UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÍNTESE E APLICAÇÕES DE INIBIDORES PEPTÍDICOS DE TOPOISOMERASES ASSOCIADOS A SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

MÁRCIO FALCI PENNISI

Araraquara – 2012

SÍNTESE E APLICAÇÕES DE INIBIDORES PEPTÍDICOS DE TOPOISOMERASES ASSOCIADOS A SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Aluno: Márcio Falci Pennisi

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara – 2012

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO 10

1.1. DNA Topoisomerases: Girase e Topoisomerase IV 11

1.2. A toxina CcdB 12

1.3. Peptídeos derivados de CcdB 14

1.4. Lipossomas 16

2. OBJETIVOS 18

3. MATERIAIS 19

3.1. Reagentes e solventes 19

3.2. Equipamentos 19

4. MÉTODOS 21

4.1. Síntese, caracterização e purificação do análogo peptídico 21

4.2. Preparo dos lipossomas 24

4.3. Determinação da eficiência de encapsulação pelos lipossomas 25

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) in vitro 26

4.5. Determinação da CIM em meio líquido (perspectivas futuras) 28

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

5.1. Síntese e purificação do peptídeo CcdBdp1 29

5.2. Ensaios de inibição enzimática 30

5.2.1. Ensaios de inibição da atividade da DNA girase 30

5.2.2. Ensaios de inibição da atividade da topoisomerase IV 31

5.3. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas 33

5.3.1. Diâmetro dos lipossomas por Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering).....33

5.4. Estudos de eficiência de encapsulação de CcdBdp1 em lipossomas do tipo SUV 35

5.5. Ensaios de inibição do crescimento bacteriano 38

6. CONCLUSÕES 39

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

RESUMO

O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de medicamentos constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia. Nesse sentido, peptídeos com efeito antimicrobiano, produzidos por plantas, animais e microrganismos estão sendo utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos com aplicações em saúde. Resultados promissores têm sido obtidos em relação à inibição da atividade das enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV por derivados peptídicos de toxinas bacterianas, comprovados em ensaios *in vitro*. Porém, ensaios *in vivo* não demonstraram reprodutibilidade, basicamente devido à baixa permeabilidade da célula bacteriana a estes compostos. Desta forma, o objetivo deste projeto consiste em aplicar sistemas eficientes para promover o acesso de moléculas peptídicas sintéticas derivadas de toxinas bacterianas, ao meio intracelular e, consequentemente, aos seus alvos intracelulares: as enzimas DNA girase e/ou topoisomerase IV. Com isso, pretendemos solucionar a barreira técnica em que se encontram as aplicações dessa classe de biomoléculas como precursores de novos agentes antibacterianos, o que certamente causaria um importante avanço nas pesquisas desenvolvidas pelo grupo.

Palavras-chave: Peptídeos, Toxina CcdB, CcdBdp1, Lipossomas, SPFS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: Acetonitrila

BOC: Terc-butiloxicarbonila

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCM: Diclorometano

DIC: Diisopropilcarbodiimida

DMF: N,N-dimetilformamida

EDT: 1, 2-etanoditiol

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonila

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC/ESI-MS: Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray

MLV: *Multilamellar Vesicles*, Vesículas multilamelares

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*, Dodecil sulfato de sódio

SPFS: Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

SUV: *Small Unilamellar Vesicles*, Vesículas unilamelares pequenas

TFA: Ácido trifluoroacético

TIS: Triisopropilsilano

Topo IV: Topoisomerase IV

Trt: Tritila

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

AMINOÁCIDOS:

ε-Ahx (Z): Ácido ε-aminocaproico

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

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1. Estrutura esquemática da forma ativa da toxina CcdB.....13

Figura 2. Alinhamento das sequências da toxina CcdB e do peptídeo CcdBdp1.....15

Figura 3. Ciclo da síntese em fase sólida.....21

Figura 4. Esquema ilustrativo da SPFS.....22

Figura 5. Estrutura primária do peptídeo CcdBdp1 22

Figura 6. Cromatogramas obtidos antes e após purificação do peptídeo CcdBdp1..29

Figura 7. Espectro de massa do peptídeo CcdBdp1. 30

Figura 8. Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBdp1.....31

Figura 9. Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBdp1 32

Figura 10. Lipossoma sem peptídeo com diâmetro médio de 111,0 nm 34

Figura 11. Lipossoma com peptídeo com diâmetro médio de 131,8 nm 34

Figura 12. Curva analítica das diversas concentrações de CcdBdp1 36

Figura 13. Curvas de fluorescência para o peptídeo livre e para peptídeo e lipossomas com peptídeos eluídos da coluna cromatográfica 37

TABELAS:

Tabela 1. Concentrações do peptídeo e suas respectivas fluorescências emitidas..36

1. INTRODUÇÃO

O combate a doenças infecciosas vem sendo o objetivo de muitos estudos atuais já que as mesmas estão entre as principais causas de morte da população humana. Este fato ocorre, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos existentes no mercado, muitas vezes relacionados com o uso intensivo ou inadequado dos mesmos, ocasionando a seleção de microrganismos patógenos resistentes.

Como o surgimento de resistência bacteriana é um processo dinâmico e sua contenção depende de diversas medidas sócio-político-econômicas, torna-se fundamental a busca por novos compostos que possam atuar como novos fármacos a serem utilizados no combate às doenças infecciosas (TROVATTI, 2006).

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

A toxina bacteriana CcdB constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica associada a antibióticos de origem natural com potencial considerável, a qual exerce sua função sobre um grupo de enzimas alvo denominadas DNA topoisomerases (GERDES et al., 2000). CcdB é um peptídeo de 101 resíduos de aminoácidos de 11,7 kDa que possui a propriedade de cessar o crescimento

bacteriano através de um mecanismo no qual a enzima DNA girase está envolvida (KATO et al., 1990).

Neste sentido, nosso grupo já vem atuando na síntese química de fragmentos peptídicos análogos da toxina CcdB, bem como o emprego dos mesmos como miméticos em estudos estruturais e em estudos de interação envolvendo as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV.

1.1. DNA Topoisomerases: Girase e Topoisomerase IV

Presentes tanto em organismos procarióticos como eucarióticos, as DNA topoisomerases têm funções essenciais à viabilidade celular. São responsáveis por alterações topológicas no DNA essenciais ao metabolismo celular (LOHNER, STAUDEGGER, 2001).

Elas fazem modificações topológicas no DNA relacionadas aos processos envolvidos na divisão celular pela indução de quebras em simples ou dupla fita na cadeia de DNA. As enzimas que clivam apenas uma fita do DNA são definidas como de tipo I, subdivididas em tipos IA e IB; as que clivam as duas fitas do DNA são classificadas como de tipo II, subdivididas em tipos IIA e IIB. Ambas as enzimas bacterianas utilizadas neste trabalho, DNA girase e DNA topoisomerase IV, são topoisomerases do tipo IIA.

A DNA girase é um membro das topoisomerases do tipo IIA encontradas somente em células bacterianas, descoberta em *Escherichia coli* por Gellert e colaboradores em 1976, sendo responsável por controlar um processo bastante específico durante a replicação do DNA nas células. Esta classe de enzima difere de todas as demais topoisomerases por ser a única capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA (REECE & MAXWELL, 1991; WIGLEY,1995).

Como a DNA girase é encontrada somente nos organismos procariotos, sua importância como alvo de agentes antimicrobianos é indiscutível. A característica única apresentada por esta classe de enzimas torna viáveis estudos de interação e inibição enzimática através da análise da migração das diferentes formas do DNA, quando submetidas a um campo elétrico.

Em 1990, Kato e colaboradores descobriram uma enzima homóloga da DNA girase, denominada topoisomerase IV. No entanto, estas enzimas diferem-se em um aspecto fundamental: a DNA girase liga o DNA ao redor de si mesma, enquanto a topoisomerase IV não. Assim sendo, com a descoberta da topoisomerase IV, tornou-se evidente que a DNA girase não é o único alvo intracelular efetivo para os diversos agentes terapêuticos.

1.2. A toxina CcdB

Sistemas toxina-antitoxina (sistemas TA), também conhecidos como sistemas de morte celular pós-segregacional, são responsáveis pela permanência de certos plasmídeos após a replicação da célula, incluindo plasmídeos responsáveis por virulência e resistência a antibióticos. O sistema TA é composto de dois genes, dos quais um que codifica uma toxina e outro que codifica seu antídoto. Como a antitoxina normalmente é mais susceptível à ação de proteases que sua toxina correspondente, esta última continua ativa mesmo nas células-filhas que não receberem seu plasmídeo. Quando o plasmídeo que contém os dois genes do sistema TA não é transferido à célula-filha, a toxina herdada da célula-mãe causa a morte da célula (HAYES, 2003).

Um exemplo claro de sistema toxina-antitoxina é o que ocorre no plasmídeo F, presente em procariotos. O sistema TA contido no plasmídeo F, denominado ccd (de *coupled cell division*), é formado pelos genes ccdB e ccdA, que expressam a toxina CcdB e sua instável antitoxina CcdA, respectivamente. *In vivo*, a antitoxina CcdA é responsável por suprimir a atividade inibitória da toxina CcdB (HIRAGA et al., 1986; VAN MELDEREN, 2002).

A toxina CcdB é uma proteína dimérica, sendo que cada um dos monômeros de 11,7 kDa é composto por uma sequência de 101 resíduos de aminoácidos, formando uma estrutura de uma folha beta de cinco fitas beta antiparalelas e uma folha beta menor de três fitas antiparalelas, ligadas a uma alfa-hélice C-terminal, conforme mostra a Figura 1 (LORIS et al., 1999).

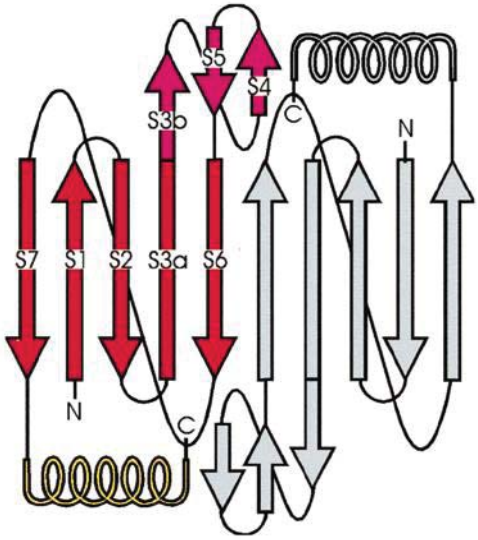


Figura 1. Estrutura esquemática da forma ativa da toxina CcdB (LORIS et al., 1999).

O principal mecanismo de ação da toxina CcdB consiste em cessar a divisão celular pela inibição da atividade da DNA girase da célula bacteriana, de uma forma similar às quinolonas. Tanto as quinolonas quanto CcdB inibem a enzima e causam consequente bloqueio da transcrição. Entretanto, a região de ligação da DNA girase com CcdB é diferente da região de ligação da enzima com as quinolonas, o que abre espaço para o desenvolvimento de uma nova classe de drogas baseadas na interação das topoisomerases com CcdB ou seus derivados peptídicos (VAN MELDEREN, 2002; TROVATTI et al., 2008).

1.3. Peptídeos derivados de CcdB

Novas substâncias com atividade terapêutica, até alguns anos atrás, eram produzidas, praticamente por meio de abordagens empíricas e básicas, uma vez que os novos compostos eram geralmente sintetizados ou obtidos a partir de fontes naturais e testados *in vitro* e *in vivo*, de forma randomizada. Esta abordagem, por sua vez, necessita de quantidades significativas de produtos para os testes biológicos, levando à necessidade da realização de sínteses ou extrações por repetidas vezes, tornando todo o processo demorado e muito trabalhoso (MARQUARDT & EIFLER-LIMA, 2001).

Uma promissora metodologia para agilizar os estudos e desenvolvimento de novas substâncias com atividade biológica é a síntese de peptídeos. Atualmente os peptídeos representam uma pequena fatia com grande potencial de crescimento no mercado de medicamentos, o que torna muito promissora essa classe de compostos.

Há um enorme interesse por esta classe de compostos, sendo que metodologias de isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação, passaram a ser sistematicamente estudadas e aprimoradas.

A síntese de moléculas idênticas ou análogas às naturais (derivados estruturais com algumas modificações pontuais) permite a realização de estudos fisiológicos, químicos, físicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos de grande parte dos peptídeos biologicamente ativos conhecidos até o presente momento (MACHADO et al., 2004).

Neste sentido, nosso grupo vem atuando na síntese química de fragmentos peptídicos análogos da toxina CcdB, bem como o emprego dos mesmos como

miméticos em estudos estruturais e em estudos de interação envolvendo as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV.

Um dos derivados de CcdB que vem demonstrando grande potencial terapêutico é o CcdBdp1 (DELFINO, 2011, p. 67), um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos, sendo dois deles o espaçador flexível ácido ε-aminocapróico, utilizado para dar mobilidade às regiões sintetizadas. Este peptídeo contém os resíduos de aminoácidos fundamentais para a interação com a DNA girase (W99, G100 e I101), incluindo os resíduos que constituem a alfa-hélice (S87-F98), um segmento importante para a formação da estrutura do dímero de CcdB (M68–P72) e uma extremidade N-terminal com uma *beta-sheet* (M1-K9) (BAHASSI et al., 1995; LORIS et al., 1999).

A única modificação feita em relação aos segmentos originais de CcdB foi a substituição da serina 70 da toxina por uma cisteína, modificação esta que possibilita a obtenção de dímeros sintéticos através da formação de ligações covalentes do tipo dissulfeto (-S-S-) entre duas moléculas do mesmo peptídeo em meio ligeiramente básico na presença de oxigênio. A Figura 2 mostra a comparação por alinhamento entre as sequências peptídicas da toxina CcdB e do peptídeo CcdBdp1.

```
 1MQFKVYTYKRESRYRLFVDVQSDIIDTPGRRMVIPLASARLLSDKVSRELY51  CcdB
 1MQFKVYTYK9 . . . . . . . . . . . . . . Z10 . . . . . .   CcdBdp1

52PVVHIGDESWRMMTTDMASVPVSVIGEEVADLSHRENDIKNAINLMFWGI101  CcdB
  . . . . . 11MTTDMACVPV20 . . Z21.   22ENDIKNAINLMFWGI36  CcdBdp1
```

Figura 2. Alinhamento das sequências da toxina CcdB e do peptídeo CcdBdp1. Destacada, a substituição da serina (S70) por uma cisteína. Z = ácido ε-aminocaproico.

Resultados promissores têm sido obtidos em termos da capacidade de inibição da atividade das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, envolvendo o

peptídeo CcdBdp1. *In vitro*, os valores de concentração para inibição total (IC_{100}) foram bastante satisfatórios, principalmente na inibição da atividade da topoisomerase IV, o que é algo inédito na literatura. Porém ensaios *in vivo* não têm sido reprodutíveis, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana a estes miméticos. Isso nos motivou a utilizar este peptídeo como elemento central deste trabalho.

1.4. Lipossomas

Lipossomas podem ser definidos como estruturas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, contendo água tanto em seu interior quanto em seu exterior. Podem variar de 0,02 a 10 µm em diâmetro, e são normalmente compostos de colesterol e fosfolipídeos naturais ou sintéticos, podendo também incluir lipoproteínas (DRULIS-KAWA et al., 2010).

O uso de lipossomas é muito comum atualmente como carreadores para fármacos, tanto na indústria farmacêutica quanto na indústria cosmética. Além da função carreadora, os diversos aspectos físico-químicos dos lipossomas permitem modificar suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Como exemplos de modificações que podem ser feitas são a alteração das moléculas dos lipídios e suas proporções, tamanho do lipossoma, a carga na sua superfície, sensibilidade ao pH e à temperatura e a fluidez da membrana lipossomal. (DRULIS-KAWA et al., 2010).

Segundo Tan et al. (2010), entre as possíveis vantagens de sistemas de liberação controlada (*drug delivery systems*) na terapia com peptídeos e proteínas, temos o aumento da solubilidade, melhor distribuição no organismo, liberação controlada do fármaco, além da possibilidade de desenvolvimento de terapias-alvo

focadas em determinados tecidos. Além disso, com o desenho adequado do sistema pode-se reduzir efeitos colaterais indesejáveis, especialmente pelo uso de sistemas de liberação controlada, que atenuam os picos de concentração plasmática do fármaco.

Sendo assim, o advento da nanotecnologia tornou possível o desenvolvimento de materiais e sistemas que possibilitam sua aplicação às mais variadas condições. A aplicação de materiais poliméricos biodegradáveis ou de origem natural (técnicas bastante conhecidas) para propósitos médicos tem demonstrado ser uma tendência mundial. Com isso é possível a utilização destas tecnologias como ferramenta para possibilitar a mobilidade das moléculas peptídicas com potencial terapêutico promissor, com o objetivo principal de desenvolvimento de novas famílias de moléculas com grande capacidade antibacteriana e reduzida toxicidade às células eucarióticas.

2. OBJETIVOS

O objetivo central do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do análogo peptídico da toxina CcdB denominado CcdBdp1.

Para atingir este objetivo, pretende-se com este trabalho:

- Sintetizar o peptídeo CcdBdp1.
- Purificar e caracterizar o análogo por CLAE (HPLC) e espectrometria de massas.
- Realizar ensaios *in vitro* por eletroforese para testar a atividade inibitória do análogo frente às enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do análogo peptídico frente a cada uma das enzimas.
- Encapsular o análogo peptídico em sistema lipossômico.
- Realizar ensaios *in vivo* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando o análogo associado aos lipossomas.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes e solventes

- Resina Fmoc-Ile-Wang com grau de substituição inicial de 0,15 mmol/g - Novabiochem®.
- Aminoácidos com grupamento N-terminal protegido com o grupo base-lábil Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) - Novabiochem®.
- N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) - Novabiochem®.
- Acetonitrila grau HPLC, obtida da Tedia Brazil®.
- Ácido acético glacial e piperidina Merck®.
- Água deionizada obtida pelo sistema de ultrafiltração Barnstead®.
- Diclorometano (DCM) e éter etílico adquiridos da Qhemis®.
- N,N´-Diisopropilcarbodiimida (DIC) e ácido trifluoroacético (TFA) obtidos da Fluka®.
- N,N-Dimetilformamida (DMF) - Synth®.
- Extrato de lecitina de soja rico em fosfatidilcolina (~40%) - Fluka®.
- Etanoditiol (EDT), Anidrido acético, octadecilamina (estearilamina), Lα-fosfatidilcolina (99%), Lα-palmitoil-glicerol (98%), colesterol (95%), obtidos da Sigma-Aldrich®.
- Fenol e tioanisol, obtidos da Acros®.
- Hexafluoroisopropanol obtido da J.T.Baker®.

3.2. Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo analítico: cromatógrafo Varian ProStar, equipado com coluna C18 Jupiter Phenomenex 5 µm, 300 Å, de dimensões 250 x 4.6 mm. O equipamento é composto por

duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, todo controlado por uma *workstation* para manipulação e tratamento dos dados.

- Espectrômetro de massas Bruker® IonTrap modelo Amazon SL equipado com *workstation* TrapControl para obtenção dos dados.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, modelo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa C18, Delta Pak, Waters, 15 µm, 300 Å, de dimensão 300 x 19 mm. O equipamento é composto por duas bombas modelo 116 e detector UV/Visível, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.
- Banho de ultrassom Sonics Vibra-Cell®.
- Espectrofotômetro de duplo feixe Shimadzu® modelo UV-1601PC, controlado por uma *workstation* Dell®.
- Espectrofluorímetro Varian® modelo Cary Eclipse, controlado por uma *workstation* Dell®, tendo instalado o software Cary Eclipse para aquisição e manipulação de dados.
- Sistema de cromatografia por exclusão molecular com coluna empacotada Sephadex G-25.
- Leitor espectrofotométrico de microplacas Biotek®, modelo Epoch.

4. MÉTODOS

4.1. Síntese, caracterização e purificação do análogo peptídico

A primeira síntese de peptídeos em fase sólida foi feita em 1901 por Emil Fischer, que é considerado o fundador da química de peptídeos, tendo cunhado o termo peptídeo. Ao longo do século XX, diversos avanços ocorreram até o estabelecimento das atuais metodologias de síntese em fase sólida, incluindo a síntese FMOC, a mais utilizada atualmente (MERRIFIELD, 1997).

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) se baseia na ligação covalente do primeiro aminoácido da sequência em um suporte polimérico sólido, insolúvel e quimicamente estável. Trata-se de um processo cíclico de desproteção do fim da cadeia, lavagem, acoplamento do próximo resíduo de aminoácido, seguido de nova lavagem (Figuras 3 e 4). A vantagem da técnica em relação a reações em meio líquido reside na facilidade em remover, através das lavagens que são feitas após cada reação, quaisquer reagentes em excesso utilizados, deixando apenas a cadeia do peptídeo que está sendo formado, ligada à resina (WELLINGS; ATHERTON, 1997).

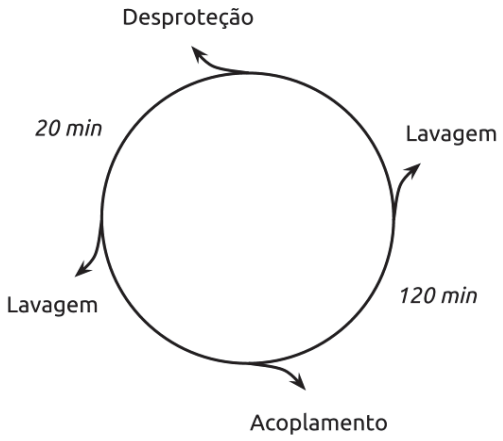


Figura 3. Ciclo da síntese em fase sólida.

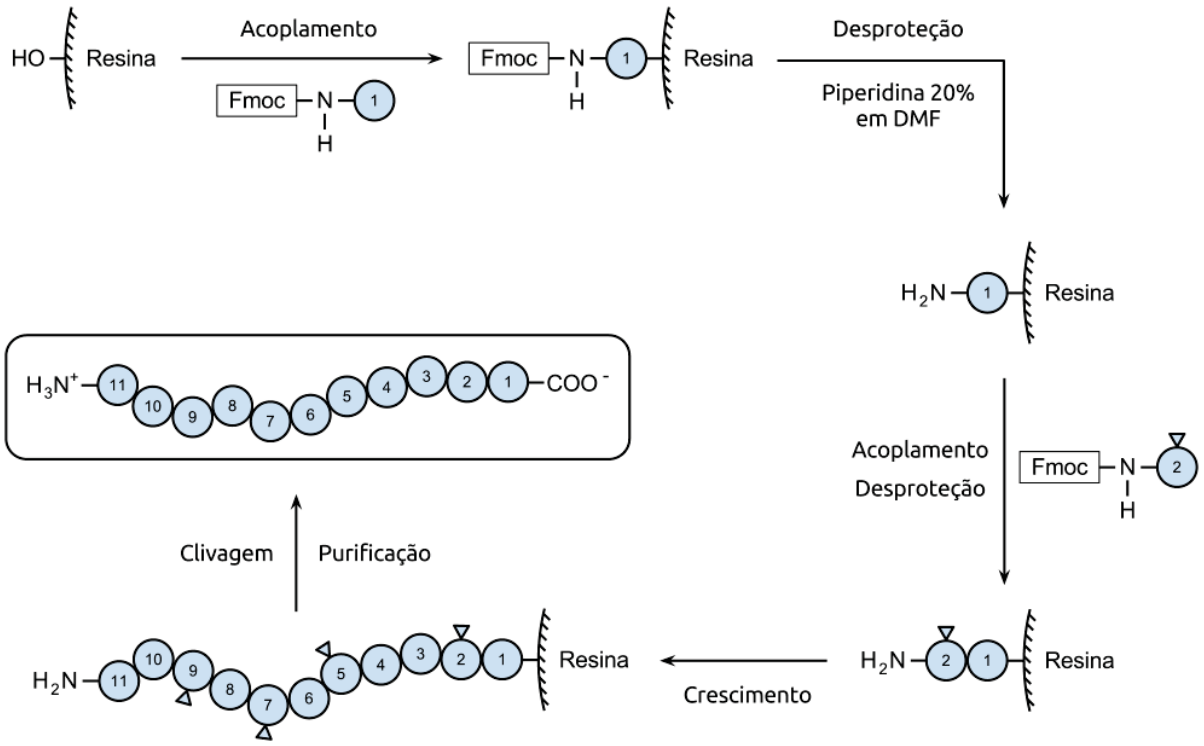


Figura 4. Esquema ilustrativo da SPFS. Os círculos representam os resíduos de aminoácidos. Os triângulos representam os protetores das diferentes cadeias laterais reativas dos aminoácidos**.**

A sequência peptídica do análogo CcdBdp1 (Figura 5) foi sintetizada manualmente pelo método de síntese em fase sólida (STEWART; YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS; ALBERICIO; GLIRALT, 1997; AMBLARD et al., 2005) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α-amino grupos e derivados t-butílicos (t-bu) para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais.

^{1}MQFKVYTYK-Z-MTTDMACVPV-Z-ENDIKNAINLMFWGI^{36}

Figura 5. Estrutura primária do peptídeo CcdBdp1. Z = ácido ε-aminocaproico.

A resina de partida foi uma resina de Wang com o primeiro aminoácido da sequência (Ile) previamente incorporado e com grau de substituição inicial de 0,15 mmol/g, usando diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como

agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de três vezes em relação à quantidade inicial de resina, tanto para Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, reagindo em uma mistura de diclorometano/dimetilformamida (DCM/DMF 1:1 v/v) por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos α-amino (remoção do grupo base-lábil Fmoc) após o acoplamento de cada aminoácido foi realizada empregando-se uma solução a 20% de piperidina em DMF.

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

A acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e diisopropiletilamina (DIEA) (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos. A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a 25ºC por 3 horas. O peptídeo obtido após a clivagem foi precipitado e lavado com éter dietílico gelado e centrifugado (seis vezes), dissolvido em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizado. A purificação foi feita em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo (conforme descrito anteriormente), com gradiente linear de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA) variável, com fluxo de 2,0 mL/min e detecção a 220 nm. A cromatografia em escala analítica foi feita com equipamento de CLAE conforme descrito no item 3.3, com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 220 nm.

A caracterização do produto após purificação foi realizada para confirmação e identificação dos picos com massa molecular correspondentes aos valores teóricos dos mesmos, empregando espectrometria de massas (LC/MS-ESI).

4.2. Preparo dos lipossomas

Explorou-se nesse trabalho a elaboração de lipossomas do tipo SUV, os quais foram feitos com diâmetro médio de 100 nm. Para tal, foi utilizada a metodologia descrita por Breukink et al. (2000), modificando-se a composição utilizando como principal componente um fosfolipídio, no caso a fosfatidilcolina, e como segundo componente, a estearilamina, um agente de carga que permite proporcionar uma superfície catiônica ao lipossoma.

A massa de fosfatidilcolina utilizada foi de 80 mg, adicionando-se 3% do agente de carga (m/m). Em seguida dissolveu-se o conteúdo em 1000 µL de clorofórmio em um tubo de ensaio. A partir dessa solução distribuiu-se 250 µL a quatro tubos de ensaio distintos (essa divisão da solução visa apenas minimizar o erro de pesagem, garantindo que pelo menos três filmes formado eram equivalentes, sendo o último tubo descartado). O solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, possibilitando a formação de um filme lipídico fino nas paredes do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foi adicionado a um dos filmes formados, 1 mL de tampão Tris.HCl, 10 mmol/L, pH 7,0; para promover a hidratação da fase lipídica. É importante ressaltar que para os lipossomas contendo peptídeo, esta etapa de hidratação da fase lipídica foi feita utilizando o mesmo tampão, contendo peptídeo na concentração adequada. Para conseguir o desprendimento total do lipídeo das paredes do tubo, foram feitas agitações suaves (manualmente), alternadas com

agitações vigorosas (mecanicamente em agitador tipo vórtex), obtendo desta maneira uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV). Para sua conversão em SUV, as MLV foram submetidas à extrusão de 30 ciclos, utilizando um extrusor equipado com membrana de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro.

4.3. Determinação da eficiência de encapsulação pelos lipossomas

Para determinação da eficiência de encapsulação das preparações de lipossomas, foram injetados 500 µL de solução da amostra de lipossomas SUV formados após extrusão, em uma coluna Sephadex-G25 média (Amersham Biosciences®) e foram eluídos com tampão Tris.HCl, 10 mmol/L, pH 7,0; sob fluxo de aproximadamente 2 mL/minuto. Frações de 1,0 mL foram coletadas e lidas no espectrofotômetro em 220 nm. As duas frações de maior absorbância foram juntadas e liofilizadas. Posteriormente, 2 mg do material liofilizado foram pesados em tubo “eppendorf”, adicionando 1 mL de metanol para rompimento das vesículas. A seguir, empregando-se uma curva analítica padrão de peptídeo em metanol, foi determinada a concentração do peptídeo que havia sido encapsulado pelo lipossoma, utilizando-se absorbância a 220 nm. Foi utilizada como branco da análise a amostra lipossoma isentos de peptídeos (extrusionados apenas com tampão) e submetidos ao mesmo tratamento. A partir da concentração do peptídeo, da massa total de lipossoma contido na solução e da massa inicial de peptídeo utilizada para preparação dos lipossomas, foram determinadas as respectivas eficiências de encapsulação para cada formulação. Os resultados foram realizados em duplicata.

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) in vitro

- Ensaio de inibição da atividade da DNA girase:

Os estudos para avaliação da inibição da atividade de superenovelamento do DNA promovido pela DNA girase foram realizados de acordo com o protocolo abaixo:

Uma unidade (U) de DNA girase é incubada com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e o análogo peptídico CcdBdp1 em concentrações variadas, em um volume de reação de 30 µL, a 37ºC por 60 minutos em tampão de ensaio. A reação foi interrompida pela adição de 3 µL de solução de SDS 2%, e incubação a 60ºC por 2 minutos. Após o fim da reação, foram adicionados 15 µL de STEB (sacarose 20%, Tris-HCl 0,05 $mol.L^{-1}$ pH 7,5, EDTA 0,05 $mol.L^{-1}$, azul de bromofenol 50 µg/ml) e 60µL de uma mistura contendo clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). A mistura resultante é então centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante é utilizado para a realização da análise posterior.

Em seguida, as amostras provenientes do sobrenadante da centrifugação são submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89mM / ácido bórico 89mM / EDTA 2mM, pH 8.2). As amostras são aplicadas uma a uma nos poços do gel e submetidas à tensão constante de 60V, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas. Ao término da corrida, o gel é corado durante 30 minutos em tampão de corrida contendo brometo de etídio a 50 mg/mL. O gel é então examinado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (Alpha Innotech®).

- Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV:

Em contraste à DNA girase, que possui atividade maior no superenovelamento negativo do DNA, a topoisomerase IV atua preferencialmente no relaxamento do DNA superenovelado positivamente, bem como no processo de desencadeamento do DNA. Assim, é evidente que a topoisomerase IV desempenha também importante papel no processo de replicação e que a DNA girase não deve ser o único alvo intracelular efetivo para os diversos agentes terapêuticos.

Os ensaios para avaliação da inibição da atividade da topoisomerase IV são realizados incubando-se 1 unidade (U) de topo IV com 0,3 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado contendo cada um dos análogos peptídicos nas concentrações variadas, em um volume de reação de 30 µL, a 37ºC por 240 minutos (4 horas) em tampão de ensaio. A reação foi interrompida pela adição de 3 µL de solução de SDS 2%, incubando-se a 60ºC por 2 minutos, e posterior adição de 15 µL de STEB (sacarose 20%, Tris-HCl 0,05 $mol.L^{-1}$ pH 7,5, EDTA 0,05 $mol.L^{-1}$, azul de bromofenol 50 µg/ml) e 60 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). A mistura resultante é então centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante é utilizado para a realização da análise posterior. Por fim, as amostras são submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose, nas mesmas condições descritas para os ensaios com DNA girase.

Os ensaios de eletroforese descritos são realizados com o intuito de determinar as concentrações inibitórias mínimas do análogo peptídico frente às duas enzimas, DNA girase e topoisomerase IV, resultados estes que são comparados com os valores encontrados para a molécula de CcdB natural.

4.5. Determinação da CIM em meio líquido (perspectivas futuras)

De acordo com os protocolos utilizados atualmente no laboratório, a atividade antimicrobiana dos peptídeos encapsulados em lipossomas será avaliada em duplicata por um ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, descrito por Ehret-Sabatier e colaboradores em 1996. Resumidamente, 30 µL de uma solução de CcdBdp1 encapsulado em lipossoma são adicionados a 30 µL de uma suspensão de bactérias em 240 µL de meio de cultura LB, contida em uma microplaca para leitura espectrofotométrica. Após adição das amostras peptídicas, a placa é incubada por 6 horas em estufa a 30ºC, sob agitação constante. O crescimento bacteriano é então medido através de um leitor espectrofotométrico de microplacas a 595 nm.

A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano de cada uma das diferentes amostras será determinada através de uma análise comparativa com amostras controles presentes na mesma placa, sendo o controle negativo composto de 240 µL de PB, 30 µL de solução 5 µmol/L de ciprofloxacina em água e 30 µL de suspensão de bactérias e o positivo de 30 µL de suspensão bacteriana e 270 µL de PB. As suspensões de bactérias utilizadas nos testes são preparadas inoculando cada uma das diferentes bactérias em ágar nutriente, incubando-se *overnight* a 37ºC. Após o período de incubação, as bactérias são ressuspendidas em NaCl 0,9% (m/v) e a concentração de células ajustada para 1 mL de suspensão (0,5 McFarland) para cada 100 mL de meio de cultura, gerando uma suspensão celular da ordem de 10^5 UFC/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e purificação do peptídeo CcdBdp1

O peptídeo CcdBdp1, análogo da toxina CcdB, foi sintetizado manualmente através do método de síntese em fase sólida, de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α-amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais.

A peptidil-resina resultante da síntese foi submetida ao processo de clivagem conforme descrito anteriormente. A solução resultante foi liofilizada e submetida a análise por CLAE em escala analítica, nas condições descritas anteriormente, a fim de se obter o perfil bruto. Após essa etapa, purificou-se o peptídeo por CLAE em escala semi-preparativa, coletando-se frações de 1,0 mL. Essas frações foram analisadas novamente em escala analítica, nas mesmas condições, a fim de se determinar quais das frações representavam o peptídeo CcdBdp1 o mais puro possível. Os perfis dos cromatogramas do peptídeo no seu estado bruto e após purificação estão representados na Figura 6.

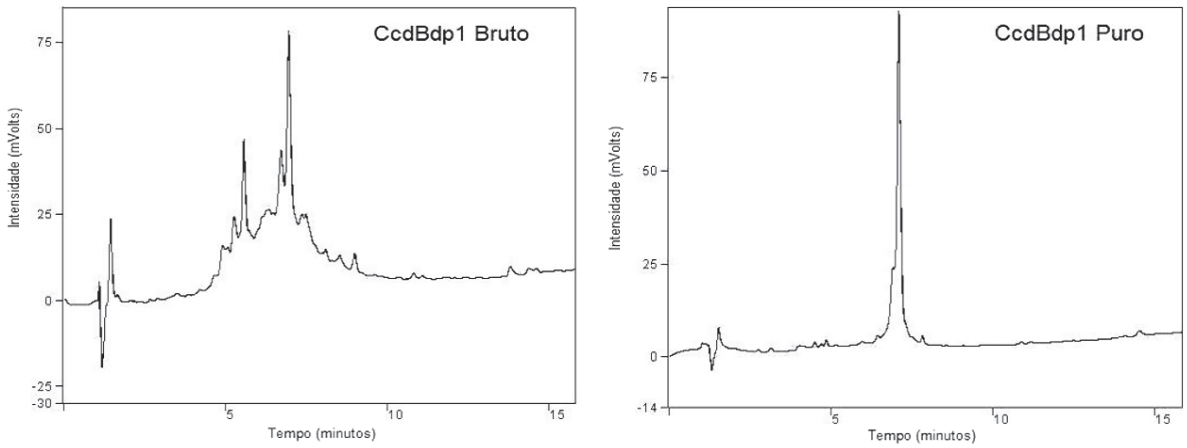


Figura 6. Cromatogramas obtidos em escala analítica para o análogo peptídico CcdBdp1 antes (amostra bruta) e após purificação (amostra pura).

Após a purificação, o peptídeo foi submetido a caracterização por equipamento de CLAE acoplado a espectrômetro de massas (LC/MS-ESI), onde se verificou que a fração isolada correspondia à estrutura desejada (Figura 7).

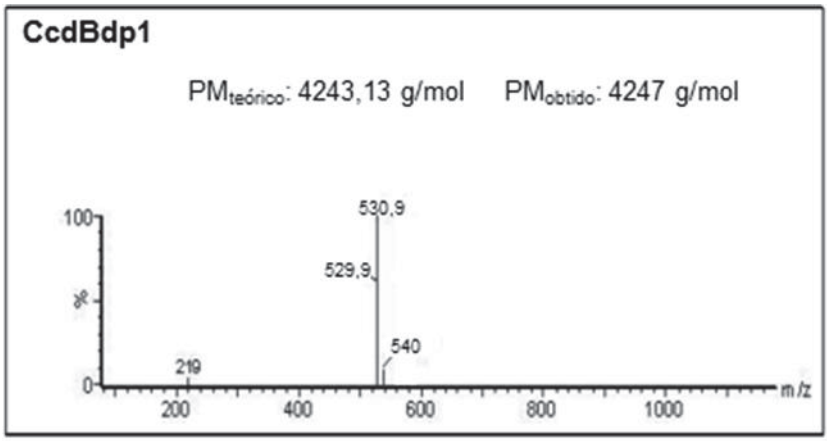


Figura 7. Espectro de massa do peptídeo CcdBdp1.

5.2. Ensaios de inibição enzimática

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

5.2.1. Ensaios de inibição da atividade da DNA girase

A atividade inibitória dos derivados de CcdBdp1 foi testada partindo-se de concentrações decrescentes a fim de se determinar a concentração mínima inibitória que produz completa inibição enzimática (IC_{100}). A Figura 8 representa o perfil de eletroforese correspondente à inibição da DNA girase frente a este peptídeo.

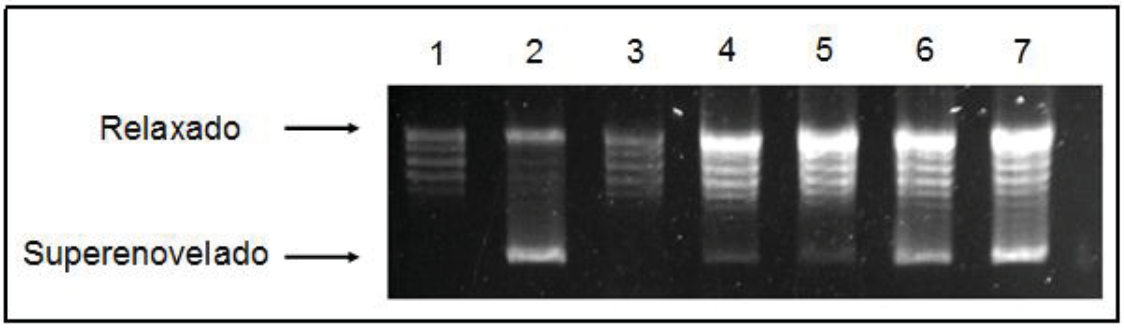


Figura 8. Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBdp1. Linha 1: plasmídeo pBR322 relaxado. Linha 2: pBR322 relaxado e DNA girase na ausência do CcdBdp1. Linhas 3 a 7: pBR322 relaxado, DNA girase e CcdBdp1 nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 μmol.L^{-1}.

A IC_{100} para o análogo CcdBdp1 foi determinada a partir de uma concentração relativamente alta em comparação com outros análogos peptídeos derivados do CcdB desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em estudos paralelos. De acordo com a Figura 8, a inibição total somente foi observada a 200 μmol.L^{-1} (linha 3), o que corresponde a 85 μg.mL^{-1}.

Este valor pode parecer um tanto quanto alto. No entanto, a inibição total da atividade da DNA girase pela toxina CcdB em seu estado natural somente é atingida a uma concentração de 100 μg.mL^{-1} (BERNARD et al., 1993). Isso indica que o análogo CcdBdp1 consegue inibir a ação desta enzima em uma concentração menor que o CcdB natural, mesmo possuindo uma cadeia de aminoácidos 64% menor. Isto é uma grande vantagem para a aplicabilidade deste peptídeo para fins comerciais.

5.2.2. Ensaios de inibição da atividade da topoisomerase IV

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

Poucos trabalhos até o momento citam inibidores específicos para a ação de topoisomerase IV e, particularmente, quase nada se conhece em relação ao efeito

da toxina CcdB frente a essa classe de enzimas, já que os inibidores conhecidos para DNA girase somente faziam efeito na inibição da topoisomerase IV em concentrações muito altas.

Com base nessas informações, a inibição do efeito desta enzima na presença de CcdBdp1 foi analisada por eletroforese em gel de agarose de acordo com o procedimento já descrito (item 4.4). O perfil de eletroforese da topoisomerase IV com o análogo CcdBdp1 pode ser observado na Figura 9.

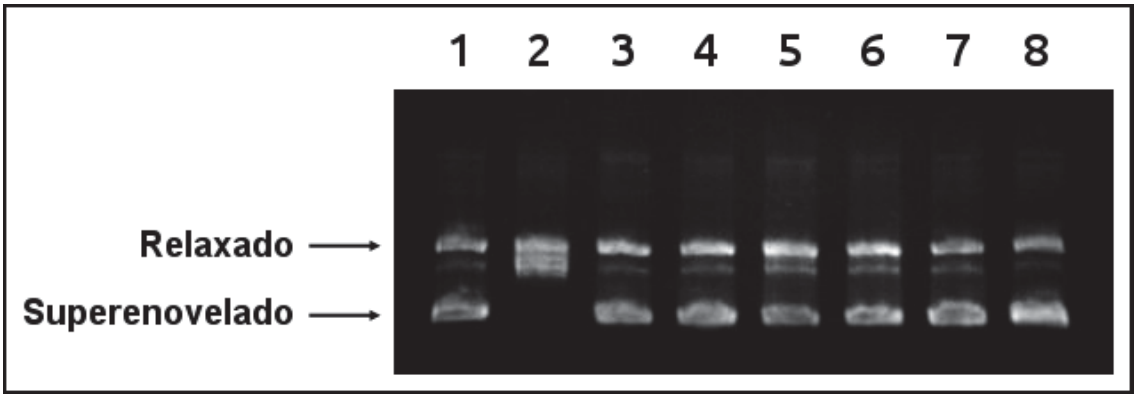


Figura 9. Inibição do relaxamento do DNA pelo CcdBdp1. Linha 1: plasmídeo pBR322 superenovelado. Linha 2: pBR322 superenovelado e topoisomerase IV na ausência do CcdBdp1. Linhas 3 a 8: pBR322 superenovelado, topoisomerase IV e CcdBdp1 nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6, 3 e 1 $\mu mol.L^{-1}$.

Através dos resultados obtidos nesta eletroforese observou-se na linha 2 a atividade da topoisomerase IV devido ao relaxamento do DNA superenovelado. Nas linhas 3 a 8 observou-se a inibição da atividade de enzima na presença de CcdBdp1 em todas as concentrações testadas, pois não houve o relaxamento do DNA. Neste caso, o IC_{100} de CcdBdp1 frente à topoisomerase IV é menor que 1 $\mu mol.L^{-1}$, valor bem inferior àquele determinado para a DNA girase (entre 200 e 100 $\mu mol.L^{-1}$).

Este valor de IC_{100} para topoisomerase IV é surpreendente, visto que está muito abaixo inclusive do mais potente inibidor já descrito na literatura, a albicidina, cujos valores chegaram a 0,5 µg/mL (HASHIMI et al., 2007).

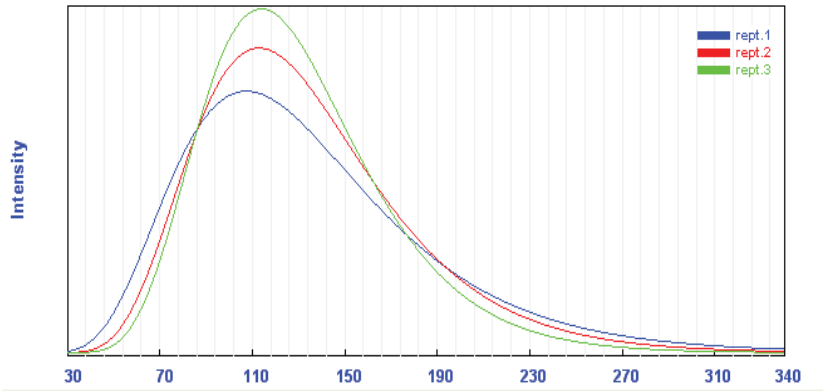
Este resultado de inibição aliado àquele de inibição da DNA girase, permite estipular em relação à dupla atividade deste peptídeo, capaz de inibir as duas topoisomerases bacterianas em concentrações relativamente baixas. Esta propriedade faz deste peptídeo um candidato promissor a ser empregado como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

5.3. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas

Foram preparados lipossomas do tipo SUV de 100 nm por evaporação de solvente seguida de extrusão, conforme descrito no item 4.2. Após sua preparação, o diâmetro dos lipossomas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz e, posteriormente, foi avaliada a eficiência de encapsulação do peptídeo CcdBdp1, por cromatografia de exclusão molecular.

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

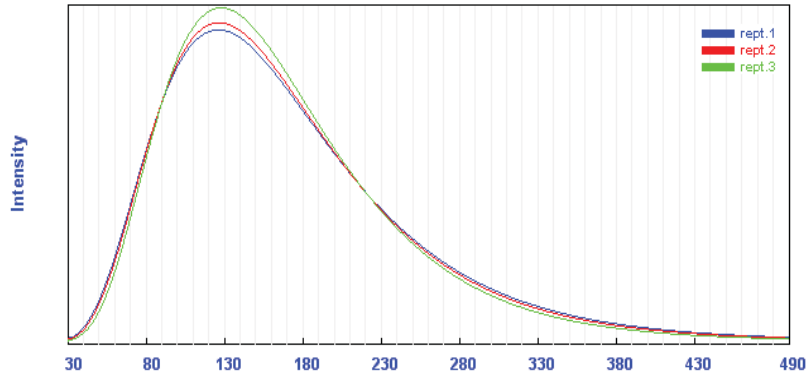
A técnica de espalhamento dinâmico de luz fornece o tamanho de gotículas de esferas monodispersas diluídas, porém quando o sistema é concentrado ou polidisperso ou ambos, a interpretação fica dificultada devido a interações interpartículas (LYKLEMA, 1991; LAWRENCE et al., 2000; ABOOFAZELI et al., 2000). A elevada viscosidade de alguns sistemas também pode conduzir a erros experimentais na determinação do tamanho de gotículas (ABOOFAZELI et al., 2000), em razão de que a técnica é fundamentada no movimento Browniano das gotículas em dispersão (ORTHABER e GLATTER, 2000). Logo, as medidas realizadas para a determinação de tamanho para lipossomas foram diluídas com água Milli-Q ultra-pura. Os gráficos representados nas Figuras 10 e 11 mostram o diâmetro dos lipossomas com e sem peptídeo encapsulado, respectivamente.



Unimodal Results Summary

Rept#.	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coef (m^2/s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
Rept.1	108.9	0.089	4.50e-12	4.66e+05	0.01%	0
Rept.2	112.1	0.052	4.38e-12	4.71e+05	0.05%	0
Rept.3	111.9	0.036	4.38e-12	4.65e+05	0.03%	0
Average	111.0 ± 1.44	0.059 ± 0.022				

Figura 10. Lipossoma sem peptídeo encapsulado com diâmetro médio de 111,0 nm.
*As diferentes curvas representam repetições do mesmo ensaio.



Unimodal Results Summary

Rept#.	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coef (m^2/s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
Rept.1	132.0	0.182	3.71e-12	4.82e+05	0.02%	0
Rept.2	131.7	0.160	3.72e-12	4.84e+05	0.18%	0
Rept.3	131.7	0.126	3.72e-12	4.80e+05	-0.01%	0
Average	131.8 ± 0.16	0.156 ± 0.023				

Figura 11. Lipossoma com peptídeo encapsulado com diâmetro médio de 131,8 nm.
*As diferentes curvas representam repetições do mesmo ensaio.

De acordo com estas figuras é possível verificar que o encapsulamento do peptídeo aumenta o diâmetro médio dos lipossomas. Os lipossomas sem peptídeo apresentaram tamanho médio de 111,0 nm enquanto que, os lipossomas com

peptídeo apresentaram aumento de tamanho de diâmetro de para 131,8 nm, o que indica a encapsulação do peptídeo no lipossoma, fazendo a vesícula aumentar de tamanho.

5.4. Estudos de eficiência de encapsulação de CcdBdp1 em lipossomas do tipo SUV

Conforme descrito anteriormente, foram preparados lipossomas com cerca de 100 nm de diâmetro através do método de extrusão. No entanto, não havia uma metodologia confiável a ser utilizada em nosso laboratório, com o intuito de avaliar a eficiência de encapsulação de peptídeos em lipossomas. Sendo assim, uma nova metodologia foi proposta a partir deste trabalho, que se utiliza de um sistema de CLME equipado com coluna Superdex™ Peptide (Pharmacia Biotech®), a qual possibilitou a separação eficiente e reprodutível de lipossomas contendo peptídeo encapsulado, do peptídeo livre que ainda sobrou em solução, isto é, que não foi encapsulado.

Para validação dos resultados obtidos através das frações recolhidas após realização da separação na coluna Superdex™ , uma curva analítica foi traçada utilizando soluções de diferentes concentrações de CcdBdp1 em solução tampão. Essas amostras de diferentes concentrações foram lidas em um aparelho de fluorescência, com excitação na faixa dos 290 nm e utilizando a emissão entre 300 e 500 nm. Os resultados obtidos para a curva padrão encontram-se demonstrados na Figura 12 e na Tabela 1.

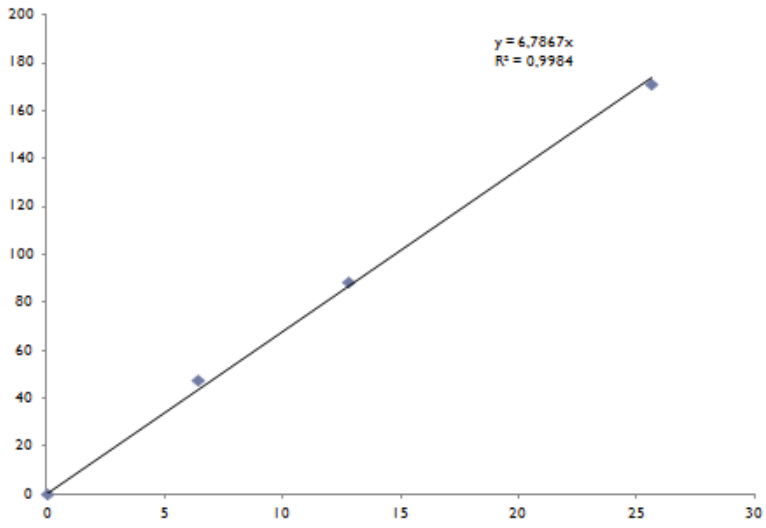


Figura 12. Curva analítica que representa os valores máximos de fluorescência (eixo X), e as concentrações utilizadas de peptídeo (CcdBdp1) em solução tampão (eixo Y).

TABELA 1. Concentrações utilizadas do peptídeo em solução tampão com suas respectivas quantidades máximas de fluorescência emitidas.

[CcdBdp1] / uM	**Máx. Fluorescência (excit.: 290nm emiss: 300-500nm)**
0	0
6,4	47,456
12,8	88,996
25,6	171,672

Depois de separadas as frações que eram recolhidas da coluna Superdex™ as frações que continham somente peptídeo livre em solução eram lidas no aparelho de fluorescência e, a partir desses dados, foi possível encontrar o valor máximo de fluorescência para cada amostra, as quais foram comparadas com a curva padrão, encontrando-se assim a quantidade do peptídeo que não era encapsulado no lipossoma (Figura 13).

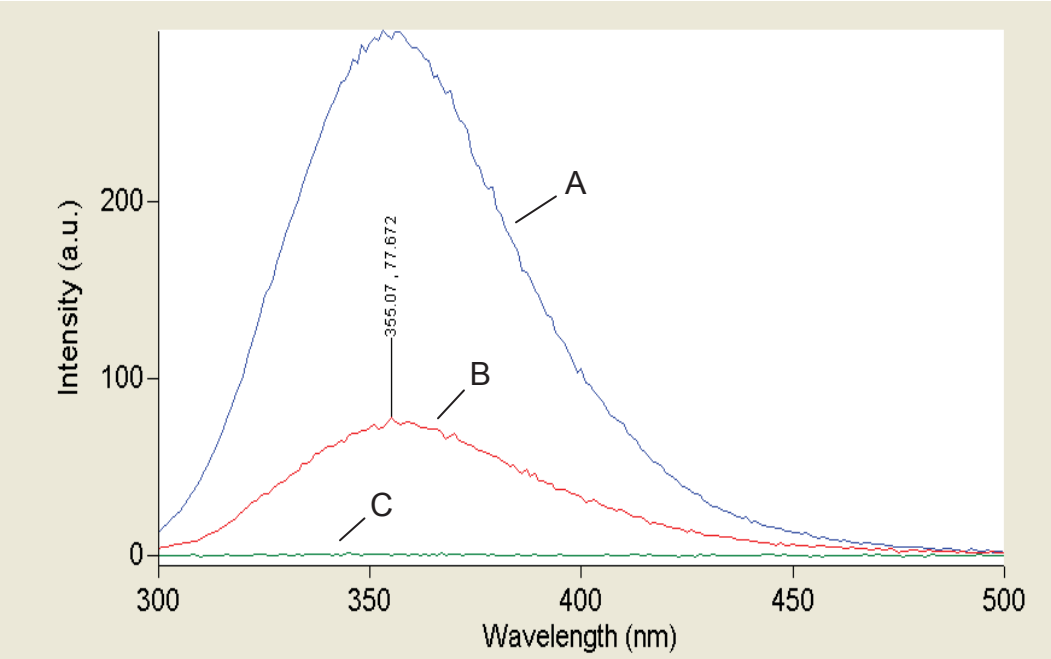


Figura 13. Curva de fluorescência mostrando o máximo de fluorescência para uma solução de concentração 100 μM de CcdBdp1 (curva A), o máximo em fluorescência para uma das amostras coletadas da coluna de cromatografia contendo somente peptídeo livre (curva B) e o máximo de fluorescência para uma amostra também coletada da coluna de cromatografia contendo somente lipossomas com peptídeos encapsulados no interior da vesícula (curva C).

Pode-se observar através da Figura 13 que a curva B realmente representa o peptídeo livre em solução que não sofreu encapsulação, pois uma vez comparando com a curva A, que representa solução de peptídeo a 100 μM, temos que a emissão máxima de fluorescência ocorre no mesmo comprimento de onda, representando a mesma substância.

Também é possível concluir que a concentração do peptídeo livre em solução que não sofreu encapsulação é menor do que a concentração total adicionada no início do processo para encapsulação (100 μM), uma vez que o máximo de fluorescência para a curva B é menor do que o máximo de fluorescência para a curva A.

Assim temos que a eficiência no processo de encapsulação de CcdBdp1 em lipossomas do tipo SUV de 100 nm de diâmetro, é da ordem de 80%. Este valor é

muito superior quando comparado com a eficiência obtida pela técnica de preparo de lipossomas por sonicação anteriormente utilizada pelo grupo de pesquisa, a qual era em torno de 15%.

5.5. Ensaios de inibição do crescimento bacteriano

Os ensaios de inibição de crescimento bacteriano estão sendo feitos de acordo com o método descrito no item 4.5, utilizando *Streptococcus agalactiae* (Gram positiva) e *Salmonella* Typhi (Gram negativa). Como esta etapa do trabalho ainda está em andamento, os resultados por ora obtidos ainda são inconclusivos.

Estamos desenvolvendo melhor o método destas análises para diminuir as interferências na leitura das absorbâncias das microplacas devido a degradação dos lipídeos da composição dos lipossomas, os quais acarretam em interferência na absorbância a 595 nm.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível levantar as seguintes conclusões em relação à síntese de peptídeo em fase sólida e em relação à capacidade de inibição da atividade de topoisomerases bacterianas:

- O novo análogo derivado da toxina CcdB, o CcdBdp1, pode ser sintetizado pela metodologia SPFS e purificado por CLAE com eficiência;
- CcdBdp1 apresentou atividade inibitória da enzima DNA girase a uma concentração entre 200 e 100 $\mu mol.L^{-1}$ e da enzima topoisomerase IV a uma concentração abaixo de 1 $\mu mol.L^{-1}$.

Em relação ao desenvolvimento dos lipossomas tipo SUV, pode-se concluir que:

- A técnica de espalhamento dinâmico permitiu inferir que a presença do peptídeo na formação dos lipossomas promoveu aumento de diâmetro da vesícula de 111,0 para 131,8 nm, o que indica que o peptídeo CcdBdp1 foi incorporado ao lipossoma.

A partir da curva de calibração estabelecida por espectroscopia de fluorescência, pode-se concluir que:

- A preparação de lipossomas do tipo SUV permitiu uma eficiência de encapsulação na ordem de 80% para o peptídeo CcdBdp1 a uma concentração de 100 $\mu mol.L^{-1}$, valor bem maior comparado com resultados anteriores obtidos pelo grupo quando se utilizava de outra metodologia para produção de lipossomas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMBLARD, M. et al. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods In Molecular Biology Clifton Nj**, v. 298, n. 6, p. 3-24, 2005.

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

BERNARD, P.; KÈSDY, K. E.; VAN MELDEREN, J. S.; WYNS, L.; PATO, M. L.; HIGGINS, P. N.; COUTURIER, M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 534-541, 1993.

BREUKINK, E. et al. Binding of Nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10247-54, 22 ago. 2000.

DELFINO, D. B. **Sistemas drug delivery aplicados a novos inibidores de topoisomerases estruturalmente derivados de toxinas bacterianas**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2011.

DRULIS-KAWA, Z.; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 187-198, 15 mar. 2010.

EHRET-SABATIER, L. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29537-44, 22 nov. 1996.

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

GERDES, K. Toxin-Antitoxin Modules May Regulate Synthesis of Macromolecules during Nutritional Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 3, p. 561-572, 1 fev. 2000.

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

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5639, p. 1496-1499, 12 out. 2003.

HIRAGA, S.; JAFFE, A.; OGURA, T. F plasmid ccd mechanism in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 1, p. 100-104, 1986.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KATO, J. et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. **Cell**, v. 63, n. 2, p. 393-404, 19 out. 1990.

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

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins**. 1. ed. [S.l.] CRC-Press, 1997.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: LOHNER, K. (Ed.). **Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. p. 149-165.

LORIS, R. et al. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from E. coli. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 4, p. 1667-1677, 29 jan. 1999.

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

MACHADO, A.; LIRIA, C.; PROTI, P. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

MERRIFIELD, B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 289, n. 1951, p. 3-13, 1997.

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

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 3-4, p. 335-375, jan. 1991.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. **Solid Phase Peptide Synthesis**. 2. ed. New York: Pierce Chemical Company, 1984.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 184-193, jan. 2010.

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

TROVATTI, E. et al. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6161-6164, 1 dez. 2008.

VAN MELDEREN, L. Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 6-7, p. 537-544, 2002.

WELLINGS, D. A.; ATHERTON, E. Standard Fmoc protocols. **Methods in Enzymology**, v. 289, n. 1951, p. 44-67, 1997.

WIGLEY, D. B. **Nucleic acids and molecular biology**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 165-176.