

Avaliação quantitativa da susceptibilidade do crescimento de *Staphylococcus aureus* na presença de sistemas antimicrobianos de alta complexidade

Saulo S. Garrido¹, Isabelle C. de Oliveira¹, Carolina Reis Zambom¹, Aline B. dos Santos Vaz¹, Reinaldo Marchetto¹, Luiz Carlos Bertucci Barbosa²

Resumo: Peptídeos antimicrobianos (PAMs) encontrados naturalmente em organismos vivos são uma grande promessa para o combate a doenças infecciosas, especialmente provocadas por micro-organismos multirresistentes aos antibióticos comerciais disponíveis no mercado, devido à intensa e inadequada aplicação dessas substâncias. No entanto, algumas características particulares que podem estar presentes em PAMs (tamanho grande, baixa solubilidade, existência de carga efetiva, elevada complexidade estrutural, etc.) representam dificuldade no uso desta classe de substâncias para aplicação clínica. Como uma abordagem para resolver esta barreira técnica para aplicação dos PAMs, diferentes formulações de lipossomas LUV foram preparadas com a intenção de promover a encapsulação de CcdBET2, um PAM com ação comprovada, e promover a sua entrega no ambiente intracelular. CcdBET2 foi sintetizado por metodologia de fase sólida e os lipossomas de 100 nm de diâmetro por extrusão. Os sistemas peptídeo-lipossomas foram testados contra *Staphylococcus aureus* por uma metodologia quantitativa utilizando MTT para testar a sua capacidade em promover a interrupção do crescimento celular. É possível sugerir que o sistema lipossomal é responsável por interagir com a membrana bacteriana permitindo que CcdBET2 exerça sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, lipossomas LUV, *Staphylococcus aureus*

Abstract: Antimicrobial peptides (PAMs) found naturally in living organisms are a great promise for the fight against infectious diseases specially by microorganisms multiresistant to the commercial antibiotics available on the market due to intensive and inadequate applying of those substances. However, some particular characteristics that may be present in PAMs (big size, low solubility, the existence of effective load, high structural complexity, etc.) pose difficulty vis-à-vis the use of this class of substances for clinical application. As an approach to solve this technical barrier to application of PAMs, different formulations of LUV liposomes were prepared with the intent to promote the encapsulation of CcdBET2, a proven PAM, and promote its delivery in the intracellular environment. CcdBET2 was synthesized by solid-phase methodology and the 100 nm liposomes by extrusion. The peptide-liposomes systems were tested against *Staphylococcus aureus* by a quantitative methodology using MTT to test their ability in promote the interruption of cell growth. It is possible

¹ UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Caixa Postal 355, Araraquara 14800-900, São Paulo, Brasil.

² UNIFEI - Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Recursos Naturais, Av. BPS n°1303, Itajubá 37500-903, Minas Gerais, Brasil

to suggest that the liposomal system is responsible to interact with the bacterial membrane allowing CcdBET2 to exert its antimicrobial activity.

Keywords: Antimicrobial peptides, LUV liposomes, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

O combate a doenças infecciosas vem sendo o objetivo de muitos estudos atuais já que as mesmas estão entre as principais causas de morte da população humana. Este fato ocorre, em grande parte, pelo surgimento de micro-organismos multiresistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, devido a uma combinação de fatores que incluem mutações em genes de resistência comuns, troca de informações genéticas entre micro-organismos, seletividade de espécies multiresistentes em ambiente hospitalar facilitando a propagação desses micro-organismos, bem como a incapacidade de técnicas laboratoriais para detectar fenótipos de resistência emergentes(1).

Apesar da frequência cada vez maior e da gravidade da resistência antimicrobiana, grandes empresas farmacêuticas vêm perdendo o interesse no investimento para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos(2). Neste sentido, é de extrema necessidade pesquisas que visam a busca por novas substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos aos agentes antimicrobianos comerciais.

As etapas de desenvolvimento de um quimioterápico antimicrobiano envolvem desde a definição de um alvo celular que é um componente celular que, quando sob efeito deste fármaco, irá resultar na interrupção do desenvolvimento celular ou mesmo na morte celular, até estudos de design molecular, os quais são de fundamental importância para que o fármaco apresente a melhor interação possível com seu alvo celular(3).

Muitos produtos de origem natural ou mesmo com estrutura química derivada de produtos naturais vêm apresentando bastante destaque como agentes antimicrobianos mais eficientes quando comparados aos fármacos comerciais, principalmente no que se refere ao combate de espécies de micro-organismos que adquiriram multiresistência a esses fármacos(4).

Esta característica deve-se principalmente ao mecanismo altamente específico que estes compostos apresentam em relação à interação com seus alvos celulares, possibilitando caminhos alternativos de combate a esses micro-organismos.

Dentre a grande variedade de produtos naturais, alguns peptídeos antimicrobianos (PAMs) com ação tóxica a diferentes espécies bacterianas, vêm sendo amplamente estudados como potenciais agentes antimicrobianos. PAMs produzidos por plantas, animais e micro-organismos estão sendo utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos com aplicações na área da saúde humana e animal(5).

As toxinas intracelulares como CcdB, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PSK) em bactérias, constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica associada a antibióticos de origem natural com potencial considerável. Estas toxinas exercem sua função sobre um grupo alvo de enzimas denominadas DNA topoisomerases(6).

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo derivados peptídicos baseados na estrutura primária da toxina CcdB (Fig. 1a), os quais apresentam atividade inibitória potencializada em DNA topoisomerases bacterianas como a DNA girase e a Topoisomerase IV(7). Por outro lado, esses análogos não são capazes de inibir a ação de DNA topoisomerases humanas como a Topoisomerase II- α e Topoisomerase I. Esta característica é essencial para um agente farmacológico específico ao combate bacteriano sem provocar efeitos colaterais em células humanas.

Para avaliar a eficácia dos PAMs derivados da toxina CcdB, ensaios de susceptibilidade de crescimento microbiano em meio líquido são realizados na presença desses compostos. No entanto, para que esses peptídeos consigam acessar o ambiente intracelular, onde encontram-se as enzimas alvo DNA topoisomerases, é necessário a associá-los a sistemas de liberação lipossomais, já que os mesmos são incapazes de permear as membranas celulares quando livres em solução(8). Neste trabalho os peptídeos

foram encapsulados em lipossomas do tipo LUV(9) (large unilamellar vesicles) com diâmetro médio de 100 nm. Sendo assim, o sistema a ser testado é uma associação de característica bastante complexa envolvendo a molécula peptídica e os componentes lipídicos variados utilizados para o preparo dos lipossomas. Esta alta complexidade estrutural do agente antimicrobiano, dificulta a escolha de uma metodologia confiável para avaliação do potencial de inibição de crescimento bacteriano.

Os métodos desenvolvidos para investigações in vitro da presença de células viáveis de microrganismos, utilizados para confirmar a atividade antimicrobiana de determinadas moléculas e/ou sistemas, tem provocado uma preocupação principalmente com relação à confiabilidade, reprodutibilidade e validade dos dados.

Em estudos da atividade antimicrobiana in vitro de plantas do semiárido sobre espécies do gênero de Streptococcus e Candida, foi utilizado o corante de Rezasurina em ensaios para confirmar a presença de células viáveis. Este composto cora as células viáveis de vermelho, sendo possível fazer uma diferenciação qualitativa das células mortas que permanecem azuis, como a cor do corante. No entanto, este é um exemplo de um método "tudo ou nada", já que não permite identificar e, principalmente quantificar uma mistura de células inviáveis com viáveis por ser um teste unicamente visual.

O corante 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio, o qual reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular microbiana, foi utilizado para a confirmação da presença de células viáveis de Candida spp após tratamento in vitro com óleo essencial de Eucalyptus globulus(10). A hidrogenação do 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusa, o trifênil formazan. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm a sua cor. A desvantagem deste método é quantificar as células viáveis, já que as mesmas estariam misturadas com as mortas em quantidades variáveis.

Ensaio colorimétrico de XTT (2 methoxy 4 nitro 5 sulfophenyl 5 phenylamino carbonyl 2H tetrazolium

hydroxide), foi utilizado para avaliar biofilmes mistos de várias espécies do gênero Candida associados à lipopolissacarídeos (LPS) extraídos de bactérias Gram-negativas (Escherichia coli)(11). O método XTT mede a atividade mitocondrial, por meio da redução intracelular do sal formando um composto denominado formazan, que pode ser quantificado pela alteração de cor para laranja(12).

Assim, nesta pesquisa buscou-se minimizar tais problemas a partir da escolha de um método para determinação da viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Este composto é reduzido pelo efeito da atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, formando cristais insolúveis de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, que pode ser quantificada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional ao número de células viáveis, já que as mesmas apresentam ativo tal atividade metabólica. Além disso, essa quantificação de células viáveis não sofre interferência alguma das células mortas, já que o composto a ser quantificado é um sal insolúvel ao meio aquoso que se forma indiretamente em solução devido a ação metabólica das células viáveis. No final do processo, todas as células e outros interferentes do meio são separados e descartados para não interferirem na quantificação do formazan.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Material e reagentes

Reagentes gerais e solventes

Foram utilizados N- α -Fluorenilmetiloxycarbonil-aminoácidos (Fmoc-aminoácido), Fmoc-Ile-Wang resina, com grau de substituição inicial de 0,69 mmol/g, N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) da Novabiochem®; N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), Diclorometano (DCM), Dimetilformamida (DMF) e ácido trifluoracético (TFA) da Fluka®; Etanoditiol (EDT), Novobiocina (N1628), Ciprofloxacina e MTT da Sigma®; tioanisol e fenol da Acros®; ácido acético glacial, anidrido acético, diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO),

hexafluoroisopropanol, N-metilpirrolidona (NMP) e acetonitrila (ACN) grau HPLC da Merck®.

Material biológico

A cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) foi obtida do Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) por meio de doação para a Unidade de Síntese, Estudos e Aplicações de Peptídeos e Proteínas.

Métodos

Síntese e purificação

O peptídeo utilizado neste estudo foi o mimético da toxina CcdB denominados CcdBET2(7) (Fig. 1b), o qual foi sintetizado manualmente pelo método de síntese em fase sólida(13) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) como protetor base-lábil dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-bu)

para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina de partida foi uma resina de Wang com grau de substituição inicial de 0,69 mmol.g⁻¹, já contendo o primeiro aminoácido da sequência (isoleucina - Ile) previamente incorporado. Durante os acoplamentos dos aminoácidos subsequentes, utilizou-se Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes, em relação a quantidade inicial de resina, tanto para Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, aplicando-se inicialmente como solvente, uma mistura de DCM/DMF 1:1, v/v, por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos α -amino (remoção da base lábil Fmoc), após o acoplamento de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução 20% de piperidina em DMF.

A)



B)

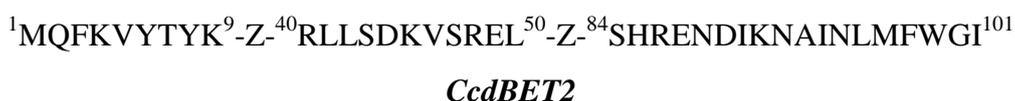


Figura I. Estrutura primária da toxina natural CcdB e do análogo peptídico **CcdBET2** sintetizado quimicamente pela metodologia da fase sólida.

A eficiência das etapas de acoplamento de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina(14) e, quando positivo (presença de amino grupos livres), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e DIEA (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos. A etapa final da síntese dos peptídeos foi a clivagem de cada peptídeo da resina concomitante com a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais. Para esta etapa foi utilizada uma solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e tri-isopropilsilano (0,5%). A quantidade solução de

clivagem utilizada seguiu um padrão de 2 mL para cada 100 mg de peptidil-resina a ser clivada. A reação de clivagem foi realizada a 25 °C durante 3 h. Os peptídeos pós-clivagem foram precipitados com éter dietílico gelado (0 °C) e centrifugados, eliminando o conteúdo sobrenadante. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. Em seguida, dissolveu-se os peptídeos em solução aquosa de ácido acético 10%, realizando posteriormente uma filtração para remoção da resina. Por fim, a solução resultante contendo os peptídeos pós-clivagem foram liofilizados e posteriormente pesados obtendo-se um rendimento em massa entre 80 e 90%.

A purificação do peptídeo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa em um cromatógrafo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; diâmetro de partícula 15 µm; porosidade 300 Å) com um gradiente de 20 a 50% de solvente B (A: água, 0,045 % TFA; B: acetonitrila, 0,036 % TFA) em 120 min. O fluxo foi de 4,0 mL.min⁻¹, com detecção em UV a 220 nm. Análises das frações foram feitas em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT operando em escala analítica, empregando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; diâmetro de partícula 5 µm; porosidade 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.

A caracterização do peptídeo foi realizada por espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo positivo (ESIMS+) por injeção direta das frações puras em um espectrômetro de massas Ion Trap Amazon SL - Brucker®.

Encapsulação dos peptídeos em lipossomas tipo SUV e caracterização física dos lipossomas

Os lipossomas do tipo SUV (small unilamellar vesicles) apresentando diâmetros próximos a 100 nm foram sintetizados através da metodologia de extrusão- evaporação(15). As formulações propostas foram: 1) DPPC:Chol:SA (10:2:1); 2) DPPC:Chol:PEG (10:2:1); 3) DPPC:Chol:POPG (10:2:1); 4) DPPC:SA (10:1), onde DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina de soja; Chol: colesterol; SA: estearilamina; PEG: polietilenoglicol; POPG:1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol) cujas quantidades estão expressas como uma proporção molar. Basicamente, as misturas de lipídeos correspondentes a cada uma das formulações, foram dissolvidas em clorofórmio em tubo de vidro. O solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, para possibilitar a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o excesso de solvente foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 h.

Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4 contendo o peptídeo em concentrações de 100 µM.

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

A quantidade de ciclos de extrusão foi fixada a partir de protocolos previamente desenvolvidos, onde foi feito um acompanhamento do diâmetro dos lipossomas por espalhamento de luz obtido pelo equipamento Beckman Coulter (modelo N5), sendo as amostras previamente diluídas de modo a se obter um índice de polidispersão adequado (entre 104 e 106). A luz espalhada foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe de laser que aumentou o sinal captado e o enviou para um sistema correlator de onde os dados gerados foram para um computador. A temperatura foi mantida a 25°C e o comprimento de onda do laser foi de 520 nm. Nestas condições, o tamanho médio de 100 nm dos lipossomas era obtido após 30 ciclos de extrusão, mantendo-se constante mesmo após 60 ciclos.

Em seguida, análise de distribuição de tamanho e determinação do diâmetro médio dos lipossomas, contendo ou não o peptídeo encapsulado, foi realizada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering), a qual fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, calculado pela equação de Einstein-Stokes. O cálculo é obtido pela equação de Einstein-Stokes: $D = Kt / 6 \pi \eta R_h$, onde K é a constante de Boltzmann, t a temperatura absoluta, η a viscosidade e R_h o raio hidrodinâmico. Esta técnica consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada em sinal que é enviado ao correlator no qual é feito o processamento dos dados, que são processados em um software fornecendo os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão(16).

Ensaio de Viabilidade Celular

Os ensaios foram realizados utilizando bactérias gram positiva *Staphylococcus aureus* - ATCC 14458 como modelo experimental quantitativo para o método proposto.

Para o início do procedimento, foi reservado em um tubo de ensaio estéril, 7 mL de meio de cultura líquido (Mueller Hinton 22 g.L⁻¹ – Biolog MHB 10608). Com uma alça de platina flambada e resfriada à temperatura ambiente, foi dissolvido nos 7 mL de meio de cultura uma pequena alíquota de bactérias (repique recente - 24 horas). Tal alíquota foi coletada de uma cultura realizada em meio sólido (Agar bacteriológico - Acumedia®). Após o meio turvo, a absorbância foi medida num espectrofotômetro Kasuaki (Modelo IL-227) utilizando comprimento de onda de 600 nm (DO600nm). A absorbância inicial obtida estava sempre dentro do intervalo de 0,1 - 0,18 unidades de absorbância (AU)(17), indicando a presença de aproximadamente 1,5.10⁸ UFC.mL⁻¹. Como branco foi utilizado 1 mL de meio de cultura livre de suspensão bacteriana.

A suspensão bacteriana foi transferida para micro tubos de centrífuga para a realização do ensaio. Para as amostras de controle negativo de crescimento, o antibiótico Novobiocina e Ciprofloxacina foram utilizados numa concentração de 100 µM. Em seguida à adição dos compostos, as amostras foram colocadas em uma estufa com temperatura e agitação controladas (54 rpm/37 °C) por um período de 3 horas.

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas lipossomais contendo o peptídeo encapsulado, utilizamos a reação de redução do composto MTT e formação dos cristais de formazan. Para isto, 20 µL de uma solução de MTT 5,0 mg.mL⁻¹ foram adicionados em cada micro tubo. As amostras foram novamente colocadas na estufa, com a mesma agitação e temperatura por 15 minutos. Ao término de incubação, os micro tubos foram centrifugados à 10.000 rpm por 30 segundos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os cristais foram ressuspensos com 500 µL de DMSO e agitados manualmente até a dissolução completa dos cristais. A suspensão foi transferida para tubos de ensaio estéreis e em cada tubo foi adicionado mais 2000 µL de DMSO, obtendo-se um volume final de 2500 µL. Para

que houvesse a dissolução completa dos cristais de formazan, foi necessário deixar a suspensão reagindo durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Ao término da reação, foi feita a leitura das absorbâncias a 550 nm das suspensões de cada tubo de ensaio em espectrofotômetro utilizando DMSO como branco.

Plaqueamento Diferencial e Contagem de Células Viáveis:

Após cada ensaio de viabilidade celular, foram realizados estudos de plaqueamento diferencial e contagem do número de colônias viáveis das espécies bacterianas testadas. Para estes estudos, uma amostra de 0,5 mL da solução do sobrenadante de cada eppendorf foi retirado, assepticamente, e colocados em 19,5 mL de água esterilizada peptonada a 0,1%. Em seguida a solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho de gelo. Para a contagem de células viáveis, inoculou-se 1 mL da solução em placas de petri estéreis contendo ágar padrão Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após o período de incubação, foi feita a contagem das colônias típicas (18).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento da síntese do peptídeo CcdBET2

Para a síntese do peptídeo CcdBET2 partiu-se de 1,0 g de uma resina Fmoc-Ile-Wang (0,69 mmol/g) e DIC/HOBt como agentes de condensação para o acoplamento dos resíduos de cada aminoácido da sequência primária. Após desproteção do grupo Fmoc do primeiro aminoácido (Ile), já acoplado na resina de partida, iniciou-se o acoplamento dos demais, seguindo sempre os passos de lavagens e desproteções, conforme descrito na parte experimental. Ao final da síntese, obteve-se aproximadamente 3,0 g de peptidil resina. Apenas parte dessa massa (900 mg) foi submetida ao procedimento de clivagem, obtendo-se 367 mg de peptídeo no estado bruto. Do extrato bruto do peptídeo liofilizado, 50 mg foi dissolvido em 5,0 mL de solvente A (água ultrapura + TFA 0,036%) e submetida a purificação conforme descrito na parte experimental. No final do processo de purificação foi

obtido 6 mg de CcdBET2 com grau de pureza de 95%, representando um rendimento de 12% no processo de purificação. A massa molar teórica do peptídeo (4871,8 g/mol) foi confirmada por espectrometria de massas com ionização por electrospray em modo positivo (ESIMS+): $m/z (M + 4H)^+ = 1219$.

A barreira terapêutica do análogo estrutural da toxina natural CcdB

O peptídeo CcdBET2 é um análogo estrutural da toxina CcdB, o qual é constituído da sequência N-terminal contendo nove resíduos de aminoácidos (Met-1 a Lys-9), além da região C-terminal que corresponde à sequência que vai do resíduo de Ser-84 a Ile-101, importante por estruturar-se como a única região em α -hélice da toxina nativa e por conter os resíduos Trp-99, Gly-100 e Ile-101, os quais são importantes para a interação dos peptídeos com a DNA gyrase(19). Na região central o peptídeo possui a região Arg-40 a Leu-50, conhecida como região de reconhecimento da antitoxina CcdA(20). Para conectar cada uma das regiões, foi utilizado ϵ -amino hexanóico (Z) como espaçador.

Estudos demonstraram a habilidade desse peptídeo na inibição da ação das enzimas bacterianas DNA girase e Topoisomerase IV em concentrações de 10 μ M e 5 μ M, respectivamente(7). No entanto, ao aplicar este peptídeo em ensaios de viabilidade celular utilizando diferente espécies bacterianas, não foi observado efeito antibiótico associado a este composto quando livre em solução (dados não mostrados). Por se tratar de um análogo que apresentou excelentes resultados de inibição da atividade enzimática, principalmente em relação à inibição da Topoisomerase IV, esperava-se que a inibição ocorresse também em ensaios de crescimento bacteriano, o que não ocorreu mesmo utilizando elevadas concentrações do peptídeo (100 μ M).

Esta ausência de atividade pode ser atribuída a características particulares de alguns peptídeos antimicrobianos como: tamanho, baixa solubilidade, existência de carga efetiva, alta complexidade estrutural, entre outras, gerando uma série de dificuldades de aplicação terapêutica relacionada a estes compostos. Certamente no caso do peptídeo

CcdBET2, as características estruturais e físico-químicas do mesmo dificultam ou até mesmo impossibilitam a penetração do mesmo ao meio intracelular bacteriano, onde se localizam seus alvos celulares.

Diante deste contexto, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos que visam encontrar métodos, sistemas ou mecanismos que sejam suficientemente adequados e eficientes para estabilizar moléculas peptídicas em solução e promover a acessibilidade dessas moléculas ao meio intracelular e, conseqüentemente, aos seus respectivos alvos como as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV. Dentre esses métodos, os lipossomas do tipo LUV de 100 nm de diâmetro médio vêm demonstrando resultados bastante promissores(21), inclusive quando associados ao peptídeo CcdBET2.

Caracterização física dos sistemas lipossomais contendo o peptídeo CcdBET2

Para cada formulação, foi feito um estudo de caracterização, utilizando lipossoma branco e lipossoma com o peptídeo CcdBET2 encapsulado, com o intuito de avaliar se o diâmetro da vesícula lipossomal sofreria alteração após a encapsulação dos peptídeos.

Os estudos de caracterização das diferentes formulações de lipossomas desenvolvidas neste trabalho foram realizados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering) conforme descrito na parte experimental.

Para todas as formulações de lipossomas preparadas, foi possível observar o mesmo comportamento com um aumento médio de 20% no tamanho dos lipossomas na presença do peptídeo, sugerindo que o peptídeo realmente foi compartimentalizado durante o processo de extrusão. Acredita-se ainda que a velocidade no processo de extrusão e o número de ciclos de extrusão são fatores que podem influenciar no tamanho final da partícula. Nesse sentido, nosso protocolo de preparo dos lipossomas utiliza 40 ciclos de extrusão de maneira lenta e contínua.

Ensaio de viabilidade celular e contagem de células viáveis

Os ensaios de viabilidade foram realizados conforme metodologia desenvolvida, a qual utiliza o sal MTT que irá funcionar como um revelador indireto do ensaio. Este sal de coloração amarela quando dissolvido em solução aquosa, possui a capacidade de sofrer redução, quando em contato com células vivas, as quais estão consumindo o oxigênio do meio para realizar suas atividades metabólicas. Desse modo o MTT ao ser reduzido, produz um sal de coloração púrpura, insolúvel ao meio aquoso, o qual se deposita no fundo do recipiente, no caso deste teste, no tubo do tipo eppendorf. Esses cristais são separados do sobrenadante por centrifugação e, em seguida dissolvidos utilizando DMSO. A absorbância da solução resultante é então lida em espectrofotometro de UV-visível a absorbância de 550 nm, obtendo diferentes valores dependendo da quantidade de cristais produzidos, o que está diretamente relacionado com a viabilidade celular. Os valores são comparados aos controles positivo e negativo de crescimento celular, o último contendo um antibiótico convencional (Novobiocina ou Ciprofloxacina).

Os ensaios com cada um dos sistemas produzidos foram feitos em triplicata, e a média das absorbâncias para cada grupo foi plotada, levando em consideração o desvio padrão, afim de facilitar a observação da inibição de crescimento bacteriano frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* - ATCC 14458 (Fig. 2).

Houve inibição de crescimento relevante a partir da adição de 50 µL de solução lipossomal contendo o peptídeo encapsulado, indicando que o sistema peptídeo-lipossoma é eficaz para causar a morte dessa espécie bacteriana. As melhores formulações que promoveram o controle de crescimento desta espécie bacteriana foram as formulações neutra e positiva com colesterol.

É importante destacar nos resultados mostrados a incapacidade do peptídeo livre em solução, isto é, não encapsulado em lipossoma, em inibir o crescimento dessa espécie bacteriana. O mesmo pode ser observado com as formulações lipossomais estudadas

na ausência do peptídeo encapsulado (lipossoma branco). Isto é mais um indicativo de que os sistemas lipossomais são responsáveis por promover o carregamento do peptídeo para o meio intracelular.

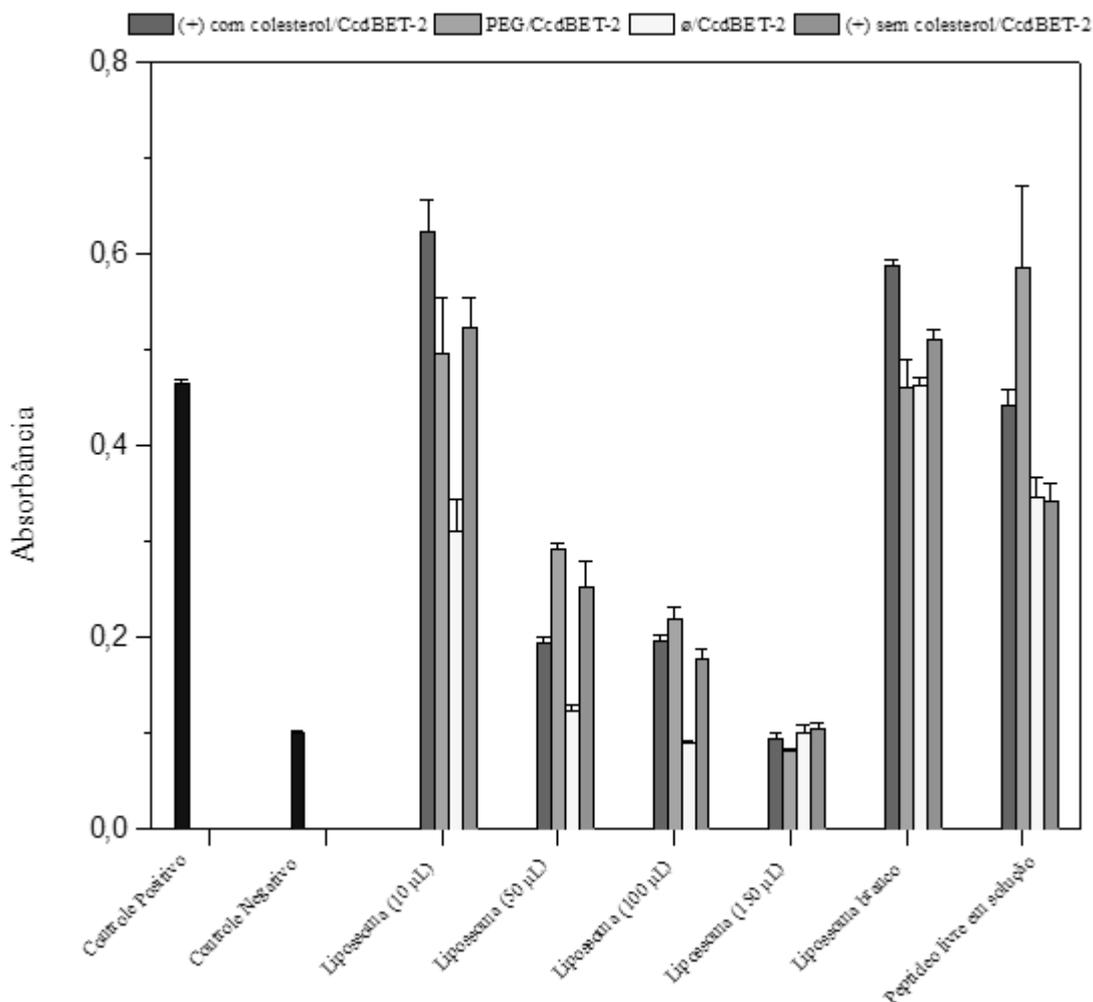


Figura 2. Ensaio de viabilidade de crescimento celular com e sem os sistemas lipossomais. Os controles positivo e negativo de crescimento de *Staphylococcus aureus* são mostrados nas barras azuis. Cada barra colorida representa um tipo diferente de formulação de lipossoma SUV (100 nm) conforme legenda. Cada conjunto de barras representa a adição de volumes variados de lipossoma (10, 50, 100 e 150 µL) contendo o peptídeo CcdBET2 encapsulada na concentração 100 µM; adição de 100 µL de lipossoma branco (ausência de peptídeo encapsulado); adição de peptídeo livre em solução na concentração 100 µM.

CONCLUSÕES

Os sistemas peptídeo-lipossomas testados neste trabalho são eficazes contra a espécie bacteriana Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a qual se caracteriza por apresentar uma membrana externa que serve como barreira seletiva para a entrada e saída de alguns componentes. No entanto, foi demonstrado que os sistemas lipossomais podem interagir com esta membrana promovendo o carreamento do peptídeo para o meio intracelular. Todas as formulações testadas diminuíram a quantidade de células inicial, sendo destacada a formulação neutra que apresentou

inibição acima de 80% com adição de 100 µL de formulação.

Para a formulação de lipossoma que contem PEG (Polietilenoglicol), observou-se que com adição de 150 µL de formulação, houve inibição total do crescimento bacteriano. Este resultado é bastante surpreendente já que a presença de PEG confere maior estabilidade ao sistema lipossomal, podendo auxiliar para uma possível aplicação em estudos *in vivo*.

Os ensaios de caracterização de lipossomas, indica que as vesículas sofrem um aumento do tamanho do diâmetro médio na ordem de 20% após a encapsulação do peptídeo, o que é uma evidência da

eficácia desses sistemas na associação com peptídeos antimicrobianos. Neste trabalho, o aumento relativo no tamanho dos lipossomas não interferiu a eficiência dos sistemas lipossomas-peptídeo nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano.

Os ensaios com lipossomas na ausência do peptídeo CcdBET2 (lipossoma branco) de todas as formulações mostraram que os mesmos não são capazes de inibir o crescimento bacteriano, indicando que de fato, o que provoca a inibição é o peptídeo. Este mesmo comportamento foi observado nos ensaios realizados com o peptídeo livre em solução, mostrando que sem estar associado aos lipossomas,

não possui capacidade de inibir o crescimento bacteriano.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela FAPESP na forma de auxílio regular à pesquisa (Processo 2013/19370-2), bolsas de IC (Processo 2012/23576-2 – C. R. Zambom) e Mestrado (Processo 2012/20342-0 – I. C. Oliveira) e pela CAPES na forma de bolsa de Doutorado (A. B. S. Vaz).

REFERÊNCIAS

- [1] Tenover, F. C. *Clinical Infectious Diseases*, **2001**; 33 (Suppl 3); 108.
- [2] Talbot, G. H.; Bradley, J.; Edwards, J. E.; Jr., D. G.; Scheld, M.; Bartlett, J. G; *Clinical Infectious Diseases*, **2006**; 42; 657.
- [3] Barbosa, L. C. B.; Garrido, S. S.; Garcia, A.; Delfino, D. B.; Gonçalves, R. D.; Marchetto, R.; *Bioinformation*. **2010**, 5(2), 46.
- [4] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311.
- [5] Reece, R.; Maxwell, A.; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, 26, 335.
- [6] Barbosa, L. C. B.; Cangussu, A. S. R.; Garrido, S. S.; Marchetto, R. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, 13(1), 11.
- [7] Trovatti, E.; Cotrim, C.; Garrido, S. S.; Barros, R. S.; Marchetto, R.; *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18(23), 6161.
- [8] Perche, F.; Torchilin, V. P.; *Journal of Drug Delivery*, **2013**, ID705265, 32p.; Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science*. **2004**, 303, 1818.
- [9] Allen, T. M.; Cullis, P. R.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, 65, 36.
- [10] Castro, R. D.; Lima, E. O.; *Rev Odontol UNESP*. **2010**; 39(3), 179.
- [11] Bandara, H. M. H. N.; Lam, O. L. T.; Watt, R. M.; Jin, L. J.; Samaranayake, L.P. *J Med Microbiol.*, **2010**, 59, 1225.
- [12] Silva, W. J.; Seneviratne, J.; Parahitayawa, N.; Rosa, E. A. R.; Samaranayake; L. P.; Del Bel Cury, A. A.; *Braz Dent J*. **2008**, 19, 364.
- [13] Stewart, J. M.; Young, J. D. Em *Merrifield, R. B. (Ed.). Solid phase Peptide Synthesis*. 2nd ed., Pierce Chemical Company: New York, 1984; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; Em *Chemical approaches to the synthesis of peptides proteins*. CRC: Boca Raton, 1997; Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Subra, G.; *Methods Mol Biol*. **2005**, 228, 3.
- [14] Kaiser, E.; Colescot, T. L.; Bossinge, C. D.; Cook, P. I.; *Anal. Bioch.*, **1970**, 34(2), 595.

- [15] Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B.; *Quim. Nova*, **2002**, 25(6B), 1181.
- [16] Chorilli, M.; Rimário, T. C.; Oliveira, A. G.; Scarpa, M.V.; *Latin American Journal Pharmacy*, **2007**, 26(5), 715.
- [17] Wang, H.; Cheng, H.; Wang, F.; Wei, D.; Wang, X.; *Journal of microbiological Methods*, 2010, 82, 330.
- [18] Kornacki, J. L.; Johnson, J. L. Em Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods; K. Ito (ed), 4th ed., Public Health Association: Washington, 2001, ch8.
- [19] Cotrim, C. A.; Garrido, S. S.; Trovatti, E.; Marchetto, R. *Quim. Nova*, **2010**, 33(4), 841.
- [20] van Melderen, L.; Dao-Thi, M.-H.; Lecchi, P.; Gottesmani, S.; Couturier, M.; Maurizi, M. R.; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 27730.
- [21] Kadry, A. A.; Al-Suwayeh, S. A.; Abd-Allah, A. R. A.; Bayomi, M. A.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**, 54, 1103.