

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Instituto de Química – Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos
encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerasas
bacterianas**

ARARAQUARA

2018

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos
encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases
bacterianas**

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

| | |
|-------|---|
| S211d | <p>Sanches, Beatriz Cristina Pecoraro</p> <p>Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerasas bacterianas / Beatriz Cristina Pecoraro Sanches. – Araraquara : [s.n.], 2018</p> <p>86 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Reinaldo Marchetto</p> <p>Coorientador: Jonas Contiero</p> <p>1. Peptídeos. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. 3. Biossurfactantes. 4. Lipossomas. 5. Peptídeos microbianos. I. Título.</p> |
|-------|---|

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

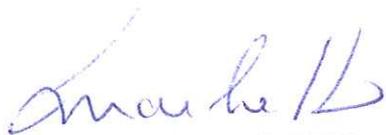
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídios encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases"

AUTORA: BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

COORIENTADOR: JONAS CONTIERO

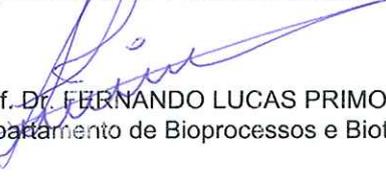
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Dados Pessoais

Nome: Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Nome em citações bibliográficas: SANCHES, B.C.P

Endereço eletrônico: biapecorarosanches@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2016 - Atual

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Desenvolvimento e Caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerasas bacterianas. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Co-orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 - 2017

Especialização em Sustentabilidade e Agronegócios.

Universidade de Araraquara (UNIARA). Título: Energias Renováveis na atualidade: Uma análise crítica. Orientadora: Vanessa Colombo Corbi.

2012 - 2015

Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal de São Carlos, Araras, Brasil. Título: Efeito da concentração de açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. Orientadora: Prof. Dr. Sandra Regina Ceccatto-Antonini. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Atuação Profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2016 - 2018

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: mestranda.

2. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

2012 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: membro do departamento de Relações Humanas e posteriormente, Diretora do Departamento Jurídico e Financeiro da Empresa Júnior de Biotecnologia (SUSTEC Jr).

2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio voluntário com biologia molecular, purificação de proteínas e mecanismos da *Neurospora crassa*, sob a orientação da Prof. Dr. Maria Célia Bertolini (UNESP, IQ).

2014 - 2014

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitora da disciplina Biologia Celular, sob a orientação da Prof. Dr. Silvana Perissato Meneghin (UFSCar, Araras).

2014 - 2014

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio com citricultura, cultura de tecidos vegetais e técnicas de microenxertia, sob orientação da Prof. Dr. Alessandra Souza (IAC, Cordeirópolis).

Idiomas

Português: Lê bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve bem.

Inglês: Lê bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve bem.

Espanhol: Lê razoavelmente bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve razoavelmente bem.

Prêmios e títulos

2017

1º Lugar entre os trabalhos apresentados na forma de painel no VII Congresso Farmacêutico da UNESP, com o trabalho intitulado “Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*”, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Produções

1. Artigos completos publicados em periódicos

FONSECA, RAFAEL F. ; MELO, CAIO C. B. ; **SANCHES, BEATRIZ B. C. P.** ; BERTUCCI-NETO, VICTOR ; FARINAS, CRISTIANE S. ; KWONG, WU H. . Modelling of Solid-State Fermentation over Wide Operational Range for Application in Process Optimization. CANADIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING **JCR**, v. 1, p. 1, 2018.

BASSI, Ana Paula Guarnieri ; Meneguello, L. ; Paraluppi, A.L. ; **Sanches, B.C.P.** ; **CECCATO-ANTONINI, S. R.** . Interaction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, *Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY **JCR**, v. 1, p. 1-12, 2018.

2. Pedidos de Patente

SANCHES, B.C.P., SILVA, V.L., BRIAM-SALAZÁR, A.M., LOVAGLIO, R., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Peptides and rhamnolipids liposomes. Provisional Number: 62517264. U.S. Patent and Trademark Office. 2017.

3. Resumos publicados em anais de eventos

1. **SANCHES, B.C.P.**, SILVA, V.L., LOVAGLIO, R., CRUSCA, E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Internalization of ParE toxin peptide analogue by rhamnolipids liposomes. SIMB, Denver, Colorado. 2017.(Apresentação de Trabalho/Outra).

2. **SANCHES, B.C.P.**, ROCHA, C.A., CARRIJO, R.S., BENITES, T.A., CRUSCA,E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETO, R. Rhamnolipid liposomes: a vehicle for ParE toxin peptide analogue transport to bacterial cell. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A. ; CONCEICAO, M. B. ; **SANCHES, B. C. P.** ; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2017, Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. ROCHA, C.A., RAMOS, M.A.S., CRUSCA, E., TOLEDO, R.G., CARRIJO, R.S., **SANCHES, B.C.P.**, BAUAB, T.M., MARCHETTO, R., Effects of dimerization on the biological activity of the WRWYCRCK peptide. 2017. SBBq, Aguas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. BENITES, T. A. ; ZOTTIS, A. ; MARCHETTO, R. ; **SANCHES, B. C. P.** . Study of computacional mutations to increase ParD antitoxin affinity. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

6. SANCHES, B. C. P.; Ceccato-Antonini, S. R. ; BASSI, A. P. Efeito da concentração de açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. 2015. CIC, São Carlos (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

7. SANCHES, B. C. P.; BASSI, A. P. ; Ceccato-Antonini, S. R. . Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*. In: International Union of Microbiological Societies, 2014, Montréal. Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*, 2014. IUMS, Québec, Canada (Apresentação de Trabalho/Outra).

Participação em eventos científicos:

- VII Rotas Tecnológicas da Biotecnologia. Parque Supera. 2018 (Evento);
- 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq – Evento);
- VII Congresso Farmacêutico da UNESP. 2017 (Congresso);
- Workshop de Caracterização de Macromoléculas com Foco em Estabilidade Estrutural e Afinidade de Interações, com Uso de nanoDSF e Termoforese em Microescala (CNPEM). 2016 (Outra);
- Four Biotec: Quatro Dias pela Biotecnologia. UFSCar. 2016. (Outra);
- SINAFERM. 2015. (Simpósio);
- International Union of Microbiological Societies Congresses. 2014. (Congresso);
- Simpósio de Biotecnologia Forense. 2014. (Simpósio);
- Terra e Alimentos. 2014. (Outra);
- SMA – Simpósio de Microbiologia Aplicada. UNESP, Rio Claro. 2013 (Simpósio).

À meus pais, Isabel e Luiz Cláudio, que nunca mediram esforços
para me auxiliar nesta caminhada.

À meu irmão, Bernardo, que sempre me guiou e
me ajudou a seguir em frente.

Vocês são a razão da minha vida,

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e perseverança concedida.

Aos meus pais: Isabel e Luiz Cláudio, meu irmão: Bernardo, meu namorado: Rafael e pets: Thor e Tobi, por clarearem meus dias mais escuros com paciência e bom humor. Aos meus familiares, Tio Pedro, Tio Egídio e Tia Sônia pela ajuda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto e ao meu co-Orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero pela oportunidade de realizar o presente trabalho, por terem me acolhido em seus respectivos grupos de pesquisa, pela paciência, disposição e conhecimentos a mim concedidos durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por ter colaborado conosco durante esses anos, além de estar sempre presente para me motivar e passar seus valiosos conhecimentos.

À Patrícia Bento, Vinícius Silva e Roberta Lovaglio por terem me auxiliado grandemente na execução deste trabalho, sendo super pacientes e dedicados. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil!

Aos meus companheiros de laboratório Milena, Bianca, Rodolfo, Jesseleine, Aline, Camila, Thaís, Greg, Caio, Leonardo, Carol, Sara, Crusca, Norival, Paulo, Matheus pelos bons momentos e boa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial de Rio Claro.

Àos professores Rodrigo Portugal, Ana Marisa Fusco, pelo apoio com os experimentos conduzidos.

Às minhas amigas de infância Cat, Vivi e Lalis por todo apoio.

Às amigas de Rio Claro por me hospedarem gratuitamente em suas respectivas residências.

Aos amigos da AIESEC por todo apoio.

Aos amigos do Departamento de Físico-Química e do Departamento de Farmacotécnica por todo conhecimento passado.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Zilda, Tarcísio e Val.

Aos demais funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

À CAPES pela Bolsa Concedida.

RESUMO

O sistema ParE-ParD é um sistema toxina-antitoxina (TA) onde ParE atua como a toxina e ParD a antitoxina. ParE tem comprovada atividade de inibição do sítio catalítico das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV (Topo IV), sendo esta uma atividade que pode ser aproveitada para fins terapêuticos. ParELC3, um peptídeo derivado à ParE também apresenta esta habilidade de inibição enzimática *in vitro*, contudo, experimentos também comprovam a dificuldade de permeabilidade e alta complexidade estrutural que este material apresenta, o que pode ser um problema para sua aplicação para fins terapêuticos. Assim, com a intenção de viabilizar o potencial biotecnológico deste peptídeo, foi feita sua incorporação em lipossomas compostos majoritariamente por ramnolipídeos. Este biotensoativo, produzido pela rota fermentativa da *Pseudomonas aeruginosa*, foi selecionado por ser considerado “sustentável”, ter atividade antimicrobiana intrínseca e ainda ser pouco empregado para fins nanotecnológicos. Ensaio de caracterização físico-química e morfológica, via espalhamento de luz dinâmica (DLS), microscopia eletrônica e transmissão (MET) e microscopia eletrônica de transmissão-crio (MET- Crio) dos lipossomas foram realizados e comprovou-se a formação de bicamadas unilamelares. Ensaio de eficiência de encapsulação mostraram que os sistemas lipossomais incorporaram entre 44 e 61% de ParELC3. Em relação à atividade antimicrobiana, as versões de ParELC3 incorporado nos lipossomas de ramnolipídeos foram mais eficientes frente a *E. coli* e *S. aureus* quando comparados à atividade antimicrobiana de ParELC3 livre. Realizou-se estudos de estabilidade e de liberação prolongada do sistema lipossomal, e comprovou-se que os lipossomas prolongam a liberação de ParELC3, mantendo a estabilidade média dos mesmos por até 20 dias. Mostrou-se que na concentração dos experimentos, os lipossomas compostos de ramnolipídeos não são tóxicos para células HepG2, assim como o peptídeo ParELC3 livre. Acredita-se que com o lipossoma obtido com ParELC3 pode ser utilizado no combate às infecções bacterianas.

Palavras chave: peptídeos. sistema toxina-antitoxina. ramnolipídeos. lipossomas. atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

ParE-ParD system is a toxin-antitoxin (TA) system where ParE acts as a toxin and ParD as an antitoxin. ParE can inhibit the catalytic site of DNA gyrase and Topoisomerase IV (Topo IV) enzymes, which can be useful for pharmaceutical applications. ParELC3, an analogue peptide from ParE also has this *in vitro* enzymatic inhibition ability, but, has also a permeability difficult and high structural complexity, which can be a problem for its therapeutic application. So, pretending to use the biotechnological potential of this peptide, its internalization in liposomes composed mainly by rhamnolipids was proposed. This biosurfactant, produced by the fermentative route of *Pseudomonas aeruginosa*, was selected for being considered "sustainable", for its intrinsic antimicrobial activity and low toxicity, in addition to not being employed for nanotechnological experiments. Physico-chemistry and morphological characterization assays were done by dynamic light scattering (DLS), transmission electronic microscopy (TEM) and transmission electronic microscopy – Cryo (TEM – Cryo), then, bilayers production was improved. Encapsulation efficiency tests showed that liposomal systems can incorporate efficiently between 44 e 61% of ParELC3. In relation to the antimicrobial activity, versions of internalized ParELC3 into liposomes composed mainly by rhamnolipids were more efficient than compared to antimicrobial activity for free ParELC3, both for *E coli* and *S aureus* bacteria representatives. In function of these promising results, was proposed to do stability and drug release assays, and results showed that liposomes prolonged the ParELC3 liberation and their average stability is around 20 days. The results still showed that at the concentration tested, liposomes constituted mainly by rhamnolipids are not toxic to HepG2 cells, neither for ParELC3 peptide. We believe that these systems, where liposomes are encapsulated with ParELC3, can be used against bacterial infections.

Key words: peptides. toxin-antitoxin systems. rhamnolipids. liposomes. antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de morte pós-segregacional | 25 |
| Figura 2 - Estrutura primária de ParE e de ParD de <i>Escherichia coli</i> (plasmídeo RK2) | 26 |
| Figura 3 - Esquema de um lipossoma e os locais de incorporação de substâncias. | 28 |
| Figura 4 - Estrutura dos quatro principais ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 30 |
| Figura 5 - Estrutura primária dos peptídeos derivados de ParE | 33 |
| Figura 6 - Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc | 34 |
| Figura 7 – Curva de calibração do peptídeo ParELC3 via UV – Visível, sob comprimento de onda de 280 nm..... | 42 |
| Figura 8 - Fluxograma para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição | 44 |
| Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3 (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm..... | 50 |
| Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3W (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm | 50 |
| Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3-CF (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. | 51 |

Figura 12 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da DNA girase. Volume de reação de 30 µL contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima DNA girase); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol.L⁻¹53

Figura 13 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da Topoisomerase IV. Volume de reação de 30 µL contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 superenovelado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 superenovelado e a enzima Topo IV); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol.L⁻¹54

Figura 14 - Micrografias obtidas por MET-Convencional para amostras de lipossomas livres. Formulações: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipidio + PC + Colesterol.....62

Figura 15 - Micrografias obtidas por Crio-EM para amostras de lipossomas de ramnolipídeos (formulação A) vazios63

Figura 16 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e extrusão e incorporados com ParELC3 frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* pelo ensaio de “*Time Killing*”. (Controle de crescimento: (+) Meio+suspensão bacteriana; (-) ciprofloxacina (100 µmol.L⁻¹)69

Figura 17 - Estabilidade das formulações lipossomais A, B, C e D (tamanho das partículas e polidispersão) durante 30 dias, sob armazenamento em 4°C.....71

Figura 18 - Liberação prolongada de ParELC3W dos sistemas lde formulações A, B, C e D (Tabela 1) conduzidos via sonicação73

Figura 19 - Fotomicrografias analisadas por microscopia confocal frente a *Escherichia coli* O157:H17 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) tratadas com ParELC3-CF incorporado nas formulações de lipossomas A, B, C, D e ParELC3-CF livre (representado pela letra E)74

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição dos lipossomas selecionados para caracterização físico-química..... | 38 |
| Tabela 2 - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas dos peptídeos ParELC3, ParELC3W e ParELC3-CF | 52 |
| Tabela 3 - Comparação da atividade inibitória dos peptídeos ParELC3 e ParELC3W em topoisomerasas bacterianas..... | 54 |
| Tabela 4 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por sonicação em função da formulação..... | 57 |
| Tabela 5 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por extrusão em função da formulação | 57 |
| Tabela 6 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por sonicação e adição do peptídeo ParELC3W | 60 |
| Tabela 7 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por extrusão e adição do peptídeo ParELC3W | 60 |
| Tabela 8 - Eficiência de encapsulação do peptídeo ParELC3W em diferentes lipossomas | 64 |
| Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e incorporadas com ParELC3 frente a <i>Escherichia coli</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ de ramnolipídeo; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da sonicação | 65 |
| Tabela 10 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e incorporadas com ParELC3 frente a e <i>Staphylococcus aureus</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ ; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da sonicação | 66 |
| Tabela 11 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via extrusão e incorporadas com ParELC3 frente a <i>Escherichia coli</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ ; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da extrusão..... | 66 |

Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via extrusão e incorporadas com ParELC3 frente a *Staphylococcus aureus*. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da extrusão67

Tabela 13 - Avaliação da citotoxicidade das formulações lipídicas A, B, C, D, ParELC3 livre e formulações vazias (LB) frente a células de HepG276

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Topoisomerases | 23 |
| 1.2 Sistema Toxina-Antitoxina (TA)..... | 24 |
| 1.3 Lipossomas e a encapsulação de substâncias..... | 27 |
| 1.4 Ramnolipídeos | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 32 |
| Objetivos específicos | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos | 33 |
| 3.2 Ensaio de inibição de atividade da DNA girase | 36 |
| 3.3 Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase IV | 36 |
| 3.4 Produção do Ramnolipídeo | 37 |
| 3.5 Preparo de lipossomas..... | 38 |
| 3.6 Caracterização dos Sistemas de lipossomas..... | 39 |
| 3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)..... | 39 |
| 3.6.2 Potencial Zeta (ζ)..... | 40 |
| 3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão convencional e crio . | 40 |
| 3.7 Eficiência de Incorporação..... | 41 |
| 3.8 Teste de Microdiluição em Placas | 42 |
| 3.9 Ensaio de “Time Killing” | 44 |
| 3.10 Ensaio de Estabilidade | 45 |
| 3.11 Ensaio de Liberação Prolongada | 45 |
| 3.12 Microscopia Confocal de Varredura a <i>Laser</i> (MCVL) | 46 |
| 3.13 Ensaio de Citotoxicidade | 46 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 4.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos | 48 |
| 4.2 Ensaio de inibição das atividades das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV | 52 |
| 4.3 Desenvolvimento das Formulações Lipídicas | 55 |
| 4.4 Caracterização dos Sistemas Lipossomais: Tamanho e Potencial Zeta (ζ)..... | 56 |
| 4.5 Caracterização dos Sistemas Encapsulados: Tamanho e Potencial Zeta(ζ)..... | 59 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.6 | Microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 61 |
| 4.7 | Eficiência de Incorporação | 63 |
| 4.8 | Ensaio de Inibição de Crescimento Bacteriano | 64 |
| 4.9 | Ensaio de “ <i>Time Killing</i> ” | 68 |
| 4.10 | Estabilidade dos lipossomas..... | 70 |
| 4.11 | Ensaio de Liberação Prolongada | 72 |
| 4.12 | Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCLV) | 73 |
| 4.13 | Ensaio de Citotoxicidade | 75 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 77 |
| 6. | REFERÊNCIAS | 78 |

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 terminologias

CF – carboxifluoresceína

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DCM – diclorometano

DIC – N,N'-diisopropilcarbodiimida

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
Fmoc – 9-fluorenilmetiloxycarbonila
Fmoc-AA – Fmoc-aminoácido
GUV – vesícula unilamelar gigante
GyrA – subunidade A da DNA girase
GyrB – subunidade B da DNA girase
HOBt – N-hidroxibenzotriazol
LUV – vesícula unilamelar grande
MCVL – microscopia confocal de varredura a *laser*
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MLV – vesícula multilamelar
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
ParED – ParE/ParD
PBS – tampão fosfato-salino
PC – fosfatidilcolina
RL – ramnolipídeo
RNA – ácido ribonucleico
SBF – soro bovino fetal
SDS – dodecil sulfato de sódio
SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida
SUV – vesícula unilamelar pequena
TA – sistema toxina-antitoxina
TBE – tampão tris-borato-EDTA
tBu – terc-butila
TFA – ácido trifluoroacético
TFE – trifluoroethanol
Topo IV – Topoisomerase IV
TRIS – tris(hidroximetil)metilamina

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos constitui hoje um dos maiores desafios da medicina e das indústrias farmacêuticas (KHAN; SIDDIQUI, 2012; FAIR; TOR, 2014; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2014). O combate a doenças provocadas por infecções microbianas vem sendo o objetivo de muitos estudos e isso ocorre, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes aos medicamentos existentes no mercado (LOHNER; STAUDEGGER, 2001).

A resistência aos antimicrobianos, um fenômeno natural, está relacionada à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antimicrobianos (LORENZÓN, 2015). Os mecanismos descritos hodiernamente na literatura seriam: mutações, que resultam em modificações no material genético dos microrganismos; transferência de genes, causada por mecanismos de transdução, transformação e conjugação de elementos genéticos como plasmídeos e transposons (CUNHA, 1998; MARTINEZ, 2012); ou ainda, um mecanismo que vem sendo estudado mais recentemente, que seria a persistência bacteriana, fenômeno que está diretamente ligado à sistemas Toxina-Antitoxina presentes em bactérias patogênicas e pode conferir à elas tolerância temporária a antibióticos (WANG; WOOD, 2011; YAMAGUCHI et al., 2011).

Segundo estimativas, até 2050 serão atribuídas à resistência antimicrobiana cerca de 10 milhões de mortes por ano (O' NEIL, 2014). Além disso, o cenário atual demonstra que estamos inseridos em uma era pós-antibióticos, já que o número de novos antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos (LUEPKE et al., 2017), sendo que na década de 2000 somente dez novas entidades de fármacos foram aprovadas, o que fez com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluísse os agentes antimicrobianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (KAPLAN et al., 2013).

Assim, é de vital importância a busca por substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que sejam resistentes aos microrganismos patogênicos que existem na atualidade, além de prezar pela baixa toxicidade, seletividade e qualidade de vida do futuro consumidor.

Neste contexto, as toxinas encontradas em organismos vivos são uma grande promessa para alcançar estes objetivos. Dentre estas toxinas, a proteína bacteriana ParE (JOHNSON et al., 1996), que exerce sua função citotóxica sobre um grupo de

enzimas denominado topoisomerasas, constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica para o desenvolvimento de novas estratégias no desenho de potenciais agentes antimicrobianos que podem vir a complementar a ação dos antibióticos já existentes (CUDIC et al., 2002).

1.1 Topoisomerasas

As topoisomerasas constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. Tais enzimas estão presentes em todos os tipos de células e catalisam mudanças topológicas no DNA, imprescindíveis ao metabolismo e, portanto, para a viabilidade celular (WANG, 1985).

Estas enzimas, com base em seus mecanismos de ação, podem ser divididas em subfamílias. As topoisomerasas do tipo I, que agem catalisando a quebra transitória de uma das fitas do DNA e as do tipo II que catalisam a quebra simultânea das duas fitas do DNA, reunindo-as posteriormente.

A DNA girase é um clássico representante das topoisomerasas do tipo II, descoberta em *Escherichia coli* por GELLERT e colaboradores em 1976, e diferentemente das demais topoisomerasas, é a única capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA (GELLERT et al., 1976; MAXWELL, 1997), e na ausência de ATP é capaz de relaxar negativamente o DNA plasmidial superenovelado (MAXWELL, 1997). Esta enzima desempenha um papel essencial para os passos de iniciação e alongação durante a replicação do DNA, assim como também para os processos de condensação e segregação, sendo, portanto de fundamental importância para a manutenção celular.

O estudo das topoisomerasas se expandiu nos campos da farmacologia e medicina clínica por meio da identificação da DNA girase bacteriana como alvo para antibióticos e algumas toxinas. A DNA girase é encontrada em todas as bactérias e ausentes em eucariotos. Mais especificamente, é uma enzima homóloga às topoisomerasas II de células eucarióticas, diferindo destas, em relação à sua região de interação com o DNA (LEVINE et al., 1998). Daí sua importância como alvo para agentes antimicrobianos, já que esta diferença permite uma ótima toxicidade seletiva para microrganismos.

Posteriormente, Kato e colaboradores descobriram um homólogo da DNA girase, a topoisomerase IV (Topo IV), capaz de relaxar o supernovelamento do DNA, facilitando, assim, os processos de replicação e transcrição (KATO et al, 1990; KATO et al, 1992). Apesar da semelhança estrutural e do mecanismo catalítico, as enzimas diferem em uma maneira fundamental: DNA girase, durante sua ação, envolve o DNA em torno de si, enquanto a topoisomerase IV não (PENG; MARIANS, 1995).

As perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana incluem o estudo aprofundado da ação das proteínas naturais produzidas por microrganismos, incluindo as que têm como alvo a DNA girase, e mais recentemente a Topo IV, dentre as quais se encontra a toxina ParE, que conjuntamente à antitoxina ParD, constitui o denominado sistema toxina-antitoxina ParE-ParD.

1.2 Sistema Toxina-Antitoxina (TA)

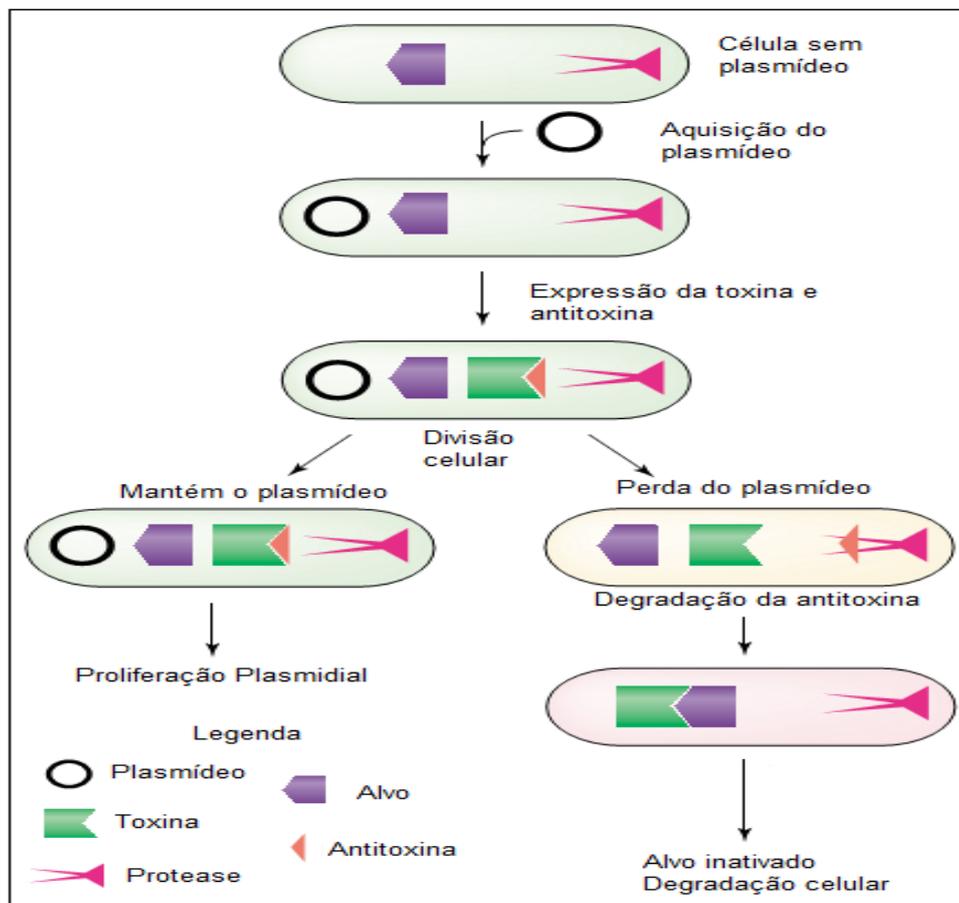
Amplamente difundidos em organismos procarióticos, os sistemas toxina-antitoxina (TA) são importantes módulos genéticos formados, geralmente, por dois elementos, sendo eles uma toxina e uma antitoxina (YAMAGUCHI et al, 2011). Em células que exibem crescimento normal, a toxina é normalmente neutralizada pela antitoxina. Contudo, em várias condições de estresse, as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases ou RNases, dependendo da sua natureza, deixando, dessa forma, as toxinas livres para agirem sobre seus alvos com consequente interferência em processos celulares fundamentais, como a replicação do DNA, tradução e produção de ATP (HAYES, 2003; BARBOSA et al., 2014; MASUDA; INOUE, 2017).

Os sistemas TA foram descobertos inicialmente em plasmídeos como um mecanismo de manutenção destes fragmentos de DNA extracromossomais, processo denominado de morte pós-segregacional, ou morte celular programada (Figura 1). Posteriormente, também foram encontrados nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias, atuando em outros eventos celulares importantes, tais como, a formação de biofilmes, proteção contra bacteriófagos, reparação do DNA

cromossomal e resposta a condições adversas (PAGE; PETI, 2016; BUSTAMANTE; IREDELL, 2017).

No caso do processo de morte celular programada, os sistemas TA exercem uma função essencial na manutenção dos plasmídeos, em virtude da sua capacidade em matar ou inibir o crescimento de uma célula filha que não recebe uma cópia do plasmídeo durante o processo de divisão celular (PANDEY; GERDES, 2005). Após a divisão celular, cada célula filha deverá herdar alguns dos complexos toxina-antitoxina do citoplasma. Se uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível (WILBAUX et al., 2007). Por ser menos estável, a antitoxina é degradada, resultando na liberação da toxina, que ficará livre para agir no seu alvo e exercer a sua função, inibindo um determinado processo celular, consequentemente levando a célula à morte (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de morte pós-segregacional



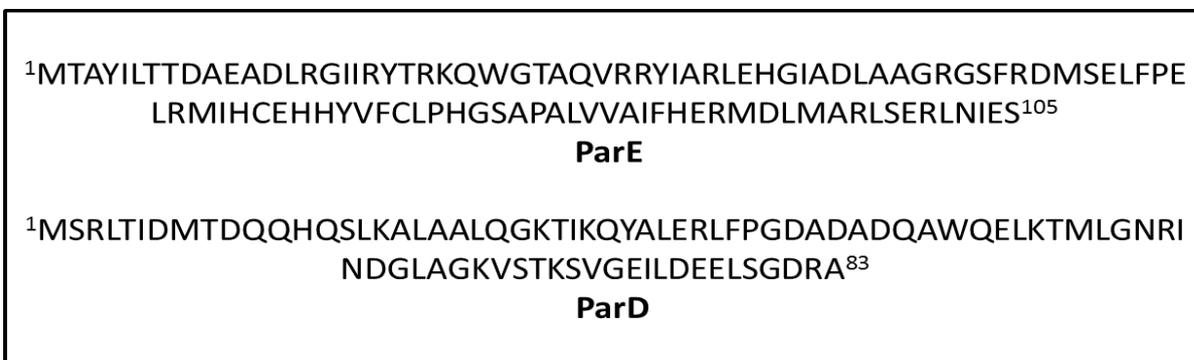
Fonte: Adaptado de Buts et al. (2005).

Assim, os módulos TA podem ser compreendidos basicamente como entidades genéticas que regulam o crescimento celular em procariotos.

Um exemplo de sistema TA é o sistema ParE/ParD, identificado no plasmídeo RK2 de uma gama de procariotos, sendo ParE (103 aminoácidos) a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina (Figura 2). ParE tem sua atividade neutralizada pela ação de ParD. ParE apresenta atividade citotóxica no processo de replicação do DNA, por interferir na ação da DNA girase, possivelmente interagindo com uma das subunidades da enzima, estabilizando o denominado “complexo clivável” (JIANG et al., 2002).

Neste sentido, o desenho racional e a síntese química de derivados de ParE, estruturalmente mais simples, surgiu como um meio alternativo, na obtenção de moléculas modelo para estudos de interação com a DNA girase, além de poderem servir como um caminho para o desenvolvimento de novos derivados peptídicos que possuam como alvo as DNA topoisomerasas bacterianas.

Figura 2 - Estrutura primária de ParE e de ParD de *Escherichia coli* (plasmídeo RK2)



Fonte: Elaborado pela autora

Desta forma, uma série de peptídeos derivados desta proteína tem sido desenhados e sintetizados quimicamente com a finalidade de se obter o melhor derivado com potencial atividade inibitória sobre a DNA girase (BARBOSA et al., 2012). Resultados promissores foram obtidos em termos de inibição da atividade desta enzima. *In vitro*, os valores de concentração para inibição total (IC₁₀₀) foram entre 10 e 25 µmol.L⁻¹ para o peptídeo denominado ParELC3, porém ensaios *in vivo*

foram insatisfatórios, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana a estes peptídeos (BARBOSA et al., 2012).

Dada esta dificuldade, a encapsulação destes peptídeos em sistemas carreadores, tal como lipossomas, poderia ajudar a superar a baixa permeabilidade da membrana, integrando-se a ela, de tal forma a permitir o transporte dos peptídeos ao interior da célula e facilitar a acessibilidade destas moléculas ao seu alvo intracelular.

1.3 Lipossomas e a encapsulação de substâncias

Os lipossomas são estruturas vesiculares e microscópicas formadas, basicamente, por fosfolípidios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelares e multilamelares, respectivamente (FRÉZARD et al., 2005). Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo caracterizadas como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (small unilamellar vesicles) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (large unilamellar vesicles).

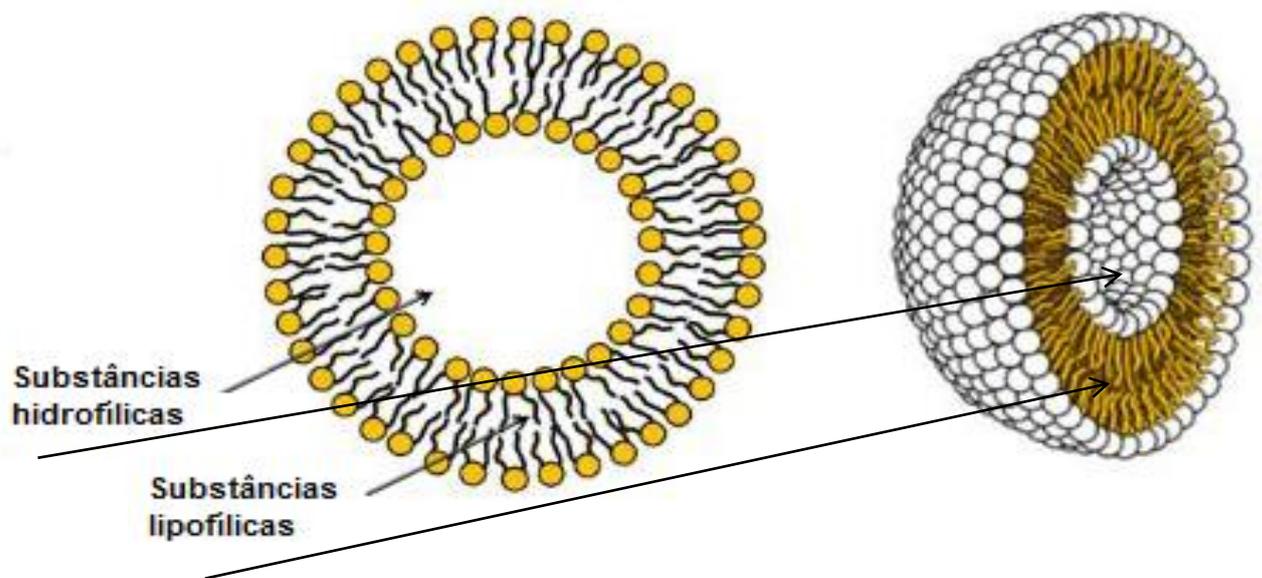
De uma forma bem geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar. Isso ocorre quando a parte hidrofóbica desta substância entra em contato com algum solvente polar. Para buscar o equilíbrio e recuperar sua estabilidade química, esta substância passa a se reorganizar em uma bicamada de modo a evitar que suas partes hidrofóbicas entrem em contato com o dado solvente.

Devido às suas propriedades anfifílicas, os lipossomas podem incorporar tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas nas lamelas (CEVC et al., 2002; CEVC, 2004; EL MAGHRABY et al., 2008) (Figura 3).

Além disso, são sistemas altamente versáteis, pois suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas de acordo com requisitos farmacêuticos e farmacológicos, de modo a permitir o direcionamento específico e a liberação progressiva e controlada de um fármaco encapsulado (EDWARDS; BAEUMNER,

2006). Devido a esta versatilidade estrutural, os lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias, aumentando a eficácia em relação a outras formas farmacêuticas e reduzindo os efeitos tóxicos dos fármacos (BATISTA, et al., 2007).

Figura 3 - Esquema de um lipossoma e os locais de incorporação de substâncias



Fonte: Modificado de <http://www.reemazeineldin.com/Liposome.html>

Nas últimas décadas tem-se presenciado uma verdadeira revolução no emprego de lipossomas nas áreas de farmacologia, biotecnologia e medicina, conduzindo a produtos de uso clínico e veterinário, além de outras inúmeras novas aplicações (SANTOS; CASTANHO, 2002). Os lipossomas são muito utilizados para prolongar o tempo de permanência dos fármacos no organismo, além de garantir maior estabilidade e eficácia destes compostos (CEVC; BLUME; 1992).

Dentre as principais funções deste material de escala nanométrica, destaca-se sua capacidade de aumentar a permeabilidade e o efeito de retenção do material encapsulado (SANTOS; CASTANHO, 2002; ZUCKER et al., 2009; ELOY et al., 2014).

Neste contexto, peptídeos biologicamente ativos, especialmente os inibidores de topoisomerasas, encapsulados em lipossomas desenvolvidos com formulação

adequada, além de estarem protegidos da ação de proteases quando em meio biológico, poderia superar a baixa permeabilidade da membrana bacteriana, entrando na célula por rotas endocíticas ou por processos fusogênicos, facilitando desta forma, a acessibilidade destes peptídeos ao seu alvo intracelular.

1.4 Ramnolipídeos

Tensoativos são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou naturais, produzidos por microrganismos (biosurfactantes).

Os biotensoativos constituem uma classe de compostos tensoativos que são produzidos a partir de organismos vivos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou excretados extracelularmente (SOUSA et al., 2014).

Estes compostos são alternativos aos tensoativos sintéticos, apresentando inúmeras vantagens especiais em relação a estes, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas (BANAT et al., 2000).

Para a indústria, estes materiais têm propriedades interessantes como capacidade emulsificante, espumante e umectante e apresentam uma alternativa promissora e interessante do ponto de vista ambiental (LOVAGLIO et al., 2011a; SOUSA et. al., 2014).

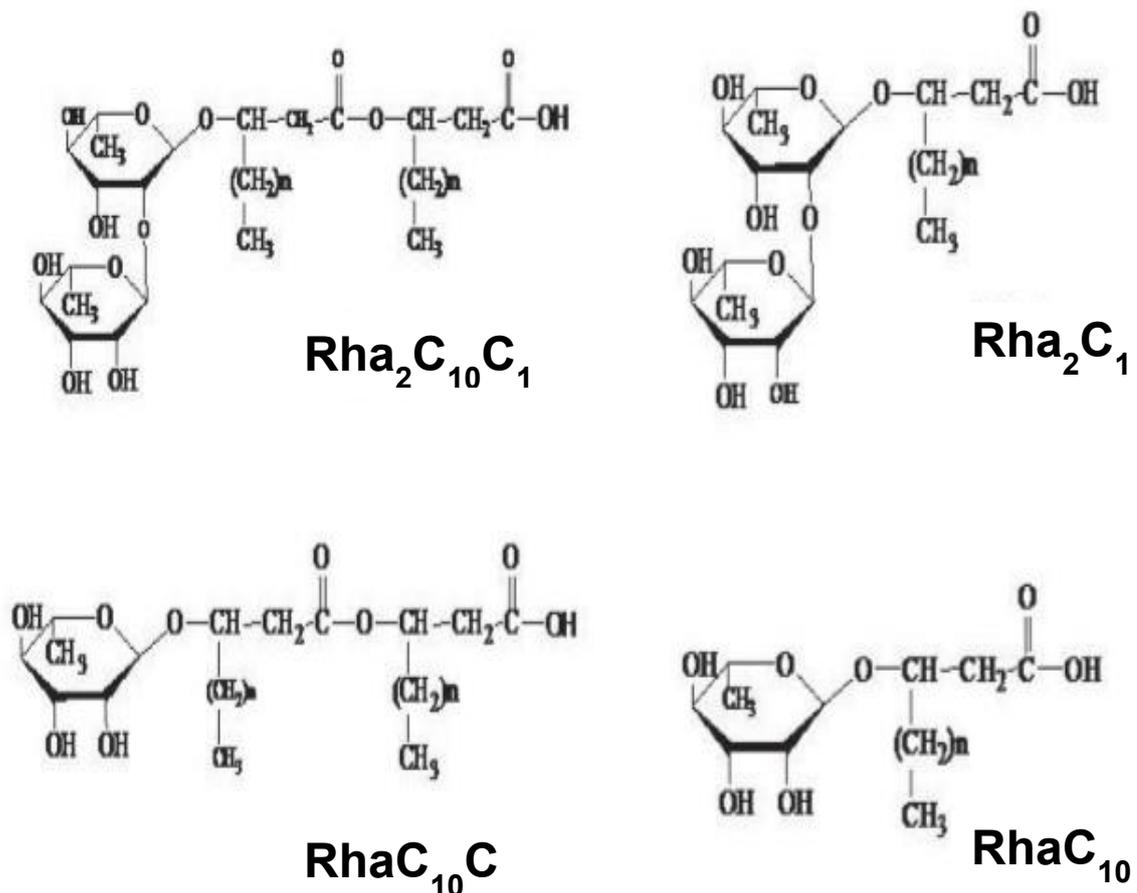
Os biotensoativos são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (CHAMPION et. al., 1995).

Os principais tipos de tensoativos podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN et al., 2001). Os glicolipídios são definidos como hidróxi-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, enquadrando nessa classe somente os ramnolipídeos (HOLMBERG, 2001).

Os ramnolipídeos são um dos mais importantes representantes da classe de biotensoativos produzidos por microrganismos (HABA et al., 2014), fazem parte da família dos glicolipídeos, não apresentam fosfato na sua composição química e são mais frequentemente produzidos por processos fermentativos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa é uma linhagem bem estudada e produtora, principalmente, de monoramnolipídeos do tipo Rha-C₁₀ e Rha-C₁₀-C₁₀ e diramnolipídeos do tipo Rha₂-C₁₀ e Rha₂-C₁₀-C₁₀ (LANG; WAGNER, 1987) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura dos quatro principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: LANG; WAGNER, (1987) modificado

Estes biotensoativos apresentam crescente interesse por parte da comunidade científica devido às suas propriedades físico-químicas e tensoativas

que lhes conferem um amplo espectro de aplicação, incluindo áreas como a biorremediação, recuperação terciária do petróleo, aditivos em alimentos, fármacos (antimicóticos e antibióticos), medicina, produtos de limpeza e cosméticos. (HENKEL, et al., 2012).

No caso da medicina, acredita-se que os ramnolipídeos provocam dificuldade à formação posterior de filmes bacterianos gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, que são patógenos, normalmente associados a alimentos. Segundo Gomes e Nitschke (2012), tais metabólitos se mostraram eficazes contra uma ampla gama de microrganismos, sendo eficientes contra bactérias Gram negativas e positivas, além de fungos filamentosos, porém não apresentam efeito significativo contra leveduras (VATSA et al., 2010).

Os ramnolipídeos ainda são pouco aproveitados e estudados para fins nanotecnológicos, no entanto, literatura aponta uma patente relacionada ao uso dos ramnolipídeos e sua aplicação como lipossoma (ISHIGAMI et al., 1990), além de outros trabalhos mais recentemente disponibilizados onde se utiliza das características do glicolipídeo para produção e caracterização de vesículas (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2009; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2011), ou ainda, onde se descreve que este biotensioativo apresenta características robustas o suficiente para ser aplicado para fins nanotecnológicos (MAIER; CHAVÉZ, 2000; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; GUDIÑA et al., 2013).

O ramnolipídeo ainda vem sendo estudado para outras aplicações nanotecnológicas, onde se destacam: emulsão, microemulsão, e mais recentemente para nanoemulsão (BAI; MCCLEMENTS, 2016; NITSCHKE; SILVA, 2018) visando aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola.

Neste contexto, acredita-se que a utilização de ramnolipídeos para a produção de lipossomas juntamente com a incorporação de peptídeos inibidores de topoisomerases seja uma ideia interessante, inovadora e capaz de conciliar as atividades de ambos (ramnolipídeo e peptídeo) de maneira sinérgica, a fim de aproveitar o potencial biotecnológico das duas moléculas, aplicando-as para o combate às infecções bacterianas.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo principal o desenvolvimento e a caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases.

Objetivos específicos

De maneira específica, foram os objetivos do trabalho:

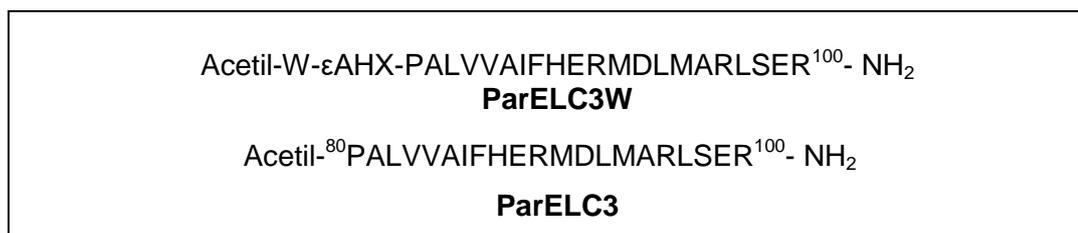
1. Sintetizar quimicamente as sequências peptídicas derivadas de ParE, empregando a metodologia da fase sólida;
2. Purificar e caracterizar os peptídeos obtidos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas;
3. Desenvolver e caracterizar os lipossomas compostos majoritariamente por ramnolipídeos;
4. Encapsular peptídeos sintéticos derivados de ParE em lipossomas de ramnolipídeos;
5. Avaliar a estabilidade e liberação modificada dos sistemas de lipossomas;
6. Realizar experimentos que comprovem possíveis atividades dos sistemas de lipossomas em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
7. Avaliar o tempo de morte (“*time killing*”);
8. Avaliar da citotoxicidade dos lipossomas e peptídeo derivado de ParE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos

Peptídeos derivados de ParE (Figura 5) foram sintetizados quimicamente pelo método da fase sólida (STEWART; YOUNG, 1984; AMBLARD et al., 2006) 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 (CHAN; WHITE, 2000). A escolha de ParELC3 deve-se a sua reconhecida capacidade de inibição das topoisomerasas bacterianas (BARBOSA et al., 2012) e ParELC3W, para a obtenção de um derivado contendo na sua estrutura um grupo cromóforo que permita sua identificação e quantificação em ensaios envolvendo técnicas espectrofotométricas.

Figura 5 - Estrutura primária dos peptídeos derivados de ParE



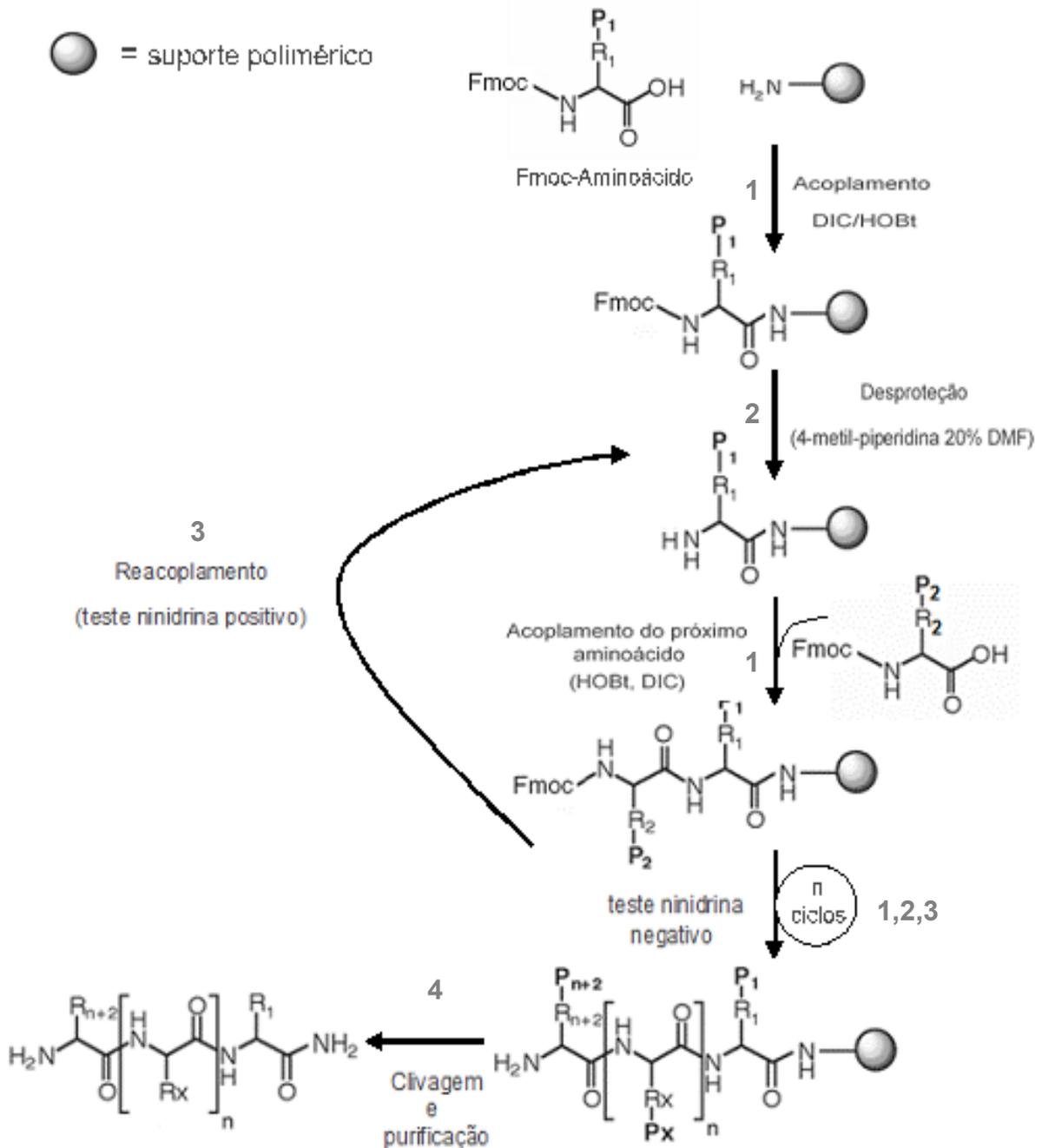
Fonte: Elaborado pela autora.

A resina de partida foi a Rink-amida-MBHA, com grau de substituição de 0,52 mmol.g⁻¹, empregando DIC/HOBt (Diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar de 3 vezes, vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina de partida (0,52 mmols), tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em uma mistura Diclorometano (DCM):Dimetilformamida (DMF) (1:1), por um período de 2 horas (Etapa 1 - Figura 6). A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF (Etapa 2 - Figura 6).

A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (condensação

incompleta), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes (Etapa 3 - Figura 6). A acetilação foi executada com anidrido acético e Diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos.

Figura 6 - Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao final, a peptídil-resina obtida foi dividida em frações, sendo a primeira de 500 mg, para prosseguimento na síntese de ParELC3W e uma outra de 200 mg para

acoplamento de carboxifluoresceína, que seguiu com o mesmo método de acoplamento adotado para os demais Fmoc-aminoácidos. O restante foi clivado para a obtenção de ParELC3.

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%), Etanoditiol - EDT (2,5%) e Triisopropilsilano - TIS (0,5%), na relação de 1 mL para cada 100 mg de peptidil-resina, a 25°C por 3 horas, sob agitação moderada (Etapa 4 - Figura 6). Peptídeos, denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados a 4.000 RPM à temperatura ambiente, dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados.

A purificação dos peptídeos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), usando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C₁₈ (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com um gradiente linear variável de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm. CLAE analítica foi realizada em um cromatógrafo UPLC da Shimadzu, empregando uma coluna de fase reversa Kromasil C₁₈ (25 x 0,46 cm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

A confirmação da identidade dos produtos obtidos foi efetuada empregando um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo de fase líquida Shimadzu no modo de ionização positivo. O espectro de massas apresenta a razão massa molecular/carga (MM/z), em que as massas moleculares obtidas experimentalmente podem ser calculadas empregando a equação 1:

$$MM_{\text{polipept}} = (MM \cdot z) - (z \cdot MM_{\text{H}^+})$$

Equação 1

onde **MM_{polipept}** a massa molecular do peptídeo em análise; **MM** é a razão massa/carga obtida pela espectrometria de massas; **z** o número de cargas que contém o peptídeo ($z = 1, 2, 3, \dots$) e **MM_{H⁺}** a massa molecular do H⁺ (1,008 g.mol⁻¹).

3.2 Ensaios de inibição de atividade da DNA girase

Os ensaios de inibição de superenovelamento do DNA (inibição da atividade da DNA girase) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de DNA girase, 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado e concentrações variadas do peptídeo ParELC3 (5 a 100 µmol.L⁻¹), em um volume de reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C, por 2h em tampão de ensaio 1X (descrito abaixo). A reação foi interrompida pela adição de 15 µL de STEB (20% sacarose; 0,05 mol.L⁻¹ Tris.HCl, pH 7,5; 0,05 mol.L⁻¹ EDTA; 50 µg.ml⁻¹ azul de bromofenol) e 60 µL da mistura clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes das mesmas foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (89 mmol.L⁻¹ Tris.HCl ; 89 mmol.L⁻¹ de ácido bórico; 2 mmol.L⁻¹ EDTA, pH 8,2). Após a corrida, o gel foi corado durante 30 min, com uma solução de brometo de etídio (1 mmol.L⁻¹). O gel foi analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech.

Tampão de diluição enzima: 50 mmol.L⁻¹ Tris.HCl (pH 7,5), 100 mmol.L⁻¹ KCl, 2 mmol.L⁻¹ DTT, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, 50% glicerol (m/v).

Tampão de ensaio (concentrado 5X): 35 mmol.L⁻¹ Tris.HCl (pH 7,5), 24 mmol.L⁻¹ KCl, 4 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 2 mmol.L⁻¹ DTT, 1,8 mmol.L⁻¹ espermidina, 1 mmol.L⁻¹ ATP, 6,5% (m/v) glicerol, 0,1 mg.mL⁻¹ albumina.

3.3 Ensaios de inibição da atividade da Topoisomerase IV

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase IV) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de topoisomerase IV com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado e concentrações variadas do peptídeo ParELC3 (5 a 100 µmol.L⁻¹), em um volume de reação de aproximadamente 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C, por 2h em tampão de ensaio 1X (descrito abaixo). Em seguida, as amostras foram tratadas e submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose, como descrito para DNA girase.

Tampão de diluição enzima: 40 mmol.L⁻¹ HEPES.KOH (pH 7,6), 100 mmol.L⁻¹ KCl, 1 mmol.L⁻¹ DTT, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, 40% glicerol (v/v).

Tampão de ensaio (concentrado 5X): 40 mmol.L⁻¹ HEPES.KOH (pH 7,6), 100 mmol.L⁻¹ KCl, 10 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹ DTT, 1 mmol.L⁻¹ ATP, 50 µg.mL⁻¹ albumina.

3.4 Produção do Ramnolipídeo

Para a produção do ramnolipídeo empregou-se uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 obtida por mutação (LOVAGLIO, 2011), a qual era mantida em caldo nutriente com glicerol a -20°C (COSTA et al., 2006). O processo fermentativo de produção de ramnolipídeos por *P.aeruginosa* LBI 2A1 seguiu metodologia previamente descrita por Lovaglio (2011), sendo realizado pelo grupo de pesquisa do Professor Jonas Contiero, Instituto de Biociências, UNESP – Rio Claro.

Para o preparo do pré-inóculo, o microrganismo foi semeado em meio Agar nutriente em tubo inclinado, por 24 horas, à 30°C. Em seguida, para a obtenção de uma suspensão microbiana, foi adicionado ao meio 3 mL de água destilada estéril. A densidade ótica (610 nm) desta suspensão bacteriana foi ajustada para 0,65 (aproximadamente 10⁸ CFU/mL). Posteriormente, 4 mL desta cultura foi inoculado em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio de sais minerais (ROBERT et al., 1989) e 2% (p/v) de óleo de soja como fonte de carbono. Este inóculo foi incubado por 24 horas a 30°C e 200 rpm em um agitador rotativo (New Brunswick, EUA)

A produção de ramnolipídeos foi feita em frascos erlenmeyers (volume de 1L), contendo 300 mL de meio mineral, 6 mL do inóculo e 6 mL de óleo de soja. Os frascos foram incubados a 30°C, 200 rpm em agitador rotativo, por um período de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8.

Os ramnolipídeos foram extraídos do meio de cultura após remoção celular por centrifugação a 10000 x g durante 20 min. Um volume do caldo livre de células foi misturado ao mesmo volume de n-hexano (1:1), agitou-se vigorosamente até completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso, até que

houvesse a separação das fases. Com auxílio de um funil de decantação, descartou-se a fase contendo n-hexano/ óleo e adicionou-se H₃PO₄ 85% 1:100 (v/v) à fase aquosa, levando à precipitação dos ramnolípídios presente.

Para a extração do tensoativo utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do ramnolípido. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

O produto rhamnolípido foi concentrado a partir das fases orgânicas reunidas utilizando um evaporador rotativo. O produto amarelado viscoso obtido foi dissolvido em metanol e concentrado novamente por evaporação do solvente a 45°C. O produto obtido foi uma mistura de mono e di-ramnolípídeos.

3.5 Preparo de lipossomas

O procedimento utilizado para o preparo dos lipossomas foi baseado em métodos já descritos por BREUKINK e colaboradores (1997), de maneira a obter a composição lipídica variável, em termos de carga e rigidez (Tabela 1).

O preparo das amostras consistiu em solubilizar os lipídeos nas quantidades e proporções correspondentes, em clorofórmio e em seguida verter o volume previamente calculado para obtenção da concentração final desejada, em um tubo de ensaio. O solvente foi evaporado lentamente sob fluxo de gás nitrogênio (N₂), para formar um fino filme lipídico nas paredes do tubo. O solvente residual foi eliminado, sob vácuo, por aproximadamente 18 horas.

Tabela 1 - Composição dos lipossomas selecionados para caracterização físico-química

| Lipossomas | Ramnolípídeo (mmol.L ⁻¹) | Colesterol (mmol.L ⁻¹) | PC* (mmol.L ⁻¹) |
|------------|---|---------------------------------------|--------------------------------|
| A | 2,6 | - | - |
| B | 2,6 | - | 0,3 |
| C | 2,6 | 0,1 | - |
| D | 2,6 | 0,1 | 0,3 |

*Fosfatidilcolina

Posteriormente, adicionou-se ao tubo, 1 mL de solução tampão PBS, pH 7,4, contendo $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do peptídeo ParELC3W (Figura 5). Para conseguir o desprendimento total do lipídeo das paredes do frasco, foram feitas agitações suaves (manualmente), alternadas com agitações vigorosas (em agitador tipo Vortex), obtendo desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV). Para a sua conversão em vesículas unilamelares pequenas (SUV), os MLV foram submetidos à extrusão (30 ciclos), utilizando extrusor (Avanti Lipids) equipado com filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro e/ou à sonicação sob amplitude de 21% e tempo de 6 minutos de sonicação, com intervalos de 1 em 1 minuto, com pausas de 20 segundos, utilizando sonicador de micropona.

Os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente pelo método não-paramétrico ANOVA, através da habilitação da ferramenta de Análises de Dados disponível no Excel 2010, seguido do Teste de Tuckey, realizado com auxílio do Software Past, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância.

3.6 Caracterização dos Sistemas de lipossomas

Para se determinar o tamanho das vesículas produzidas, estas foram submetidos à análise por DLS (*Dynamic Light Scattering*), Potencial Zeta e Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Microscopia eletrônica de transmissão - Crio (MET-Crio).

3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico das amostras foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na qual o detector é posicionado em um ângulo de 173° em relação à luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25°C . A técnica de espalhamento de luz dinâmico relaciona o tamanho das vesículas com o movimento Browniano. O movimento Browniano refere-se à movimentação das vesículas devido a colisões randômicas

com as moléculas dos líquidos que as circundam. Ao detectar as flutuações de intensidade de luz espalhada o equipamento é capaz de estabelecer um tamanho médio das vesículas através da equação de Stokes-Einstein (equação 2) na qual D_h corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, D ao coeficiente de difusão translacional, k à constante de Boltzmann, T à temperatura e n à viscosidade (Malvern Instruments, 2004).

$$D_h = (kT)/(3 \pi nD)$$

Equação 2

3.6.2 Potencial Zeta (ζ)

O potencial Zeta (ζ) foi determinado, indiretamente, em um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. O aparelho calcula o potencial zeta a partir de valores de mobilidade eletroforética, aplicando a equação de Henry. A mobilidade eletroforética é medida aplicando potencial em cada eletrodo da cubeta. As partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta quando sua velocidade é determinada. As amostras foram dispersas em solução tampão PBS, pH 7,4 (800 μ L) e adicionadas à cubeta de Potencial Zeta, modelo DTS1070. (Malvern Instruments, 2004).

3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão convencional e crio

A criomicroscopia é uma técnica de análise que fornece informação estrutural, com resolução subnanométrica, de macromoléculas biológicas, principalmente complexos de proteínas, além de ser uma importante técnica para a análise de coloides, micelas e lipossomas, já que estes podem perder sua morfologia e estrutura quando liofilizados ou desidratados. Nos experimentos com criomicroscopia, a amostra é mantida a -170°C , de modo a assegurar a sua integridade.

A criomicroscopia eletrônica (Crio-EM) dos lipossomas desenvolvidos, foi realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Campinas, CNPEM. onde os sistemas foram congelados e posteriormente analisados. Neste caso, o contraste entre as vesículas e o fundo ocorre por espalhamento de elétrons pela

matéria e é diretamente proporcional ao número atômico, assim, não existe emprego de agente contrastante nesta técnica (KUNTSCHE; HORST; BUNJES, 2011).

Para a utilização do Crio-EM foram utilizadas amostras dos lipossomas de composições A (Tabela 1) com concentração total de lipídeo de 2,7 mmol.L⁻¹ no tampão PBS 0,01 mol.L⁻¹, pH 7,2. As amostras foram preparadas em ambiente controlado, com temperatura e umidade ajustados para 22°C e 100%, respectivamente, num sistema de vitrificação automatizado (Vitrobot Mark IV, FEI). Os parâmetros do Vitrobot seguiram um tempo de blot de 3s. As amostras foram analisadas utilizando um equipamento JEOL JEM-2100 operando a 200kV.

Todavia, neste trabalho não foi possível submeter todas as amostras à análise por Crio-EM, e por tal motivo, foi empregada também a técnica de microscopia convencional, adicionando um agente contrastante capaz de fixar os lipossomas na grade de carbono antes de sua secagem completa, mantendo as estruturas das amostras e possibilitando a visualização e caracterização das partículas.

Assim, para a utilização do MET - convencional, as soluções lipossomais foram colocadas em uma grade de carbono, e em seguida, o excesso da amostra foi removido com o auxílio de um papel absorvente. Subseqüencialmente, 1 gota de solução aquosa de acetato de uranila 1% (v/v) foi adicionado para corar negativamente as soluções. Depois de 1 minuto, o excesso de solução foi removida e a grade seca à temperatura ambiente. As análises foram submetidas ao microscópio eletrônico JEOL JEM-100CX com aceleração de 100kv. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o Software ImageJ.

3.7 Eficiência de Incorporação

Para determinar a eficiência de incorporação dos lipossomas, foi utilizada a técnica de separação por filtração molecular (MOHAN et.al., 2016). Os lipossomas foram submetidos à centrifugação em sistemas AMICON, *cut-off* de 50 KDa (Millipore), sob velocidade de centrifugação de 14.000 x g, por 15 minutos, para separação de possíveis peptídeos livres na solução.

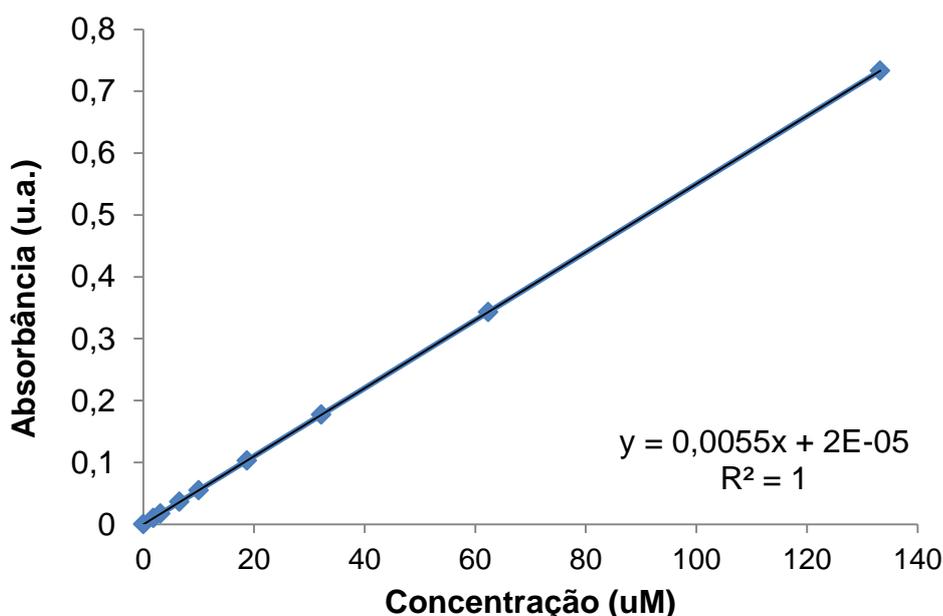
O conteúdo obtido por centrifugação foi analisado espectrofotometricamente a 280 nm, empregando um espectrofotômetro UV-1601PC da Shimadzu.

Para eliminar a interferência dos lipídeos livres na solução, o procedimento de centrifugação foi repetido utilizando lipossomas “vazios”, ou seja, preparados na ausência de peptídeo, com leitura espectrofotométrica a 280 nm. Os valores ocasionalmente obtidos foram subtraídos dos valores determinados para o filtrado.

A eficiência de incorporação foi determinada empregando a equação 3, onde C_i corresponde à concentração total de peptídeo, C_f corresponde à concentração de peptídeo livre, ou seja, peptídeo não incorporado (separado por centrifugação), ambas determinadas empregando uma curva padrão (Figura 7) previamente obtida:

$$(EI\%) = [C_i - C_f]C_i \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Figura 7 – Curva de calibração do peptídeo ParELC3 via UV – Visível, sob comprimento de onda de 280 nm



3.8 Teste de Microdiluição em Placas

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em caldo Muller Hinton (CMH), para as bactérias *Escherichia coli* O157:H17 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) até atingirem turbidez (leituras a 620 nm) equivalente à 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,0

$\times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, a qual foi utilizada nos ensaios.

O teste antimicrobiano foi determinado pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita na norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Para peptídeos encapsulados, os poços foram preenchidos com 40 μ L do meio Muller Hinton, seguido da adição de 50 μ L da solução de lipossoma, nas diferentes formulações A, B, C ou D (Tabela 1), contendo o peptídeo ParELC3 (100 μ mol.L⁻¹) encapsulado, e posterior diluição seriada (50 a 6,12 μ mol.L⁻¹). Por fim, foram distribuídos 10 μ L das suspensões dos microrganismos (inóculo) em cada poço das placas. A mesma metodologia foi adotada para ParELC3 não encapsulado.

Como controle negativo de crescimento foi utilizada 50 μ L de uma solução de ciprofloxacina Sigma N1628 (100 μ mol.L⁻¹), em substituição a solução de lipossomas. Como controle positivo, foi utilizada 10 μ L de inóculo em 90 μ L de Meio de cultura.

Outros controles utilizados foram preparados contendo 40 μ L de Meio, 10 μ L de inóculo e 50 μ L de lipossomas A, B, C e D ou contendo 50 μ L de Meio e 50 μ L de lipossomas A ou apenas 100 μ L de Meio de cultura.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Em seguida foi feita a leitura espectrofotométrica a 595 nm em um leitor de microplaca (Epoch). Em cada microplaca testou-se as 4 formulações de lipossomas (A, B, C e D) em quadruplicata (Figura 8).

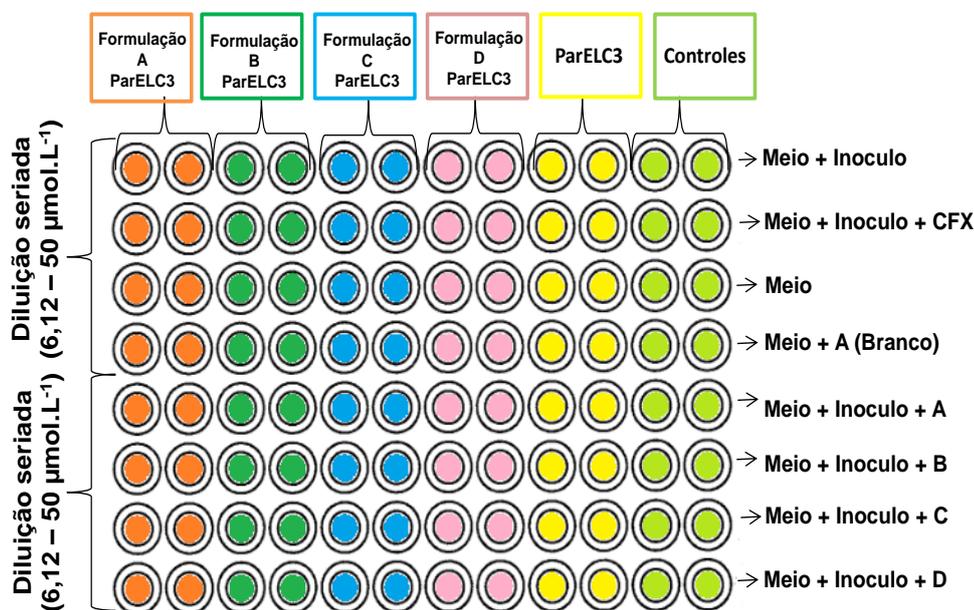
Os valores obtidos foram considerados para determinar a viabilidade microbiana para cada microrganismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações do peptídeo testado, para cada microrganismo de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_1/A_0) \times 100] \quad \text{Equação 4}$$

em que: A_1 representa a média das absorbâncias obtida para cada concentração de substância testada, corrigida pela eventual absorção dos lipossomas em cada concentração. A_0 representa a média das absorbâncias do controle de crescimento

microbiano (somente com o lipossoma “vazio”, ou seja, sem peptídeo encapsulado) (GUDIÑA et al, 2010).

Figura 8 - Fluxograma para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição



Fonte: Elaborado pela autora

3.9 Ensaio de “Time Killing”

O teste de “*Time Killing*” é o método mais apropriado para determinar o efeito bactericida ou fungicida de uma amostra. É uma boa ferramenta para obter informações sobre a interação dinâmica e cinética entre o agente antimicrobiano e a estirpe microbiana (PFALLER et al., 2004). Contudo, a utilização da técnica pelo convencional método de macrodiluição é de difícil adaptação para amostras em baixas concentrações, como peptídeos antimicrobianos e agentes “antisense” (SCHIAVONE et al, 2004; HANCOCK; SAHL, 2006). Assim, baseado no princípio da técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), o método de microplacas também pode ser aplicado para o teste de “*Time Killing*” (ZHOU et al., 2012).

Desta feita, o teste de “*Time Killing*” *in vitro* foi realizado pela técnica diluição em microplacas seguindo a metodologia descrita por Zhou et al. (2012), na qual, utilizou-se 50 µL dos peptídeos encapsulados ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), 40 µL de meio CMH e 10 µL de suspensão bacteriana. As mesmas proporções foram adotadas para peptídeos livres. As microplacas foram incubadas a 37°C e as leituras realizadas em um leitor de microplacas (Epoch) nos tempos de 0, 2, 4, 6, 12, 18 e 24 horas para determinar

a cinética para cada sistema. Em cada microplaca testaram-se as 4 formulações de lipossomas em quadruplicata. O comprimento de onda utilizado para realizar as leituras de absorvância foi de 595 nm. Os controles utilizados foram os mesmos do teste anterior.

3.10 Ensaio de Estabilidade

A estabilidade das lipossomas é um aspecto importante que pode ser analisado para facilitar a escolha da melhor formulação lipídica e determinar a maneira mais eficiente para sua aplicação. Para este estudo, as lipossomas encapsuladas foram armazenadas em tampão PBS, sob a temperatura de 4^o C durante um período de 30 dias. Em intervalos de tempos variados, as amostras foram monitoradas via Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para análise de tamanho das partículas, polidispersão (IPD) e potencial zeta (ZP).

3.11 Ensaio de Liberação Prolongada

Um volume de 6 mL de lipossoma contendo peptídeo ParELC3W encapsulado foi preparado pela técnica de sonicação e mantido sob agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 37°C para simular o meio fisiológico. A liberação foi determinada em função do tempo, a partir de alíquotas de 0,5 mL que foram previamente centrifugadas com auxílio do filtro AMICON (50 kDa), sob velocidade de centrifugação de 14000 x g, por 14 minutos, posteriormente monitoradas usando espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu sob comprimento de onda de 280 nm.

Para eliminar a interferência do sinal do lipídeo na solução, o procedimento de centrifugação foi repetido para lipossomas “vazias”, ou seja, preparados na ausência de peptídeo, com leitura espectrofotométrica a 280 nm. Os valores ocasionalmente obtidos foram subtraídos dos valores determinados para o filtrado. Como controle, o peptídeo ParELC3W livre foi monitorado a fim de determinar se o dado material conseguiria passar pela membrana selecionada.

3.12 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Para este estudo foi utilizado o peptídeo ParELC3 marcado com carboxifluoresceína (CF). O teste foi conduzido seguindo a metodologia proposta pelo item 3.8, e 24 horas após a execução do experimento normal.

Com a intenção de eliminar qualquer contaminação proveniente do peptídeo livre em solução, de maneira a restar apenas as células bacterianas marcadas pelo material, as amostras foram lavadas com PBS filtrado ($0,45 \mu\text{mol.L}^{-1}$), centrifugadas por 3 minutos a $2000 \times g$. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Posteriormente, $50 \mu\text{L}$ das amostras foram pipetadas em lâminas de microscópio, tiveram suas lamínulas seladas e foram analisadas pelo microscópio Zeiss Confocal Scanning (LSK 780 Inverted).

A fluorescência foi monitorada pelo comprimento de onda de excitação de 488 nm (verde) e comprimento de emissão de 525 nm. As imagens obtidas foram tratadas pelo programa ZEN Zeiss Configuration.

3.13 Ensaio de Citotoxicidade

Este teste foi realizado com as células HepG2 cultivadas em meio RPMI.1640 suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) e antibiótico. Inicialmente as células são lavadas com PBS e SDS, removidas da garrafa com auxílio de tripsina e ajustadas para uma concentração de 5×10^4 células. mL^{-1} com auxílio de uma Câmara de Neubauer.

Posteriormente, o material obtido foi pipetado para uma microplaca de 96 poços e incubado a 37°C por 24 h com 5% de CO_2 . Após o período, o meio de cultura foi removido. Com as células já aderidas à microplaca, inoculou-se $100 \mu\text{L}$ da substância teste e novamente incubadas a 37°C por mais 24 h.

Finalmente, adicionou-se Alamar Blue às amostras e a leitura realizada no comprimento de onda de 570 nm. Como controle positivo de crescimento utilizou-se as células vivas, sem a presença da substância teste e como controle negativo de crescimento, células vivas na presença de DMSO.

Quando as células estão vivas, elas mantêm um ambiente de redução no interior do citosol. A resazurina, o ingrediente ativo do reagente alamarBlue, é um composto não tóxico e permeável às células, de cor azul e praticamente não fluorescente. Ao entrar em células, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente. As células viáveis continuamente convertem a resazurina em resorufina, aumentando a fluorescência geral e a cor dos meios que circundam as células.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos

A síntese dos peptídeos ParELC3 e ParELC3W, bem como de ParELC3 marcado com carboxifluoresceína (ParELC3-CF), foi desenvolvida seguindo os protocolos básicos da SPFS e descritos no item 3.1, partindo-se de 1g de uma resina Rink Amida MBHA de grau de substituição 0,52 mmol/g, a qual foi utilizada para produzir peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal, após a clivagem final. Já o resíduo N-terminal (Prolina), foi acetilado ao final da síntese, empregando anidrido acético e DIEA em DMF. O uso de Rink Amida MBHA resina e o procedimento de acetilação, foram necessários para mimetizar as ligações peptídicas nestas regiões, visto que nestes peptídeos, os resíduos das extremidades C- e N-terminais correspondem a um resíduo interno da sequência da toxina (BARBOSA, 2012).

ParELC3, não apresenta nenhum grupo cromóforo intrínseco, além das ligações peptídicas, na sua estrutura, o que dificulta estudos que envolvem sua identificação e quantificação.

Os cromóforos intrínsecos de um peptídeo são de duas categorias: as ligações peptídicas e as cadeias laterais de alguns aminoácidos. Em termos quantitativos, a ligação peptídica é o cromóforo mais importante, pois existem $n-1$ ligações peptídicas em cada n aminoácidos. O seu comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) encontra-se em torno dos 220 nm. Trata-se de um cromóforo que absorve na região dos UV longínquo devido às transições eletrônicas do C=O da ligação peptídica ($n \rightarrow \sigma^*$). Este grupo carbonila tem as suas propriedades eletrônicas modificadas devido à proximidade dos elétrons desemparelhados do átomo de nitrogênio que participa na ligação. De um modo geral, a banda de absorção das ligações peptídicas é a mais intensa num espectro de absorção. No entanto, a este comprimento de onda também absorvem muitos outros compostos, nomeadamente uma grande quantidade de solventes orgânicos e tampões, o que pode contribuir negativamente na detecção e quantificação do peptídeo em análise (SEGURA-GARCÍA et al., 1999). Quanto às cadeias laterais dos aminoácidos, as bandas de absorção mais significativas encontram-se no intervalo de comprimentos de onda

entre os 260 e 290 nm, ou seja, dentro da zona do UV próximo. Concretamente, as cadeias laterais que absorvem neste intervalo de frequências são as dos aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr e Phe), que não estão presentes na estrutura primária de ParELC3.

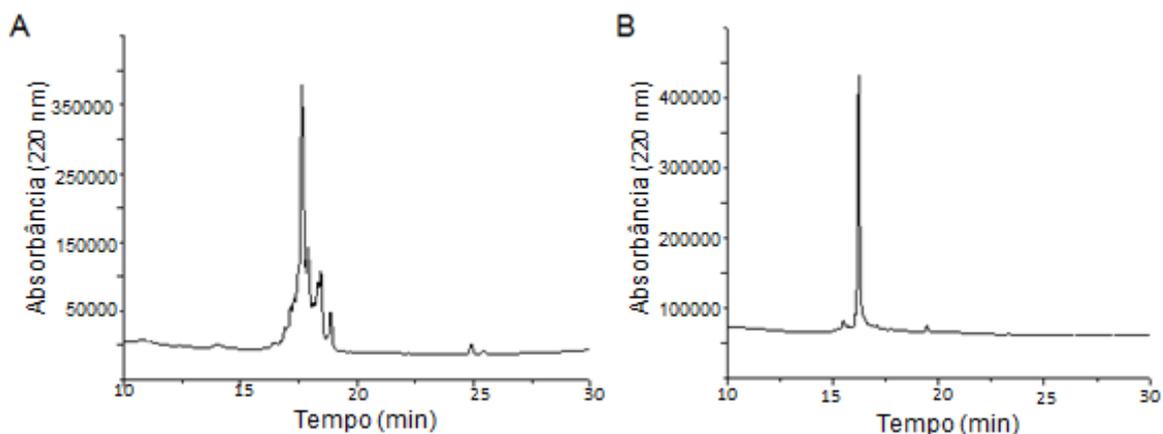
Sendo assim, com a finalidade de eliminar qualquer influência externa no monitoramento de ParELC3 por espectrofotometria, foi sintetizado o peptídeo ParELC3W. Para isso, 500 mg da peptidil-resina obtida, foi tratada com 4-metilpiperidina (20% em DMF), para retirada do grupo Fmoc, e lavada por seis vezes com DMF/DCM. Em seguida, acoplou-se o ácido ϵ -amino hexanóico (ϵ -AHX), para atuar como um espaçador entre a cadeia peptídica de ParELC3 e o resíduo de triptofano posteriormente acoplado. Este sendo um aminoácido aromático, absorve radiação eletromagnética na faixa de UV próximo, especificamente a 280 nm, além de emitir fluorescência a 350 nm, o que vem facilitar o uso de técnicas espectrofotométricas na detecção e quantificação de ParELC3.

Da mesma forma, a 200 mg de peptidil-resina previamente reservada, acoplou-se o marcador 5(6)-carboxifluoresceína, empregando-se a mesma metodologia descrita no item 3.1. Esta marcação se fez necessária, para os ensaios de Microscopia Confocal, devido ao maior rendimento quântico deste marcador, bem como às características técnicas do equipamento, constituído de filtros próprios para detecção deste fluoróforo e não para o triptofano.

Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE-FR, como descrito em Material e Métodos. De acordo com os resultados encontrados a partir desta análise, obteve-se o tempo de retenção e a porcentagem de solvente para cada peptídeo. Então, foram definidas as condições relativas ao tempo de corrida e gradiente adotado para cada purificação em escala semi-preparativa.

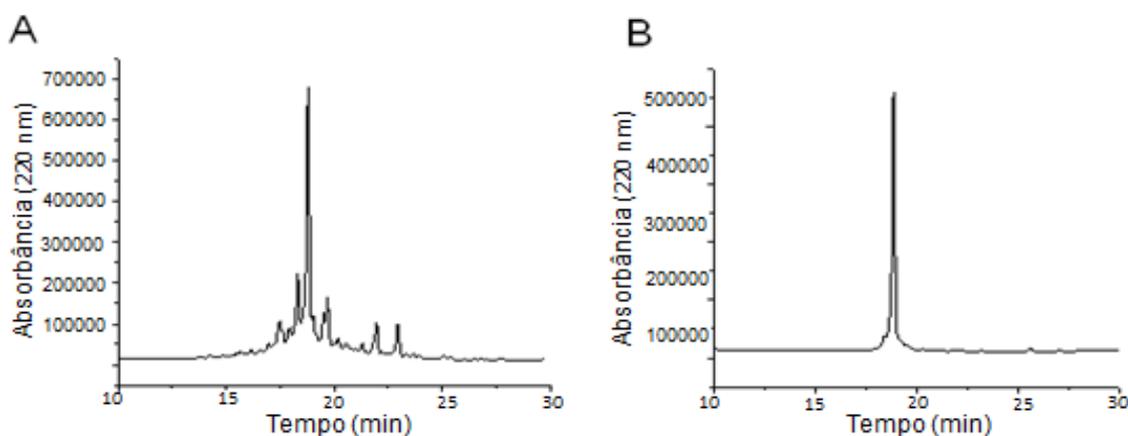
As frações provenientes do processo de purificação (condições descritas nos respectivos espectros) foram submetidas novamente a análises por CLAE em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado. Posteriormente, foram analisados por CLAE-FR em modo analítico para confirmação da pureza (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3 (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 μ m; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3W (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 μ m; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm

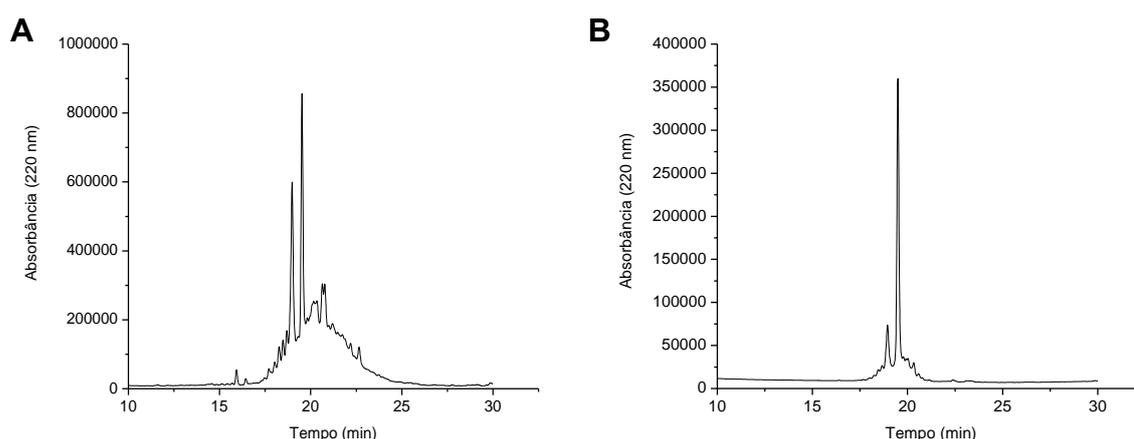


Fonte: Elaborada pela autora

Pode-se observar que os perfis cromatográficos dos peptídeos puros apresentaram um único pico em relação aos perfis cromatográficos dos peptídeos brutos. O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos puros foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto, e a pureza relativa demonstra que os métodos utilizados foram adequados.

Para o peptídeo marcado ParELC3-CF (Figura 11), observam-se dois picos principais no perfil cromatográfico da sua forma pura, provavelmente em razão da condensação da 5(6)-carboxifluoresceína estar envolvendo a carboxila do carbono 5 (em maior quantidade) ou do carbono 6, já que uma mistura de ambos constituem o marcador original. Porém, este fato em nada influi na sua aplicabilidade nos ensaios de microscopia confocal.

Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3-CF (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm ; 300 \AA). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 μm ; 300 \AA) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pela autora

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: (M + H)⁺], estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. O conjunto de resultados, permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequencias desejadas.

Tabela 2 - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas dos peptídeos ParELC3, ParELC3W e ParELC3-CF

| Peptídeo | Massa Molecular teórica (g/mol) | ES+ (z) | ES m/z (MM) |
|------------|---------------------------------|----------|------------------|
| ParELC3 | 2.495,97 | +3 +4 | 833,10 625,10 |
| ParELC3W | 2.795,34 | +3 +4 | 932,90 699,90 |
| ParELC3-CF | 2.812,26 | +3 +4 | 938,30 704,00 |

Fonte: Elaborado pela autora

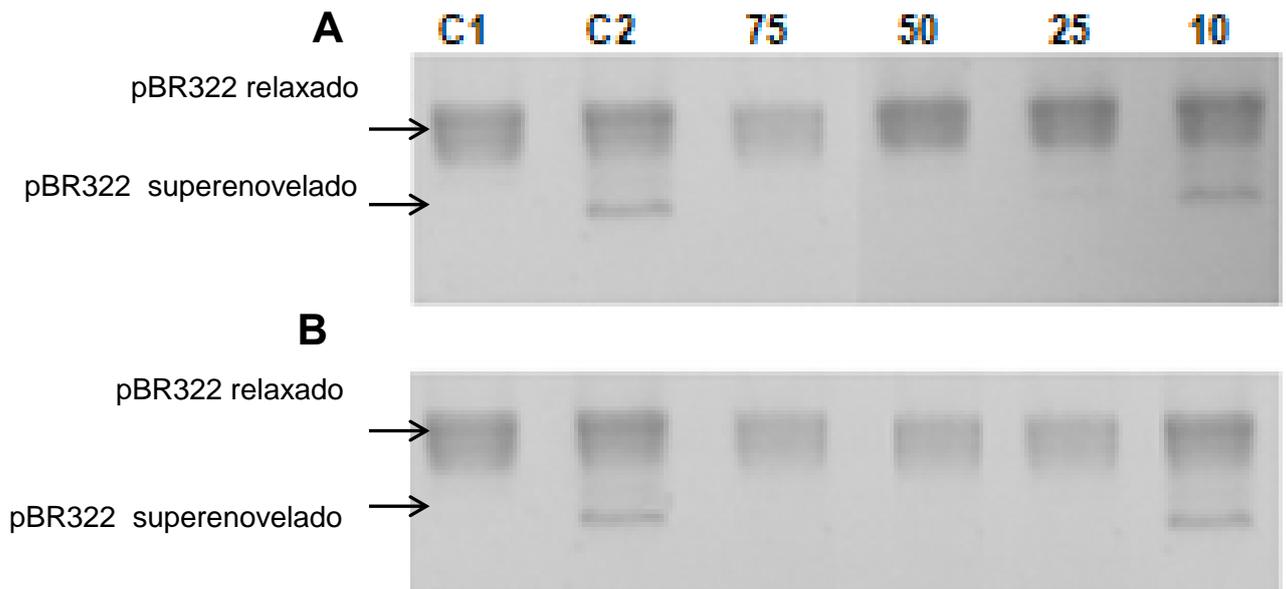
4.2 Ensaio de inibição das atividades das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV

Os peptídeos sintetizados e purificados foram testados quanto a capacidade inibitória sobre a atividade das topoisomerasas.

A enzima DNA girase introduz superenovelamento negativo em um DNA circular fechado, gerando uma molécula mais compacta, que migra mais rapidamente em relação ao DNA relaxado fechado durante a corrida em gel de eletroforese. Deste modo, foi realizada a reação de superenovelamento do DNA

pela girase na presença dos peptídeos ParELC e ParELC3W, como visualizados na Figura 12.

Figura 12 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da DNA girase. Volume de reação de 30 μ L contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima DNA girase); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em μ mol.L⁻¹

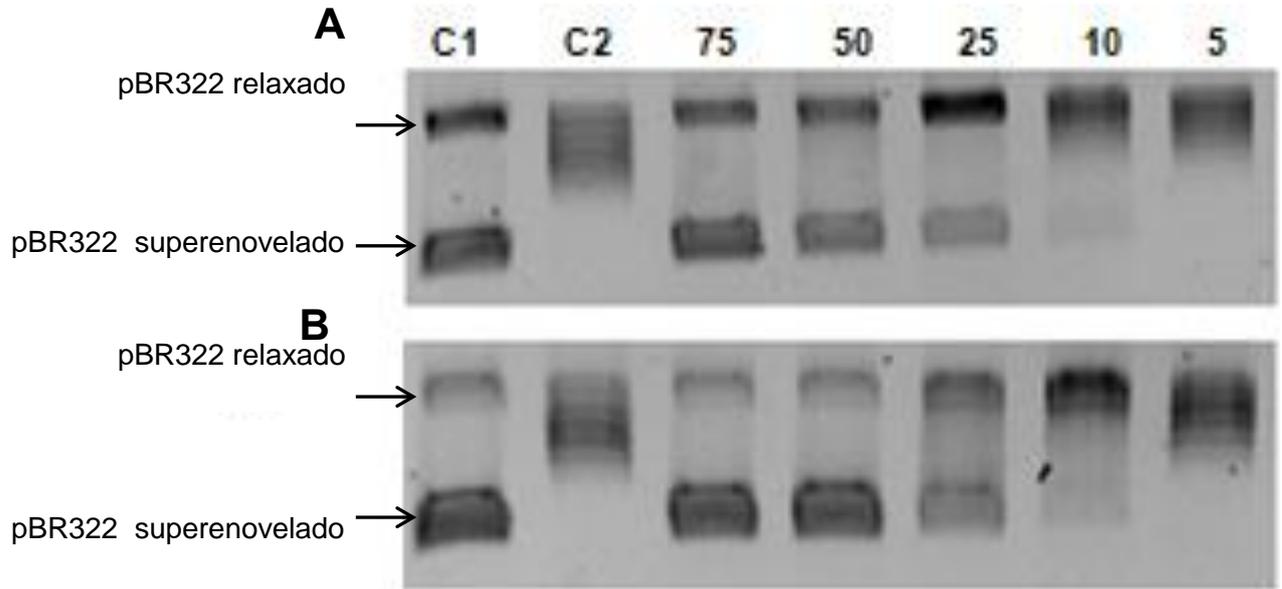


Fonte: Elaborada pela autora

Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV (Topo IV) de *E. coli* também foram realizados, com base em estudos prévios do grupo de pesquisa, que tem demonstrado que além de inibir a atividade da DNA girase, peptídeos derivados de ParE e de CcdB, também inibem a atividade da topoisomerase IV (TROVATTI et al., 2008; BARBOSA, et al., 2012).

A Topo IV é uma topoisomerase bacteriana do tipo II que possui estrutura e mecanismo catalítico semelhante à girase (KATO et al., 1990). A Topo IV possui a capacidade de relaxar positiva ou negativamente moléculas de DNA superenovelado, gerando uma molécula mais volumosa que migra mais lentamente em relação à molécula de DNA superenovelado fechado durante a eletroforese em gel. Assim, a reação de relaxamento do DNA superenovelado catalisada pela topoisomerase IV foi realizada na presença de cada um dos peptídeos e submetidos à eletroforese em gel. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 13.

Figura 13 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da Topoisomerase IV. Volume de reação de 30 μ L contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 superenovelado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 superenovelado e a enzima Topo IV); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em μ mol.L⁻¹



Fonte: Elaborada pela autora

Os valores de IC₁₀₀ de cada peptídeo para as reações de superenovelamento e relaxamento das enzimas girase e topoisomerase IV, respectivamente, estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação da atividade inibitória dos peptídeos ParELC3 e ParELC3W em topoisomerasas bacterianas

| Peptídeo | IC ₁₀₀ (μ mol.L ⁻¹) | |
|-----------------|---|---------|
| | DNA Girase | Topo IV |
| ParELC3 | < 25 | < 10 |
| ParELC3W | < 25 | < 10 |

Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser observado, os peptídeos ParELC3 e ParELC3W apresentaram os mesmos valores de inibição para ambas as enzimas. A inclusão de dois aminoácidos, na extremidade N-terminal de ParELC3, não alterou a atividade inibitória previamente observada, um resultado que permite concluir acerca da viabilidade de uso de ParELC3W em substituição a ParELC3 em estudos que envolvam a identificação ou quantificação do peptídeo por análises espectrofotométricas.

ParELC3, um peptídeo com atividade inibitória pré-determinada em DNA girase e Topo IV (BARBOSA et al., 2012), não possui capacidade de absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda superiores a 220 nm, o que dificulta sobremaneira qualquer estudo que envolva sua identificação ou quantificação. A introdução de uma sonda fluorescente (triptofano), na extremidade N-terminal e a consequente manutenção da atividade inibitória, permitiu o uso deste peptídeo, nos ensaios de internalização de peptídeos derivados de ParE em lipossomas.

4.3 Desenvolvimento das Formulações Lipídicas

A concentração de ramnolipídeo selecionada inicialmente para a formulação foi de 10 mmol.L^{-1} , contudo, os experimentos iniciais mostraram a formação de um precipitado lipídico após armazenamento do material durante 10 dias, excluindo a possibilidade de experimentos futuros. Iniciou-se, então, um trabalho com lipossomas com a concentração de $2,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ramnolipídeo, por ser um valor acima da CMC do ramnolipídeo (PORNUNTHORNTAWEE, et al., 2009).

Com a intenção de avaliar a interação e o comportamento dos lipossomas de ramnolipídeo associadas a outros lipídeos, escolheu-se trabalhar com a fosfatidilcolina e o colesterol, lipídeos amplamente consagrados na literatura e muito utilizados para aplicações nanotecnológicas.

O colesterol foi inicialmente adicionado às formulações para conferir estabilidade, rigidez e estruturação aos lipossomas. Pensando na concentração de ramnolipídeo previamente estabelecida, a concentração de trabalho ideal para o colesterol foi de $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$, conforme já descrito na literatura (PORNUNTHORNTAWEE, et al., 2011), a fim de aumentar a eficiência de incorporação do peptídeo.

Por outro lado, a fosfatidilcolina, um fosfolípido neutro, foi adicionada às formulações considerando sua abundância na composição das membranas bacterianas e capacidade de conferir fluidez e estruturação às vesículas. A concentração ideal de trabalho para este lipídeo foi estabelecida através de alguns ensaios, estabelecendo-a a $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

4.4 Caracterização dos Sistemas Lipossomais: Tamanho e Potencial Zeta (ζ)

Como o peptídeo ParELC3 apresenta atividade inibitória de topoisomerases de células procariontes, foi proposto produzir lipossomas com diâmetro hidrodinâmico próximo ao tamanho médio das bactérias (50 – 200 nm) (KUUPPO-LEINIKKI, 1990; TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Foram testadas quatro formulações de lipossomas, denominadas A, B, C e D (Tabela 1) e preparados por duas técnicas: sonicação e extrusão.

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 4 e 5), é possível notar que apesar de não existir diferença significativa entre as variações no tamanho das vesículas de formulações A e C, a presença do colesterol provocou a redução de 4,45% e 2,10 % no diâmetro hidrodinâmico das vesículas quando comparados ao tamanho do lipossoma constituído apenas por ramnolípido, preparados pelas técnicas de sonicação e extrusão, respectivamente.

Essa redução, apesar de não significativa, poderia ser explicada pelo fato de o colesterol dificultar o empacotamento perfeito das cadeias carbônicas ao ramnolípido, diminuindo a extensão das interações de Van der Waals na fase gel, provocando a redução da espessura da bicamada (PALMEIRA, 2012). Corroboram com este resultado a redução significativa do tamanho das vesículas formadas por ramnolípido em relação ao aumento na concentração de colesterol (em concentrações superiores a $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) observada por Pornsuntornatavee e colaboradores (2011).

Os resultados também mostram que a adição de PC (fosfatidilcolina), assim como descrito na literatura para outros tipos de lipossomas (SCHWARZ et al., 1994; PRADO et al., 2015), provocou redução de 17,95 e 22,42% (para sonicação, Tabela 4) e 26,81 e 27,74% (para extrusão, Tabela 5) no tamanho médio das vesículas compostas pelas formulações B e D respectivamente, quando comparadas com a

formulação A. Este resultado evidencia a capacidade de interação do ramnolípídeo com a fosfatidilcolina.

Tabela 4 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por **sonicação** em função da formulação

| SONICAÇÃO | Média (nm) | IPD | Zeta (mV) |
|------------|----------------------------|-------------|--------------|
| Formulação | | | |
| A | 118,67 ^a ± 2,88 | 0.20 ± 0,01 | -16,7 ± 1,5 |
| B | 97,36 ^b ± 6,00 | 0.17 ± 0,02 | -20,5 ± 1,3 |
| C | 113,40 ^a ± 4,50 | 0.28 ± 0,01 | -19,7 ± 0,3 |
| D | 87,98 ^b ± 6,74 | 0.20 ± 0,02 | -20,0 ± 0,5 |

^{a,b} Valores estatisticamente iguais, considerando 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 5 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por **extrusão** em função da formulação

| EXTRUSÃO | Média (nm) | IPD | Zeta (mV) |
|------------|----------------------------|-------------|--------------|
| Formulação | | | |
| A | 128,67 ^a ± 6,66 | 0,28 ± 0,01 | -12,3 ± 1,1 |
| B | 94,17 ^b ± 1,54 | 0,30 ± 0,01 | -17,0 ± 0,7 |
| C | 125,98 ^a ± 4,93 | 0,23 ± 0,02 | -15,0 ± 1,2 |
| D | 91,03 ^b ± 4,16 | 0,31 ± 0,02 | -18,0 ± 0,8 |

^{a,b} Valores estatisticamente iguais, considerando 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora

O Índice de Polidispersão (IPD) é a razão que correlaciona a variância amostral com o quadrado do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas em uma

curva de distribuição (ZAMARION, 2012). Assim, este dado pode oferecer informações a respeito da dispersão e da homogeneidade do tamanho das lipossomas, sendo este um parâmetro que pode ser levado em conta no momento da escolha ou da validação do sistema lipossomal. Em geral, valores de IPD entre 0,2 e 0,7 para lipossomas, indicam um sistema monodisperso e homogeneamente distribuído (PIAZZA, 2014).

De acordo com a literatura (LAPINSKI et al., 2007), os processos de produção de lipossomas, via extrusão, tendem a conferir maior homogeneidade aos sistemas, e por consequência, valores mais baixos para o IPD deveriam ser encontrados; contudo, através dos resultados disponíveis nas Tabelas 4 e 5 pode-se observar que o IPD de lipossomas produzidos via sonicação foram inferiores ao IPD de lipossomas produzidos via extrusão. Este resultado, apesar de inesperado, pode estar relacionado à formulação lipídica que compõe os lipossomas estudados, uma vez que resultados semelhantes foram obtidos por Cho e colaboradores (2013) e por Isailović e colaboradores (2013), que concluíram que cada lipossoma tende a se comportar de uma maneira peculiar ao sofrer variações de composições e proporções lipídicas e/ou de técnicas de produção.

O potencial zeta, por sua vez, é a medida que relaciona o equilíbrio estérico dos lipossomas, associando isso à carga que eles adotam, de maneira que quanto mais próximos de 20 – 30 mV (em módulo) existe menor chance dos coloides se aglomerarem (HONARY et al, 2013; PIAZZA, 2014). A partir dos ensaios realizados, pode-se perceber que as formulações adquiriram cargas mais próximas de 20 mV (em módulo), quando preparadas via sonicação. Esses valores vão de encontro com os dados de Índice de Polidispersão, evidenciando que a sonicação pode vir a ser a técnica de produção de lipossomas mais adequada para os tipos de coloides produzidos.

O teste estatístico não-paramétrico foi conduzido através do software de análise de dados disponível no Excel, versão 2016. O teste de Tuckey foi realizado pelo software Past, utilizando 5% de nível de significância.

4.5 Caracterização dos Sistemas Encapsulados: Tamanho e Potencial Zeta(ζ)

Por se tratar de uma molécula ainda pouco estudada para fins nanotecnológicos, torna-se interessante discutir preliminarmente a respeito dos parâmetros físico-químicos de ParELC3W, um peptídeo composto por 23 resíduos de aminoácidos.

Este peptídeo apresenta 14 resíduos de aminoácidos classificados como hidrofóbicos (W78, P80-F87, M91, L93-A95 e L97), na sua maioria localizados na sua extremidade N-terminal e 8 resíduos de aminoácidos classificados como hidrofílicos (H88-R90, D92, R96 e S98-R100), concentrados na extremidade C-terminal da molécula, além do aminoácido espaçador. Esta composição confere à molécula uma carga líquida positiva ($pI = 8,84$) e solubilidade reduzida em $pH 7,4$ (<https://pepcalc.com>).

Segundo a literatura, lipossomas têm a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas no compartimento interno aquoso e moléculas hidrofóbicas na bicamada lipídica. Além disso, a internalização de moléculas majoritariamente hidrofílicas provoca um aumento do diâmetro hidrodinâmico das lipossomas, ao passo que, a internalização de moléculas hidrofóbicas provoca efeito inverso (SHARMA, et al., 1997; MARTINS et al., 2007; ELOY et al., 2017).

Comparativamente aos lipossomas não encapsulados (Tabelas 5 e 6), o tamanho médio dos lipossomas aumentou com a encapsulação do peptídeo ParELC3W (Tabelas 7 e 8). Este aumento caracteriza a incorporação do peptídeo às vesículas, e por se tratar de um peptídeo com carga líquida positiva, especificamente na fase aquosa interior à vesícula (MARTINS et al., 2007).

A redução do Potencial Zeta (ζ), por sua vez, está associada à estabilização estérica das vesículas. Acredita-se que quando os valores de potencial zeta de uma suspensão coloidal estão próximos de 20 - 30mV (em módulo) as vesículas estão em uma suspensão estável e não sofrem grande influência do solvente, força iônica e agitação (PIAZZA, 2014).

O fator responsável por esta redução pode estar relacionado com a presença do peptídeo ParELC3W encapsulado, dado que o mesmo apresenta carga levemente positiva, corroborando com os dados obtidos para o diâmetro hidrodinâmico e evidenciando a internalização eficiente de ParELC3W.

Tabela 6 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por **sonicação** e adição do peptídeo ParELC3W

| SONICAÇÃO | Média (nm) | IPD | Zeta (mV) |
|------------|---------------|-------------|-------------|
| Formulação | | | |
| A | 198,60 ± 5,87 | 0,49 ± 0,19 | -20,7 ± 1,3 |
| B | 158,10 ± 9,07 | 0,47 ± 0,14 | -21,7 ± 0,9 |
| C | 212,90 ± 7,08 | 0,49 ± 0,17 | -22,2 ± 1,4 |
| D | 128,30 ± 8,89 | 0,37 ± 0,21 | -21,3 ± 4,5 |

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 7 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por **extrusão** e adição do peptídeo ParELC3W

| EXTRUSÃO | Média (nm) | IPD | Zeta (mV) |
|------------|---------------|-------------|-------------|
| Formulação | | | |
| A | 210,70 ± 3,78 | 0,31 ± 0,21 | -21,8 ± 2,7 |
| B | 128,30 ± 4,44 | 0,37 ± 0,10 | -26,8 ± 3,3 |
| C | 247,80 ± 7,89 | 0,51 ± 0,18 | -28,8 ± 4,8 |
| D | 146,70 ± 6,87 | 0,48 ± 0,23 | -26,5 ± 4,2 |

Fonte: Elaborada pela autora

Pode-se ainda observar um pequeno aumento do Índice de Polidispersão das lipossomas internalizadas, produzidas por ambas técnicas. A princípio, este aumento

poderia ter ocorrido por conta da aglomeração dos sistemas. Contudo, os dados de Potencial Zeta evidenciam que as vesículas estão com estabilidade estérica suficiente para evitar a formação de aglomerados.

Assim, os dados levam a crer que este alto valor de IPD pode estar relacionado ao fato de que nem todos os lipossomas presentes na amostra tiveram a capacidade de internalizar o peptídeo igualmente, por consequência alguns lipossomas permaneceram no tamanho original. Desta forma, o sistema se tornou menos monodisperso, ou seja, com valores de IPD superiores, contudo, os resultados ainda estão dentro do aceitável para lipossomas (PIAZZA, 2014).

Algumas alternativas para tentar manter um Índice de Polidispersão baixo seria utilizar um número maior de ciclos no processo da extrusão, ou ainda, fornecer uma amplitude maior para o sistema durante o processo de sonicação, no entanto, essas alterações acabam provocando a redução do diâmetro hidrodinâmico das lipossomas, alterando o objetivo final do trabalho e podendo reduzir a eficiência de incorporação (HELVACI et al., 2004; ELOY et al., 2016).

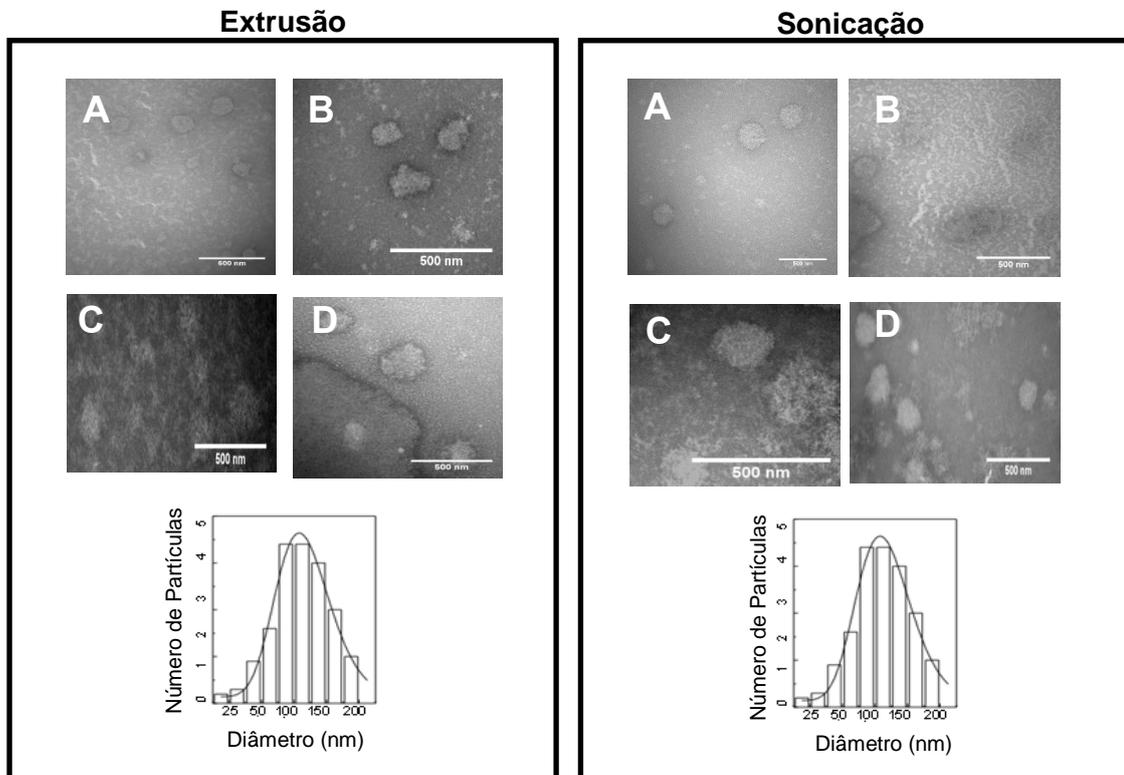
O teste estatístico não-paramétrico foi conduzido através do software de análise de dados disponível no Excel, versão 2016. O teste de Tuckey foi realizado pelo software Past, utilizando 5% de nível de significância.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na imagem de microscopia eletrônica de transmissão apresentada na Figura 14, observa-se que foram obtidas vesículas com padrão esférico e unilamelar, cujo diâmetro médio foi de 120 ± 2 nm. O histograma ilustra a possível dispersão das partículas em solução, onde é possível se observar uma maior população de lipossomas entre 100 e 150 nm de diâmetro hidrodinâmico.

A morfologia dos lipossomas mostrou-se mais definida quando utilizada as formulações A, B e D (Tabela 1). Já para a formulação C, composta por Ramnolipídeo e Colesterol, pode-se notar que a morfologia não foi mantida. Este problema pode ser referente ao tempo que estas amostras passaram em contato com o agente contrastante (acetato de uranila 1%), visto que estas amostras foram as últimas a serem analisadas.

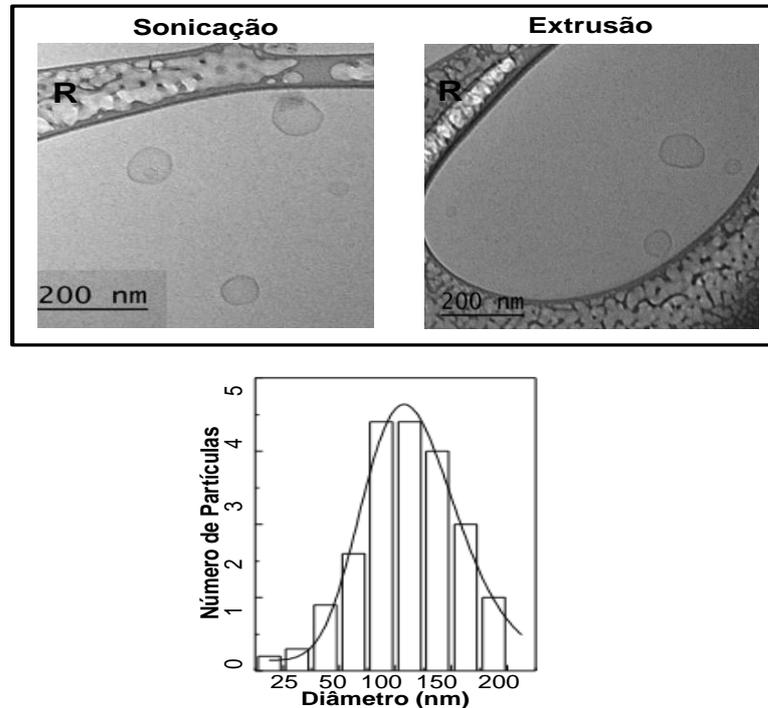
Figura 14 - Micrografias obtidas por MET-Convencional para amostras de lipossomas livres. Formulações: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol



Fonte: Elaborada pela autora

É interessante observar que as medidas de diâmetro das lipossomas obtidas via microscopia coincidiram com as medidas de diâmetro determinadas pelo DLS. Foi observado que apesar dos resultados de Crio-EM (Figura 15) serem mais claros e bem definidos que as imagens obtidas com o MET-Convencional, ambos resultados também coincidem com o tamanho previamente calculado pelo DLS, comprovando assim que a utilização do MET adicionado da técnica de contraste negativo também foi eficiente para caracterizar os sistemas formados.

Figura 15 - Micrografias obtidas por Crio-EM para amostras de lipossomas de ramnolípídeos (formulação A) vazios



Fonte: Elaborada pela autora

4.7 Eficiência de Incorporação

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que as técnicas utilizadas para preparo das lipossomas não alteraram significativamente a Eficiência de Incorporação (E.I.%) do peptídeo ParELC3W. Os resultados são coerentes quando comparados com o "tamanho dos sistemas" (apresentado no item 4.5), no qual, vesículas que apresentaram diâmetro hidrodinâmico maiores, foram capazes de internalizar maior quantidade de peptídeo. Isso acontece, pois, em geral, lipossomas com maior diâmetro hidrodinâmico apresentam também maior cavidade aquosa interna, capazes, assim, de incorporarem maior quantidade de moléculas.

Os testes indicam que a formulação C foi a responsável por incorporar maior quantidade do peptídeo ParELC3W para ambas as técnicas utilizadas. Segundo Pornsuntorntawee e colaboradores (2011), a adição de colesterol às membranas

formadas por ramnolipídeos pode facilitar a permeação de agentes externos. Ademais, devido à baixa concentração de colesterol utilizada na composição da bicamada lipídica composta majoritariamente por ramnolipídeos, as vesículas tornaram-se menos rígidas, facilitando a internalização de ParELC3W.

A eficiência de incorporação de peptídeos com valores entre 40 a 60% já havia sido discutida por Morais e colaboradores (2004), que atribuiu relações entre a eficiência de incorporação e fatores como interação da carga do peptídeo e a carga da vesícula. Além disso, as características de hidropaticidade do peptídeo também pode influenciar na sua eficiência de incorporação (MOHAN et al., 2016).

Tabela 8 - Eficiência de encapsulação do peptídeo ParELC3W em diferentes lipossomas

| Formulação | Eficiência de Incorporação (%) | |
|------------|--------------------------------|-------------|
| | Sonicação | Extrusão |
| A | 57,80 ± 1,2 | 56,0 ± 0,7 |
| B | 47,59 ± 2,1 | 40,87 ± 2,2 |
| C | 61,92 ± 1,8 | 59,08 ± 2,0 |
| D | 44,59 ± 3,0 | 47,66 ± 1,4 |

Fonte: Elaborada pela autora

4.8 Ensaio de Inibição de Crescimento Bacteriano

Determinou-se a Inibição de Crescimento Bacteriano por meio do teste de microdiluição em placas. Os microrganismos escolhidos para avaliar a atividade biológica dos peptídeos foram *E. coli* e *S. aureus*, sendo estes representantes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente (Tabelas 9 a 12).

Para ambos os microrganismos testados, as versões peptídicas incorporadas tiveram uma atividade antimicrobiana superior quando comparadas com o peptídeo livre. Este resultado está de acordo com o obtido por Garrido (2007), quando foi

observado que peptídeos livres não apresentaram atividade inibitória aos microrganismos testados, contudo, quando incorporados, passaram a inibir o crescimento de células bacterianas.

Este efeito também foi semelhante ao obtido por Barbosa (2012), em que foi testada a incorporação do peptídeo ParELC3 em vesículas de fosfatidilcolina de soja e estearilamina frente a *S. aureus* e *E. coli*. Neste caso, o resultado final de inibição de crescimento bacteriano não foi tão eficiente quanto ao obtido neste trabalho, onde foi utilizado ramnolipídeos para a incorporação de ParELC3.

Muitos fatores podem estar atrelados às diferenças de resultados obtidos entre estes trabalhos; contudo, este pode ser outro indício de que a utilização de um lipídeo com atividade antimicrobiana intrínseca, como o ramnolipídeo, pode ter aumentado a atividade antibiótica do sistema lipossomal produzido, além de comprovar eficiência das vesículas produzidos majoritariamente por ramnolipídeos.

Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via **sonicação** e incorporadas com ParELC3 frente a ***Escherichia coli***. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: "LB" corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹ de ramnolipídeo; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da sonicação

| Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) | Inibição de Crescimento Celular (%) | | | | |
|--|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | A | B | C | D | ParELC3 |
| 50 | 68,7 \pm 2,7 | 72,5 \pm 5,9 | 85 \pm 4,6 | 66,5 \pm 1,5 | 23,6 \pm 1,5 |
| 25 | 26,7 \pm 5,7 | 46,3 \pm 4,5 | 53,5 \pm 7,8 | 50,5 \pm 1,2 | 10,6 \pm 1,8 |
| 12,5 | 19,3 \pm 5,2 | 22 \pm 4,3 | 19,4 \pm 2,3 | 23,5 \pm 1,5 | 3,7 \pm 1,3 |
| 6,25 | 11,5 \pm 3,2 | 4,3 \pm 2,3 | 3,5 \pm 1,3 | 2,3 \pm 2,6 | 0 |
| LB | 28 \pm 1,2 | 32 \pm 3,4 | 38 \pm 1,4 | 35 \pm 2,9 | - |
| R | 19 \pm 2,4 | 19 \pm 2,4 | 19 \pm 2,4 | 19 \pm 2,4 | - |

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 10 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via **sonicação** e incorporadas com ParELC3 frente a *Staphylococcus aureus*. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: "LB" corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da sonicação

| Concentração (µmol.L ⁻¹) | Inibição de Crescimento Celular (%) | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | A | B | C | D | ParELC3 |
| 50 | 73,1 ± 2,7 | 78,3 ± 1,3 | 93,5 ± 4,4 | 83,6 ± 3,8 | 32,8 ± 4,3 |
| 25 | 37 ± 2,8 | 63,7 ± 3,3 | 65,9 ± 3,4 | 67,5 ± 2,5 | 15,8 ± 6,1 |
| 12,5 | 34 ± 2,5 | 60 ± 5,7 | 58,2 ± 7,3 | 61,3 ± 6,8 | 11,9 ± 5,4 |
| 6,25 | 30 ± 3,8 | 55 ± 7,8 | 55,2 ± 9,1 | 34,6 ± 2,6 | 4,5 ± 3,3 |
| LB | 36 ± 4,7 | 39 ± 7,4 | 40 ± 5,8 | 40 ± 5,2 | - |
| R | 15 ± 4,9 | 15 ± 4,9 | 15 ± 4,9 | 15 ± 4,6 | - |

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 11 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via **extrusão** e incorporadas com ParELC3 frente a *Escherichia coli*. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: "LB" corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da extrusão

| Concentração (µmol.L ⁻¹) | Inibição de Crescimento Celular (%) | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | A | B | C | D | ParELC3 |
| 50 | 60,3 ± 3,2 | 58,4 ± 4,5 | 70,7 ± 2,4 | 66,9 ± 3,5 | 29,5 ± 3,5 |
| 25 | 57,5 ± 4,4 | 46,3 ± 8,6 | 60,2 ± 3,5 | 58,6 ± 6,3 | 19,6 ± 2,2 |
| 12,5 | 40,1 ± 5,7 | 45,2 ± 7,8 | 58,1 ± 1,1 | 55,6 ± 5,7 | 0 |
| 6,25 | 17,6 ± 6,8 | 15,6 ± 3,5 | 22,3 ± 2,7 | 18,9 ± 9,8 | 0 |
| LB | 34,9 ± 8,9 | 40,2 ± 1,3 | 37,5 ± 5,4 | 39,3 ± 4,5 | - |
| R | 26,5 ± 3,0 | 26,5 ± 3,0 | 26,5 ± 3,0 | 26,5 ± 6,6 | - |

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via **extrusão** e incorporadas com ParELC3 frente a ***Staphylococcus aureus***. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da extrusão

| Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) | Inibição de Crescimento Celular (%) | | | | |
|--|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | A | B | C | D | ParELC3 |
| 50 | 71,3 ± 4,3 | 68,5 ± 5,6 | 91,8 ± 2,3 | 72 ± 2,9 | 25,6 ± 2,0 |
| 25 | 60 ± 3,3 | 61,4 ± 7,3 | 66,7 ± 3,6 | 69,8 ± 5,4 | 10,3 ± 3,1 |
| 12,5 | 57,6 ± 2,1 | 58,7 ± 6,8 | 60,4 ± 4,6 | 65,9 ± 3,6 | 0 |
| 6,25 | 51,4 ± 6,5 | 40,6 ± 5,8 | 23,4 ± 5,5 | 50,7 ± 6,0 | 0 |
| LB | 43,9 ± 7,5 | 50,7 ± 6,6 | 53,8 ± 4,4 | 52,7 ± 6,0 | - |
| R | 17,3 ± 4,2 | 17,3 ± 4,2 | 17,3 ± 4,3 | 17,3 ± 2,3 | - |

Fonte: Elaborada pela autora

Também foi observado que na concentração de ensaio, o ramnolipídeo solubilizado em PBS foi capaz de inibir entre 10 e 30% do crescimento celular, e esta atividade antimicrobiana já vem sendo reportada na literatura (LOVAGLIO et al., 2011; SILVA, 2014). Mas, quando organizado na forma de vesículas, após os processos de extrusão e/ou sonicação, o ramnolipídeo teve sua atividade inibitória aumentada. Esse mesmo relato ainda não foi reportado na literatura. Uma possível explicação seria o fato das lipossomas apresentarem uma superfície de pequeno raio de curvatura, assim, quando sua energia interna é equilibrada, há formação de lipossomas de menor tamanho possível, favorecendo sua penetração na membrana plasmática das células bacterianas e por consequência, aumentando sua atividade de inibição (YEAGLE, 2005).

Esses resultados também mostram que a formulação C provocou maior inibição do crescimento celular frente às bactérias testadas, tal fato corrobora com os ensaios de eficiência de incorporação, onde foi observado que esta formulação foi capaz de incorporar maior concentração peptídica.

Outrossim, os testes realizados com o ramnolípídeo adicionado de colesterol e/ou fosfatidilcolina mostram que tais lipídeos podem interagir de maneira sinérgica, aumentando a inibição do crescimento celular frente as bactérias testadas. Esse dado ainda não tinha sido reportado na literatura, embora, HABA e colaboradores (2014) já tenham mostrado que a presença da fosfatidilcolina, dependendo de sua concentração no meio, pode alterar o efeito hemolítico do ramnolípídeo e poderia provocar também algumas alterações na sua atividade antimicrobiana.

Os dados também evidenciam que ambas as técnicas de produção de lipossomas (sonicação e extrusão) não provocam diferenças na inibição de crescimento celular.

Os ensaios de crescimento celular também foram realizados para o peptídeo ParELC3W, porém não foram identificadas variações significativas nos resultados, de acordo, portanto com os resultados de inibição na atividade das topoisomerases.

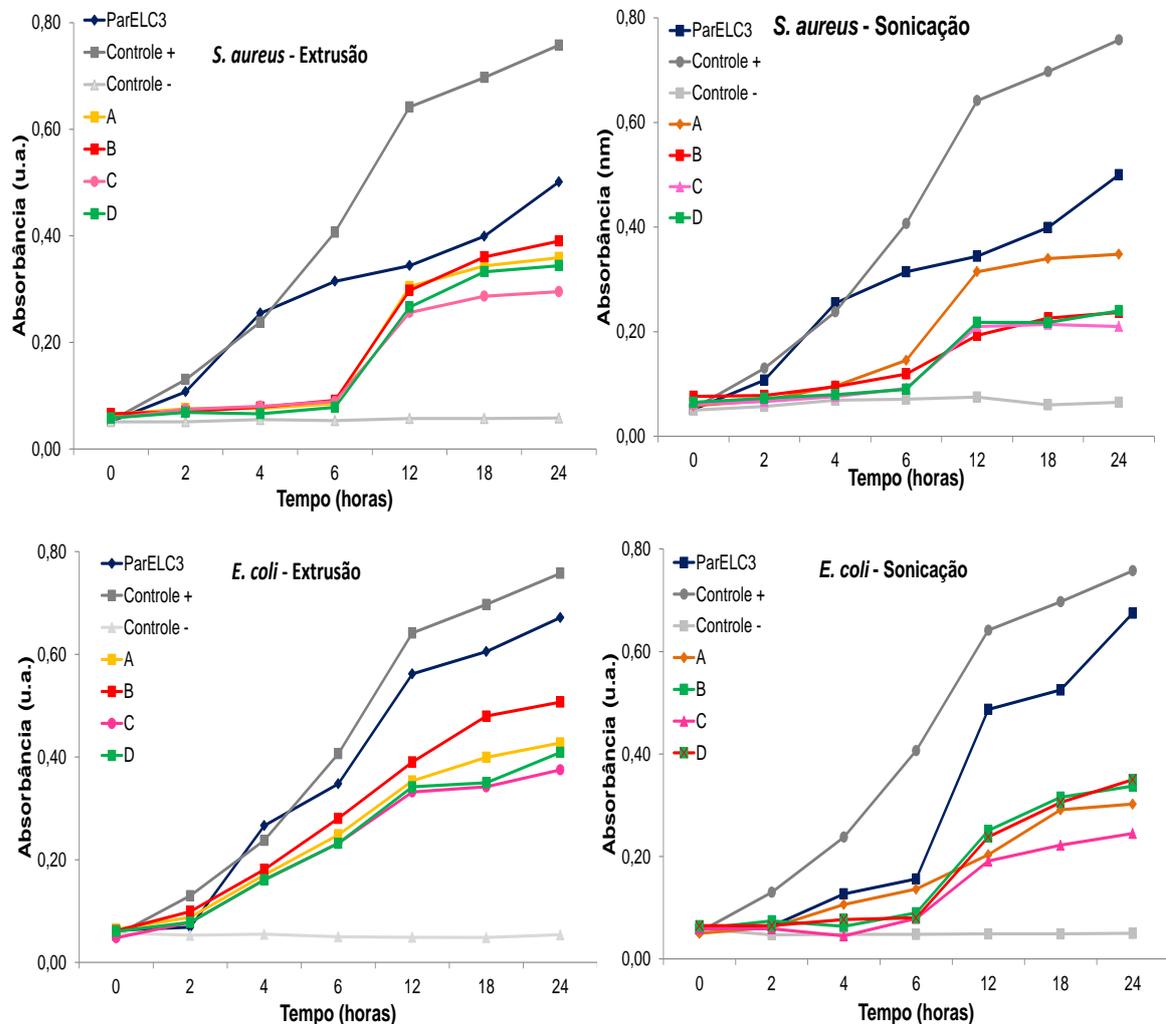
4.9 Ensaio de “*Time Killing*”

Tendo em vista os resultados de inibição de crescimento celular, foi realizado o ensaio “*Time Killing*”, que oferece informações importantes referentes à velocidade de ação dos peptídeos e auxiliam na compreensão do processo de liberação que o sistema de lipossomas estudado pode apresentar. Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita e os resultados foram coerentes com aqueles de crescimento celular, ou seja, a atividade inibitória do peptídeo ParELC3 foi aumentada quando incorporado nos lipossomas. Este fato pode estar atrelado ao aumento de solubilidade, permeação e penetração do peptídeo quando em contato com a membrana plasmática bacteriana.

Como observado na Figura 16, os resultados mostram que a formulação C foi a que mais inibiu o crescimento das bactérias testadas no período avaliado, de maneira que este resultado está de acordo com os resultados do item anterior. Também notou-se que as diferentes técnicas de produção de lipossomas (extrusão ou sonicação) levam a resultados de inibição de crescimento celular semelhantes.

Foi observada certa tendência dos valores das absorbâncias de *S. aureus* permanecerem constantes a partir de 10 horas de experimento, evidenciando um possível efeito bacteriostático para ParELC3 quando encapsulado em lipossomas.

Figura 16 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e extrusão e incorporados com ParELC3 frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* pelo ensaio de "Time Killing". (Controle de crescimento: (+) Meio+suspensão bacteriana; (-) ciprofloxacina ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$))



Fonte: Elaborada pela autora

Já para *E. coli*, esse efeito bacteriostático não foi tão evidente e isso pode ser parcialmente explicado pelo fato da membrana plasmática de *S. aureus* ter uma superfície mais hidrofóbica tornando esse microrganismo mais susceptível à ação de antibióticos hidrofóbicos ou incorporados com uma camada lipídica (SANCHÉZ et al., 2006), evidenciando ainda mais o efeito aditivo da ação antibacteriana do ramnolípídeo presente na bicamada formada e a capacidade inibitória de ParELC3 viabilizada pela permeação dos lipossomas.

Diante de todo o exposto, fica clara a possibilidade de peptídeos derivados de ParE constituírem uma classe importante de moléculas bioativas dentro deste emergente cenário que é o da terapia baseada em proteínas e peptídeos, especialmente quando incorporados em lipossomas constituídos de ramnolipídios que otimizam a permeabilidade celular dos mesmos, a células procarióticas.

Diante dos resultados obtidos nestes estudos, foi possível inferir que não existem diferenças entre as duas técnicas utilizadas para produção dos lipossomas, deste modo, os experimentos posteriores foram realizados apenas com a técnica de sonicação, por ser uma técnica de fácil execução comparada à extrusão e por apresentar facilidade de escalonamento e aplicação na indústria (CHO, et al., 2013).

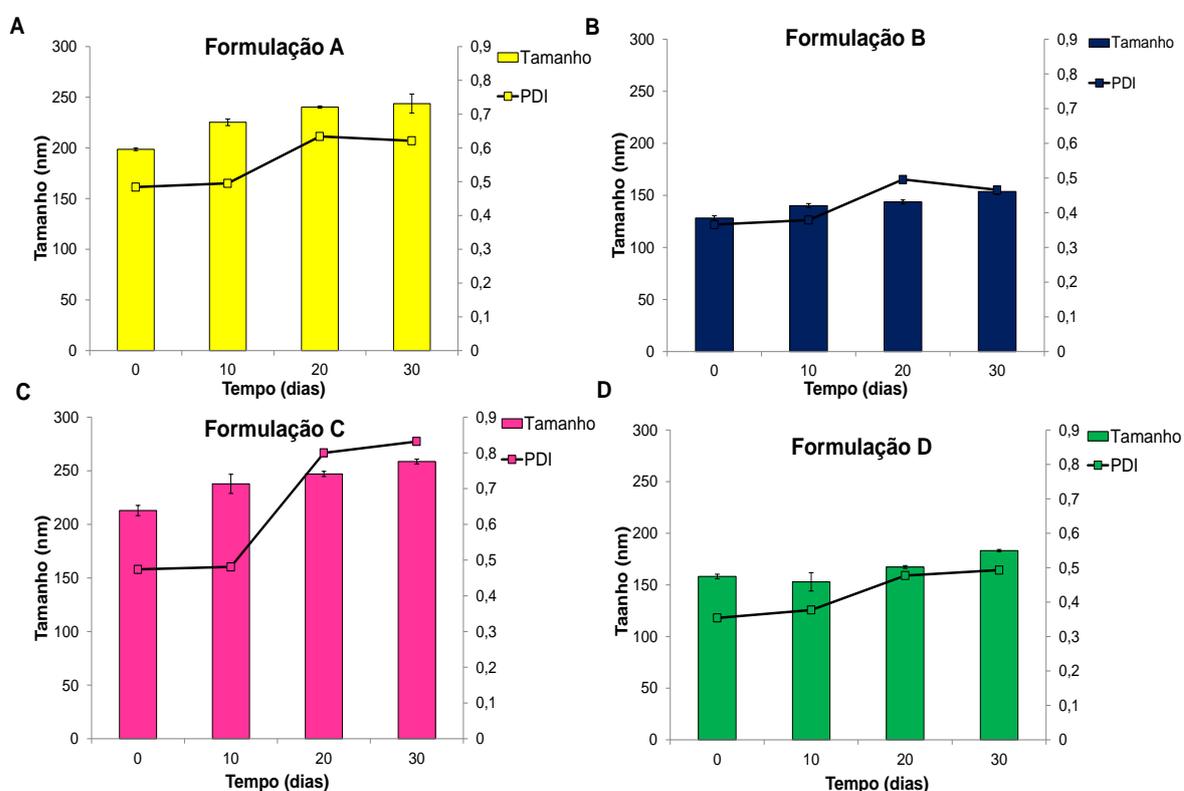
4.10 Estabilidade dos lipossomas

O estudo de estabilidade, via tamanho e polidispersão dos lipossomas é importante pois pode inferir na maneira como as suspensões constituídas por estes lipossomas se comportariam como produto, além de claro, inferir sobre interações entre peptídeo-lipídeo. Associam-se estes parâmetros à estabilidade de sistemas coloidais, já que se acredita que lipossomas que sofrem grande aumento do seu tamanho médio podem estar se agregando. Assim, valores de índice de Polidispersão elevados (acima de 0,7) podem indicar a existência de várias populações de tamanhos diferentes, que compõem a mesma amostra. E ainda, sistemas com mobilidade eletroforética abaixo ou acima da faixa aceitável (30 mV em módulo), podem se aproximar e aglomerar por conta de equilíbrio de cargas, interferindo na estabilidade física e estérica do sistema.

No caso do presente trabalho, todas as formulações lipídicas sofreram aumento de tamanho médio (nm), entre 15 e 25% e de Índice de Polidispersão entre 0,15 e 0,35 em valor real, após 30 dias de experimento. Vale destacar a formulação C como o sistema que sofreu maior aumento no tamanho em função do tempo e, que após 20 dias, foi caracterizado por um IPD elevado; acima de 0,7, caracterizando o sistema como polidisperso (Figura 17). Este resultado poderia ser adverso à literatura, já que a maioria dos autores descrevem que a presença do colesterol pode conferir estabilidade e rigidez à bicamada (GREGORIADIS et al., 1979; SHIN-ICHIRO et al., 2005). Todavia, é importante esclarecer que o colesterol pode estar em dois estados físicos em uma bicamada, dependendo da concentração e proporção

utilizada para sua composição (TAMAI et al., 2008). Ele pode atuar na fase líquida das vesículas conferindo-as rigidez e estabilidade, ou atuar na fase gel, conferindo fluidez e auxiliando na estruturação do material nanométrico. No caso deste trabalho, sabendo que a quantidade utilizada de colesterol foi abaixo do valor médio mais comumente utilizada (25%) é coerente afirmar que o colesterol não foi eficiente em conferir maior estabilidade à formulação testada (GLUKHOV et al., 2005).

Figura 17 - Estabilidade das formulações lipossomais A, B, C e D (tamanho das partículas e polidispersão) durante 30 dias, sob armazenamento em 4°C



Fonte: Elaborada pela autora

É conveniente discorrer que para o presente trabalho também foi testada uma formulação lipídica contendo 10 mmol.L^{-1} de ramnolípídeo e $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de colesterol, contudo, esta formulação teve seus testes, ainda em fase inicial, interrompidos por ser observada a formação de um precipitado lipídico por conta do excesso de material usado para produção de lipossomas. Desta maneira, quando se

trata do aumento de concentração de colesterol para resolver o problema da estabilidade dos lipossomas sugere-se um estudo prolongado e específico para estes componentes, afim de obter um sistema mais eficiente.

De maneira oposta, foi observado que a presença da fosfatidilcolina, dada pelas formulações B e D, conferiu maior estabilidade às lipossomas. Isso pode ser relacionado à reconhecida interação fosfatidilcolina-ramnolípido (HABA et al., 2013), ou seja, a fosfatidilcolina pode se intercalar à bicamada de ramnolípido, conferindo estabilidade à membrana, melhorando sua fluidez e permeabilidade (ELOY, et al., 2016; MOUSSA et al., 2017).

Para completar o teste, foi feito monitoramento da mobilidade eletroforética por Potencial Zeta (PZ), e no caso, todos os valores obtidos, durante todos os dias de experimento foram de $-21 \text{ mV} \pm 3$, o que ajuda a compreender que os sistemas lipossomais não estão se aglomerando, dado que os valores encontrados estão próximos dos ideais para manter o equilíbrio estérico das bicamadas (HONARY; ZAHIR et al., 2013).

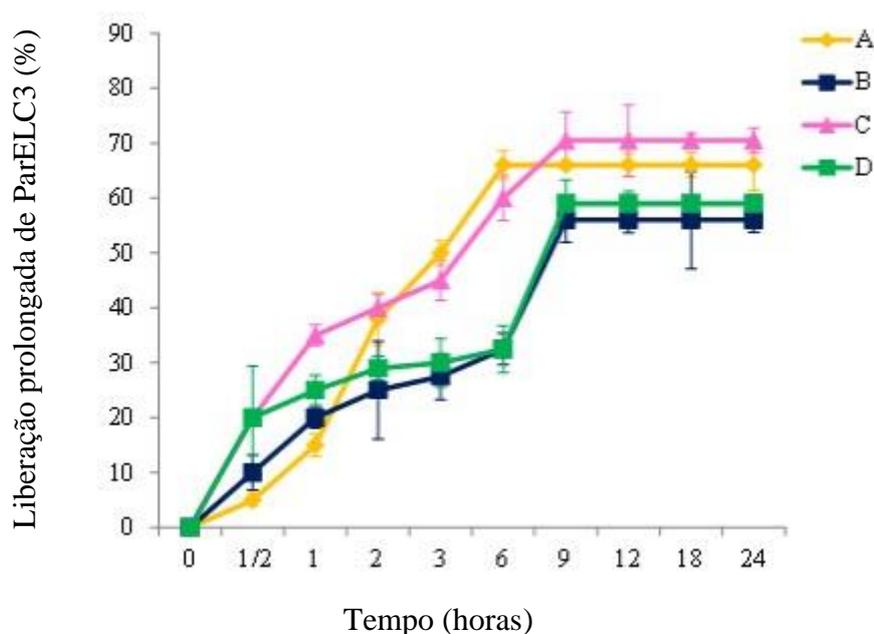
4.11 Ensaio de Liberação Prolongada

A determinação do perfil de liberação de fármacos em sistemas lipossomais é uma técnica adotada para conhecer melhor o sistema trabalhado além de corroborar com os dados de sua caracterização e inferir na performance *in vivo* do produto (ELOY et al., 2017). Em tal sentido, testou-se a liberação do peptídeo ParELC3W nos lipossomas produzidos. Os resultados, apresentados na Figura 18, revelaram que o tempo médio de liberação do peptídeo é de 6-9 horas. Este resultado está próximo daquele obtido por Geraldo e colaboradores onde verificou-se que, em filmes nanosestruturados contendo lipossomas, 9 horas foram necessárias para liberar Ibuprofeno (GERALDO et al., 2008).

Para este experimento foi verificado que os sistemas lipossomais A e C têm a capacidade de liberar maior quantidade de peptídeo em menos tempo e isto pode estar atrelado ao fato de que ambas composições tiveram maior eficiência de incorporação (EI%). Por outro lado, foi visto que a adição de fosfatidilcolina (formulações B e D) resultou uma liberação peptídica mais prolongada. (Figura 17). Isso pode estar relacionado com o fato de que este lipídeo pode intercalar-se de maneira organizada nas vesículas formadas por ramnolípido, melhorando a

estabilidade do peptídeo aprisionado, como demonstrado pelo teste de estabilidade (MOUSSA et al., 2017).

Figura 18 - Liberação prolongada de ParELC3W dos sistemas de formulações A, B, C e D (Tabela 1) conduzidos via sonicação



Fonte: Elaborada pela autora

4.12 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCLV)

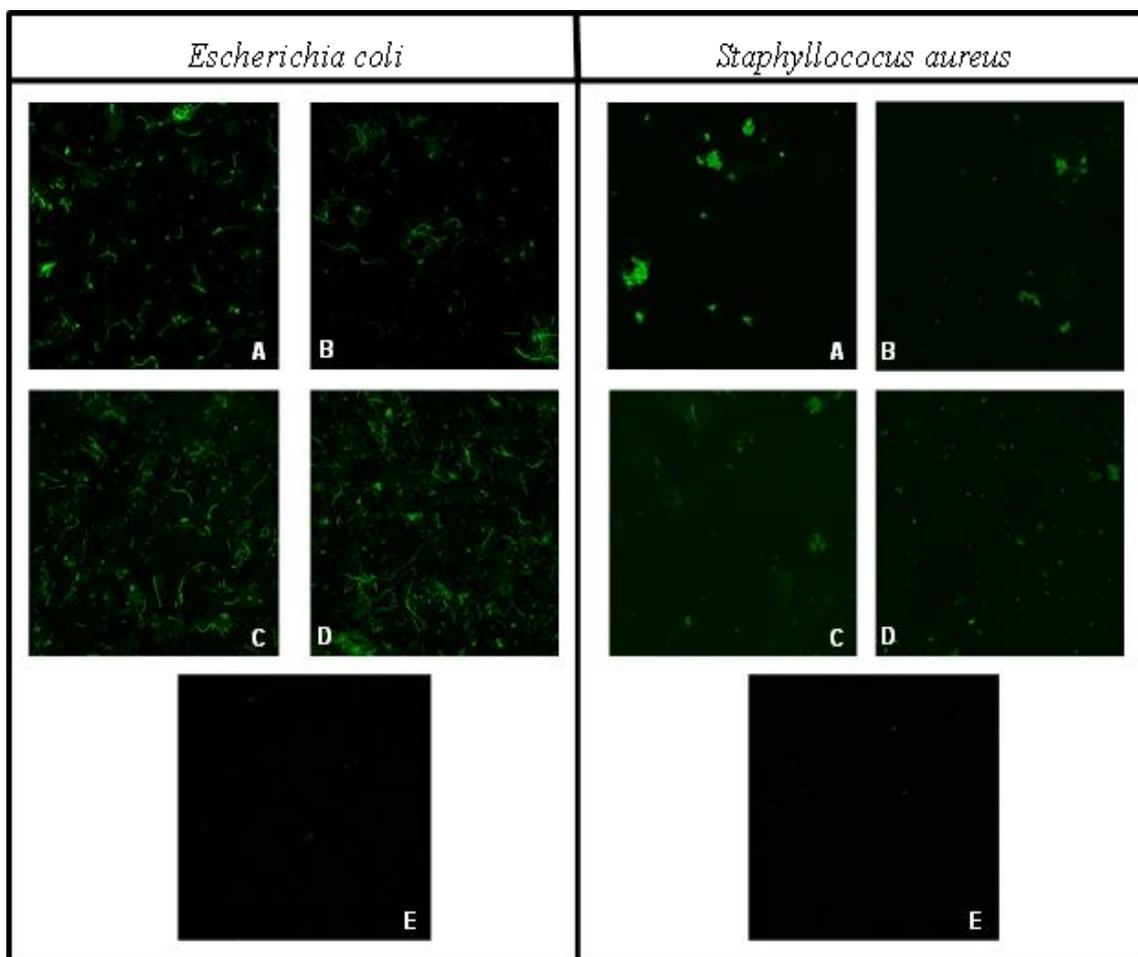
Experimentos de microscopia confocal são interessantes para determinar, de maneira qualitativa a viabilidade celular ou a permeabilidade de um dado material. Assim, quando permeado (em uma célula ou bactéria), o material marcado poderá ser monitorado pelos *lasers* fluorescentes que excitam e absorvem no comprimento de onda previamente programado.

Esta técnica, que é muito comum para análises de cultura de células e fungos, já vem sendo mais empregada para bactérias e através dela foi possível inferir qualitativamente que o peptídeo ParELC3-CF, quando livre, tem baixa permeabilidade pela membrana plasmática bacteriana.

Isso pode ser observado pois a fluorescência emitida pelas bactérias presentes na placa é muito baixa (ou nula), dado pela Figura 19E. É importante

notar que para ambas bactérias o resultado foi semelhante, independente da constituição de sua membrana plasmática, mostrando a dificuldade de permeabilidade que o material sintetizado apresenta, como havia sido descrito por Barbosa em 2012.

Figura 19 - Fotomicrografias analisadas por microscopia confocal frente a *Escherichia coli* O157:H17 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) tratadas com ParELC3-CF incorporado nas formulações de lipossomas A, B, C, D e ParELC3-CF livre (representado pela letra E)



Fonte: Elaborada pela autora

Em contrapartida, quando o mesmo material foi incorporado pelos 4 sistemas lipossomais propostos, as bactérias ficaram fluorescentes, mostrando que estas células tiveram sua membrana plasmática permeada (Figura 19). Em outras

palavras, é possível dizer que o sistema “drug delivery” construído foi eficiente, funcionalizando e aproveitando o potencial biotecnológico do peptídeo.

Outro aspecto observado foi que o sistema composto pela formulação B, para ambas bactérias, mostrou uma intensidade de fluorescência superior às demais. Este fato pode estar relacionado à alta eficiência de incorporação do peptídeo determinada para este sistema lipossomal (item 4.7). Esta afirmação corrobora com os outros dados de caracterização físico-química dos lipossomas, levando a crer que os resultados estão bem coerentes.

4.13 Ensaios de Citotoxicidade

Como previamente descrito, dentre as variadas aplicações e atividades do ramnolipídeos está o efeito bactericida, bacteriostático, fungicida e fungistático. Esta informação já é muito consagrada na literatura, e alguns autores afirmam que a produção deste material pela *Pseudomonas aeruginosa* está atrelada a um mecanismo de defesa controlado por conjuntos de genes dispersos no material genético deste microrganismo (SOBERÓN-CHÁVEZ, et al., 2005); contudo, o mecanismo de ação deste surfactante ainda não é muito bem definido; acredita-se que o ramnolipídeo age desequilibrando a estabilidade da membrana plasmática dos outros organismos (e até mesmo na própria membrana da *Pseudomonas aeruginosa*), promovendo a formação de poros (HABA et al., 2014).

Este possível mecanismo de ação ainda precisa ser mais investigado e é preciso checar outras possibilidades de mecanismos também, contudo, um aspecto negativo deste surfactante seria sua capacidade não seletiva de também causar poros nas membranas dos eritrócitos, tendo um efeito hemolítico que poderia dificultar sua implementação e aplicação oral para fármacos.

Assim, este experimento foi proposto com a intenção de avaliar a atividade citotóxica de lipossomas de ramnolipídeos frente à HepG2 (células de hepatoma humano), dado que ainda não existem experimentos que utilizam este tipo de célula.

Este tipo de célula é um protótipo celular que vem sendo muito utilizado por ter capacidade de reter muitas funções especializadas, as quais normalmente são perdidas em cultura primária de hepatócitos, além de conservarem proteínas essenciais para o metabolismo hepático, tais como enzimas e componentes de fase

I ou II, entre outros (MAJER et al., 2004). Em geral, estas são células cultivadas com facilidade e que são facilmente encontradas em laboratórios de cultura de células.

Segundo Fernandes (2011), o ramnolipídeo pode ser tóxico para as células HepG2 quando em uma concentração superior a 1,5 g/L (2,5 mmol.L⁻¹), com uma viabilidade celular média de aproximadamente 3%. Já para concentrações inferiores, a viabilidade deste tipo de célula é alta. Pouco se sabe a respeito da toxicidade das lipossomas de ramnolipídeos. Os resultados mostram que em uma concentração de ramnolipídeo de 1,3 mmol.L⁻¹ (equivalente a 50 µmol.L⁻¹ de peptídeo), os lipossomas mantiveram as células com 100% de viabilidade (Tabela 13).

Tabela 13 - Avaliação da citotoxicidade das formulações lipídicas A, B, C, D, ParELC3 livre e formulações vazias (LB) frente a células de HepG2

| (µmol.L ⁻¹) | Viabilidade Celular (%) | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | A | B | C | D | LB | ParELC3 |
| 50 | 125 ± 4,8 | 121,8 ± 9,1 | 123,8 ± 9,8 | 115,4 ± 7,6 | 102 ± 3,5 | 111 ± 8,5 |
| 25 | 121,8 ± 3,8 | 119,8 ± 4,0 | 116,6 ± 7,8 | 117,2 ± 3,0 | 101 ± 4,3 | 109 ± 12,6 |
| 12,5 | 105,1 ± 5,3 | 113,9 ± 8,3 | 110,5 ± 3,2 | 104,7 ± 6,8 | 105 ± 3,6 | 100,9 ± 5,9 |
| 6,25 | 99,9 ± 6,5 | 97,4 ± 8,8 | 96,8 ± 5,1 | 96,1 ± 7,6 | 102 ± 7,6 | 98,4 ± 12,4 |

Fonte: Elaborada pela autora

Por se tratar se um peptídeo sintetizado quimicamente e que foi descrito recentemente, não existem artigos que revelam sua toxicidade através de cultura de células, contudo, por se tratar de um peptídeo derivado de uma toxina que tem atividade para células de procaríotos, já era esperado uma baixa toxicidade para células humanas, assim como determinado no experimento.

Além disso, é possível observar que a incorporação do peptídeo ParELC3 nas respectivas formulações não causou diminuição da viabilidade celular.

Apesar dos resultados positivos, sugere-se a realização de testes *in vivo* para avaliação da farmacocinética dos materiais testados, inferindo de maneira mais consistente na toxicidade do ramnolipídeo e do peptídeo ParELC3.

5. CONCLUSÕES

- Os métodos desenvolvidos para a síntese, purificação, análise e caracterização de ParELC3 e seus derivados marcados, foram adequados e permitiram a obtenção dos peptídeos em boas quantidades e qualidade para a execução de todos os experimentos deste trabalho;
- Lipossomas constituídos de ramnolipídeos foram desenvolvidos em diferentes formulações e foram capazes de internalizar eficientemente o peptídeo ParELC3;
- Diferentemente da forma livres, ParELC3 encapsulado em lipossomas de ramnolipídeo mostrou inibição de crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- A liberação do peptídeo ParELC3 foi mais prolongada em lipossomas contendo fosfatidilcolina nas suas formulações;
- A estabilidade dos lipossomas foram em média de 15 a 20 dias, suficiente para testes cumulativos, o que os tornaria susceptíveis à aceitabilidade de indústrias farmacêuticas;
- Lipossomas constituídos majoritariamente de ramnolipídeos, contendo ParELC3 incorporados, não apresentam citotoxicidade;
- O presente trabalho contribui para demonstrar a interação positiva e o efeito sinérgico entre ramnolipídeos e peptídeos inibidores de DNA topoisomerasas;

6. REFERÊNCIAS

- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Mol. Biotechnol.** v. 33, n.3, p. 239-254, 2006.
- BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of colloid and interface science**, v. 479, p. 71-79, 2016.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.
- BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, S. R. R.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, p. 11-17, 2014.
- BARBOSA, L.C.B. **Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara.
- BARBOSA, L.C.B.; GARRIDO, S.S.; GARCIA, A.; DELFINO, D.B.; SANTOS, L.N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 591 -596, 2012.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sc.**, v.43, n.2, p.167-179, 2007.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BREUKINK, E.; VANKRAAIJ, C.; DEMEL, R. A.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. P.; DEKRUIJFF, B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. **Biochemistry**, v. 36, n. 23, p. 6968-6976, 1997.
- BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.
- BUTS, L.; LAH, J.; DAO-THI, M. H.; WYNS, L.; LORIS, R. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 672-679, 2005.
- CEVC, G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. **Clinical Pharmacokinetics**, v.56, n.5, p.675-711, 2004.
- CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1104, p. 226-232, 1992.
- CEVC, G.; SCHATZLEIN, A.; RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1564, p.21-30, 2002.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach**, New York, Oxford University Press, 2000.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

CHO, N.J., HWANG, L.Y., SOLANDT, J.J.R, FRANK, C.W. Comparison of extruded and sonicated vesicles for planar bilayer self-assembly. **Materials**, v. 6, n. 8, p. 3294-3308, 2013.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COUTURIER, M.; BAHASSE, E.M.; MELDEREN, L. V. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 7, 1998.

CUDIC, M.; CONDIE, B.A.; WIENER,D.J.; LYSENKO, E.S.; XIANG, Z.Q.; BULET, P.; OTVOS Jr, L. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. **Peptides**, v.23, p.2071-2083, 2002.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs Today**, v. 34, n. 8, p. 691-698, 1998.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n.5, p.1432-1441, 2006.

EL MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, n.4-5, p.203-222, 2008;

ELOY, J.O., PETRILLI, R., CHESCA, D.L., SAGGIORO, F.P., LEE, R.J., MARCHETTI, J.M. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 159-167, 2017.

ELOY, J. O., PETRILLI, R., TOPAN, J. F., ANTONIO, H. M. R., BARCELLOS, J. P. A., CHESCA, D. L.,...MARCHETTI, J. M. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p.74-82, 2016.

ELOY, J. O.; SOUZA de, M.C.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J.P.A; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345-363, 2014.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspect. Medicine Chemicals**, v. 6, p. 25-64, 2014.

FARKUH, L. **Estudo e desenvolvimento de lipossomas com potencial para aplicação em base cosmética**. 2016. Dissertação(Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos do biossurfactante ramnolipídeo e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O,G,F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim Nova**, v. 3, p. 511-518, 2005.

FU, X.; HUCK, D.; MAKEIN, L.; ARMSTRONG, B.; WILLEN, U.; FREEMAN,T. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. **Particuology**, v. 10, n. 2, p. 203-208, 2012;

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

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.

GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada do Ibuprofeno**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos.

GLUKHOV, E., STARK, M., BURROWS, L. L., CHARLES, M. D. Basis of selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33960-33967, 2005.

GOMES, M.Z.V.G., NITSCHKE, M. Evaluations of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, n. 2, p.441-447, 2012.

GREGORIADIS, G., DAVIS, C. Stability of liposomes *in vivo* and *in vitro* is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 89, n. 4, p. 1287-1293, 1979.

GUDIÑA, E.J., RANGARAJANV., SEN, R., RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n.12, p.667-675, 2013.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HABA, E.; PINAZO, A.; PONS, R.; PÉREZ, L.; MANRESA, A. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 776-783, 2014.

HANCOCK,R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol.** p. 1551- 155, 2006.

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

HELVACI, S. S., PEKER, S., ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, p.225-23, 2004.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochem.** v. 47, p.1207-1219, 2012.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.. 6, p. 148-159, 2001.

HONARY, S., ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v,12, p.265-273, 2013.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. **Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives.** Clinical Infectious Diseases, v. 52, n. suppl 5, p. S 397-S428, 2011.

ISAILOVIĆ, B. D., KOSTIĆ, I.T., ZVONAR, A., DORDEVIC´, V.B., GASPERLIN, M., NEDOVIC´, V.A., BUGARSKI, B.M. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 181-189, 2013.

ISHIGAMI, Y., GAMA, Y., NAGAHORA, H., HONGU, T., YAMAGUCHI, M. (1990). **Rhamnolipid Liposome.** U.S. Patent No. 4,902,512. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

JIANG, Y.; POGLIANO, J.; HELINSKI, D. R.; KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad- host- range plasmid RK2 is na innibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Mol Mibrobiol** v. 44, n.4, p.971-979, 2002.

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

KUUPPO-LEINIKKI, P. Protozoan grazing on planktonic bacteria and its impact on bacterial population. **Marine Ecology Progress Series**, p. 227-238, 1990.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v.34 n.2 1970.

KAPLAN, W.; WIRTZ, V.; MANTEL, A.; STOLK,P.; DUTHEY, B.; LAING, R. **Priority Medicines for Europe and the World** 2013 Update. **Methodology**, v. 2, p. 7, 2013.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, n. 2, p. 393-404, 1990.

KATO, J.I.; SUZUKI, H.; IKEDA, H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.25676-25684, 1992.

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. War on terror cells: killing the host that harbours 'superbugs' is an infection control strategy in our fight against infectious diseases. **Pathology Global Health**, v. 108, n. 1, p. 4-10, 2014.

KUNTSCHE, J.; HORST, J.C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. v. 417, n. 1-2, p. 120-137, 2011.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1987.

LAPINSKI, M. M., CASTRO-FORERO, A., GREINER, A.J., OFOLI, R.Y., BLANCHARD, G.J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. **Langmuir**, v. 23, p. 11667 – 11683, 2007.

LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p. 29-43, 1998.

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, p. 149-16. 2001.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011.

LOVAGLIO, R.B. **Produção de rhamnolipídeos por mutantes de Pseudomonas aeruginosa LBI**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011a.

LORÉNZON, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureínas 1.2 e Magainina 2**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

LOURITH, N., KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v.31, n.4, p.255-261, 2009.

LUEPKE, K.H., SUDA, K.J., BOUCHER, H., RUSSO, R.L., BONNEY, M.W., HUNT, T.D., MOHR, J. F. Past, present and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy**, v. 37, n.1, 2017.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WITK.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in 161 human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p. 153 - 166, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 269 p. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/>>. Acesso em: 2017.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Front. Microbiol.**, v. 3, 2012.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Ups. J. Med. Sci.**, v. 119, n. 2, p. 68-77, 2014.

MARTINS, S., SARMENTO, B., FERREIRA, D. C., & SOUTO, E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n.4, p. 595–607, 2007;

MASUDA, H.; INOUE, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 140, 2017.

MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends In Microbiol.**, v. 5, 1997.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.

MOHAN, A.; MCCLEMENTS, D. J.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: influence of peptide molecular weight. **Food Chemistry**, v. 213, p. 143-148, 2016.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. **Journal of food biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 21-41, 2004.

MOUSSA, Z.; CHEBL, M.; PATRA, D. Interaction of curcumin with 1, 2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline liposomes: Intercalation of rhamnolipids enhances membrane fluidity, permeability and stability of drug molecule. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n149, p.30-37, 2017.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. v. 60, p. 371-380, 2001.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018.

O' NEIL, J. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Rev Antimicrob Resist**, 2014.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat. Chem. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 208-214, 2016.

PALMEIRA, T. F. dos S. **Interacção de uma série homóloga de anfífilas fluorescentes com bicamadas lipídicas na fase líquido ordenado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Avançada e Industrial) – Universidade de Coimbra.

PANDEY, D. P.; GERDES, K. Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 3, 2005.

PENG, H.; MARIANS, K.J. The interaction of Escherichia coli topoisomerase IV with DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.252286-25290, 1995.

PFALLER, M. A., SHEEHAN, D.J., REX. J. H., Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clin. Microbiol. Rev.**, 17, pp. 268–280, 2004.

PIAZZA, R.D. **Modificação da superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicações em liberação de fármaco.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

PORNSUNTHORNTAWEE, O., CHABADEJ, S., RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 6-15, 2009.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Characterization and encapsulation efficiency of rhamnolipid vesicles with cholesterol addition. **Journal of Biosc. and Bioeng.**, v. 112, n. 1, p. 102-106, 2011.

PRADO, A.H., RIGON, R.B., CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação de p-metoxicinamato de octila. **Rev. Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36 Supl. 1., 2015.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, p.871 - 874, 1989.

SANCHÉZ, M.; TERUEL, J.A., ESPUNY, M.J., MARQUÉS, A., ARANDA, F.J., MANRESA, A., ORTIZ, A. Modulation of the physical properties of the laidoylphosphatidylethanolamine membranes by dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chem. Phys. Lipids** 142, 118-127, 2006.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A.B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Química nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHIAVONE, N.; DONINI, M.; NICOLIN, A.; CAPACCIOLLI, S. Antisense; oligonucleotide drug design. **Curr Pharm Des** 10:769–784, 2004.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, p. 83-96, 1994.

SEGURA-GARCÍA, J. M., GAVILANES, J. G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERO, M., VIVARCO, F. **Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica.** Capítulo 2, Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible. Editorial Síntesis. 1999.

SHARMA, A; SHARMA, U S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International journal of pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123-140, 1999.

SHIN-ICHIRO, M., MIZUTANI, Y., KURITA, K., WATANABE, A., AKIYOSHI, K. Changes in the morphology of cell-size liposomes in the presence of cholesterol: formation of neuron-like tubes and liposome networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1669, n. 2, p. 164-169, 2005.

SILVA da, V.L. **Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI SA1 em biorreator**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718-725, 2005.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Quím. Nova**, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. *In*: MERRIFIELD, R. B. (Ed.) **Solid Phase Peptide Synthesis**, New York: Pierce Chemical Company, 2ª Ed., 1984.

TAMAI, N., UEMURA, M., GOTO, G., MATSUKI, H., KANESHIN, S. Lateral phase separation in cholesterol-diheptadecanoylphosphatidylcholine binary bilayer membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.65, p.213-218, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 964 p.

TROVATTI, E.; COTRIM, C. C.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p.5095-5108, 2010.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 665-697, 1985.

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.

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

YAMAGUCHI, Y., INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.9, n.11, p.779-790, 2011.

YEAGLE, P.L. The roles of cholesterol in the biology cells, in: YEAGLE, P.L (Ed), **The structure of biological membrane**, 2ª Edição, CRC Press, Londres, 2005.

ZAMARION, V. **Funcionalização de Nanopartículas Plasmônicas para o Desenvolvimento de Sensores SERS, Anexo: Espalhamento de Luz Dinâmico - Dynamic Light Scattering (DLS)**. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.

ZHOU, Y., HOU, Z., FANG, C., XUE, X., DA, F., WANG, Y., BAI, H., LUO, X. Comparison of microplate and macrodilution methods in time-kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiol**, v. 58, p. 9-16, 2013.

ZUCKER, D., MARCUS, D., BARENHOLZ, Y., GOLDBLUM, A. Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v.139, n.1, p.73-80, 2009.