERNARD; COUTURIER, 1992).

Estudos feitos por Kampranis e colaboradores (1999), mostraram que existem dois complexos formados pela interação entre CcdB-Girase, um chamado α e outro chamado β . O complexo α se dá pela interação do CcdB com a subunidade A da DNA girase e não apresenta efeito na taxa de hidrólise de ATP e na inibição da reação de superenovelamento. Quando este complexo está na presença de ATP, DNA e da subunidade B da DNA-girase, ele é convertido lentamente para o complexo β , o qual apresenta uma taxa de hidrólise de ATP menor que o complexo Girase-DNA e se mostra como a forma tóxica atuante na DNA girase por inibir sua atividade de superenovelamento, reduzir sua atividade ATPase e inibir sua habilidade de estabilizar o complexo de DNA clivado (KAMPRANIS e col., 1999).

Ainda em 1999, Loris e colaboradores determinaram a estrutura cristalina da toxina CcdB, mostrando que esta aparece como um dímero no cristal (LORIS e col., 1999). Estes mesmos pesquisadores propuseram que a estrutura dimérica do CcdB interage com a subunidade GyrA da DNA girase, ligando-se no interior de uma cavidade formada entre duas subunidades GyrA (**Figura 5**). Neste caso, a cadeia lateral do resíduo de Arg-462 de GyrA, responsável pela interação com o CcdB, apontaria para o interior desta cavidade, que, por sua vez, parece não ser capaz de acomodar um dímero do CcdB sem conflitos estéricos. Dessa forma, é necessário que esta cavidade esteja aberta para que a toxina possa entrar e se ligar, possivelmente ao resíduo Arg-462 em um processo que envolve a hidrólise de ATP, cujo resultado é a clivagem do DNA (LORIS e col., 1999).

Figura 5 - Estrutura Cristalina do complexo girase-CcdB. A estrutura da esquerda representa GyrA em sua conformação fechada. A estrutura da direita representa as mudanças conformacionais em GyrA após ligação do CcdB. A abertura na interface superior do dímero propicia um amplo espaço para que o dímero de CcdB possa se acomodar. A α -hélice C terminal do CcdB encontra-se próxima ao resíduo Arg462 de GyrA. A ligação de CcdB à GyrA previne seu fechamento e consequentemente a religação ao DNA, resultando num complexo bloqueado.

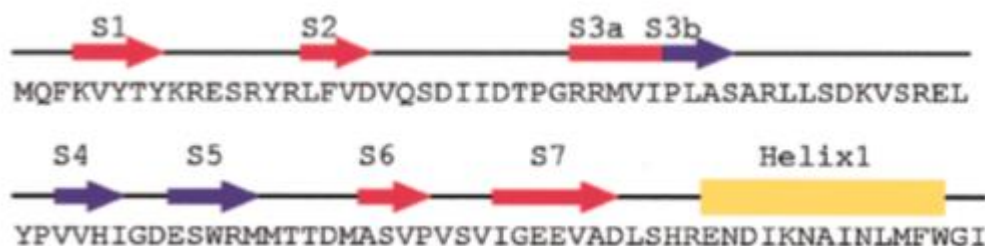


Fonte: Loris e colaboradores (1999).

Estes estudos da estrutura cristalina realizados por Loris e colaboradores (1999), juntamente com estudos envolvendo a identificação de mutantes com perda de atividade *killer* (BAHASSI e col., 1995), mostraram que o resíduo de Arg-462 de GyrA e os três últimos resíduos C-terminais do CcdB (Trp-99, Gly-100 e Ile101) desempenham função essencial no processo da formação do complexo GyrA-CcdB, além de sugerir que o CcdB pode tolerar mudanças significativas em muitas posições da região amino terminal sem perder sua potência letal.

Já o monômero do CcdB é composto por uma α -hélice C-terminal contendo 13 resíduos de aminoácidos, cinco fitas principais N-terminais antiparalelas denominadas folhas- β , nomeadas por S1, S2, S3a, S6 e S7, e três fitas menores, localizadas entre as fitas principais S3a e S6, que se projetam para fora da molécula como uma “asa” (Loris e col., 1999). Esta “asa” envolve os resíduos 41 a 50 que formam um loop e permanecem protegidos da ação de proteases, na presença de CcdA (VAN MELDEREN e col., 1996)

Figura 6 - Sequência de aminoácidos do CcdB alinhado com sua estrutura secundária. As setas em vermelho representam as cinco folhas- β principais da estrutura, enquanto as setas em azul representam as três fitas menores que formam uma “asa” para fora da molécula. Já a área em destaque amarelo representa a única α -hélice da estrutura.



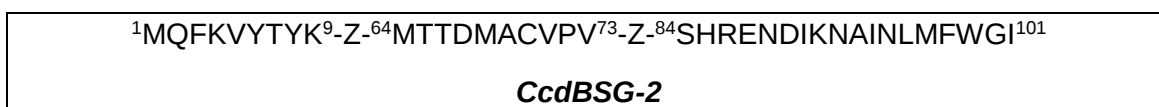
Fonte: Loris e col. (1999).

Assim, a síntese de novos peptídeos baseados na estrutura da toxina CcdB, bem como a realização de estudos estruturais e de interação envolvendo a DNA girase, mostra-se como uma excelente alternativa para que novos peptídeos inibidores de DNA girase e outras topoisomerases sejam descobertos, podendo tais resultados trazer não somente a elucidação do modo de ação destas substâncias, mas também auxiliando no desenvolvimento de novos antibióticos com grande capacidade antibacteriana e menor tendência ao aparecimento de resistência bacteriana.

1.5 O análogo peptídico CcdBSG-2

O presente trabalho apresenta como objeto de estudo o peptídeo intitulado CcdBSG-2, derivado estrutural da toxina natural CcdB, que já possui atividade inibitória comprovada frente à topoisomerases bacterianas (GARRIDO, 2007) e têm sua estrutura primária representada na **Figura 7**.

Figura 7 - Sequência primária dos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo CcdB-SG2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Para o design deste peptídeo, levou-se em consideração apenas regiões específicas da toxina CcdB que apresentam algum tipo de influência na interação e ação desta sob a DNA girase, tendo como base a estrutura cristalina do CcdB proposta por Loris e colaboradores (1999) e já descrita no **item 1.4**.

Sendo assim, as regiões consideradas foram do resíduo Ser-84 a Ile-101, Met-68 a Pro-72 e o segmento N-terminal Met-1 a Lys-9. A escolha destas regiões foram feitas, pois segundo Loris e colaboradores (1999), a primeira região citada apresenta importância significativa na interação com a DNA girase; a segunda região apresenta-se como uma área provável na formação de dímeros e a última região, além de conter uma estrutura em folha β , pode servir como sequência de reconhecimento em mecanismos envolvidos no processo de penetração através da parede celular.

Apesar deste trabalho em questão não realizar estudos com dímeros do CcdBSG-2, a região citada anteriormente por ser responsável pela formação de dímeros foi mantida em sua estrutura para que estudos futuros pudessem envolver os dímeros de CcdBSG-2.

Ainda em relação as regiões escolhidas para o design dos peptídeos, os três resíduos da extremidade C-terminal (Trp-99, Gly-100 e Ile-101) são essenciais para a formação do complexo entre CcdB e a subunidade A da DNA girase (GyrA), pois mutações realizadas nesta região ocasionaram substancial perda da atividade “killer”, levando estes mutantes a uma menor habilidade na formação do complexo com GyrA (LORIS e col.,1999; BAHASSI e col., 1995). Por outro lado, estes mesmos autores mostram que tais mutações não provocaram qualquer efeito na função de auto repressão de CcdB, dependente de CcdA, evidenciando que estes aminoácidos não devem estar envolvidos na formação do complexo CcdB-CcdA. Além disso, o resíduo Trp-99, juntamente com outros doze resíduos da extremidade C-terminal (Glu-87 a Phe-98), faz parte da composição da única α -hélice presente na estrutura do CcdB.

De acordo com estas considerações, a estrutura do análogo CcdBSG-2 é, portanto, composta por três segmentos da molécula CcdB, sendo eles: I) a região C-terminal que corresponde a única α -hélice presente na molécula e formada pelos resíduos Ile-101 a Ser-84; II) a região da fita principal S6, que compreende

os resíduos Met-64 a Val-73, mas com a alteração do resíduo de serina na posição 70 por um resíduo de cisteína para que dímeros possam ser formados a partir de uma ligação dissulfeto intramolecular; III) a região N-terminal formada pelos resíduos Met-1 a Lys-9. Estes três segmentos foram conectados por um linker, o ácido ϵ -aminocapróico, representado por Z na estrutura primária do análogo CcdBSG-2 (**Figura 7**) (GARRIDO, 2007).

1.6 Síntese de peptídeos

Atualmente o principal processo utilizado para síntese de peptídeos é a chamada síntese em fase sólida (SPFS) proposta por Bruce Merrifield em 1963. Este procedimento consiste no crescimento da cadeia peptídica, um aminoácido por vez, a partir do grupo carboxílico C-terminal que se encontra ligado covalentemente a um suporte polimérico insolúvel, comumente chamado de resina (MERRIFIELD, 1963). Devido a característica insolúvel da resina, todo o processo de síntese pode ser realizado em um único frasco de reação contendo uma placa porosa filtrante, a qual contém a resina do início ao fim do processo de síntese e permite que a eliminação dos reagentes, solventes e subprodutos das diversas etapas do ciclo sintético seja realizada por um simples processo de filtração (CILLI e col., 2017).

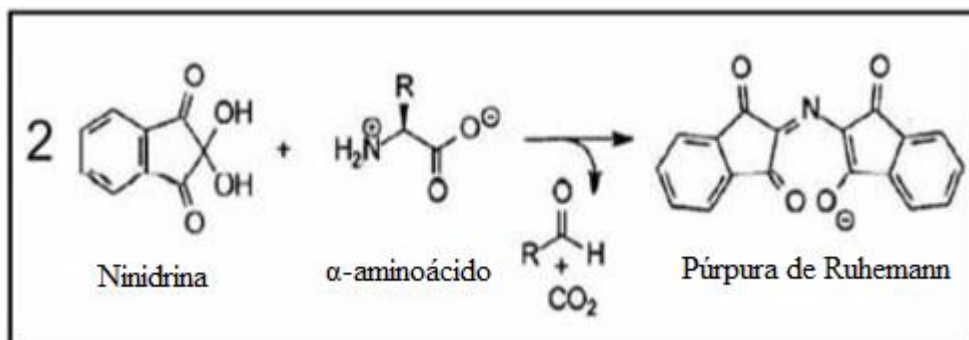
A SPFS pode ser compreendida por um ciclo que consiste na desproteção dos grupos protetores N-terminais, etapas de lavagem, acoplamento do aminoácido protegido desejado e assim sucessivamente até que toda a cadeia peptídica desejada esteja sintetizada. O primeiro aminoácido da cadeia peptídica liga-se covalentemente à resina por meio de sua extremidade C-terminal, enquanto os outros aminoácidos de interesse realizam ligações peptídicas (ligação amida) entre sua extremidade C-terminal e a extremidade N-terminal do aminoácido acoplado anteriormente. Dessa forma, para que a ligação peptídica aconteça entre as funções desejadas, todas as demais devem estar protegidas, de modo que a formação das ligações peptídicas posteriores irá requerer a eliminação do grupo protetor da função que irá formar esta nova ligação.

A proteção temporária do grupo α -amínico é realizada praticamente com dois protetores, terc-butiloxicarbonila e 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc), os quais são diferenciados principalmente quanto sua labilidade ácido-base e são removidos a cada etapa de acoplamento. Já a proteção dos grupos laterais de aminoácidos trifuncionais é realizada com os grupos protetores permanentes terc-butila (tBu), tritila (Trt), terc-butiloxicarbonila, entre outros, uma vez que os grupos laterais devem permanecer protegidos até o final da síntese para que não ocorra a formação de produtos indesejados.

A etapa de acoplamento é parte crucial para a SPFS sendo necessária a ativação do grupo carboxila do aminoácido a ser inserido, gerando assim uma espécie eletrofílica passível de sofrer ataque pelo grupo amino do aminoácido ligado à resina. Um dos métodos mais utilizado para a ativação dos grupos carboxila e que foi empregado neste trabalho, é a combinação de uma carbodiimida, a N, N-diisopropilcarbodiimida (DIC), com uma hidroxilamina, podendo esta ser o hidroxibenzotriazol (HOBt) ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt).

O processo de acoplamento de cada aminoácido deve ser monitorado para garantir sua eficiência, sendo o teste de ninidrina proposto por Kaiser e colaboradores (KAISER e col., 1970) um dos mais indicados. Segundo estes autores, a reação de ninidrina com aminas primárias leva a formação de um produto com coloração violeta, indicando assim um resultado positivo e a existência de grupos amino livres (**Figura 8**).

Figura 8 - Reação dos aminos grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.



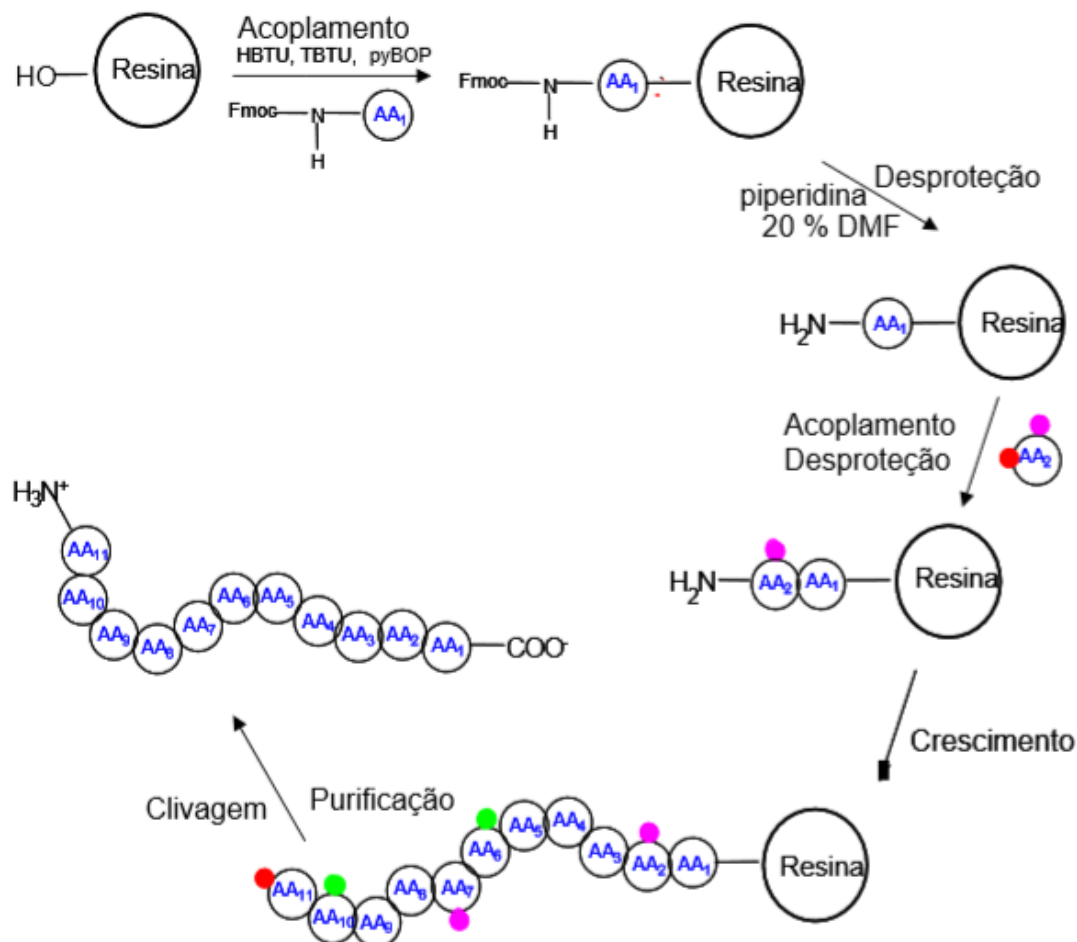
Fonte: Oliveira (2014).

Assim que todos os aminoácidos desejados são adicionados à cadeia peptídica, os grupos protetores temporários e permanentes devem ser removidos e o peptídeo deve ser clivado da resina. Na síntese utilizando-se *t*-*boc* como protetor, isto deve ser feito através do tratamento com um ácido forte, como o ácido fluorídrico, enquanto na síntese utilizando-se Fmoc como protetor, a remoção é feita através do tratamento com ácido de força moderada, como o ácido trifluoracético (GARRIDO, 2007).

A solução ácida empregada no procedimento de clivagem exerce duas funções principais, o rompimento da ligação entre a cadeia peptídica e o grão da resina e a desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais, enquanto os supressores de reações colaterais têm como função o sequestro, através de reações químicas, dos grupos protetores liberados em solução, impedindo que estes reajam com outros grupos da cadeia peptídica (CILLI, e col, 2017).

Um esquema geral do procedimento de síntese utilizado para a obtenção do peptídeo empregado nos estudos deste trabalho é representado na **Figura 9**.

Figura 9 - Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida. Os círculos vermelhos representam o protetor do grupo amina, enquanto os círculos rosa e verde representam os diferentes protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais.



Fonte: Garrido (2007).

1.7 Incorporação de metais em fármacos

Estudos recentes vêm mostrando a capacidade de síntese de uma nova classe de moléculas denominada metalopeptídeos, a qual um íon metálico é incorporado a um peptídeo, formando assim um complexo estável. Além da formação desse complexo estável, os íons metálicos incorporados aos peptídeos mostram um aumento da interação das moléculas de peptídeos com seu alvo celular, em especial no caso de o alvo ser uma proteína (MALAPEDDI; JAMBUINGAM, 2013; PURI e col., 2015). De modo geral, os complexos metálicos parecem exercer sua capacidade inibitória frente as enzimas a partir de uma reação de substituição de ligantes com seus alvos biomoleculares, na

qual os íons metálicos podem se ligar aos átomos de nitrogênio, enxofre ou selênio presentes nos resíduos de histidina, cisteína ou selenocisteína das proteínas, exercendo assim seus efeitos terapêuticos (CHE; SIU, 2010).

Desde a demonstração da atividade antitumoral do complexo cisplatina, $[PtCl_2(NH_3)_2]$, em 1965, diversos novos fármacos envolvendo a incorporação de metais foram desenvolvidos e são utilizados até hoje na clínica médica, como os complexos de ouro aplicados no tratamento à artrite reumatoide; o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro (III) eficaz no tratamento da hipertensão; carbonato de lítio, fármaco com ação antidepressiva, entre outros (ROCHA e col., 2011).

Estudos envolvendo a adição de uma região que permite a ligação de cobre e níquel em peptídeos antimicrobianos sintéticos e naturais, conhecida como ligação amino terminal Cu(II) e Ni(II) (ATCUN), revelaram que estes tornam-se quatro vezes mais potentes comparados com o peptídeo livre em testes contra bactérias e que o provável mecanismo de ação dessa ligação metal-ATCUN é a clivagem do DNA ou proteínas a partir da produção de radicais hidroxila (HARFORD; SARKAR, 1997) .

Uma classe de antibióticos que possui um amplo espectro de ação contra organismos patogênicos são as tetraciclinas, mas por ser um dos antibióticos mais utilizados no mundo houve o surgimento da resistência bacteriana em um grupo variado de bactérias, contra esses antibióticos. Diante disso, a incorporação de paládio (II) em tetraciclinas foi implementada a fim resolver o problema da resistência bacteriana, obtendo como resultado uma maior atividade antibacteriana contra as linhagens resistentes (ROCHA e col., 2011). A incorporação de metais em fármacos, portanto, pode ser um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas contra diversas enfermidades, aumentando muitas vezes o potencial dessas drogas já existentes ou até mesmo modificando a forma de ação destas.

Neste trabalho, o íon metálico Cu(II) e o lantanídeo Tb(III) foram utilizados para a incorporação com o peptídeo CcdBSG-2, pois, em estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, estes metais foram os que apresentaram os melhores resultados no que diz respeito à cinética de formação

do complexo e às alterações nos espectros de emissão de fluorescência do peptídeo na presença do metal, além de possuírem capacidade de interagir com diversos grupos positivos presentes no peptídeo.

Objetivos

2 Objetivos

O objetivo central deste trabalho foi sintetizar metalopeptídeos a partir da associação do peptídeo CcdBSG-2, derivado estrutural da toxina natural CcdB, com os íons metálicos Cu(II) e Tb(III), a fim de investigar em comparação com o peptídeo livre, o potencial inibitório destes metalopeptídeos frente à topoisomerases bacterianas.

Para se alcançar este objetivo central os seguintes objetivos específicos são propostos:

- I. Síntese de metalopeptídeos derivados do peptídeo CcdBSG-2 utilizando os íons metálicos Tb(III) e Cu(II);
- II. Caracterização dos metalopeptídeos através de espectroscopia de UV-Vis, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular;
- III. Avaliar a atividade inibitória dos metalopeptídeos frente à ação das enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, ambas topoisomerases bacterianas, através de eletroforese em gel de agarose;
- IV. Aplicar os metalopeptídeos com melhor atividade inibitória em estudos de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido.

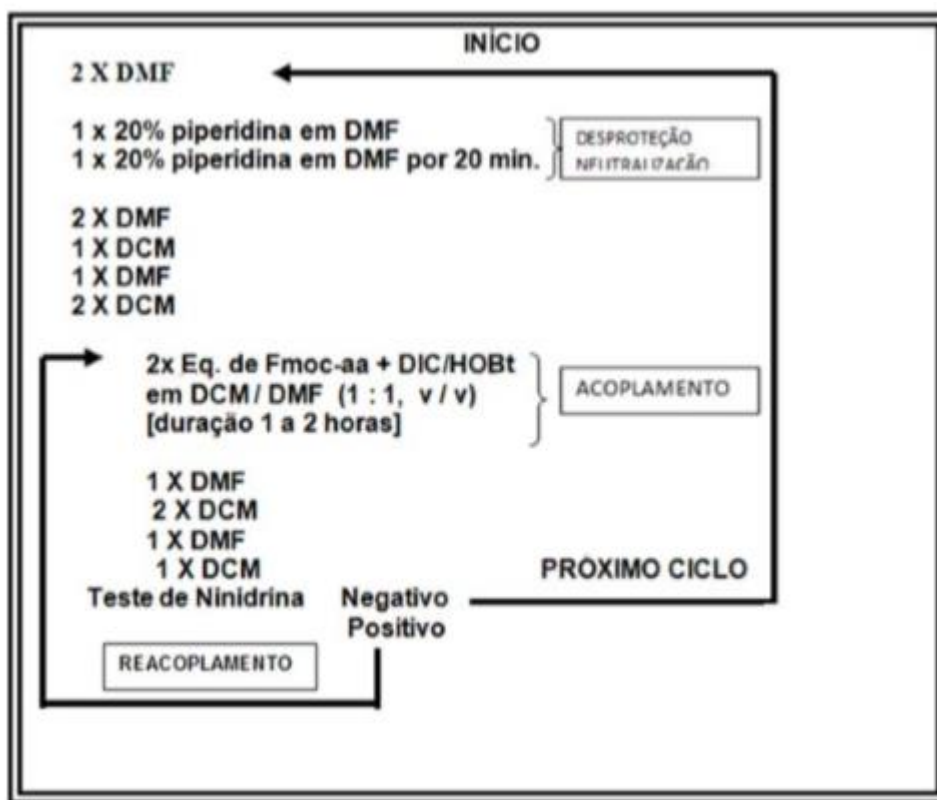
Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Síntese do peptídeo CcdB-SG2

A sequência peptídica do derivado estrutural CcdBSG-2 (**Figura 7**) foi sintetizada pelo método de síntese em fase sólida (STEWART; YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS; ALBERICIO; GLIRALT, 1997; AMBLARD e col., 2005) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento 9-fluorenilmetiloxycarbonil (F-moc) como protetor base-lábil dos α amino grupos, e derivados t-butílicos (t-bu) para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina de partida foi uma resina de Wang com grau de substituição inicial de 0,69 mmol/g, já contendo o primeiro aminoácido comum nos dois peptídeos (isoleucina - Ile) previamente incorporado. Durante o acoplamento dos aminoácidos subsequentes, utilizou-se Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes, em relação a quantidade inicial de resina, tanto para Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, aplicando-se inicialmente como solvente, uma mistura de diclorometano/dimetilformamida (DCM/DMF 1:1, v/v), por um período de 2 horas, em média. A desproteção dos grupos α -amino (remoção do grupo base lábil Fmoc), após o acoplamento de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução 20% de piperidina em DMF. Na **Figura 10** está representado um esquema resumido do protocolo de síntese em fase sólida (SPFS) empregada neste trabalho.

Figura 10 - Protocolo utilizado para Síntese em Fase Sólida (SPFS).



Fonte: Adaptado de Lorenzón (2011).

A eficiência das etapas de acoplamento de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (**Figura 8**), indicando a presença de α -amino grupos livres, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

A clivagem final do peptídeo e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento da peptidil-resina com uma solução de clivagem contendo TFA (94%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1%), a 25°C por 3 horas em agitação branda. Para cada 100 mg de resina, 1,5 mL de solução foi preparada. Após o período de 3 horas, foi adicionado éter etílico gelado ao conteúdo do frasco e observado a formação de um precipitado branco (peptídeo bruto). A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos tipo "falcon" de centrífuga de 15 mL de capacidade volumétrica, sendo submetidos a centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Após este período o sobrenadante foi descartado em frasco precaução. O processo de lavagem com éter foi repetido mais 3 vezes. Após as lavagens, o precipitado foi seco em

sistema a vácuo por 6 horas para evaporação do excesso de solventes orgânicos. Após a secagem a vácuo, o peptídeo foi extraído utilizando 100 mL de solução aquosa contendo 15% de ácido acético (v:v).

3.2 Purificação e caracterização do peptídeo sintetizado

Independentemente do processo de síntese utilizado, os peptídeos são obtidos em sua forma bruta, ou seja, apresentam contaminantes peptídicos indesejados gerados durante o próprio procedimento sintético (GARRIDO, 2007). Dessa forma, torna-se importante o processo de purificação desse peptídeo para que ele atinja um grau de pureza mais elevado.

A técnica utilizada para purificação do peptídeo foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e utilizada com as seguintes condições cromatográficas:

Coluna semi-preparativa:

- Equipamento: Cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT, equipado com detector UV/VIS modelo SPD-20A, controlador e bomba.
- Coluna cromatográfica: Coluna de fase reversa modelo Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10mm; diâmetro da partícula = 10µm; porosidade 300Å).
- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . H₂O
- Gradiente: 5% a 55% de solvente B em 120 minutos.
- Fluxo: 3,0mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220nm e 280nm.

Coluna analítica:

- Equipamento: Cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT, equipado com detector UV/VIS modelo SPD-20A, controlador e bomba.
- Coluna cromatográfica: Coluna de fase reversa modelo Kromasil 300-5-C18 (250 x 4,6mm; diâmetro da partícula = 5µm; porosidade 300Å).
- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . H₂O
- Gradiente: 5% a 55% de solvente B em 140 minutos.
- Fluxo: 0,8mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 220nm e 280nm.

Todos os solventes utilizados durante a purificação foram de grau cromatográfico e a água do tipo ultrapura.

Finalizado o procedimento de purificação, a caracterização do peptídeo foi realizada em um cromatógrafo “ultra-fast liquid chromatography” (UFLC) Shimadzu, modelo LC20AD, equipado com detector UV/VIS modelo SPD-20A, auto injetor modelo SIL-20A HT, controlador e bomba, acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por electrospray (LC/ESI-MS) da marca Brucker® modelo Ion Trap Amazon SL, ou então por injeção direta das amostras em modo de electrospray positivo, permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente.

As condições cromatográficas utilizadas para a caracterização do peptídeo utilizando UFLC acoplado ao espectrômetro de massas estão expostas abaixo:

- Equipamento: Cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AD, equipado com detector, controlador e bomba.
- Coluna cromatográfica: Coluna de fase reversa modelo Júpiter Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; diâmetro da partícula = 5 µm; porosidade 300 Å).
- Solventes: A: 0,045% TFA . H₂O
B: 0,036% TFA . H₂O
- Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos.
- Fluxo: 0,6mL/min.

- Comprimento de onda de detecção: 220nm e 280nm.

O valor de massa molecular obtido experimentalmente foi comparado com o valor teórico calculado previamente para o peptídeo de estudo, de acordo com seus resíduos de aminoácidos.

3.3 Preparo e caracterização dos metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdbSG-2

Após a obtenção do peptídeo puro, o mesmo foi submetido ao processo de complexação com soluções de cloreto dos metais térbio e cobre ($\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e CuCl_2). Para associar o metal ao peptídeo, alíquotas crescentes de cada solução de metal foram adicionadas a uma solução contendo o peptídeo a uma concentração fixa e, caso necessário, o pH da solução era ajustado para um valor próximo a 7,5 utilizando HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ou NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, um acompanhamento nos espectros de emissão de fluorescência e absorção na região do UV-Vis do peptídeo para cada uma das adições da solução dos metais foi realizado a fim de se estabelecer a proporção molar que os metais Tb(III) e Cu(II) se complexam com o peptídeo.

Estudos cinéticos com o intuito de determinar o tempo necessário para que ocorresse a formação dos complexos também foram realizados a partir do acompanhamento dos espectros de absorção e emissão de fluorescência em função do tempo.

Por fim, estudos de supressão de fluorescência foram realizados com o peptídeo CcdBSG-2 a uma concentração de $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, utilizando alíquotas crescentes das soluções de cada solução de metal a fim de se determinar qual o tipo de supressão ocorre entre as espécies, dinâmica (ou colisional) ou estática (formação de complexo).

3.4 Ensaios de inibição enzimática

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados com o propósito de avaliar a capacidade de inibição dos peptídeos sintetizados frente a DNA girase e a Topoisomerase IV, ambas enzimas que são alvos de agentes antimicrobianos.

Para os ensaios de inibição enzimática frente a enzima DNA girase, utilizou-se o Kit de superenovelamento do DNA pela girase de *E. coli* adquirido da empresa Inspirallis®, contendo a enzima DNA girase, plasmídeo pBR322 relaxado e os tampões de diluição e de ensaio cuja composição é mostrada na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição dos tampões de diluição e de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática frente a DNA girase.

Tampão	Composição
Tampão de diluição	Tris.HCl 50 mmol. L ⁻¹ ; KCl 100 mmol.L ⁻¹ ; Ditioneitol 2 mmol. L ⁻¹ ; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 1 mM; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5.
Tampão de ensaio (concentrado 5x)	Tris.HCl 35 mmol. L ⁻¹ ; KCl 24 mmol. L ⁻¹ ; MgCl ₂ , 4 mmol. L ⁻¹ ; Ditioneitol, 2 mmol. L ⁻¹ ; Espermidina 1,8 mmol. L ⁻¹ ; ATP 1 mmol. L ⁻¹ ; glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1 µg /mL; pH = 7,5.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os ensaios de inibição enzimática frente a enzima Topoisomerase IV utilizou o Kit de relaxamento do DNA pela Topoisomerase IV de *E. coli* também adquirido pela empresa Inspirallis®, contendo a enzima Topo IV, plasmídeo pBR322 superenovelado e os tampões de diluição e de ensaio que são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Composição dos tampões de diluição e de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática frente a Topoisomerase IV.

Tampão	Composição
Tampão de diluição	HEPES.KOH 40 mM; glutamato de potássio 100 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; glicerol a 40% (v / v); pH = 7,6.
Tampão de ensaio (concentrado 5x)	HEPES.KOH 40 mM; glutamato de potássio 100 mM; acetato de magnésio 10 mM; DTT 10 mM; ATP 1 mM; albumina 50 µg/ml; pH = 7,6.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Para ambos os estudos de inibição enzimática o protocolo empregado foi o mesmo, variando apenas a enzima utilizada (DNA girase ou Topo IV), os tampões e o plasmídeo pBR322 (relaxado ou superenovelado) de acordo com qual inibição enzimática seria estudada.

A partir dos estudos envolvendo a complexação dos metais ao peptídeo, foi possível determinar a proporção molar com que estes se complexavam e, dessa forma, preparar os metalopeptídeos para os ensaios subsequentes. Assim, preparou-se três soluções estoque com concentração de $432\mu\text{mol. L}^{-1}$ do peptídeo puro, cada uma delas utilizadas posteriormente para a complexação com o íon metálico Cu(II) e outra para a complexação com o íon metálico Tb(III). A solução restante seria utilizada com o peptídeo puro para que a comparação entre as atividades de inibição dos peptídeos pudesse ser realizada.

Cada uma dessas soluções foi então pipetada em tubos diferentes de 1,5mL a fim de se obter diluições com concentrações de $250\mu\text{mol. L}^{-1}$, $200\mu\text{mol. L}^{-1}$, $150\mu\text{mol. L}^{-1}$, $100\mu\text{mol. L}^{-1}$, $50\mu\text{mol. L}^{-1}$ e $25\mu\text{mol. L}^{-1}$, considerando um volume final de $30\mu\text{L}$. Para as soluções utilizadas na complexação adicionou-se também o volume necessário de cada solução do metal, calculado de acordo com a concentração desejada.

Tabela 3 - Composição dos tubos para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios de inibição enzimática. Para as frações envolvidas na complexação utilizou-se as soluções de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ e $CuCl_2$, respectivamente.

Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Volume da solução estoque ($432 \mu\text{mol.L}^{-1}$)	Volume da solução de metal para a complexação
250	17,3 μL	5 μL
200	13,9 μL	4 μL
150	10,4 μL	3 μL
100	6,9 μL	2 μL
50	3,5 μL	1 μL
25	1,73 μL	0,5 μL

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Com as diluições e complexos dos peptídeos preparados, adicionou-se em cada tubo uma unidade (U) de enzima, preparada a partir da enzima e seu respectivo tampão de diluição presente no Kit. Foi preparado um MIX composto por 6,5 μL do tampão de ensaio concentrado 5x e 0,5 μL do plasmídeo pBR322, por ensaio, totalizando assim 7 μL do MIX para cada tubo. Para completar o volume final de 30 μL água ultrapura foi adicionada.

Além dos tubos contendo os peptídeos, outros dois tubos chamados de controle positivo e controle negativo foram preparados, possuindo também 30 μL como volume final. O tubo do controle positivo era composto por 22 μL de água ultrapura, 7 μL do MIX e uma unidade (U) de enzima (1 μL). Já o tubo do controle negativo era composto por 23 μL de água ultrapura e 7 μL de MIX. Como pode-se observar, os controles são diferenciados pela presença ou ausência de enzima, pois, desta forma, estes controles atuam como um padrão para identificar se houve a ação do peptídeo frente a enzima ou não.

Após o preparo de todos os tubos, estes foram incubados durante 40 minutos à 37°C.

Passado o tempo de incubação, 3 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado em cada tubo e estes incubados novamente à 65°C durante 2 minutos. A adição do SDS nesta etapa tem como função principal encerrar a reação entre a enzima e o DNA, a partir da desnaturação da enzima.

Posteriormente, 15µL de STEB (Sacarose a 40% (p / v), Tris-HCl 100 mM, pH 8, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,5 mg/ml) e 60µL de clorofórmio foram adicionados para encerrar a reação entre DNA, enzima e peptídeo. Os tubos foram então centrifugados durante 3 minutos à 12000 rpm.

As amostras, presentes agora no sobrenadante dos tubos e com coloração azul, foram aplicadas uma a uma nos poços do gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM / ácido bórico 89 mM / EDTA 2 mM, pH 8.2) e submetidas à análise por eletroforese sob tensão constante de 60V, 250mA, à temperatura ambiente, por 2 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 30 minutos em tampão de corrida, contendo Nancy-520 (5 mg/mL). O gel foi então examinado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando o sistema Alpha Innotech Alphamager EP.

Os ensaios de eletroforese descritos foram realizados com o intuito de se avaliar as concentrações mínimas em que o peptídeo puro e seus complexos são capazes de inibir a ação das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV.

3.5 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica

Os testes de atividade hemolítica dos peptídeos em estudo neste trabalho foram realizados de acordo com protocolo modificado de Onuma e colaboradores (1999) a fim de investigar a toxicidade dos mesmos em células eucarióticas.

Células vermelhas de sangue humano, obtidas a partir do sangue fresco de doador voluntário, foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas 3 vezes em tampão 0,01 mol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,15 mol.L⁻¹ de NaCl. O peptídeo puro e os respectivos complexos utilizados para o estudo encontravam-se em uma concentração inicial de 648,8 µmol.L⁻¹, sendo realizadas diluições seriadas em tubos tipo eppendorf nas concentrações de 160 µmol.L⁻¹, 80 µmol.L⁻¹, 40 µmol.L⁻¹, 20 µmol.L⁻¹, 10 µmol.L⁻¹ e 5 µmol.L⁻¹, considerando como volume final 200 µL para cada tubo. Previamente foi adicionado 1% (v/v) de eritrócito em cada tubo. Foram preparados também os controles positivo e negativo, representando 100% de hemólise e 0% de hemólise, respectivamente. O

controle positivo foi preparado utilizando 2 µL de eritrócitos (1%) misturado com 198 µL de uma solução 1% (v/v) Triton X-100, enquanto o controle negativo foi preparado utilizando 2 µL de eritrócitos (1%) e 198 µL de tampão Tris.HCl pH 7,4.

Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 540 nm foi determinada usando leitor de microplaca Biotek, modelo Epoch. O ensaio foi realizado em triplicata e em eventos independentes. Os cálculos para obtenção da porcentagem de hemólise para cada peptídeo foram realizados utilizando a **Equação 1:**

$$\% \text{ de Hemólise} = \frac{(A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Tampão}})}{A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tampão}}} \times 100$$

onde “A” representa a absorbância obtida nas leituras das microplacas e “Triton” e “Tampão”, representam as leituras obtidas nos controles positivos e negativos, respectivamente.

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

Os testes de inibição de crescimento bacteriano foram realizados para verificar a sensibilidade de microrganismos que contribuem para processos infecciosos frente aos peptídeos produzidos neste trabalho.

Como descrito por Garrido (2007), o peptídeo CcdBSG-2 apresenta baixa permeabilidade da membrana citoplasmática impedindo que o mesmo iniba o crescimento bacteriano quando livre em solução. Dessa forma, para estabilizar em solução os peptídeos produzidos e possibilitar sua translocação através da membrana, permitindo que sua ação antimicrobiana seja realizada, os mesmos foram encapsulados em lipossomas do tipo SUV (vesículas unilamelares

pequenas), uma vez que esses sistemas se mostram como uma excelente alternativa para administrar os fármacos de forma mais segura e com efeitos colaterais minimizados.

Para o preparo do lipossoma, uma única formulação foi escolhida, sendo constituído pela fosfatidilcolina de soja (DPPC), um fosfolípídeo, e por colesterol (Chol), um lipídeo. A presença de fosfolípídeos, como o DPPC, tem como objetivo dar a partícula maior semelhança estrutural com a membrana celular, conferindo a ela maior fluidez e interação com componentes da membrana celular bacteriana. Já o uso de lipídeos, como o colesterol, confere ausência de carga à partícula e visa fornecer à vesícula maior rigidez e resistência, podendo assim melhorar a encapsulação do fármaco e sua biodisponibilidade (DRULIS-KAWA & DOROTKIEWICZ-JACH, 2010). A escolha desta formulação foi feita devido a sua simplicidade de preparo e eficiência.

A metodologia utilizada para o preparo dos lipossomas foi a de extrusão-evaporação. Dessa forma, 40 mg de DPPC e 2 mg de Chol foram dissolvidas em 4mL de clorofórmio e a solução resultante transferida para um tubo de vidro. O solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, para possibilitar a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o excesso de solvente foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 h.

Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com uma solução em concentração de 300 μ M para o peptídeo sem os metais e com uma solução em concentração de 100 μ M para os peptídeos complexados com os metais.

Para conseguir o desprendimento total do lipídeo das paredes do tubo, foram feitas agitações suaves (manualmente), alternadas com agitações vigorosas (mecanicamente em agitador tipo Vortex), obtendo desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV). Para a sua conversão em SUV, os MLV foram submetidos à extrusão (30-40 ciclos), utilizando extrusor equipado com filtro de polycarbonato com poros de 100nm de diâmetro.

O teste de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizou o análogo peptídico CcdBSG-2 e seus complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, encapsulados em uma única formulação de lipossoma descrita anteriormente. Além dos peptídeos, os metais Cu(II) e Tb(III) também foram

testados para observar se a atividade dos complexos se dá por conta dos metais ou pelo sinergismo criado entre peptídeo-metal.

Os peptídeos foram testados frente a duas variedades de bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC: 14458) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (ATCC 43895), sendo a primeira uma bactéria gram positiva e a segunda uma bactéria gram negativa. A escolha destas espécies bacterianas se deu a partir de sua importância médica e devido à resistência a antibióticos já apresentada por elas.

As bactérias foram cultivadas previamente em placa contendo meio sólido Muller Hinton (Mueller Hinton 22 g/L – Biolog MHB 10608) durante 24 horas, em estufa a 35°C. A seguir, uma pequena quantidade de bactérias foi retirada da placa de cultura com o auxílio de uma alça de platina, diluídas em 7mL de meio de cultura líquido e incubadas para o preparo do inóculo inicial. Após o período de crescimento, as suspensões bacterianas foram padronizadas a partir da contagem do número de células em suspensão, realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 620nm, até atingir a densidade padrão de 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Após a padronização da suspensão de bactérias foram preparados os controles positivo e negativo, os peptídeos encapsulados em lipossomas na concentração desejada para o teste e os metais, respeitando sempre o volume total de 400µL por solução. O controle positivo foi preparado com 200µL da suspensão de microrganismos previamente padronizada juntamente com 200µL de meio de cultura Muller Hinton, enquanto o controle negativo foi preparado com 200µL da suspensão bacteriana, 60µL do antibiótico Ciprofloxacino em uma concentração de 150µM e 40µL de meio de cultura Muller Hinton.

Para o preparo dos peptídeos, primeiramente realizou-se a extrusão com lipossomas (30 ciclos) para converte-los em vesículas do tipo SUV. O peptídeo CcdBSG-2 foi preparado a uma concentração inicial de 300µM, enquanto seus complexos, Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, foram preparados a uma concentração de 100µM. Terminada a extrusão, os peptídeos foram diluídos para as concentrações desejadas no ensaio e preparados com a suspensão de

bactérias. As concentrações utilizadas para o ensaio de cada peptídeo e a composição das soluções podem ser vistas na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Composição dos peptídeos utilizados para o ensaio de crescimento bacteriano em diferentes concentrações, considerando o volume final de 400µL e realizando as diluições a partir da solução inicial passada por extrusão com lipossomas.

Peptídeo	Concentração do peptídeo para ensaio (µM)	Volume de suspensão bacteriana (µL)	Volume do peptídeo na concentração inicial de extrusão (µL)	Volume do meio de cultura Muller Hinton (µL)
CcdBSG-2	150	200	200	0
CcdBSG-2	75	200	100	100
CcdBSG-2	37,5	200	50	150
Cu(II)-CcdBSG-2	50	200	200	0
Cu(II)-CcdBSG-2	25	200	100	100
Cu(II)-CcdBSG-2	12,5	200	50	150
Tb(III)-CcdBSG-2	50	200	200	0
Tb(III)-CcdBSG-2	25	200	100	100
Tb(III)-CcdBSG-2	12,5	200	50	150

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As concentrações utilizadas nos ensaios microbiológicos foram definidas a partir dos resultados obtidos nos testes de inibição enzimática, de modo que a menor concentração que o peptídeo apresentasse inibição enzimática, seria a maior concentração utilizada no ensaio microbiológico.

Finalizada a preparação das amostras, estas foram levadas para estufa durante 3 horas à uma temperatura de 35°C e sob agitação controlada (54 rpm). Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas lipossomais contendo os peptídeos encapsulados, utilizou-se a reação de redução do composto MTT e formação dos cristais de formazam, a partir de protocolo baseado em Wang e colaboradores (2010). Dessa forma, ao término do tempo de incubação, 20 µL de MTT foram adicionados em cada micro tubo de ensaio e as amostras foram novamente incubadas com a mesma agitação e temperatura, porém, com o tempo reduzido para 30 minutos.

Após esse tempo, os micros tubos foram centrifugados a 10.000 RPM por 60 segundos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os cristais formados pela reação do MTT foram ressuspensos com 500µL de DMSO e agitados manualmente até a dissolução completa dos mesmos. A suspensão foi transferida para tubos de ensaio estéreis e a eles adicionado mais 2000 µL de DMSO, obtendo-se um volume final de 2500 µL. Para que houvesse a dissolução completa dos cristais de formazam, a suspensão foi deixada reagindo durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Ao término da reação, foram feitas as leituras de absorbância a 550 nm das suspensões de cada tubo de ensaio num espectrofotômetro utilizando DMSO como branco.

3.7 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) foi realizado neste trabalho a fim de fornecer informações sobre a possível estrutura tridimensional dos peptídeos sintetizados, uma vez que a espectroscopia de CD é um poderoso método em biologia estrutural, utilizado desde 1960 para examinar a estrutura secundária, em solução, de proteínas e peptídeos, por exemplo (WHITMORE & WALLACE, 2007).

Muitos peptídeos que não possuem ligações de dissulfeto apresentam, em água, estruturas aleatórias, mas quando entram em contato com membrana, meio auto agregado ou hidrofóbico, podem apresentar outros tipos de estrutura (BELLO e col., 1982; FALLA e col., 1996).

Cada aminoácido da cadeia polipeptídica apresenta três ligações covalentes, sendo que entre as ligações HN-C α e C α -C=O, são formados os ângulos de ligação Φ (phi) e ψ (psi), respectivamente, pois essas regiões podem sofrer rotações. Já as ligações C-N apresentam caráter de dupla ligação e, dessa forma, a rotação ao redor da ligação peptídica é impedida. Portanto, os ângulos Φ e ψ se tornam os responsáveis pelos espectros característicos de CD das estruturas em α -hélice, folha β e estrutura randômica dos peptídeos (NELSON; COX, 2011).

As formas dos espectros de CD, referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas, podem apresentar as seguintes características: curva representando o espectro característico de estrutura tipo α -hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 193 nm. Uma curva representando o espectro característico de estrutura tipo folha- β , apresentando uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm. Por fim, uma curva representando o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 198 nm.

A estrutura secundária de cada peptídeo foi analisada por dicroísmo circular utilizando o equipamento Jasco J-815, pertencente ao laboratório multiusuário do Instituto de Química UNESP de Araraquara. Utilizou-se uma concentração de 15 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de cada peptídeo em volume final de 500 μL . Os espectros foram obtidos com acúmulo de 6 varreduras de 190 a 280 nm, em três condições de ensaio diferentes: I) tampão HEPES 1 mmol. L^{-1} ; II) utilizando o indutor de estrutura 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) em solução 60% TFE e 40% tampão HEPES 1 mmol. L^{-1} , e III) em meio de SDS 15 mmol. L^{-1} , todos à 25°C.

Resultados e Discussões

4 Resultados e Discussões

4.1 Síntese, purificação e caracterização do peptídeo CcdBSG-2

Para a síntese do peptídeo CcdBSG-2 foi utilizada resina Wang, já acoplada com o primeiro aminoácido da sequência peptídica, isoleucina, seguindo da extremidade C-terminal para a N-terminal. A escala de síntese utilizada foi de 0,12 mmol, com massa de resina de 300mg e grau de substituição 0,40 mmol/g. Para a etapa de acoplamento dos demais aminoácidos da sequência peptídica, seguiu-se os passos descritos no **item 3.1**.

Ao final da síntese a resina foi desprotegida com solução 20% 4-metil-piperidina/DMF, clivada e purificada. As massas aproximadas da peptilresina, bem como a massa aproximada obtida após os processos de clivagem e purificação podem ser encontrados na **Tabela 5**.

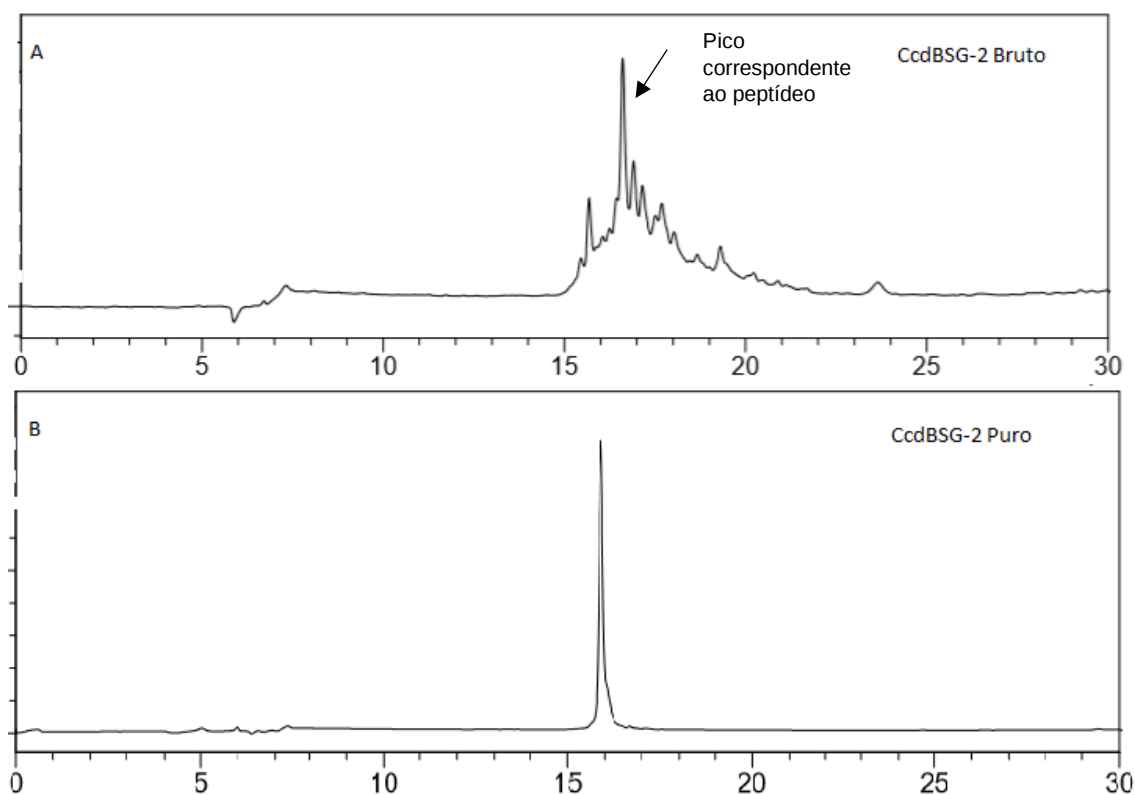
Tabela 5 - Massas obtidas após o processo de síntese, clivagem e purificação do peptídeo CcdBSG-2.

Peptídeo	Massa peptilresina (g)	Massa após clivagem (mg)	Massa após purificação (mg)
CcdBSG-2	1,0062	400	35

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Após o processo de purificação do peptídeo, utilizando-se CLAE e as condições descritas no **item 3.2**, obteve-se um produto puro que apresentava um único pico em relação ao extrato bruto, sendo que o tempo de retenção do derivado purificado foi mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto e posteriormente analisado por espectrometria de massas. Os perfis cromatográficos do peptídeo antes (bruto) e após (puro) o processo de purificação são apresentados na **Figura 11**.

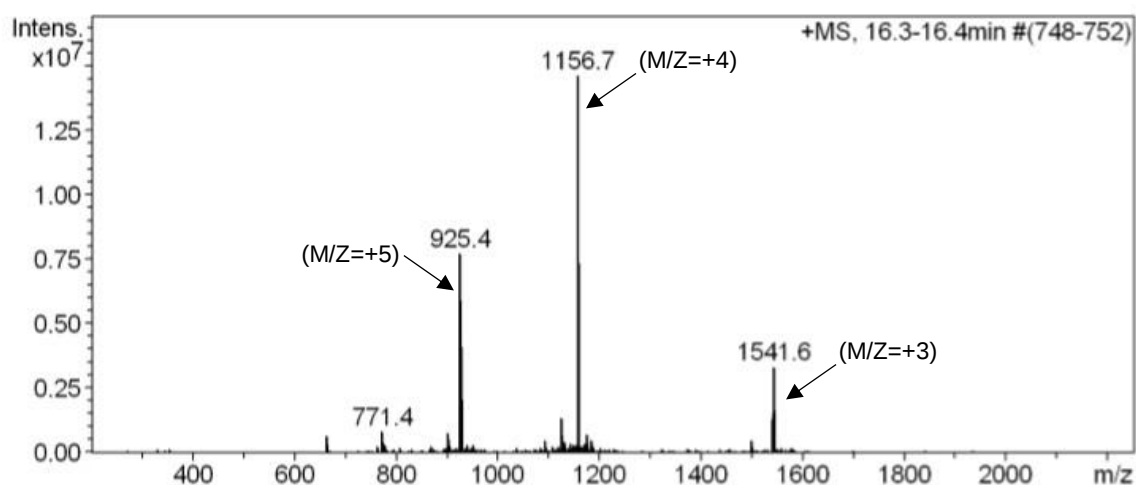
Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE, em escala analítica, para o peptídeo CcdBSG-2, antes (A) e após (B) o processo de purificação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Com relação a caracterização do peptídeo, feita por espectrometria de massas, os resultados mostraram valores coerentes com o teórico esperado, conforme pode ser visto na **Figura 12**. A massa molecular para o peptídeo CcdBSG-2 é de 4623,48 g/mol, desse modo, no espectro da Figura 12 pode ser observado o pico de 1156,7 referente a $Z=+4$, assim como 1541,6 ($Z=+3$), 925,4 ($Z=+5$) e 771,4 ($Z=+6$), todos relacionados com a massa teórica calculada para este peptídeo, confirmando assim sua obtenção.

Figura 12 - Espectro de massas do peptídeo CcdBSG-2 obtido após purificação.



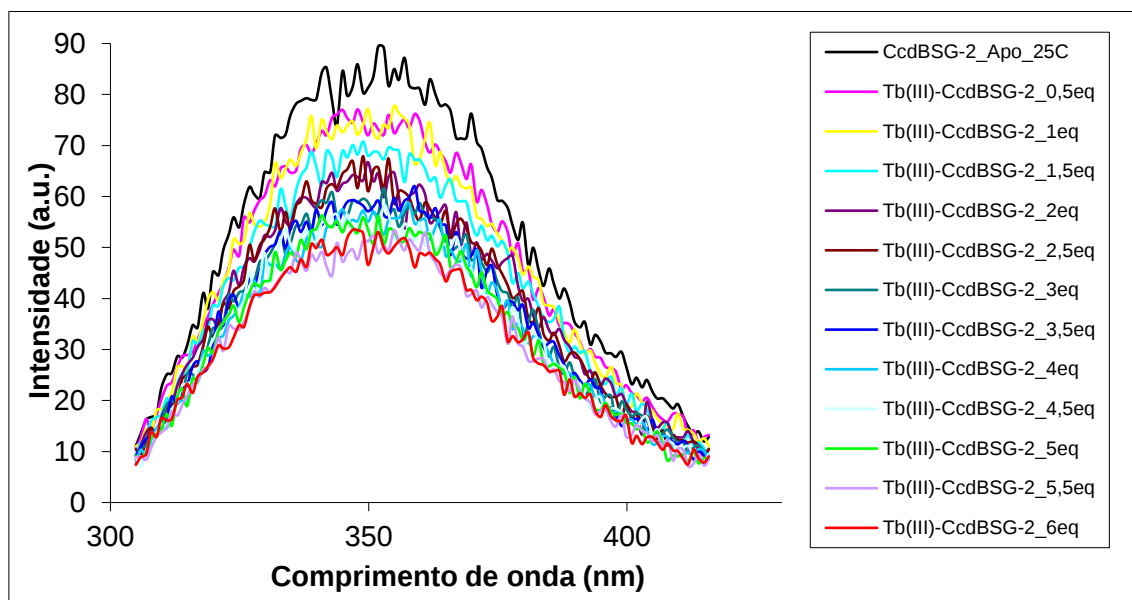
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.2 Preparo e caracterização dos metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2.

Para o preparo e caracterização dos metalopeptídeos, alíquotas crescentes das soluções de cloreto de térbio hexahidratado ($\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de cobre (II) (CuCl_2) foram adicionadas a uma solução contendo o peptídeo CcdBSG-2 em uma concentração fixa de 20 μM . O pH da solução foi então ajustado para um valor próximo de 7,5 utilizando HCl 0,1 M ou NaOH 0,2 M.

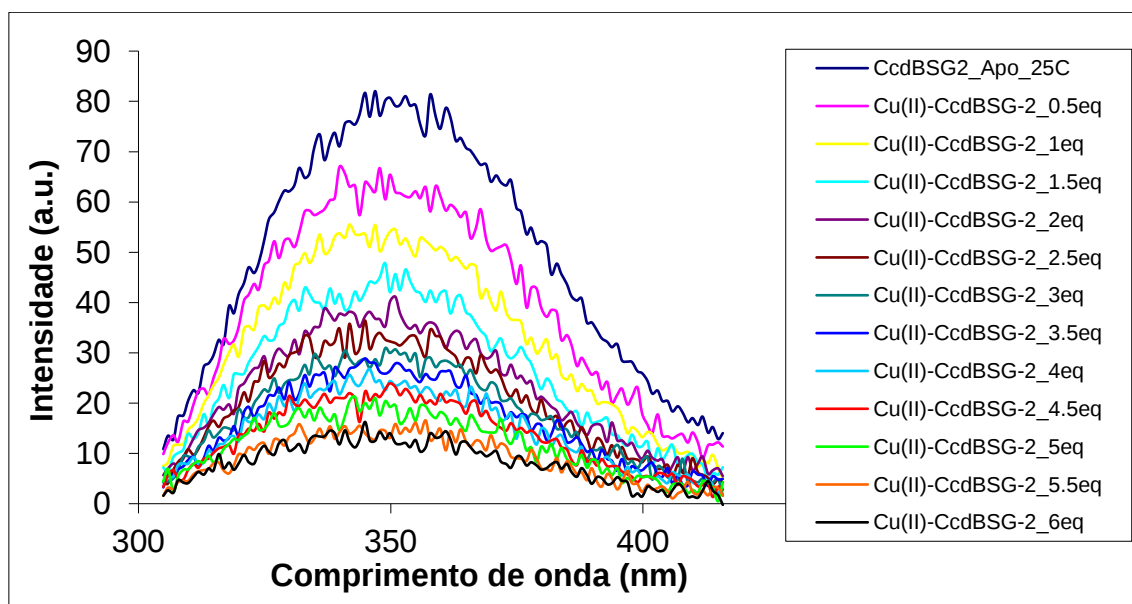
Em seguida, um acompanhamento nos espectros de emissão de fluorescência foi realizado para cada uma das adições das soluções de metais a fim de se estabelecer a melhor proporção molar que o lantanídeo Tb(III) e o íon metálico Cu(II) se complexam com o peptídeo. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas utilizando um comprimento de onda de excitação de 280 nm e a varredura utilizada foi o intervalo de 305 nm a 415 nm, tendo como fluoróforo, o resíduo de triptofano (W) presente no peptídeo CcdBSG-2. Os resultados obtidos pela adição de Tb(III) ao peptídeo podem ser vistos na **Figura 13**, enquanto os resultados obtidos pela adição de Cu(II) ao peptídeo são vistos na **Figura 14**.

Figura 13 - Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo CcdBSG-2 20 μ M após adição de quantidades crescentes de Tb(III).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 14 - Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo CcdBSG-2 20 μ M após adição de quantidades crescentes de Cu(II)

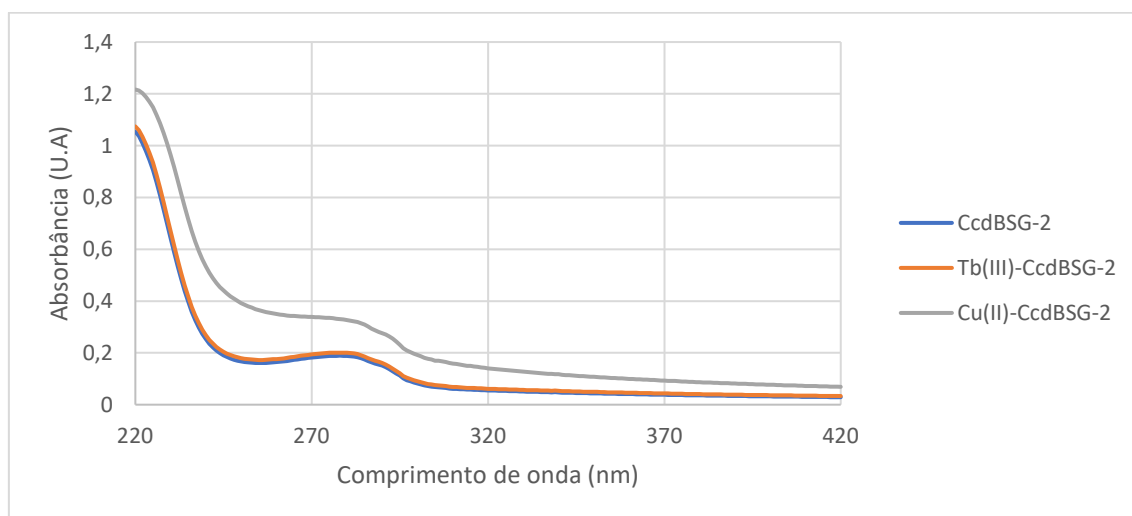


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir dos dados apresentados nas **Figuras 13 e 14**, podemos observar que a partir da adição de 3 equivalentes molares dos metais ao peptídeo não há uma mudança significativa nos espectros de emissão de fluorescência, sendo assim um indicativo de que a adição desse valor de equivalentes molares é suficiente para a formação dos complexos.

Ensaio de absorção na região do UV-Vis utilizando a adição de 3 equivalentes molares dos metais Tb(III) e Cu(II) à solução do peptídeo em uma concentração de 20 μM foram realizados com o intuito de corroborar com os dados apresentados anteriormente de que essa adição é suficiente para a formação dos complexos. Para estes ensaios, foram realizadas varreduras na região de 200 nm a 400 nm e os resultados obtidos são apresentados na **Figura 15**.

Figura 15 - Espectros de absorção na região UV-Vis do peptídeo CcdBSG-2 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e dos complexos formados com adição de três equivalentes molares dos metais Tb(III) e Cu(II).

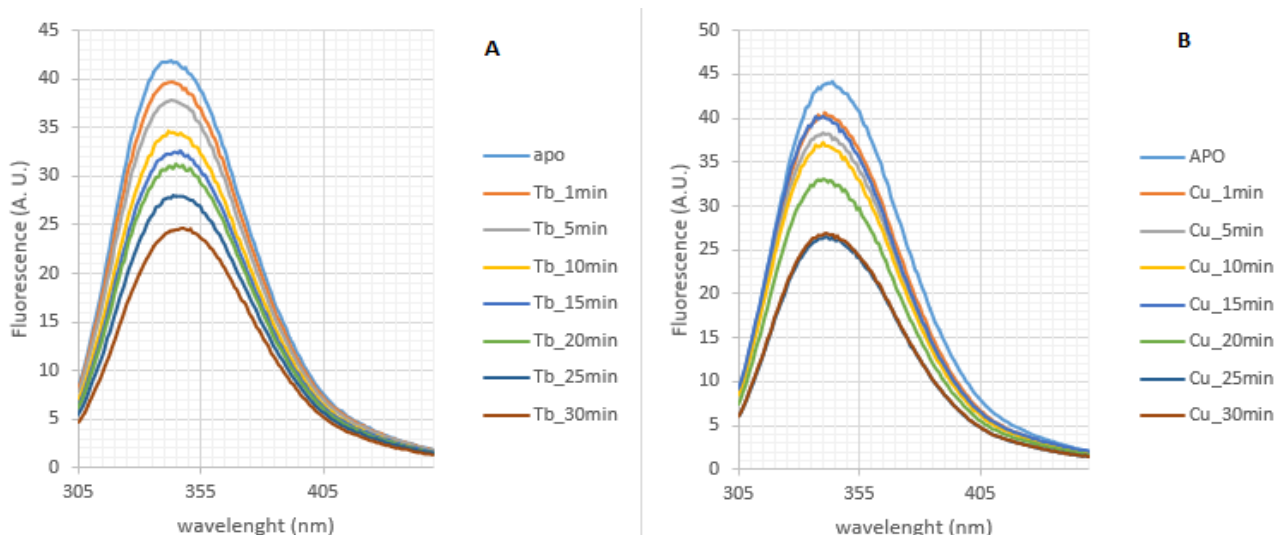


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Estes resultados comprovam que não há alteração significativa nos espectros de absorção na região do UV-Vis dos metalopeptídeos quando comparados ao peptídeo sem a presença dos metais, sustentando a afirmação de que a adição de 3 equivalentes molares dos metais é suficiente para a formação dos complexos.

Estudos cinéticos foram realizados com o intuito de determinar o tempo necessário para a formação dos complexos. Para isto, foram adicionados um volume proporcional de 3 equivalentes molares de cada solução de metal à uma solução aquosa 20 μ M do peptídeo CcdBSG-2, considerando um volume final de mistura de 500 μ L. Em seguida, um acompanhamento nos espectros de emissão de fluorescência em função do tempo foi realizado, utilizando como comprimento de onda de excitação 280 nm e a varredura do espectro sendo realizada entre 305 nm e 450 nm. Os dados obtidos são apresentados na **Figura 16**, abaixo.

Figura 16 - Espectros de fluorescência em função do tempo para o complexo (A) Tb(III)-CcdBSG-2 e (B) Cu(II)-CcdBSG-2



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

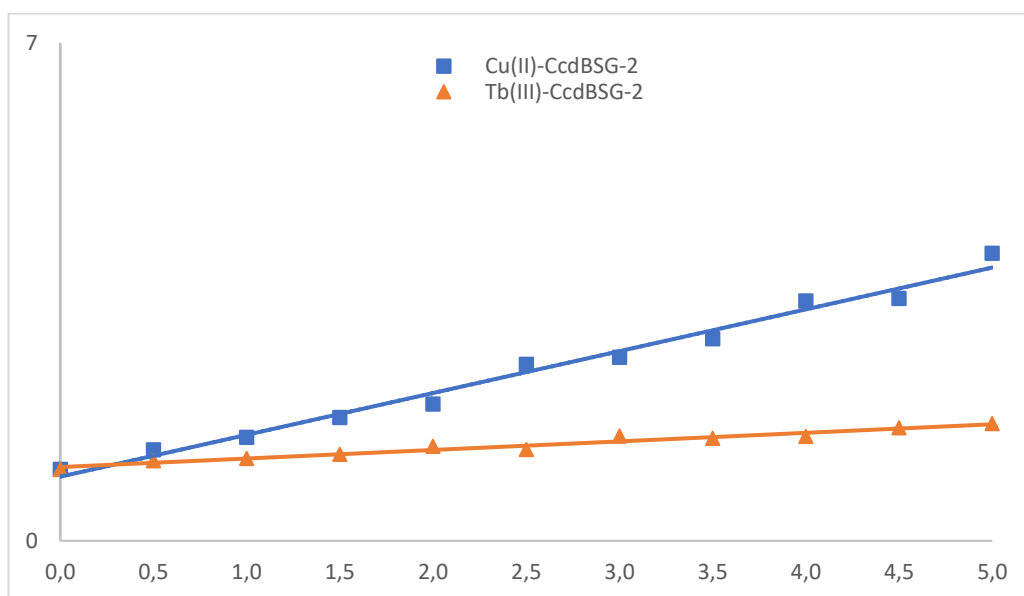
A partir da análise dos dados obtidos na **Figura 16**, o tempo de 30 minutos foi adotado para a formação e estabilização dos complexos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2, uma vez que não há variação considerável no máximo de emissão de fluorescência para os dois complexos a partir deste tempo. Dessa forma, para todos os ensaios posteriores, as soluções dos complexos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2 eram preparadas previamente, homogeneizadas e deixadas durante 30 minutos em repouso para formação e estabilização dos complexos, sendo utilizadas somente após este período.

Por fim, estudos de supressão do peptídeo CcdBSG-2 pelo lantanídeo Tb(III) e pelo íon metálico Cu(II) foram realizados, considerando que o comportamento apresentado pela supressão dos metais é semelhante aos estudos envolvendo a supressão entre dois peptídeos, como proposto em Lacowicz (2006). Alíquotas crescentes das soluções desses metais, variando de 0,5 equivalentes a 5 equivalentes molares em relação a concentração fixa de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do peptídeo foram utilizadas para os estudos de supressão. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm e a emissão foi medida em 350 nm, sendo estas medidas realizadas à 25 °C e posteriormente à 45 °C.

Os dados obtidos foram representados em um gráfico de SternVolmer, onde a variação da fluorescência relativa do CcdBSG-2 (F_0/F) foi avaliada em função da concentração dos metais adicionados, Tb(III) e Cu(II), sendo que F_0 representa a intensidade de fluorescência do peptídeo na ausência dos metais e F representa a intensidade de fluorescência na presença dos metais.

A variação de intensidade de fluorescência relativa do CcdBSG-2, com excitação em 280 nm e emissão a 350 nm, em função da adição de alíquotas crescentes de Tb(III) e Cu(II), está representada na **Figura 17**.

Figura 17 - Interação do CcdBSG-2 com Cu(II) (■) e Tb(III) (▲) a 25 °C. Cu(II) ou Tb(III) (0.5 a 5 equivalentes) foram adicionados a uma solução 20 μM de CcdBSG-2 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, após cada adição.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Dados de supressão geralmente são apresentados como uma variação de F_0/F em função da concentração de um agente supressor, no caso um dos metais Cu(II) ou Tb(III), de acordo com a **Equação 2**, abaixo:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]$$

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência do CcdBSG-2 na ausência e presença de um dos metais, respectivamente, $[Q]$ a concentração dos metais Cu(II) ou Tb(III) e K_{sv} a constante de supressão (LACOWICZ, 2006).

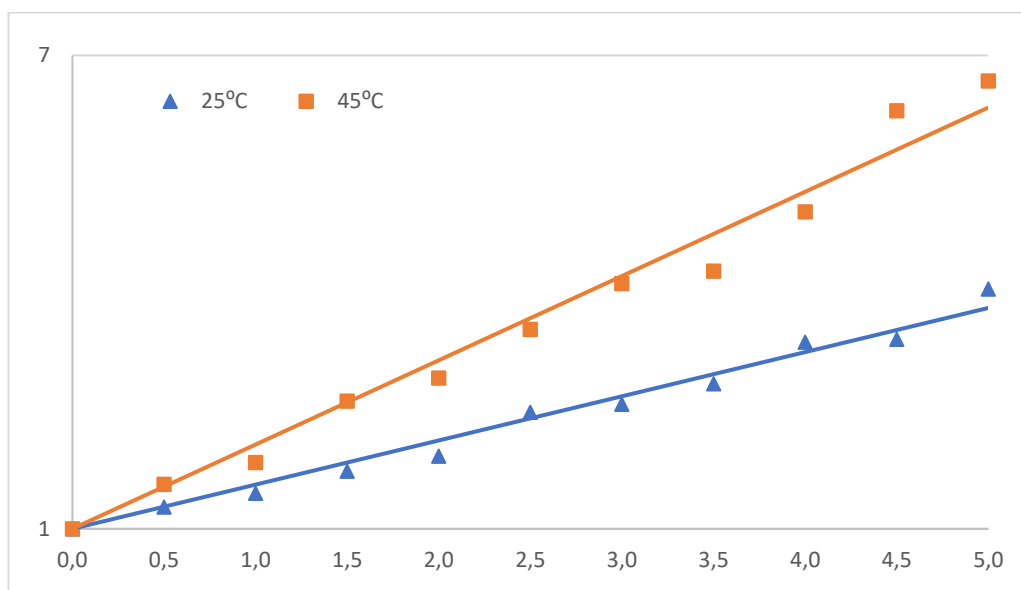
Uma linearidade, como observada na **Figura 17**, para ambos os metais, é um indicativo da existência de uma única classe de fluoróforos, em CcdBSG-2, todos igualmente acessíveis aos supressores. Porém, uma linearidade na representação gráfica de Stern-Volmer pode resultar tanto de uma supressão dinâmica (colisional) como de uma supressão estática (formação de complexo) (LACOWICZ, 2006).

O tipo de supressão pode ser diferenciado através de uma avaliação comparativa em diferentes temperaturas, sendo que uma diminuição na constante de supressão (K_{sv}), com a elevação da temperatura, é esperada no caso de supressão estática, enquanto um efeito inverso é observado para uma supressão dinâmica. Para ambas, a dependência de F_0/F em relação a $[Q]$ (Equação 1) é idêntica, exceto que a constante de supressão, para uma supressão estática, corresponde à constante de associação (K_a) do complexo formado (LACOWICZ, 2006).

Os resultados obtidos a partir dos estudos de supressão realizados entre o peptídeo CcdBSG-2 e o íon metálico Cu(II) são apresentados na **Figura 18** e revelam um aumento na inclinação da curva de Stern-Volmer com o aumento da temperatura, indicando assim uma supressão dinâmica, resultante de encontros colisionais entre as espécies e não devido a formação de um complexo. Além disso, o valor da constante de supressão de Stern-Volmer, obtida a partir da **equação 2**, apresenta um valor de ($K_{sv} = 2,66 \pm 0,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) à 25°C e de ($K_{sv} = 5,15 \times 10^4$) à 45°C, sendo estes resultados obtidos a partir de uma média entre as dez medidas realizadas, incluindo o desvio padrão.

O aumento do valor da constante de supressão de Stern-Volmer em temperaturas mais altas se dá por conta de a supressão de processos dinâmicos ser dependente da difusão. Dessa forma, um aumento na temperatura resulta em maiores coeficientes de difusão e, conseqüentemente, em um aumento na constante de supressão.

Figura 18 - Efeito da temperatura na interação do CcdBSG-2 com Cu(II). Cu(II) (0,5 a e 5 equivalentes molares) foi adicionado a uma solução de 20 μ M de CcdBSG-2 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a 25°C (□) e 45°C (▪).



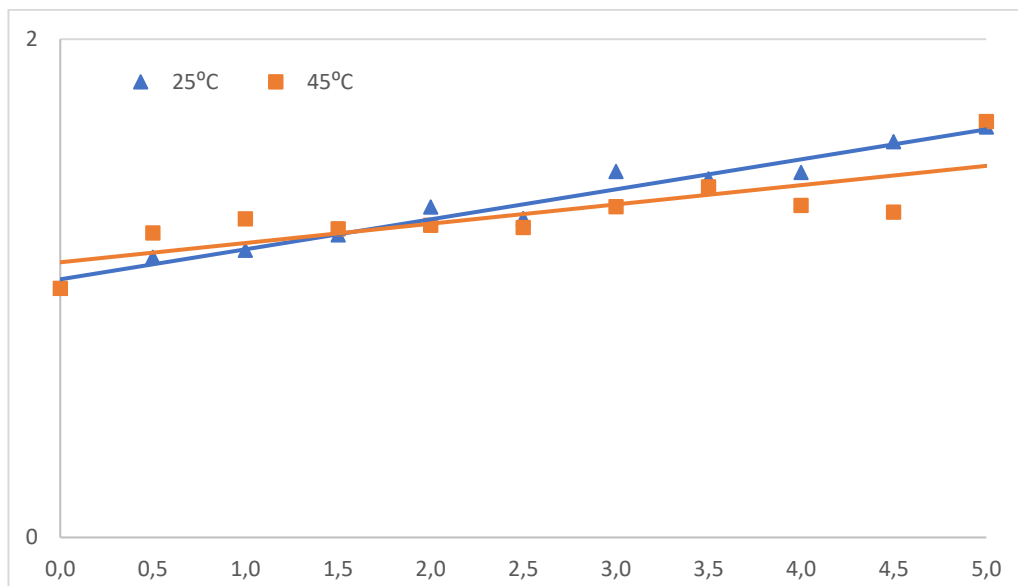
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os estudos realizados entre CcdBSG-2 e o lantanídeo Tb(III) têm seus resultados apresentados na **Figura 19** e, como é possível observar, há uma pequena diminuição na inclinação da curva de Stern-Volmer com o aumento da temperatura, um indicativo de que uma supressão estática está ocorrendo entre as espécies. Porém, quando o cálculo da constante de supressão é realizado utilizando a **equação 2**, o que observamos é um pequeno aumento em seu valor, ($K_{sv} = 7,39 \pm 1 \times 10^3$) à 25°C e ($K_{sv} = 8,08 \times 10^3$) à 45°C, indicando que uma supressão dinâmica ocorre entre as espécies.

Dessa forma, não é possível afirmar que um complexo está sendo formando entre CcdBSG-2 e Tb(III), mas há uma possibilidade de as espécies

estarem em parte se colidindo e em parte formando complexos devido a pequena variação que ocorre com a elevação da temperatura.

Figura 19 - Efeito da temperatura na interação do CcdBSG-2 com Tb(III). Tb(III) (0,5 a e 5 equivalentes molares) foi adicionado a uma solução de 20 μ M de CcdBSG-2 e a fluorescência medida com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm, a 25°C ($\square$) e 45°C ($\blacktriangle$).

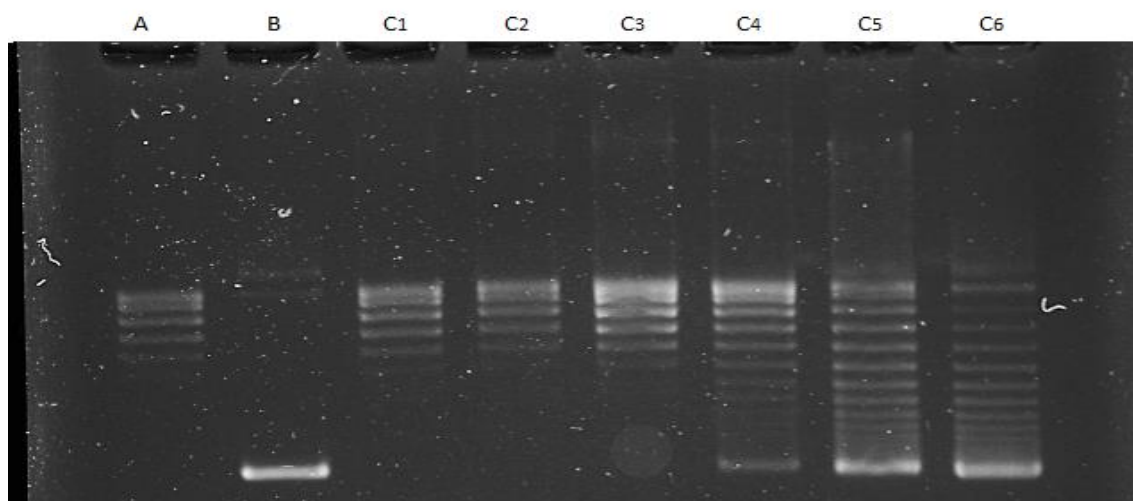


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.3 Ensaios de inibição enzimática

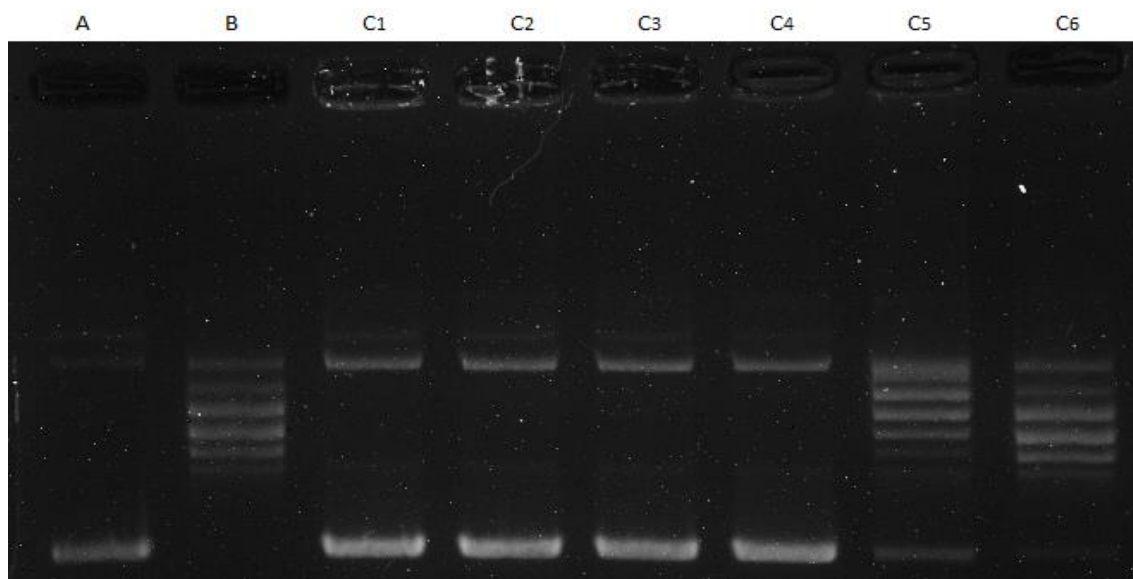
A inibição da reação de superenovelamento catalisada pela DNA girase e de relaxamento catalisada pela Topoisomerase IV, ambas enzimas bacterianas, pelo análogo peptídico CcdBSG-2, seus complexos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2 e pelos metais Tb(III) e Cu(II), foi analisada através de eletroforese em gel de agarose, de acordo com o procedimento descrito no item **3.4**. Os resultados obtidos para o peptídeo CcdBSG-2 frente as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, são apresentados nas **Figuras 20 e 21**, respectivamente.

Figura 20 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 μ L, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e o peptídeo CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 μ mol/L, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 21 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 μ L, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e o peptídeo CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 μ mol/L, respectivamente.



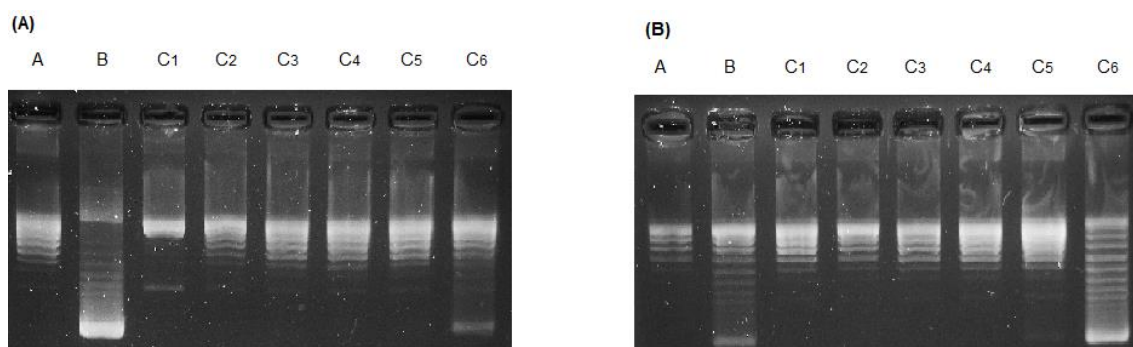
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir das figuras podemos observar que o peptídeo CcdBSG-2 apresenta uma inibição total da DNA girase a partir de uma concentração de 150 μM e uma inibição parcial a partir de uma concentração de 100 μM , já que não é possível visualizar a existência de bandas do plasmídeo superenovelado, evidenciando a capacidade de interação desse peptídeo com a enzima.

Já os ensaios envolvendo a enzima topoisomerase IV apontam que o peptídeo CcdBSG-2 apresenta uma inibição total desta enzima a partir de uma concentração de 100 μM e uma inibição parcial a partir de 50 μM , uma vez que não é possível visualizar bandas do plasmídeo relaxado.

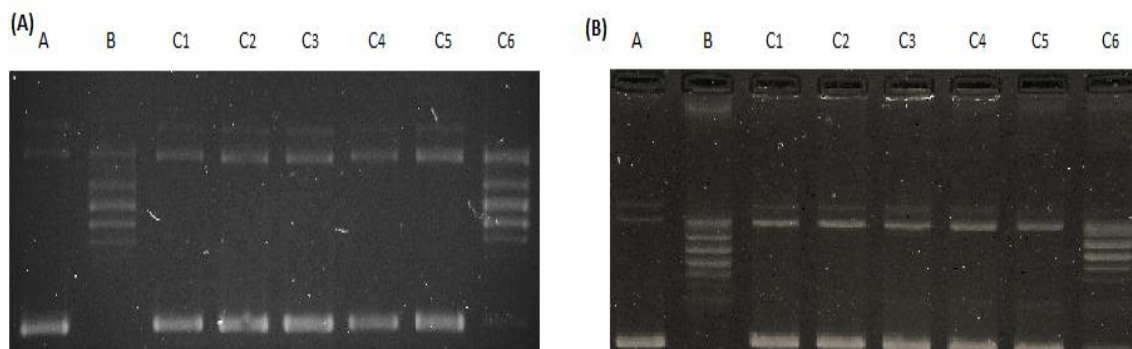
Os mesmos ensaios foram realizados com os complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, a fim de avaliar a capacidade de inibição frente às enzimas DNA girase e Topoisomerase IV. Os resultados obtidos nos ensaios envolvendo a DNA girase são apresentados nas **Figuras 22A e 22B**, enquanto os resultados obtidos nos ensaios envolvendo a Topoisomerase IV são apresentados nas **Figuras 23A e 23B**.

Figura 22 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo complexo Cu(II)-CcdBSG-2 em (A) e pelo complexo Tb(III)-CcdBSG-2 em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 μL , contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e os complexos de CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 23 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo complexo Cu(II)-CcdBSG-2 em (A) e pelo complexo Tb(III)-CcdBSG-2 em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 μ L, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e os complexos de CcdBSG-2. Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem às concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 μ mol/L, respectivamente.

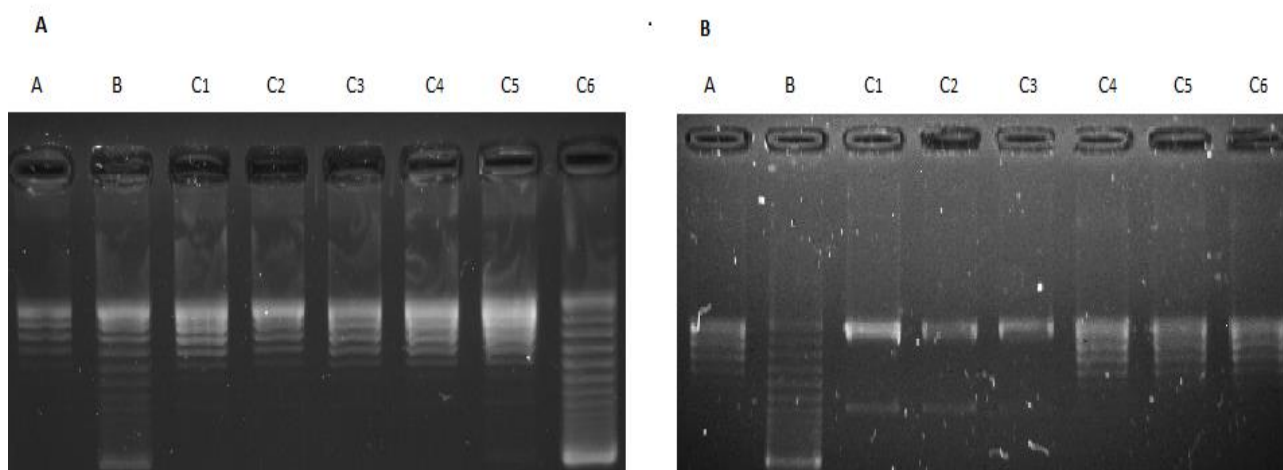


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Podemos observar que tanto para a enzima DNA girase, quanto para a enzima Topoisomerase IV, ambos os complexos de CcdBSG-2 são capazes de inibir totalmente a ação das enzimas a partir de uma concentração de 50 μ M, o que representa um ganho real de mais de 50% de atividade inibitória em relação ao peptídeo CcdBSG-2 sem a presença dos metais.

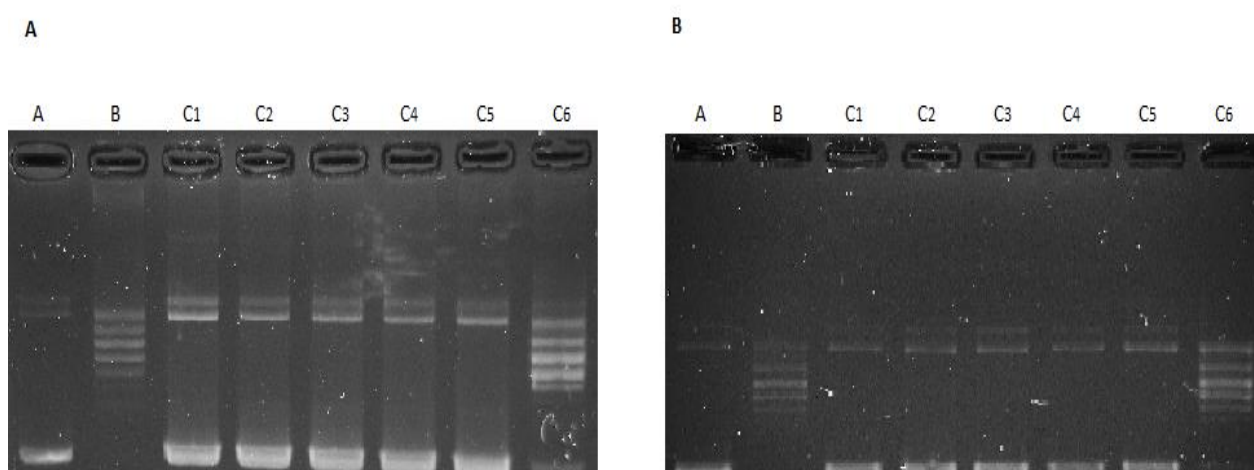
Por fim, é importante destacar que foram realizados ensaios de eletroforese apenas com os metais Tb(III) e Cu(II), para avaliar se estes possuem atividade inibitória frente as enzimas, utilizando a mesma quantidade de equivalentes molares empregado nos ensaios envolvendo os complexos. Os resultados obtidos para os ensaios envolvendo a DNA girase e os metais Tb(III) e Cu(II) são apresentados nas **Figuras 24A e 24B**, respectivamente, enquanto os resultados para os ensaios envolvendo a Topoisomerase IV são apresentados nas **Figuras 25A e 25B**.

Figura 24 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo metal Tb(III) em (A) e pelo metal Cu(II) em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 μ L, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado relaxado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 relaxado e DNA girase (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U), e os metais Tb(III) e Cu(II). Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos equivalentes molares utilizados nas concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 μ mol/L, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 25 - Inibição da atividade de relaxamento da Topoisomerase IV pelo metal Tb(III) em (A) e pelo metal Cu(II) em (B). Em ambas as imagens o volume de reação utilizado foi de 30 μ L, contendo: (linha A) controle negativo contendo apenas plasmídeo pBR322 no estado superenovelado; (linha B) controle positivo contendo plasmídeo pBR322 superenovelado e Topoisomerase IV (1U); (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, Topoisomerase IV (1U), e os metais Tb(III) e Cu(II). Os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos equivalentes molares utilizados nas concentrações 250, 200, 150, 100, 50 e 25 μ mol/L, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Como indicam os resultados, os metais apresentam a capacidade de inibir as enzimas nas mesmas concentrações utilizadas para os metalopeptídeos, demonstrando a capacidade de interação entre os metais e as enzimas.

4.4 Ensaio de toxicidade dos peptídeos: estudos de atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade dos peptídeos, permitindo quantificar o dano causado por substâncias sobre a membrana plasmática dos eritrócitos e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise) (ALVES, 2003, PAPE, HOPPE, 1990).

Os testes foram realizados em triplicata de acordo com o protocolo descrito no item 3.5 e a média do percentual de atividade hemolítica, nas diferentes concentrações testadas para o peptídeo CcdBSG-2, os metalopeptídeos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2 e os metais Tb(III) e Cu(II) são apresentados na **Tabela 6**, com o desvio padrão calculado.

Tabela 6 - Porcentual da atividade hemolítica para o peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos Tb(III)-CcdBSG-2 e Cu(II)-CcdBSG-2.

Amostra	160 μ M	80 μ M	40 μ M	20 μ M	10 μ M	5 μ M
CcdBSG-2	2,40% $\pm$ 0,01	2,30% $\pm$ 0,01	0,25% $\pm$ 0,01	0%	0%	0%
Tb(III)-CcdBSG-2	6,87% $\pm$ 0,02	4,26% $\pm$ 0,01	2,55% $\pm$ 0,01	2,20% $\pm$ 0,01	1,15% $\pm$ 0,01	0,35% $\pm$ 0,01
Cu(II)-CcdBSG-2	0,15% $\pm$ 0,01	0%	0%	0%	0%	0%
Tb(III)	0,95% $\pm$ 0,01	0,85% $\pm$ 0,01	0,82% $\pm$ 0,01	0,70% $\pm$ 0,01	0%	0%
Cu(II)	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Como é possível observar, os valores de porcentagem de hemólise para o peptídeo e seus metalopeptídeos são bem inferiores à 12% mesmo na concentração mais alta e que apresenta uma inibição de 100% frente as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV nos ensaios de eletroforese em gel de

agarose. De acordo com OLIVEIRA (2014), estes valores percentuais são considerados mínimos para um fármaco, estando dentro do valor de segurança.

Os resultados obtidos para os metais também demonstram que estes possuem baixo valor de hemólise, evidenciando que baixos valores de hemólise para os complexos peptídicos pudessem ser esperados, como ocorre de fato.

De acordo com os resultados apresentados acima, tanto o peptídeo CcdBSG-2, quanto seus complexos não apresentam toxicidade para as células sanguíneas humanas, característica de extrema importância para suas aplicações como agentes antimicrobianos.

4.5 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido

Os ensaios de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido foram realizados como descrito na metodologia presente no item **3.6**. Os peptídeos produzidos foram testados frente a duas bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC: 14458) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (ATCC 43895), sendo a primeira uma bactéria Gram positiva e a segunda uma bactéria Gram negativa.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a média das absorbâncias medidas para cada amostra, bem como o desvio padrão, é apresentada na **Tabela 7** para os ensaios envolvendo a bactéria *Escherichia coli* enterohemorrágica e na **Tabela 8** para os ensaios envolvendo a bactéria *Staphylococcus aureus*.

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

***Escherichia coli* enterohemorrágica**

Concentração	CcdSG2	Cu(II)-CcdBSG-2	Tb(III)-CcdBSG-2	Cu(II)	Tb(III)	Lipossoma
150µM	0,591 ± 0,04	-----	-----	-----	-----	0,737 ± 0,02
75µM	0,699 ± 0,04	-----	-----	-----	-----	0,750 ± 0,02
50µM	-----	0,370 ± 0,02	0,392 ± 0,05	0,873 ± 0,01	0,851 ± 0,02	-----
37,5µM	0,813 ± 0,03	-----	-----	-----	-----	0,752 ± 0,03
25µM	-----	0,504 ± 0,06	0,651 ± 0,08	0,845 ± 0,02	0,930 ± 0,02	-----
12,5µM	-----	0,599 ± 0,03	0,826 ± 0,02	0,837 ± 0,02	0,671 ± 0,01	-----

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 8 - Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* utilizando CcdBSG-2 e seus complexos

Staphylococcus aureus

Concentração	CcdSG2	Cu(II)-CcdBSG-2	Tb(III)-CcdBSG-2	Cu(II)	Tb(III)	Lipossoma
150µM	0,032 ± 0,02	-----	-----	-----	-----	0,025 ± 0,03
75µM	0,030 ± 0,04	-----	-----	-----	-----	0,037 ± 0,01
50µM	-----	0,035 ± 0,02	0,032 ± 0,01	0,159 ± 0,01	0,113 ± 0,03	-----
37,5µM	0,075 ± 0,02	-----	-----	-----	-----	0,102 ± 0,02
25µM	-----	0,018 ± 0,001	0,026 ± 0,01	0,097 ± 0,03	0,137 ± 0,02	-----
12,5µM	-----	0,0485 ± 0,01	0,073 ± 0,001	0,105 ± 0,02	0,113 ± 0,02	-----

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

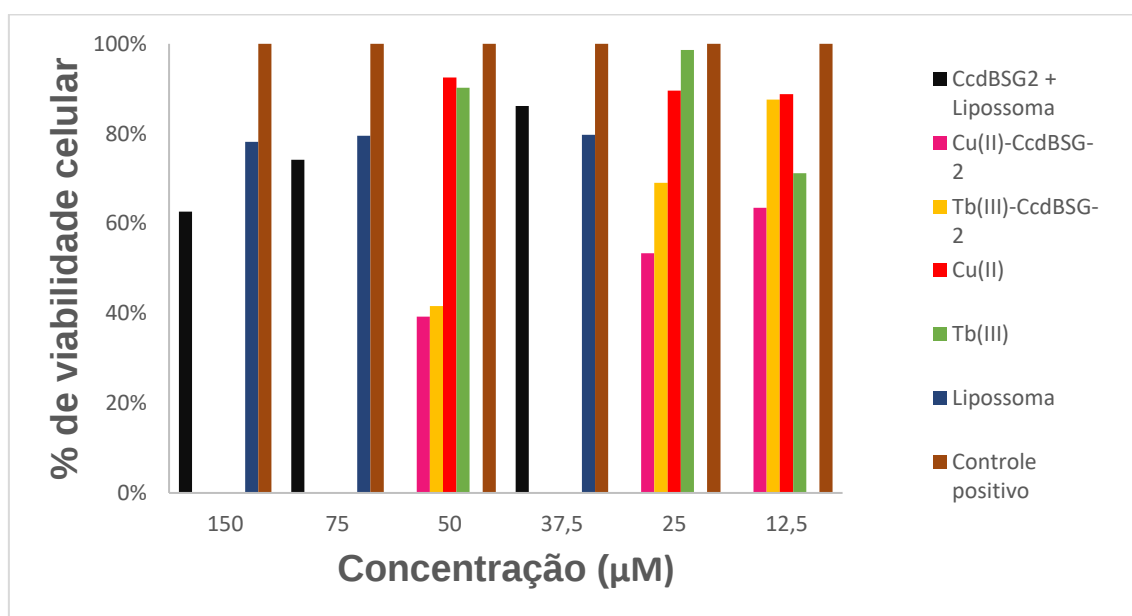
Foram medidas ainda as absorbâncias do controle positivo e negativo em cada um dos ensaios. Para os ensaios envolvendo a bactéria *Escherichia coli* enterohemorrágica, a absorbância obtida para o controle positivo foi de $0,943 \pm 0,02$ e para o controle negativo foi de $0,089 \pm 0,01$. Já para os ensaios envolvendo a bactéria *Staphylococcus aureus*, a absorbância medida para o controle positivo foi de $0,140 \pm 0,02$, enquanto o controle negativo apresentou absorbância de $0,019 \pm 0,02$.

Para que os dados pudessem ser comparados, foram elaborados gráficos de porcentagem de viabilidade celular para cada ensaio, considerando a absorbância medida no controle positivo como 100% de viabilidade celular, uma vez que este controle apresenta apenas a suspensão de microrganismos e o

meio de cultura Muller Hinton. Dessa forma, foi então possível determinar o percentual de viabilidade celular para cada amostra em diferentes concentrações.

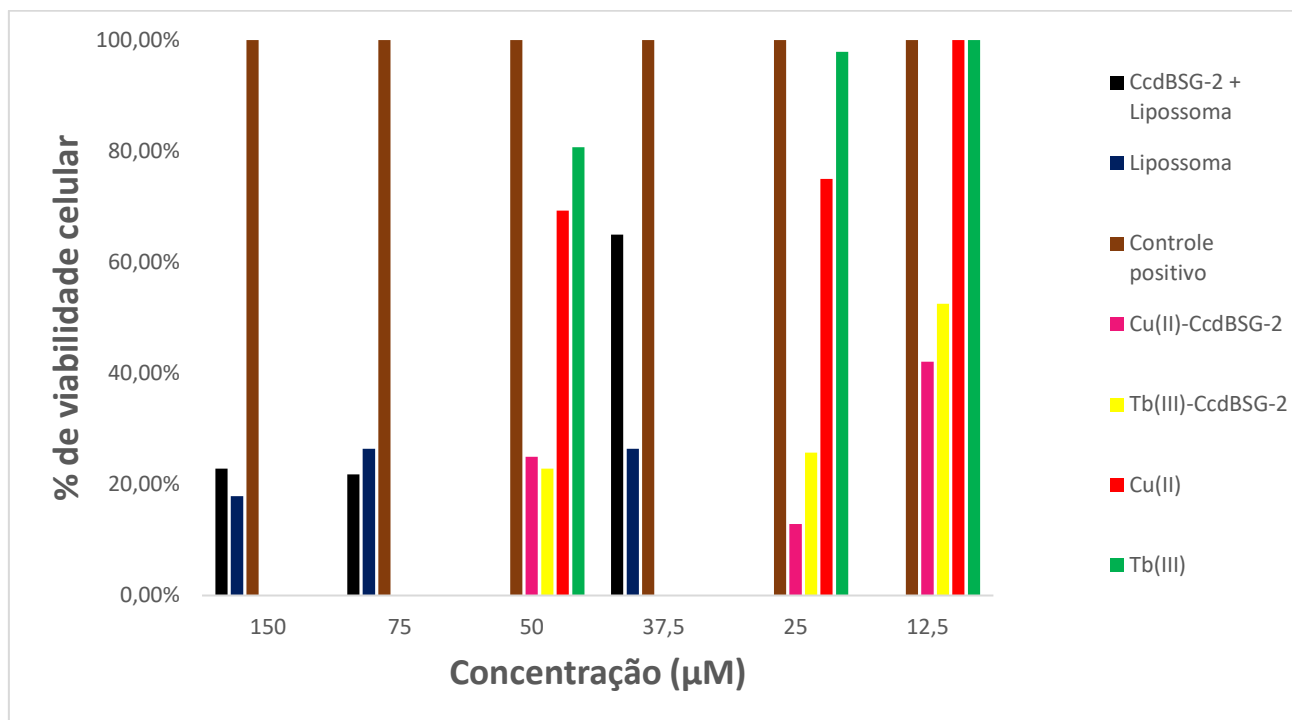
Os dados obtidos nos ensaios frente a bactéria *Escherichia coli* enterohemorrágica são apresentados na **Figura 26**, enquanto os dados obtidos nos ensaios frente a bactéria *Staphylococcus aureus* são apresentados na **Figura 27**.

Figura 26 - Resultados obtidos utilizando *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Cada agrupamento de barras representa uma concentração diferente utilizada no ensaio microbiológico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 27 - Resultados obtidos utilizando *Staphylococcus aureus*. Cada agrupamento de barras representa uma concentração diferente utilizada no ensaio microbiológico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os resultados mostram que contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (**Figura 26**), o número de células indiretamente mortas é menor que quando comparado à *Staphylococcus aureus* (**Figura 27**), tanto para o CcdBSG-2, quanto para seus complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2. Enquanto frente à *Escherichia coli* há uma inibição de 37,33% para o CcdBSG-2 e de 60,76% e 58,80% para os complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, respectivamente, nas maiores concentrações testadas (150 µM para o CcdBSG-2 e 50 µM para os complexos), a inibição frente à *Staphylococcus aureus* é de 77,14% para o CcdBSG-2 e de 75% e 77,14% para os complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, também nas maiores concentrações testadas.

A inibição relativamente menor frente à *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) pode ser explicada devido sua maior complexidade estrutural, quando

comparada à bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, uma vez que ela apresenta uma membrana externa que atua como uma barreira seletiva para a entrada e saída de alguns componentes, dificultando assim a fusão do sistema lipossomal. Porém, ainda assim é possível observar inibição frente a esta bactéria.

Quando comparamos o CcdBSG-2 com seus complexos, Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, os resultados são ainda mais satisfatórios, uma vez que, frente à *Escherichia coli* enterohemorrágica, o complexo Cu(II)-CcdBSG-2 é capaz de inibir 23,43% a mais o crescimento bacteriano e o complexo Tb(III)-CcdBSG-2 é capaz de inibir 21,47% a mais, quando comparados ao CcdBSG-2, mesmo em uma concentração três vezes menor que o CcdBSG-2 (150 µM para o CcdBSG-2 e 50 µM para os complexos).

Para a inibição frente à *Staphylococcus aureus*, este aumento do potencial de inibição dos complexos também é observado quando comparados ao CcdBSG-2. Em termos de percentual de inibição não há uma mudança significativa entre os três peptídeos, todos inibem cerca de 75% do crescimento microbiano, porém, esta inibição também é atingida com uma concentração três vezes menor dos complexos em relação ao CcdBSG-2.

Por fim, os mesmos testes foram também realizados utilizando apenas os metais Cu(II) e Tb(III), com as mesmas quantidades utilizadas para o preparo dos complexos, a fim de se determinar se o metal por si só é capaz de inibir o crescimento bacteriano ou se um sinergismo entre metal e CcdBSG-2 é responsável pelo aumento no potencial de inibição. Podemos observar pelas **Figuras 26 e 27**, que os metais são capazes de inibir uma quantidade muito pequena das bactérias, 7,48% para o Cu(II) e 9,76% para o Tb(III) frente à *Escherichia coli* enterohemorrágica, e 30% para o Cu(II) e 19,29% para o Tb(III) frente à *Staphylococcus aureus*, nas maiores concentrações (50 µM).

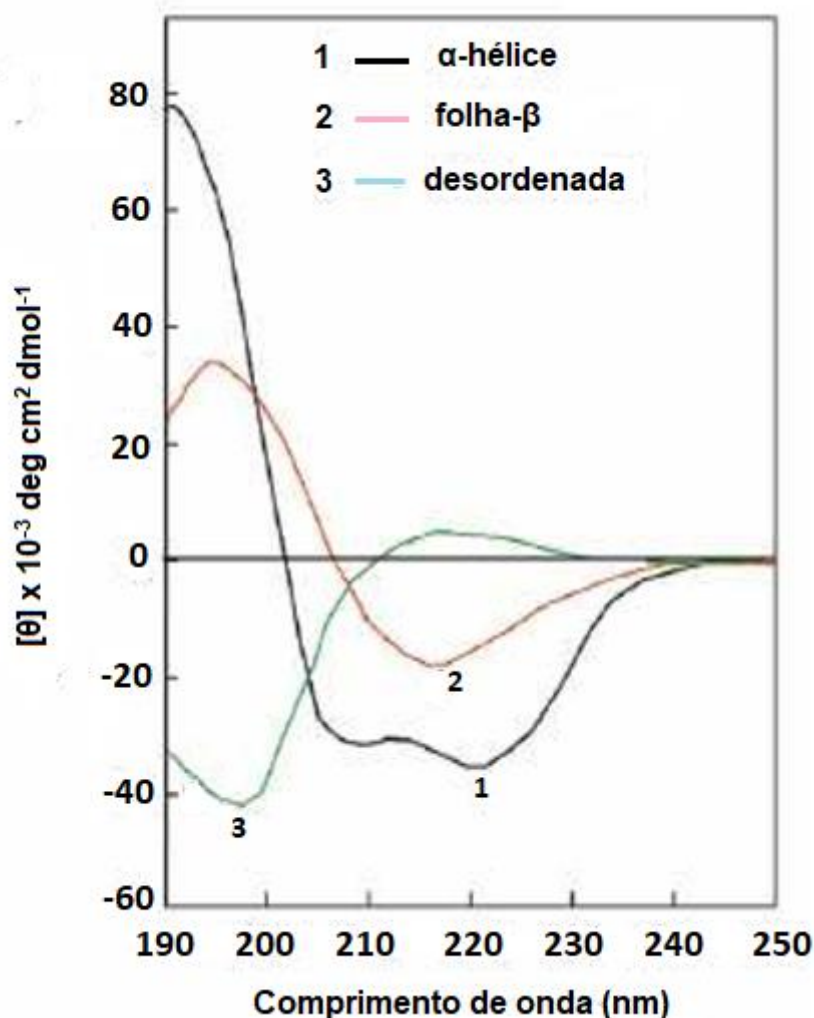
Dessa forma, é possível afirmar que o aumento na capacidade de inibição de crescimento bacteriano por parte dos complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2 é um sinergismo criado entre os metais e o peptídeo CcdBSG-2 e não apenas devido aos metais, uma vez que estes apresentam uma capacidade de inibição bem inferior aos complexos e ao próprio CcdBSG-2.

4.6 Dicroísmo Circular

Os resultados das análise de CD correspondem às únicas informações sobre a estrutura secundária dos peptídeos sintetizados neste projeto e foram utilizados com o intuito de se investigar uma possível mudança estrutural entre o peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos, Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, uma vez o aumento visto no potencial inibitório dos complexos pode estar relacionado à sua estrutura.

As análises foram realizadas conforme descrito no **item 3.7** e, como referência para a análise dos espectros, a **Figura 10**, apresentada no **item 3.7** foi utilizada, mas é agora reapresentada como **Figura 28** para uma melhor comparação entre os espectros obtidos e o espectro de referência.

Figura 28 - Espectro de CD característicos das estruturas secundárias α -hélice, folha β e estrutura randômica

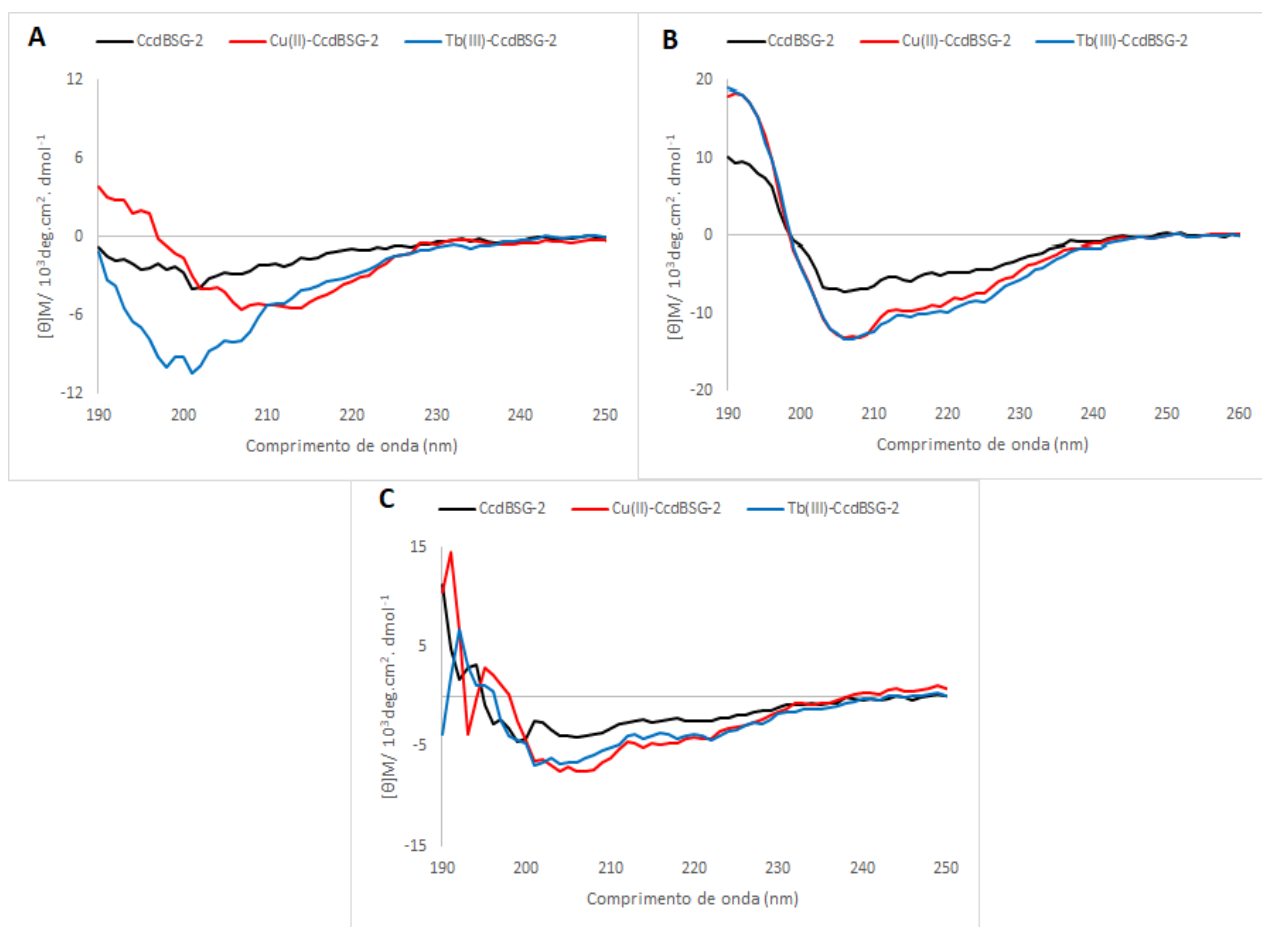


Fonte: Greenfield; Fasman (1969).

Os resultados obtidos através da espectroscopia de CD estão apresentados na **Figura 29**. A análise dos espectros de CD obtidos com o peptídeo a uma concentração de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão HEPES 1mmol.L^{-1} (**Figura 29A**), revelam que o complexo Cu(II)-CcdBSG-2 apresenta uma leve tendência à uma estruturação do tipo α -hélice, devido à presença de picos positivos em torno de 195 nm e negativos a 208 nm e 222 nm. Já o complexo Tb(III)-CcdBSG-2 e o peptídeo CcdBSG-2 não apresentam estrutura secundária definida. Quando o peptídeo e seus complexos são então colocados na presença

de TFE 60% (**Figura 29B**) e SDS 15mmol.L⁻¹ (**Figura 29C**), o observado é que todos apresentam uma tendência na formação de α -hélice (picos positivos em torno de 195 nm e negativos a 208 nm e 222 nm), sendo esta tendência mais perceptível na presença de TFE 60%.

Figura 29 - Espectros de CD do peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2 a 10 μ mol.L⁻¹ em (A) tampão HEPES 1 mmol.L⁻¹, (B) TFE 60% e (C) SDS 15 mmol.L⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir da apresentação de todos os resultados, podemos afirmar que não há uma mudança significativa de estruturação entre o peptídeo CcdBSG-2 e seus complexos Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2. Dessa forma, não é possível associar o aumento do potencial de inibição do crescimento bacteriano e de inibição enzimática à uma diferença na estruturação entre o peptídeo e os complexos. Assim, este aumento é devido a um sinergismo criado pela

associação dos metais com o peptídeo, mas que não ocasiona uma mudança na estruturação.

Devido ao tamanho do peptídeo e aos diversos sítios de ligação possíveis para que o metal se ligue, é provável que ele esteja acomodado no interior do peptídeo e assim possa criar um sinergismo com o mesmo, ocasionando uma potencialidade quando comparado com o CcdBSG-2 sem os metais.

Conclusões

5 Conclusões

Neste trabalho foi possível concluir que a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, bem como as técnicas empregadas para purificação e caracterização, foram adequadas para sintetizar o peptídeo CcdBSG-2 e obter um material com grau de pureza acima de 90% que é necessário para a aplicação em estudos de atividade biológica.

Os estudos envolvendo a complexação do peptídeo CcdBSG-2 com os metais Tb(III) e Cu(II) demonstraram que estes complexos são formados com três equivalentes molares dos metais em aproximadamente 30 minutos em solução aquosa.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição enzimática utilizando eletroforese em gel de agarose mostraram que o peptídeo CcdBSG-2, seus metalopeptídeos, Cu(II)-CcdBSG-2 e Tb(III)-CcdBSG-2, e os metais são capazes de inibir as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, sendo que os resultados obtidos com os metalopeptídeos apresentaram um potencial de inibição maior que o peptídeo CcdBSG-2, representando um grande potencial para a exploração da capacidade de aplicação dessa nova classe de peptídeos.

Os testes de capacidade hemolítica demonstraram que tanto o peptídeo quanto os metalopeptídeos apresentam capacidade hemolítica abaixo de 12% mesmo na concentração mais alta testada, valor este que os caracterizam como não tóxicos aos eritrócitos humanos.

Com relação aos ensaios de inibição do crescimento bacteriano em meio líquido, podemos afirmar que todos os peptídeos são capazes de inibir as bactérias Gram positiva e Gram negativa testadas, quando encapsulados em lipossomas do tipo SUV. Além disso, os resultados mostram que os metalopeptídeos possuem um potencial de inibição do crescimento bacteriano cerca de três vezes maior quando comparados ao CcdBSG-2 e que aumento no potencial se dá por conta de um sinergismo criado entre peptídeo e metal, e não devido apenas ao metal.

Por fim, os estudos de espectroscopia de dicroísmo circular mostraram que todos os peptídeos possuem a tendência de se estruturar em α -hélice, não sendo

possível, portanto, determinar que o aumento no potencial inibitório dos metalopeptídeos está relacionado à uma mudança estrutural quando comparado ao CcdBSG-2 .

Os resultados obtidos neste projeto demonstram que esta nova classe de peptídeos, chamada metalopeptídeos, possuem um grande potencial e características desejáveis para sua aplicação como possíveis agentes antimicrobianos.

Novas etapas de estudos ainda são necessárias para a aplicação efetiva destes compostos na terapêutica e para uma melhor compreensão de como a ligação entre metal-peptídeo ocorre, mas os estudos realizados até então demonstram que os metalopeptídeos podem apresentar características semelhantes com fármacos convencionais, o que é de suma importância na área de desenvolvimento de novos fármacos.

Referências

6 Referências

- AAKRE, C. D.; PHUNG, T. N.; HUANG, D.; LAUB, M. T. A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation Through a Direct Interaction with the β Sliding Clamp. **Molecular Cell**, v. 52, p. 617-628, 2013.
- AIZENMAN, E.; ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 6059-6063, 1996.
- ALI, J. A.; JACKSON, A. P.; HOWELLS, A. J.; MAXWELL, A. The 43-Kilodalton N-Terminal Fragment of the DNA Gyrase B Protein Hydrolyzes ATP and Binds Coumarin Drugs. **Biochemistry**, v. 32, p. 2717-2724, 1993.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 228, p. 3-24, 2005
- BACHEM GROUP. **Solid phase peptide synthesis**. 2016. Disponível em: <<http://www.bachem.com/service-support/technical-library/catalogs-brochures/>>. Acesso em: 13 mar. 2018.
- BAHASSI, E. M.; O'DEA, M. H.; ALLALI, N.; MESSENS, J.; GELLERT, M.; COUTURIER, M. Interactions of CcdB with DNA gyrase - Inactivation of GyrA, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 10936-10944, 1999.
- BARBOSA, L. C. B., CANGUSSU, A. S. R., GARRIDO, S.S., MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2014.
- BELLO, J.; BELLO, H. R.; GRANADOS, E. Conformation and aggregation of melittin: dependence of pH and concentration. **Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 461-465, 1982.

- 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, p. 735-745, 1992.
- BERNARD, P.; KEZDY, K. E.; VAN MELDEREN, L.; STEYAERT, J.; WYNS, L.; PATO, M. L.; HIGGINS, P. N.; COUTURIER, M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 534-541, 1993.
- BROWN, P. O.; PEEBLES, C. L.; COZZARELLI, N. R. A topoisomerase from Escherichia coli related to DNA gyrase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 12, p. 6110-6114, 1979.
- CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.
- CHE, CHI-MING; SIU, FUNG-MING. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 255-261, 2010.
- CILLI, M. E.; PICCOLI, P.J.; ERNANDES, R.J.; NAKAIE, R.C.; JUBILUT, N.G. In: **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v.4, cap. 5, p. 175-196.
- CRITCHLOW, S. E.; O'DEA, M. H.; HOWELLS, A. J.; COUTURIER, M.; GELLERT, M.; MAXWELL, A. The interaction of the F-plasmid killer protein CcdB with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, p. 826-839, 1997
- DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 3, p.377-392, 1997.
- FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19298-19303, 1996.
- FINERAN, P. C; BLOWER, T. R.; FOULDS, I. J.; HUMPHREYS, D. P.; LILLEY, K. S.; SALMOND, G. P. C. The phage abortive infection system, ToxIN,

functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 894-899, 2009.

FOZO, E. M.; MAKAROVA, K. S.; SHABALINA, S. A.; YUTIN, N.; KOONIN, E. V.; STORZ, G. Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 11, p. 3743-3759, 2010.

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

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L. S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, No. 3, p. 667-679, 2010.

HIRAGA, S.; JAFFÉ, A.; OGURA, T.; MORI, H.; TAKAHASHI, H. F Plasmid ccd Mechanism in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 1, p.100-104, 1986.

HOROWITZ D. S.; WANG, J. C. Mapping the Active Site Tyrosine of Escherichia coli DNA Gyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5339-5344, 1987.

KAMPRANIS, S. C.; HOWELLS, A. J.; MAXWELL, A. The interaction of DNA Gyrase with the bacterial toxin CcdB: Evidence for the existence of two Gyrase-CcdB complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, p. 733-744, 1999.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New Topoisomerase Essential for Chromosome Segregation in E. coli. **Cell Press**, v. 63, p. 393-404, 1990.

KATO, J.; SUZUKI, H.; IKEDA, H. Purification and Characterization of DNA Topoisomerase IV in Escherichia coli. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n. 36, p. 25676-25684, 1992.

KLEVAN, L; WANG, J.C. Deoxyribonucleic Acid Gyrase-Deoxyribonucleic Acid Complex Containing 140 Base Pairs of Deoxyribonucleic Acid and an $\alpha_2\beta_2$ Protein Core. **Biochemistry**, v. 19, No.23, p. 5229-5234, 1980.

LACOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3th. ed. New York: Springer, 2006.

LEPLAE R.; GEERAERTS, D.; HALLEZ, R.; GUGLIELMINI, J.; DRÈZE, P.; VAN MELDEREN, L. Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 13, 2011.

LIBARDO, D. M. J.; NAGELLA S.; LUGO A.; PIERCE S.; ANGELES-BOZA A. M. Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, p. 446-451, 2014.

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

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: LOHNER, K. (Ed.). Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies. **England: Horizon Scientific Press**, 2001. p. 1-15.

LORENZÓN, E. N. **Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre cadeias do peptide Hylina-C na forma dimérica**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

LORIS, R.; DAO-THI, M.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L.; POORTMANS, F.; LIDDINGTON, R.; COUTURIER, M.; WYNS, L. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from E. coli. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 1667-1677, 1999.

- LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**, v. 34, No. 1, p. 77-84, 2016.
- MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de inibição da atividade da DNA girase**. 2006. 163f. Texto (Livre-Docência) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- MASUDA, H.; TAN, Q.; AWANO, N.; WU, K.; INOUE, M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 84, p. 979-989, 2012.
- MAXWELL, A.; GELLERT, M. The DNA Dependence of the ATPase Activity of DNA Gyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 23, p. 14472-14480, 1984.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149– 2154, July. 1963.
- MILLS, S.D. When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1096–1102, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1328 p.
- NOVARETTI, M.C.Z; AQUINO, S.; PISCOPO, M.R. Controle de vendas de antibióticos no brasil: análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. **Revista Acadêmica São Marcos**, ano 4, n.2, p. 25-39, jul./dez. 2014.
- PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nature Chemical Biology**, v. 12, p. 208-214, 2016.
- PANDEY, D. P.; GERDES, k. Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 3, p. 966-976, 2005.

PENG, H; MARIANS, K. J. The Interaction of Escherichia coli Topoisomerase IV with DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 25286-25290, 1995.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA Gyrase: Structure and Function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p. 335-375, 1991.

REECE, R. J.; MAXWELL, A. Tryptic Fragments of the Escherichia coli DNA Gyrase A Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 33, p.19648-19653, 1989.

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W.; FONTE, A.P.S.; TAVARES, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011

SHAO, Y.; HARRISON, E.M.; BI, D.; TAI, C.; HE, X.; OU, H.; RAJAKUMAR, K.; DENG, Z. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin–antitoxin loci in bacteria and archaea. **Nucleic acids research**, v. 39, p. D606-D611, 2011

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. Rockford: Pierce Chemical Company, 1984. STEWART, L.; REDINBO, M. R.; QUIXHOL, W. G. J.; CHAMPOUX, J. J. A model for the mechanism human topoisomerase I. **Science**, v. 279, p. 1534-1541,1998.

STOCO, P. H. **Caracterização das dna topoisomerasas II de *Trypanosoma Rangeli***. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.

SUGINO, A.; PEEBLES, C. L.; KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 4767-4771, 1977.

SWANBERG, S.L; WANG, J.C. Cloning and Sequencing of the Escherichia coli gyrA Gene Coding for the A Subunit of DNA Gyrase. **Journal of Molecular Biology**, v. 197, p. 729-736, 1987.

- WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 330-333, 2010.
- WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. **Nature**, v. 3, p. 430-440, 2002.
- WANG, X.; LORD, D. M.; CHENG, H.; OSBOURNE, D. O.; HONG, S. H.; TORRES, V. S.; QUIROGA, C.; ZHENG, K.; HERRMANN, T.; PETI, W.; BENEDIK, M. J.; PAGE, R.; WOOD, T. K. A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 855-861, 2012.
- WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5577-5583, 2011.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2007.
- WHO - World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland. 2005.
- WIGLEY, D.B. Structure and mechanism of DNA Gyrase. In: **Nucleic Acids and Molecular Biology**, v. 9 (Eckstein, F. & Lilley, D.M.J., Eds.), pp. 165 - 176 Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 1995.
- YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. mRNA Interferases, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin–Antitoxin Systems. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 85, p. 467-500, 2009.
- YAMAGUCHI, Y.; PARK, J.; INOUE, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 61-79, 2011.
- YARMOLINSKY, M. B. Programmed cell death in bacterial populations. **Science**, v. 267, 1995.