



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Síntese e Caracterização de Sistemas Nanoestruturados Contendo o inibidor de proteínases BTCl e Peptídeos Derivados

Sandrielle Aires de Oliveira

Orientadora: Dr^a. Sonia Maria de Freitas
Co-orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Brasília
2012



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Síntese e Caracterização de Sistemas Nanoestruturados Contendo o inibidor de proteinases BTCl e Peptídeos Derivados

Sandriele Aires de Oliveira

Orientadora: Dra. Sonia Maria de Freitas
Co-orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília
2012

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Sebastião e Zilda, que estão ao meu lado em qualquer situação. Vocês vivem meus sonhos como se fossem seus e não poupam esforços para que eu os realize, sempre com sabedoria, humildade e infinito amor. Vocês são os grandes responsáveis por eu estar aqui!

Dedico à minha amada irmã Marília, que esteve comigo todo esse tempo, fazendo o meu dia mais simples e feliz por meio de uma palavra ou um gesto de carinho.

Dedico a meus irmãos Plínio e Jobson, que mesmo distantes, me dão apoio e carinho. Também ao meu cunhado Paulo, que está sempre disposto a me ajudar!

AGRADECIMENTOS

*A Deus pelo seu amor e por me presentear com tantas dádivas,
me guiando sempre pelo melhor caminho.*

*A minha orientadora Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas pelo seu
apoio e carinho comigo, pelo grande exemplo como pesquisadora e
mulher. Obrigada pela dedicação, respeito e todos os preciosos
ensinamentos que recebi.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva pelo
exemplo de pesquisador e pelo entusiasmo e solícitude com que me
recebeu. Obrigada por não poupar esforços em me ajudar.*

*Aos meus amigos que me apoiaram desde a graduação e me fazem
sentir sempre feliz com suas palavras amigas. Obrigada Gutto,
Bia, Mariana, Marina, Renata, Tayanna, Larissa, André, Gabi e
todos meus amigos da Universidade.*

*Aos meus amigos de infância que até hoje vivem meus sonhos
comigo e estão sempre ao meu lado, mesmo com a grande
distância que existe entre nós. Obrigada aos meus amados amigos
do CHONPS, Hugo, João Paulo e Nile e a todos meus amigos de
Catalão.*

*Aos meus amigos do laboratório de Biofísica, por me ajudarem em
todas as dificuldades e por fazerem meu dia muito mais
agradável. Obrigada pela amizade incondicional Alice, Amanda,
Daniela, Diego, Jonny, Mary-Ann, Muriele e todos que passaram
por aqui.*

Ao Chiquinho, do laboratório de biofísica. Sem você, tudo seria mais difícil.

Aos professores do laboratório de espectrometria de massa do CENARGEN, Prof. Dr. Marcelo Bemquerer e a Profa. Dra. Maura Prates por me orientarem e disponibilizarem todo o necessário para o meu trabalho. Obrigada também aos queridos amigos Eduardo, Kelliane, Maéve, Tatiana, Zé e todos do laboratório.

Ao prof. Dr. João Batista Lopes por me receber e orientar no seu laboratório. Agradeço também a Érica que me acompanhou e me orientou para melhor realização do meu trabalho, mesmo quando distante. Obrigada a todos os alunos do laboratório de Química Computacional.

Ao laboratório de enzimologia, bioquímica nutricional e todos os outros que me cederam equipamentos e reagentes para execução do meu trabalho. Meu trabalho não seria possível sem a ajuda de todos.

Agradeço também aos meus queridos familiares, que estão sempre ao meu lado e me incentivam a sempre fazer o melhor e seguir em frente com os meus objetivos.

Ao CNPQ e CAPES por fomentarem e possibilitarem o meu projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram para a execução do meu projeto!

RESUMO

A incidência e mortalidade por câncer têm aumentado em todo mundo e representam um problema de saúde pública. Os tratamentos mais comuns são muitas vezes invasivos e inespecíficos. Quimioterápicos mais potentes e específicos têm sido estudados para elaboração de novos tratamento contra vários tipos de câncer. O inibidor de tripsina e quimotripsina BTCI, extraído a partir de sementes de feijão-de-corda *Vigna unguiculata*, foi caracterizado como um potente agente anticancerígeno devido à sua capacidade de diminuir a proliferação e viabilidade das células de câncer da mama. No presente trabalho, nanopartículas de quitosana contendo BTCI foram escolhidas para serem sintetizadas devido ao potencial anticarcinogênico do inibidor e às propriedades biomédicas de quitosana, que é atóxica e biodegradável. Além disso, peptídeos derivados de BTCI foram sintetizados e purificados a fim de estudar a atividade inibitória contra proteinases e a capacidade destes peptídeos de se translocarem através da membrana celular na ausência de receptores. Os peptídeos derivados apresentaram atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina, e foram capazes de desestabilizar a bicamada de lipossomas POPC, utilizados neste trabalho como modelos de membrana. O diâmetro da nanopartícula contendo quitosana e BTCI variou entre 25 e 200 nm, em relação a diferentes pHs e concentrações de BTCI. A eficiência de encapsulamento do BTCI foi superior a 50%, apresentando liberação prolongada em condições fisiológicas. Análises de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular sugeriram que a molécula de BTCI interage com a superfície externa das nanopartículas, apresentando algumas modificações estruturais, mas mantendo ainda a atividade inibitória contra proteinases. Estes resultados mostraram que os sistemas de nanopartículas de quitosana contendo BTCI são estáveis e ativos, podendo ser testados em ensaios *in vitro* com células de câncer da mama, visando investigar a atividade antitumoral destes sistemas contendo BTCI associado a polímeros de quitosana.

Palavras chave: *Vigna unguiculata*, BTCI, quitosana, nanopartículas

ABSTRACT

The incidence and mortality caused by cancer have increased and represent a public health problem. The common treatments are often invasive and nonspecific. More potent and specific chemotherapeutic agents have been studied for the alternative treatment of several types of cancer. The black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI), a Bowman-Birk inhibitor isolated from *Vigna unguiculata* seeds, was characterized as a potent anticarcinogenic agent due its ability to significantly decrease the proliferation and viability of breast cancer cells. In the present work, chitosan nanoparticles encapsulating BTCI were chose to be synthesized due the anticarcinogenic potential of inhibitor and the nontoxic and biodegradable properties of chitosan. In addition, peptides derived from BTCI were synthesized and purified in order to study their activity against serine proteinases and the ability to translocate through the cell membrane models. The peptides presented inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin and were able to destabilize POPC phospholipids from membrane model. The diameter of chitosan-BTCI nanoparticles ranged from 25 and 200 nm in different pH and concentrations of BTCI. The encapsulation efficiency of the BTCI into chitosan particles was > 50% and the liberation of the inhibitor in physiological condition was prolonged. Analysis of fluorescence spectroscopy and circular dichroism suggested that BTCI interacts with the external surface of nanoparticles. Although the BTCI presents structural changes in this condition its inhibitory activity against proteinases was preserved. Altogether, these results showed that Chitosan-BTCI nanoparticles are active and stable and should be tested *in vitro* assays with breast cancer cells aiming investigation of the BTCI anticarcinogenic action in this system.

Key words: *Vigna unguiculata*, BTCI, Chitosan, nanoparticles

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- α = Alfa
 β =Beta
 Δ = Delta
 θ = Tetha
 λ_{exc} = Comprimento de onda de excitação
 λ_{em} = Comprimento de onda de emissão
Asp = Aminoácido aspartato
BTCI= Inibidor de tripsina e quimotripsina extraído de grãos de *Vigna unguiculata*
BAPNA= N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
CD = Dicroísmo circular
CPP= *Cells Penetrating Peptides*
 D_{hid} = Diâmetro hidrodinâmico
DIPEA = N, N-diisopropiletilamina
DLS = Espalhamento de luz dinâmico
DMF = N,N-dimetilformamida
GNPA = N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida
HBTU = hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
His = Aminoácido histidina
 I_3^- = Triodeto
 K^+ = Íon de Potássio
KDa = Quilodaltos
Ki = Constante de inibição enzimática
Ksv = Constante de supressão
Lys 26 = Sítio inibitório contra tripsina no BTCI
MALDI-TOF = Espectrômetro de massa
MCF-7 = linhagem de células de câncer de mama
MFA = Microscopia de força atômica
 Na^+ = Íon de sódio
Pep 1 = Peptídeo derivado do BTCI que inibe a tripsina
Pep 2 = Peptídeo derivado do BTCI que inibe a quimotripsina
Phe 53 = Sítio de inibição contra a tripsina no BTCI
PLGA = Ácido poli-lático-glicólico
PMSF = Fenilmetilsulfonilfluor
POPC = Fosfolípido palmitoil-oleoil-phosphatidil-colina
RP-HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
Ser = Aminoácido serina
TCA = Ácido tricloroacético
TFA = Ácido trifluoroacético
TPP = Tripolifosfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura tridimensional do BTCI representada em bastões e do complexo ternário BTCI com quimotripsina e tripsina, em fitas. À esquerda: Molécula de BTCI com sítios inibitórios para quimotripsina (Phe53) em vermelho e para tripsina (Lys26) em azul. À direita, o complexo ternário do BTCI com a tripsina (rosa) e quimotripsina (verde).....6
- Figura 2.** Representação da superfície da molécula de BTCI em modelo CPK (Corey, Pauling e Koltun) mostrando as regiões hidrofílicas (em branco) e hidrofóbicas (em amarelo).....7
- Figura 3.** Na imagem a cima, distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012, exceto pele não melanoma. Na imagem abaixo, representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para 2012, segundo Unidades da Federação (INCA, 2011).....11
- Figura 4.** Representação esquemática de nanocápsulas a) fármaco no núcleo, b) fármaco retido na parede polimérica; e nanoesferas c) fármaco retido na matriz polimérica e d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica. (Schaffazick, 2003)14
- Figura 5.** Estruturas moleculares da quitina e quitosana (Azevedo, 2007)15
- Figura 6.** Degradação de PLGA em ácido lático e ácido glicólico, ilustrando as moléculas do copolímero e seus componentes (Dinarvand *et al.*, 2011).....16
- Figura 7.** Purificação do inibidor BTCI em cromatografia de troca iônica. Em destaque (seta), o pico onde são coletadas as frações de proteína pura.....35
- Figura 8.** Análise da massa molecular e pureza do inibidor BTCI por espectrometria de massa MALDI-TOF. No gráfico estão representados o pico correspondente ao BTCI ionizado (m/z 9109,65) e o pico (*) correspondente ao BTCI duplamente carregado $[M+2H]^+$ 36
- Figura 9.** Cromatograma do peptídeo sintético Pep 1 oxidado, produzido por síntese em fase móvel em cromatografia de fase reversa. O gradiente utilizado foi o de acetonitrila de 5-95% (linha preta). A absorbância foi monitorada em 216 (linha azul) e 254 nm (linha vermelha). O pico detectado em 25 minutos representa a fração de peptídeo puro.....37
- Figura 10.** Cromatograma do peptídeo sintético Pep 2 oxidado, produzido por síntese em fase móvel, em cromatografia de fase reversa. Foi utilizado um gradiente de acetonitrila de 5-95% (linha preta). A absorbância foi monitorada em 216 nm (linha azul) e 254 nm (linha vermelha). O pico detectado em 25 minutos representa a fração de peptídeo puro.....38
- Figura 11.** Análise da massa e pureza do peptídeo derivado do BTCI, Pep 1, por espectrometria de massa. No espectro são observados três picos principais, todos correspondentes ao Pep 1. Além da forma livre, são encontrados picos com massa referente ao peptídeo ligado a íons de Na^+ e K^+39
- Figura 12.** Análise da massa e pureza do peptídeo derivado do BTCI, Pep 2, por espectrometria de massa. No espectro são observados três picos principais, todos correspondentes ao Pep 2. Além da forma livre, é observado no espectro outros dois picos referentes a massa do peptídeo ligado a íons de Na^+ e K^+40
- Figura 13.** Atividade residual da tripsina na presença do inibidor de proteinases BTCI nas concentrações de 0 a 20 μM . Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente utilizando o substrato cromogênico BAPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorbância à 410 nm.....41
- Figura 14.** Atividade residual da quimotripsina na presença do inibidor de proteinases BTCI nas concentrações de 0 a 50 μM . Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente utilizando o substrato cromogênico GPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorbância a 410 nm.....41
- Figura 15.** Atividade residual da tripsina na presença do peptídeo derivado do BTCI, Pep 1, nas concentrações de 0 a 160 μM . Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente

utilizando o substrato cromogênico BAPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorbância a 410 nm.....42

Figura 16. Atividade residual da quimotripsina na presença do peptídeo derivado do BTCl, Pep2, nas concentrações de 0 a 960 μM . Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente utilizando o substrato cromogênico GPNA. A redução da atividade foi monitorada pela absorbância a 410 nm.....42

Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na ausência dos peptídeos, em relação ao tempo. Observa-se que no intervalo de 10 a 55 minutos os lipossomas permanecem estáveis, sem alteração do sinal de fluorescência.....44

Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na presença de 50-500 μM de Pep1 e o extravasamento total por ruptura dos lipossomas com Triton 100-X. A interação entre a bicamada e Pep 1 causou um extravasamento de até 82% da carboxi-fluoresceína encapsulada.....45

Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na presença de 50-310 μM de Pep2 e o extravasamento total por ruptura dos lipossomas com Triton 100-X. A interação entre a bicamada e Pep 2 causou um extravasamento de até 50% da carboxi-fluoresceína encapsulada.....45

Figura 20. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão controle de BTCl nas concentrações de 50 μM (A), 100 μM (B) e 200 μM (C) produzida pelo método físico, na ausência de quitosana. As estruturas observadas nas imagens de dimensão 5 μm x 5 μm são agregados do BTCl.....47

Figura 21. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1% vazia (A); Quitosana 1%/BTCl nas concentrações de 50 μM (B), 100 μM (C) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH 9. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm49

Figura 22. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1% vazia (A); Quitosana 1%/BTCl nas concentrações de 50 μM (B), 100 μM (C) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH 7. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm50

Figura 23. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1%/BTCl nas concentrações de 50 μM (A), 100 μM (B) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH ácido, e nanopartículas Quitosana 1%/BTCl 100 μM produzida pelo método químico. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm51

Figura 24. Distribuição do número de nanopartículas contendo BTCl produzidas em pH 3, obtida das imagens de microscopia de força atômica, em relação a altura (nm). (A) Nanopartículas contendo BTCl 50 μM , (B) nanopartículas contendo BTCl 100 μM e (C) nanopartículas contendo BTCl 200 μM52

Figura 25. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCl, nas concentrações 0 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , preparadas pelo método físico em ácido acético 0,2 M pH 3.....53

Figura 26. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCl, nas concentrações 0 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , preparadas pelo método físico em ácido acético 0,2 M pH 7.....53

Figura 27. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCl, nas concentrações 0 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , preparadas pelo método físico em ácido acético 0,2 M pH 3.....54

Figura 28. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de PLGA/BTCI na concentração 100 µM preparadas em água pelo método de nanoprecipitação.....	55
Figura 29. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCI nas concentrações 0 e 100 µM, preparadas pelo método de geleificação ionotrópica em ácido acético 0,1 M.....	55
Figura 30. Curva padrão de dosagem de proteína utilizando a soroalbumina bovina (método de Lowry) em concentrações de 0 a 2 mg/mL para quantificação do BTCI encapsulado. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e a absorbância monitorada a 730 nm.....	57
Figura 31. Análise do encapsulamento do BTCI 50 µM em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCI 50 µM na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os <i>pellets</i> gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 g, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.....	60
Figura 32. Análise do encapsulamento do BTCI 100 µM em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCI 100 µM na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os <i>pellets</i> gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 g, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.....	61
Figura 33. Análise do encapsulamento do BTCI 200 µM em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCI 200 µM na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os <i>pellets</i> gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 g, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.....	62
Figura 34. Gráfico de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão do BTCI livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor acrilamida, nos pHs 3, 7 e 9.....	63
Figura 35. Gráfico de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão do BTCI livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor iodeto de potássio, nos pHs 3, 7 e 9.....	63
Figura 36. Gráfico de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão do BTCI livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor cloreto de céσιο, nos pHs 3, 7 e 9.....	64
Figura 37. Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta Mudanças no posicionamento e intensidade das bandas dicróicas são observadas para as amostras contendo BTCI 0,25 mg/mL, partículas de quitosana vazias, partículas de quitosana vazias adicionadas a BTCI 0,25 mg/mL e partículas contendo BTCI, antes e após a centrifugação a 3300 g.....	66
Figura 38. Perfil de liberação do BTCI encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCI nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 3, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da proteína.....	67
Figura 39. Perfil de liberação do BTCI encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCI nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 7, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da proteína.....	68
Figura 40. Perfil de liberação do BTCI encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCI nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 9, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da proteína.....	68
Figura 41. Atividade inibitória do BTCI associado às nanopartículas de quitosana, incubadas por 48 Horas em tampão PBS 1x a 37°C, em relação da atividade do BTCI livre. (cinza) Atividade inibitória contra tripsina e (amarelo) atividade inibitória contra quimotripsina.....	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Constantes de inibição (K_i) do BTCl e peptídeos derivados em relação à tripsina e quimotripsina à temperatura ambiente. As constantes foram calculadas a partir do ajuste das curvas de inibição utilizando o programa Grafitt e a equação de Morrison.....43
- Tabela 2.** Diâmetro hidrodinâmico (D_{Hid}) e potencial zeta das nanopartículas produzidas pelos diferentes métodos, com variação de pH e concentração do BTCl, obtidos por espalhamento de luz dinâmico.....55
- Tabela 3.** Eficiência de encapsulamento (E.E.) do BTCl pelas nanopartículas em diferentes condições monitorada pela dosagem de proteínas.....56
- Tabela 4.** Eficiência de encapsulamento do BTCl em diferentes pHs, monitorada pela relação da intensidade de fluorescência da proteína livre/proteína total. A amostra de proteína livre foi obtida por centrifugação em Centricon 100 kDa.....57
- Tabela 5.** Constantes de Stern-Volmer calculadas para a supressão de fluorescência do BTCl livre e em suspensão de nanopartículas pelos supressores acrilamida (neutro), iodeto de potássio (negativo) e cloreto de cézio (positivo) nos pHs 3, 7 e 9. Em vermelho, condições onde a presença das partículas diminuiu a acessibilidade ao triptofano e, em azul, onde a presença das partículas aumentou a acessibilidade ao triptofano pelos atenuadores.....65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objeto de Estudo: Considerações Gerais.....	1
1.2. Serinoproteinases.....	2
1.3. Inibidores de serinoproteinases.....	4
1.4. Família de inibidores Bowman-Birk.....	5
1.5. Inibidor de serinoproteinases BTCI.....	6
1.6. Câncer.....	9
1.7. Estabilidade estrutural e agregação do BTCI.....	12
1.8. Sistemas de liberação controlada	13
1.9. Nanopartículas poliméricas.....	15
1.10. Peptídeos derivados de moléculas naturais.....	17
2. OBJETIVO	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Purificação do BTCI	22
3.1.1 Obtenção de sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	22
3.1.2 Cromatografia de troca iônica e pureza da amostra.....	22
3.2 Obtenção dos peptídeos derivados do BTCI	23
3.2.1 Síntese dos peptídeos por fase móvel	23
3.2.2 Reação de formação das ligações dissulfeto	24
3.2.3 Purificação dos peptídeos por fase reversa em HPLC.....	24
3.2.4 Análise da pureza dos inibidores e oxidação dos peptídeos.....	25
3.3 Atividade inibitória do BTCI e peptídeos derivados.....	25
3.3.1 Ensaio de inibição para tripsina.....	25
3.3.2 Ensaio de inibição para quimotripsina	26
3.3.4 Constantes de inibição do BTCI e peptídeos derivados.....	26
3.4 Efeito da interação entre os peptídeos e modelos de membrana....	27
3.4.1 Síntese e purificação de lipossomas com carboxi-fluoresceína.....	27
3.4.2 Interação dos peptídeos com os lipossomas.....	27
3.5 Encapsulamento de BTCI em nanopartículas.....	28

3.5.1 Síntese de partículas de ácido poli-láctico co-glicólico.....	28
3.5.2 Síntese de nanopartículas de quitosana	28
3.5.2.1 Método químico	28
3.5.2.2 Método físico.....	29
3.5.3 Eficiência de encapsulamento do BTCl nas nanopartículas.....	29
3.5.4 Análise das partículas por microscopia de força atômica.....	30
3.5.5 Análise do potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das partículas.	30
3.5.6 Análise das nanopartículas por dicróismo circular.....	31
3.5.7 Análise das nanopartículas por fluorescência.....	31
3.5.7.1. Associação do BTCl/partículas por fluorescência estática.....	31
3.5.7.2. Associação do BTCl/partículas por supressão de fluorescência...	32
3.5.8 Ensaios de liberação do BTCl pela nanopartícula.....	33
3.5.9 Atividade inibitória do BTCl em sistemas nanoparticulados.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Purificação do BTCl.....	35
4.2. Purificação dos peptídeos sintéticos.....	37
4.3. Atividade inibitória do BTCl e peptídeos derivados	38
4.4. Interação bicamada/peptídeos por modelo de membrana.....	43
4.5. Encapsulamento do BTCl em nanopartículas.....	46
4.5.1- Microscopia de força atômica.....	46
4.5.2. Espalhamento de luz dinâmica.....	53
4.5.3. Eficiência de encapsulamento.....	56
4.5.3.1. Quantificação do encapsulamento pelo Método de Lowry.....	57
4.5.3.2. Quantificação do encapsulamento por fluorescência.....	58
4.5.4 Análise das nanopartículas por fluorescência intrínseca.....	59
4.5.5 Interação BTCl/Quitosana por dicróismo.....	65
4.5.6 Liberação do BTCl pelas nanopartículas.....	67
4.5.7 Atividade inibitória do BTCl associado às nanopartículas.....	69
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1- INTRODUÇÃO

1.1- Objeto de Estudo: Considerações Gerais.

O BTCI (*black-eye pea trypsin chymotrypsin inhibitor*) é um inibidor de proteinases da família Bowman-Birk encontrado em grãos de *Vigna unguiculata* (feijão de corda). Essa proteína é um inibidor de tripsina e quimotripsina estável em pHs de 3 a 10 e em temperaturas variando de 25 a 95°C, com estrutura rígida mantida por sete ligações dissulfeto (Ventura et al, 1966; Mohry and Ventura, 1987; Barbosa et al, 2007). Esse inibidor foi purificado inicialmente por Ventura e Xavier (1966) e, desde então, tem sido extensivamente caracterizado físico-quimicamente e em relação a sua função e estrutura.

O BTCI inibe as proteinases tripsina e quimotripsina simultaneamente formando um complexo binário ou ternário estável (Freitas et al., 1997; Barbosa et al., 2007), apresentando atividade inibitória nas temperaturas de 25 a 95°C e em pH 3 a 10 (Silva et al., 2000). Devido à superfície parcialmente hidrofóbica, em solução, este inibidor se organiza espontaneamente em estruturas multiméricas como monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros (Ventura et al., 1981; Silva et al., 2005). No entanto, além da formação dessas estruturas organizadas, esse inibidor forma agregados, processo recorrente em muitas proteínas e geralmente irreversível (Dong et al., 1995). Atualmente, existem várias alternativas para redução da agregação de proteínas, como uso de sais, cossolutos e surfactantes, que são moléculas anfipáticas capazes de formar uma estrutura micelar ao redor da molécula (Chi et al., 2003). Semelhante às micelas, sistemas nanoparticulados baseados em polímeros tem sido testados com a finalidade de evitar a agregação da molécula de interesse e influenciar sua atividade, intensificando ou modulando seu efeito.

Considerando que as proteinases participam de diversos mecanismos intracelulares, como proteólise e vias de transdução de sinal, os inibidores de proteinases tem sido investigados visando aplicação tecnológica no tratamento de diversas patologias e processos fisiológicos. O BTCI, objeto de estudo dessa dissertação, tem sido reportado como uma molécula com alto potencial biotecnológico, considerando suas propriedades funcionais e estruturais. O

BTCl inibe a digestão e o desenvolvimento de uma das pragas mais nocivas e disseminadas em plantações de algodão, o bicudo do algodoeiro (Franco et al., 2003). Ensaios com ratos (Wistar-Kyoto) revelaram o potencial do BTCl como indutor da natriurese, influenciando conseqüentemente a homeostase, o que o torna uma molécula promissora para o desenvolvimento de drogas com potencial para o tratamento de hipertensão (Carvalho, 2008). Estudos mais recentes mostraram que o BTCl apresenta ação anticarcinogênica indicada pelos efeitos citotóxicos e citostáticos em células de câncer de mama MCF-7. No entanto, nenhum desses efeitos foi observado em células mamárias normais (Joanitti, 2010). A via de ação do BTCl não é conhecida, mas sabe-se que essa molécula inibe o proteassoma 20S, importante no ciclo celular (Souza, 2010). Esses resultados indicam que o BTCl apresenta potencial farmacológico para produção de novas drogas contra o câncer de mama.

Considerando o efeito anticarcinogênico do BTCl recentemente reportado na literatura e visando futuramente a utilização desse inibidor em ensaios pré-clínicos e clínicos, em animais e pacientes com câncer de mama, é necessário desenvolver novas formas de administração desse inibidor, para ação eficaz contra as células tumorais. Nesse contexto, um dos objetivos do presente trabalho é o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados baseados em polímeros, com a finalidade de diminuir a concentração do inibidor a ser administrado em ensaios pré-clínicos futuros, aumentar a biodisponibilidade e minimizar o processo de agregação, crítico para elaboração e industrialização de um fármaco.

1.2. Serinoproteinases

Proteinases são proteínas responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas de outras proteínas. Algumas dessas enzimas estão envolvidas no processo de digestão intra e extracelular, em processos fisiológicos especializados, como ativação da cascata de zimogênios, liberação de hormônios a partir de precursores, liberação de peptídeos ativos, ativação de receptores, entre outros (Neurath, 1984). No genoma humano, são encontradas aproximadamente 700 diferentes proteinases envolvidas na

remodelagem de matriz extracelular, coagulação sanguínea, imunidade, processamento protéico, sinalização celular e apoptose (Puente et al, 2005). Dentre essas proteinases, destaca-se a classe das serinoproteinases, que recebem este nome pelos resíduos de aminoácidos envolvidos na reação de clivagem.

Dentre as serinoproteinases, as mais conhecidas são aquelas pertencentes às famílias da tripsina e da subtilisina. A família da tripsina pode ser encontrada desde procariontos até vertebrados e englobam as enzimas tripsina, quimotripsina, elastase, entre outras (Stamato et al, 1984). Essas serinoproteinases possuem uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos Ser195, Asp102 e His57 envolvidos no mecanismo de ação por ataque nucleofílico do átomo de oxigênio hidroxílico da serina reativa sobre o átomo de carbono da carboxila do substrato. A característica nucleofílica da serina é devido a transferência do seu único próton para a histidina, formando-se a estrutura intermediária, um complexo multipolar Asp-Hist⁺Ser⁻ (Wang , 1968).

A tripsina e quimotripsina, pertencentes à família da tripsina, são enzimas com estruturas e funções bem semelhantes e responsáveis pela digestão protéica em mamíferos, porém com especificidades de clivagem distinta. A tripsina possui uma cadeia polipeptídica de 246 resíduos de aminoácidos, seis ligações dissulfeto, com a maioria das estruturas secundárias em folhas- β e cliva o substrato na proximidade de resíduos carregados positivamente, como a arginina e lisina. A quimotripsina é uma enzima, com 245 aminoácidos, secretada no pâncreas de mamíferos (Hartley et al., 1964). A quimotripsina cliva o substrato na proximidade de resíduos hidrofóbicos, como leucina, fenilalanina, triptofano e tirosina.

A família das proteinases do tipo tripsina são agrupadas filogeneticamente em seis categorias funcionais: digestão, coagulação e imunidade, triptases, matriptases, calicreínas e granenzimas. As triptases são os componentes mais abundantes na secreção de células mamárias (Pereira et al. 1998), enquanto as matriptases são proteinases associadas a membrana e a diversos tipos de câncer (Lin et al., 1999). As calicreínas estão também relacionadas ao câncer e

participam da regulação da pressão sanguínea por meio do sistema das cininas (Diamandis et al., 2000). As granzimas são mediadoras da apoptose nas células *Natural Killer* e células T citotóxicas e, por isso, estão envolvidas da defesa contra infecções virais (Barry e Bleackley, 2002). Devido à abundância de funções e vias de ação dessas proteinases, tanto em células saudáveis quanto em patologias, os membros da família das proteinases do tipo tripsina são alvos em diversas intervenções terapêuticas, por meio de inibidores específicos para essas proteinases que podem suprimir ou regular suas atividades (Gohara e Di Cero, 2011).

1.3. Inibidores de serinoproteinases

Inibidores de proteinases são proteínas encontradas em microorganismos, plantas e animais. Esses inibidores interagem com enzimas específicas por meio de sítios de ligação semelhantes aos de seus substratos, formando um complexo estável que impede que a enzima exerça sua atividade catalítica. Em plantas, eles estão presentes em tubérculos e sementes (Garcia-Olmeda et al., 1987, Laskowisk and Kato, 1980), sendo atuantes nos mecanismos de defesa contra predadores e patógenos (Bergey et al., 1996). Em humanos, estes inibidores são responsáveis por inibir proteinases intestinais, como tripsina, quimotripsina e elastase. Além dessa interação antinutricional, estes inibidores tem sido investigados em relação a seu potencial regulatório, antimicrobiano e, principalmente, anticarcinogênico.

Estudos epistemológicos mostraram que a incidência e mortalidade por doenças como o câncer são influenciadas pela dieta alimentar. É relatado que a incidência de câncer de mama nos países asiáticos, onde se ingere muitas leguminosas ricas em inibidores de proteinases, representa apenas 10% do número de casos de câncer detectados nos países europeus e Estados Unidos (Hakkak et al., 2000). A ingestão destes legumes, como soja e feijão, foi associada à menor mortalidade principalmente para cânceres de cólon, próstata e mama (Kennedy, 1998) e em camundongos, mostrou efeito na

proteção contra as três fases do câncer de mama: inicialização, promoção e progressão (Mukhopadhyay, 2006).

Estes grãos são reportados na literatura como agentes anticarcinogênicos por apresentarem, além de moléculas antioxidantes, alto conteúdo de inibidores de proteinases (Blondell, 1988). Dentre essa classe de moléculas, o alvo de pesquisas para tratamento de câncer tem sido os inibidores de proteinases da família Bowman-Birk (Kennedy, 1998). Membros dessa família têm sido descritos como eficazes na prevenção e supressão de câncer, mesmo quando administrados na forma de concentrados, onde há baixíssima quantidade do inibidor (Witschi e Espiritu, 2002).

1.4. Família de inibidores Bowman-Birk

Inibidores de proteinases da família Bowman-Birk (BBIs) são proteínas abundantes em monocotiledôneas e dicotiledôneas que inibem principalmente a tripsina e quimotripsina. Os BBIs de dicotiledôneas, como os extraídos de leguminosas, apresentam massa molecular de aproximadamente 8 kDa, dois sítios inibitórios específicos e estrutura rígida mantida por ligações dissulfeto (Rui-Feng et al., 2005). Essas ligações dissulfeto desempenham papel relevante na atividade da proteína, pois mantém a conformação ativa do inibidor nos sítios inibitórios ou sítios reativos (Prakash et al., 1996). Além disso, possibilitam a distinção entre dois subdomínios semelhantes entre si, cada um deles contendo um sítio reativo específico para tripsina ou quimotripsina (Fig. 1), sendo que a reação de inibição das duas enzimas pode ocorrer simultaneamente, com a formação de um complexo ternário. Os sítios reativos apresentam uma conformação canônica que é similar ao substrato da proteinase (Bode et al., 2000). No entanto, ao contrário da reação com o substrato, a formação de ligações não-covalentes entre inibidor e enzima levam à inativação permanente da proteinase após essa interação (Clemente et al., 2006).

Um dos inibidores da família Bowman-Birk mais estudados devido ao seu potencial anticarcinogênico é o inibidor extraído dos grãos da soja. Esse

inibidor apresenta massa molecular de aproximadamente 9 KDa, sete ligações dissulfeto e estrutura estável em diversas condições de pH e temperatura (Birk, 1985). Devido a sua capacidade de prevenção e supressão de tumores, ele tem sido testado em diversos tipos de câncer e em diferentes espécies, tanto puro quanto em forma de concentrado (Kennedy, 1998). De acordo com a literatura, não só o inibidor extraído da soja, mas diferentes inibidores de proteinases são capazes de suprimir a carcinogênese (Kennedy, 1993).

1.5. Inibidor de serinoproteases BTCl

BTCl (*Black-Eye pea Trypsin Chymotrypsin inhibitor*) é um inibidor de serinoproteases da família Bowman-Birk, extraído de sementes de feijão de corda, *Vigna unguiculata*, (variedade Seridó) (Ventura et al., 1966, Ventura et al., 1971) Esta proteína é globular estável, formada por uma única cadeia polipeptídica de 83 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 9 kDa e sete ligações dissulfeto (Morhy e Ventura, 1987). O BTCl pode inibir a tripsina e quimotripsina simultaneamente, por meio de sítios de inibição específicos formados por Lys26/Ser27 e Phe53/Ser54, respectivamente, com a formação de um complexo ternário estável (Barbosa et al., 2007, Freitas et al., 1997) (Fig.1). Este inibidor é estável em condições extremas de temperatura e pH, apresentando atividade inibitória de 25 a 95°C e em pH 3 a 10, sendo mais ativo em pHs neutros e ácidos (Silva et al., 2000).

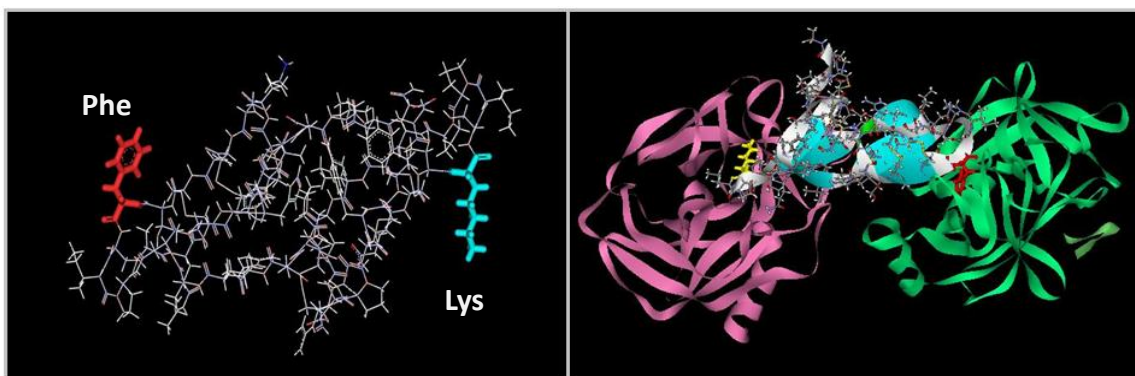


Figura 1. Estrutura tridimensional do BTCl representada em bastões e do complexo ternário BTCl com quimotripsina e tripsina, em fitas. À esquerda: Molécula de BTCl com

sítios inibitórios para quimtripsina (Phe53) em vermelho e para tripsina (Lys26) em azul. À direita, o complexo ternário do BTCI com a tripsina (rosa) e quimotripsina (verde).

O BTCI apresenta parte de seus resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos expostos ao solvente, o que caracteriza sua superfície como heterogeneamente hidrofóbica (Ventura et al., 1984) (Fig.2) e torna a estrutura monomérica desfavorável em solução aquosa. Em solução, por mecanismos de associação e dissociação, este inibidor se organiza espontaneamente em diferentes estruturas multiméricas em equilíbrio entre si (Ventura et al., 1981).

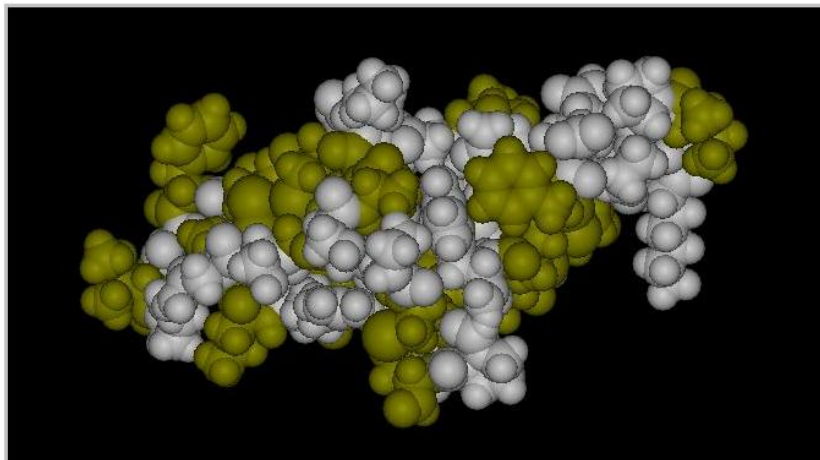


Figura 2. Representação da superfície da molécula de BTCI em modelo CPK (Corey, Pauling e Koltun) mostrando as regiões hidrofílicas (em branco) e hidrofóbicas (em amarelo).

As estruturas cristalográficas do complexo deste inibidor com a β -tripsina e o complexo ternário com a quimotripsina e tripsina foram resolvidas e depositadas no *Protein Data Bank* (Barbosa et al., 2007). Com o BTCI amplamente caracterizado em relação à estrutura e considerando a ação inibitória de enzimas que atuam na proteólise e em vias de transdução de sinal de diversos processos intracelulares, estudos visando a caracterização funcional e biotecnológica desse inibidor foram priorizados. Em 2003, Franco e colaboradores mostraram o efeito do BTCI na inibição da atividade proteolítica de enzimas digestivas do coleóptero *Anthonomus grandis* tanto na fase adulta quanto na fase larval. Conhecido como bicudo-do-algodoeiro, esse inseto representa uma das pragas mais nocivas para as plantações de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) tanto em regiões tropicais quanto subtropicais, tendo sido inserido no Brasil na década de 80, afetando as plantações da região nordeste do Brasil (Franco et al., 2003).

Os insetos adultos se alimentam do botão floral e da fruta dos algodoeiros e se alojam nos gomos de algodão causando sérios danos à planta. Para a digestão, eles necessitam de tripsina e quimotripsina que participam da atividade proteolítica. Com o uso do BTCl, essa atividade proteolítica foi inibida, o que mostra o potencial deste inibidor para efeito antinutricional e consequente controle dessa praga. Além disso, larvas de *A. grandis* incubadas com BTCl apresentaram modificações morfológicas que impediram seu desenvolvimento. Estes resultados indicam a possibilidade do uso deste inibidor na produção de plantas de algodão transgênicas e no aumento de resistência a pragas (Franco et al., 2003).

Em estudos relacionados à homeostase e natriurese em sistemas *in vivo*, Carvalho e colaboradores (2008) demonstraram, pela primeira vez, efeitos na função renal influenciados por inibidores de proteinases da família Bowman-Birk. Nos ensaios realizados, foram administradas, em ratos, doses de BTCl e guanilina, um peptídeo envolvido na regulação da homeostase de fluidos e eletrólitos por meio da ligação e ativação de uma ciclase expressa no intestino e nos rins (Carvalho et al., 2008). Os resultados demonstraram que a presença do inibidor intensificou e prolongou a natriurese induzida por guanilina. Nesse caso, o BTCl impede a degradação do peptídeo pelas proteinases da corrente sanguínea, protegendo a molécula de interesse. Além disso, os ensaios de perfusão mostraram um efeito natriurético do BTCl mesmo na ausência da guanilina. Mesmo não conhecendo as vias de ação do BTCl no metabolismo renal, é possível que este promova a proteção de peptídeos envolvidos na regulação da homeostase, o que indica o potencial do BTCl no desenho de novas drogas para hipertensão (Carvalho et al., 2008).

Mais recentemente, estudos *in vitro* confirmaram que o BTCl apresenta efeito anticarcinogênico, semelhante a outro da família Bowman-Birk extraído da soja. No entanto, além de apresentar efeitos citostático, o BTCl mostrou um efeito citotóxico contra células tumorais, enquanto outros BBIs, como aquele extraído da soja, apresentam somente efeito na diminuição da proliferação celular (Joanitti et al, 2010).

Nos ensaios *in vitro* com células de mama MCF-7, o BTCl apresentou efeito citostático e citotóxico associado à morte celular por apoptose e

permeabilização da membrana lisossomal (LMP). Análises morfológicas das células tumorais após tratamento com o BTCI, indicaram fragmentação da membrana, desorganização citoplasmática, aumento do volume dos lisossomos e desorganização da cromatina. Não são conhecidas exatamente as vias de ação do BTCI, mas sabe-se que o inibidor interage com o proteossoma 20S dessas células, diminuindo sua capacidade de inibir enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e caspase, importantes no ciclo celular e nas vias proteolíticas da célula (Souza, 2010).

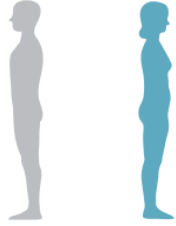
Em linhagens de células de mama normais, não houve interferência deste inibidor na viabilidade celular (Joanitti et al., 2010), uma característica essencial na elaboração de novas drogas que buscam redução de efeitos colaterais. Devido a seu efeito potente e específico contra células tumorais e também a alta estabilidade estrutural, o BTCI tem se tornado uma molécula promissora para estudos visando o tratamento de câncer, sendo necessários agora aprimoramentos desses estudos e sobre a via de administração, a fim de intensificar a atividade e evitar a agregação do inibidor, que pode reduzir sua atividade.

1.6. Câncer

Atualmente são conhecidos mais de 100 tipos diferentes de câncer, sendo incluídas as neoplasias malignas em diferentes localizações. Essas neoplasias são conceituadas como proliferações celulares locais, causadas por acúmulo de mutações genéticas. Essas proliferações não podem ser controladas no ciclo celular, o que acarreta o crescimento progressivo até a perda da diferenciação normal das células, resultando na formação de tumores malignos capazes de espalhar-se por outros órgãos e tecidos do corpo (INCA,2010). Os cânceres evoluem em um processo que se estende por décadas, passando por diversos estágios, entre eles a iniciação, promoção e finalmente progressão do tumor. Carcinomas malignos de mama, cólon, pulmão, entre outros, frequentemente apresentam mutações em diversos oncogenes e genes supressores de tumores, e também estão relacionados a anormalidades cromossômicas e a redução da variabilidade genética em diversos *loci*.

Em âmbito global, a ocorrência de câncer dobrou nos últimos 30 anos (IARC 2007). No Brasil, óbitos por câncer representam aproximadamente 20% da mortalidade por causas conhecidas. Dentre os diversos tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama que é o mais freqüente em mulheres e com ocorrência aumentada nas últimas décadas devido a influências ambientais e aumento da longevidade. No Brasil em 2008, o número de mortes ultrapassou 20.000 em 2012, foram estimados mais de 50.000 novos casos de câncer de mama entre (INCA, 2011) (Fig 3).

Mesmo com avanços na medicina e investimentos na prevenção por políticas públicas, como realização de triagens e mamografia, a mortalidade por câncer de mama continua alta pela detecção tardia da doença e pela imprecisão e excesso de diagnósticos (Newman, 2010), com taxa de sobrevivência após cinco anos de apenas 61%. Os tratamentos existentes para esses tipos de câncer são geralmente a combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que além de vários efeitos colaterais, podem levar a complicações e até à morte do paciente (Hynes et al., 2004).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

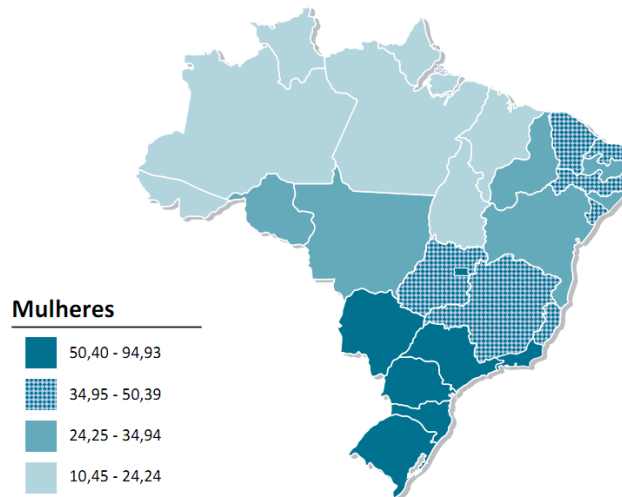


Figura 3. Na imagem a cima, distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012, exceto pele não melanoma. Na imagem abaixo, representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para 2012, segundo Unidades da Federação. Fonte da imagem: (INCA, 2011).

Atualmente, novas formas de tratamentos para o câncer têm sido investigadas, principalmente aquelas que utilizam moléculas mais potentes e que causem menores efeitos colaterais. Dentre essas moléculas, destacam-se as extraídas de plantas. Por estarem presentes em vegetais que fazem parte da alimentação do ser humano, biomoléculas extraídas de grãos, como inibidores de proteinases, são ótimos candidatos para o estudo farmacológico considerando o seu potencial anticarcinogênico e a possibilidade de ausência de efeitos colaterais. Esse potencial farmacológico se deve ao fato das proteinases estarem relacionadas à proteólise e transdução de sinal de vias responsáveis pela degradação tecidual, apoptose, viabilidade celular e expressão gênica (Joanitti et al., 2006).

1.7. Estabilidade estrutural e agregação do BTCI

Estudos recentes com BTCI demonstram seu potencial farmacológico, principalmente anticarcinogênico, pela interferência em vários processos celulares da célula tumoral. A condição essencial para que este inibidor atue na célula é que ele consiga chegar e entrar na célula de câncer, sem que ocorra degradação ou agregação da molécula. Mesmo que o BTCI seja uma molécula altamente estável, a superfície externa hidrofóbica do inibidor pode corroborar para formação de agregados, quando este é submetido a condições pouco controladas, como nos processos de produção e estocagem de fármacos. As proteínas são, de modo geral, macromoléculas sensíveis a alterações químicas e físicas do ambiente que direcionam o dobramento e mudança conformacional ou até à degradação (Lumry et al., 1954). Por essa razão a estabilidade do BTCI é uma das principais preocupações quando se visa o uso farmacológico. Para ser economicamente viável, uma molécula deve ser estável de 18 a 24 meses em condições muitas vezes adversas, como nas fases de produção, distribuição e estocagem do agente terapêutico (Cleland et al., 1993).

A degradação protéica pode ser física ou química. Na degradação química, há alterações nas ligações covalentes como oxidações e modificação das posições das ligações dissulfeto. A degradação física pode ocorrer por desdobramento da estrutura terciária, adsorção a superfícies e agregação (Oolcharran, 2000). Este último tipo é o mais preocupante, sendo recorrente durante a produção de fármacos em escala industrial, mesmo quando a estrutura nativa da molécula é termodinamicamente favorável. A agregação é um processo predominantemente irreversível, onde há uma organização de moléculas inicialmente ativas gerando uma estrutura inativa, normalmente contendo alto conteúdo de estruturas folhas- β intermoleculares (Dong et al., 1995).

A formação de agregados geralmente ocorre devido a alterações na estabilidade estrutural ou da solubilidade da proteína. No caso da estabilidade estrutural, essas alterações se referem a diminuição da energia de ativação dos estados nativos para os estados de transição não ativos da molécula. Já a agregação pela alteração da estabilidade coloidal de proteínas causada não

por modificações estruturais da molécula, mas por interações atrativas intermoleculares entre as proteínas em solução, principalmente as interações eletrostáticas de Coulomb e de van der Waals (Chi et al., 2003).

O processo de agregação é influenciado por diversos fatores, como pH, força iônica, temperatura e características do solvente (Randolph et al., 2002). Diversos procedimentos tem sido utilizados para evitar a formação destes agregados, como o uso de sais para solubilização, co-solutos como a sucralose (Krishnan et al., 2002), surfactantes, moléculas anfipáticas que formam uma estrutura micelar ao redor da molécula e aumentam sua solubilidade. Semelhantes às micelas, novos sistemas nanoparticulados de liberação controlada tem sido testados não só com a finalidade de evitar a agregação de fármacos, mas também intensificar ou modular seu efeito. Esses sistemas de liberação ou entrega de drogas tem sido o foco de diversos estudos biotecnológicos, sendo que existem diversos modelos, de diversas composições e tamanhos, que corroboram para a atividade da molécula que carregam.

1.8. Sistemas de liberação controlada

Com os últimos avanços da nanotecnologia na área biomédica, novos sistemas de liberação controlada de drogas, em escala nanométrica, tem sido criados a fim de alterar e intensificar características estruturais e funcionais de novos fármacos (Hoet, 2004). Além disso, dependendo da composição e estrutura, estes sistemas particulados podem ser direcionados especificamente para o local da patologia, como tecidos específicos, vírus, bactérias ou células tumorais. Esses sistemas híbridos são fundamentais para novos tratamentos do câncer ou de doenças imunológicas (Sinha et al., 2006). Dentre as vantagens do uso destes sistemas, destaca-se o aumento da biodisponibilidade e biodistribuição do fármaco, redução dos efeitos colaterais e uso de doses menores.

São exemplos de sistemas de veiculação e liberação controlada de drogas, as emulsões, nanogéis, lipossomas, cápsulas, nanotúbulos,

microtúbulos, dentrímeros, nanopartículas magnéticas, de sílica ou de polímeros biocompatíveis (Wang et al., 2008). Estas nanopartículas poliméricas se destacam por serem biocompatíveis e biodegradáveis em condições fisiológicas, não desencadeando resposta imunológica ou inflamação e sendo, por fim, excretadas pelo organismo (Lima, 2000). Estes sistemas são classificados como sistemas de liberação controlada do tipo polimérico, sendo divididos de acordo com seus mecanismos de liberação (Brannon-Peppas, 2002).

As nanopartículas podem apresentar duas estruturas distintas: a nanoesfera e a nanocápsula (Fig. 4). No caso da nanoesfera, o ativo encontra-se disperso homogeneamente no interior da matriz polimérica, consistindo de um sistema monolítico onde não se identifica um núcleo (Azevedo, 2002). Na nanocápsula, a molécula é envolvida por uma membrana que o separa do meio externo, onde é possível identificar um núcleo diferenciado. A incorporação de proteínas ou peptídeos pela nanopartícula ocorre de três maneiras: absorção, bioconjugação e encapsulamento (Marco et al., 2009).

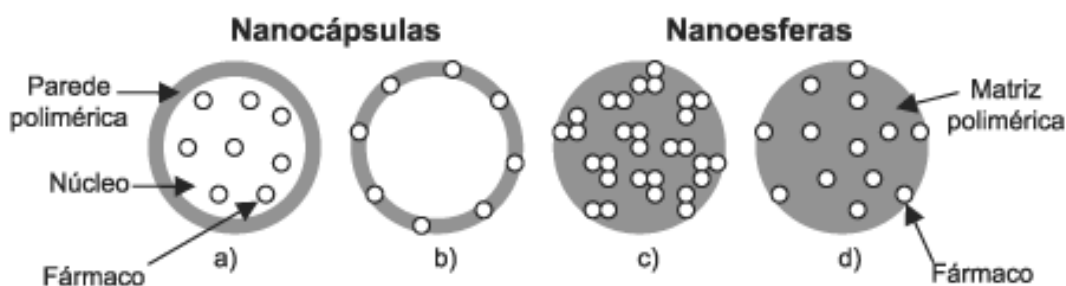


Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas a) fármaco no núcleo, b) fármaco retido na parede polimérica; e nanoesferas c) fármacos retidos na matriz polimérica e d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica. Fonte da imagem: (Schaffazick, 2003).

No processo de absorção, a molécula é absorvida pela superfície da partícula de acordo com sua afinidade, tanto em altas quanto em baixas concentrações. Essa superfície híbrida tem papel importante para transporte pela membrana celular, embora haja problemas com tamanho final da partícula e toxicidade da molécula encapsulada (Lynch et al., 2008). Na bioconjugação, há a incorporação do fármaco por meio de ligações covalentes com os

polímeros da nanopartícula causando mudanças físico-químicas no sistema, representando uma alternativa quando a interação proteína/superfície pode ser revertida por mudanças de pH, temperatura e força iônica (Marco et al, 2009).

No processo de encapsulamento, o polímero envolve a proteína, sendo que esta permanece no seu interior até ser liberada. O encapsulamento da molécula representa uma estratégia para prevenir a agregação e desnaturação e reduz respostas imunológicas, embora, em casos específicos, a interação proteína-proteína seja danosa para sua atividade. Para o encapsulamento, os polímeros biodegradáveis são os mais indicados, por longa circulação na corrente sanguínea e alta capacidade de carreamento (Marco et al, 2009).

1.9. Nanopartículas poliméricas

Dentre os diversos polímeros utilizados para elaboração de sistemas de entrega ou liberação controlada, destacam-se os polímeros sintéticos, naturais modificados e naturais, como colágeno, celulose e quitosana. A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, um biopolímero abundante encontrado em exoesqueletos de artrópodes e crustáceos e é também um importante componente da parede celular de fungos (Herring, 1979) (Fig 5). Enquanto a quitina possui 6-7% de nitrogênio em sua estrutura, a quitosana possui 7-9,5% e apresenta grande variação de massa molecular (Mathur et al., 2010).

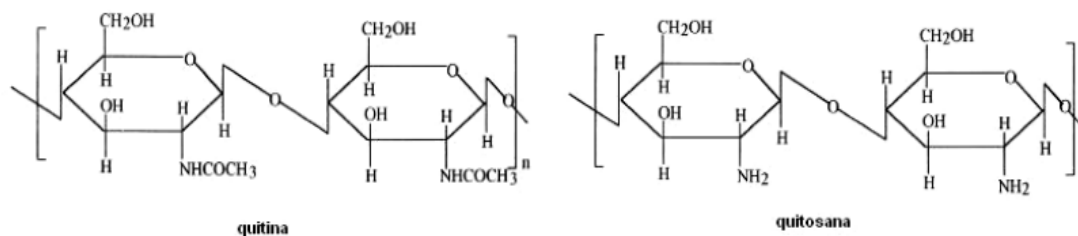


Figura 5: Estruturas moleculares da quitina e quitosana. Fonte da imagem:(Azevedo, 2007).

O polímero de quitosana é catiônico, com grupos amino livres, o que o torna insolúvel em pHs neutros e básicos, sendo necessário uma acidificação do solvente para sua solubilidade (Agnihotri et al., 2004). Esta molécula tem

sido intensamente estudada devido às várias aplicações em imunomodulação, homeostase, controle do colesterol, atividade antimicrobiana, propriedades antioxidantes e principalmente como carreadores de fármacos (Khoushalb et al., 2010). Esse polímero funciona como um carreador, pois forma estruturas coloidais, nano ou micrométricas, que podem abrigar macromoléculas de diversas formas (Dev et al., 1979).

Já foram descritos na literatura, diversos métodos para a produção de partículas de quitosana. A escolha do método mais adequado depende de fatores como tamanho de partícula desejada, estabilidade química e térmica do fármaco a ser encapsulado, reprodutibilidade da cinética de liberação, além da estabilidade do produto final e da toxicidade associada a ele (Agnihotri et al., 2004). As vantagens da utilização da quitosana para síntese de nanopartículas são muitas, incluindo seu baixo custo de produção por ser extraída de descartes de conchas e carapaças e por serem estáveis, biocompatíveis e pouco tóxicas (Ichikawa *et al*, 2005). Além disso, a preparação das nanopartículas é simples, realizada por meio de processo físico ou químico.

Além da quitosana, existem outras opções de polímeros e preparações, dependendo das características estruturais da molécula a ser encapsulada e da necessidade de polímeros com carga e características específicas. Uma alternativa é o PLGA, ácido poli-lático-co-glicólico, um copolímero sintetizado por meio da copolimerização de dois diferentes monômeros, dímeros cíclicos de ácido glicólico e ácido lático (Fig. 6). As formas de PLGA são identificadas em relação a razão dos monômeros utilizados. O PLGA 50:50 (v/v) é usualmente o mais utilizado na nanotecnologia (Lü *et al.*, 2009).

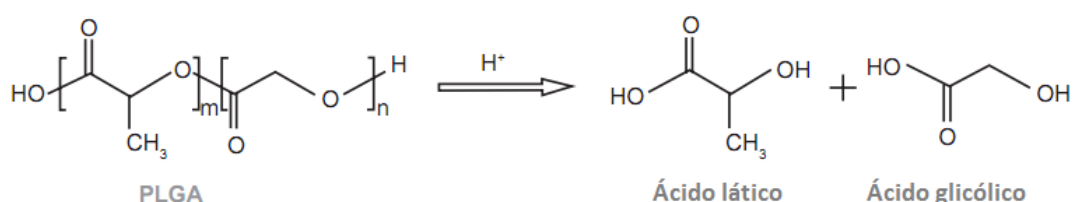


Figura 6. Degradação de PLGA em ácido lático e ácido glicólico, ilustrando as moléculas do copolímero e seus componentes. Fonte da imagem: (Dinarvand *et al.*, 2011).

O PLGA é um polímero aniônico, o qual tem sido muito utilizado para síntese de sistemas de liberação controlada devido a biocompatibilidade, biodegradação e resistência mecânica. As características de seus sistemas nanoestruturados, como degradação e cinética de liberação, podem ser precisamente controladas devido às propriedades físico-químicas do polímero, como massa molecular e polidispersividade. Muitos métodos para produção das nanopartículas de PLGA são utilizados, como emulsificação por evaporação do solvente, por difusão do solvente, por *salting-in* reverso, ambas metodologias divididas em dois passos de produção e a nanoprecipitação. Este último método consiste em apenas um passo, onde os solventes são removidos por evaporação. Nanopartículas de PLGA tem sido utilizadas na terapia e diagnóstico contra o câncer devido às características compatíveis do polímero (Dinarvand *et al.*, 2011).

1.10. Peptídeos derivados de moléculas naturais

Muitas das novas biomoléculas estudadas devido ao seu potencial farmacológico são extraídas de plantas selvagens ou cultivadas pelo homem. A extração destas proteínas, no entanto, apresenta baixo rendimento quando comparadas às proteínas recombinantes, pois são diretamente afetadas por condições climáticas, técnicas de cultivo e outros fatores de difícil padronização, como as condições de isolamento e purificação a partir de extratos complexos. Quando é necessária a obtenção de grandes quantidades destas moléculas, visando produção industrial, uma alternativa é o desenho e a síntese química de peptídeos derivados da molécula nativa e cuja atividade seja mantida em sua totalidade ou pelo menos parcialmente. Estes apresentam inúmeras vantagens, dentre as quais a obtenção de grandes quantidades em curtos períodos de tempo, controle do grau de pureza, das condições de produção e dos custos (Rates, 2001).

Uma etapa crucial para o desenvolvimento da droga sintética é o desenho da molécula, que deve conservar sua atividade e estrutura. No caso de peptídeos derivados de inibidores de proteinases, estes devem se ligar e bloquear a atividade da enzima, mesmo com seu tamanho reduzido. No

entanto, a distribuição assimétrica de resíduos polares e apolares e a grande área superficial relativa fazem com que os peptídeos derivados apresentem dificuldade em se ligar às enzimas ou manter estável esse complexo de inibição (Kawashima et al., 1997). Avanços têm ocorrido nesta área e alternativas, como a criação de bibliotecas de peptídeos ativos e análises computacionais, tem corroborado para a descoberta de peptídeos com propriedades terapêuticas melhoradas ou não encontradas nos compostos originais (McBride et al., 2001).

São encontrados na literatura diversos exemplos de peptídeos derivados de inibidores de serinoproteinases da família Bowman-Birk que preservam função inibitória e estrutura semelhante à molécula de origem (McBride et al., 2001). A família dos inibidores do tipo Bowman-Birk se distingue de outras famílias pelo número de resíduos de aminoácidos e pelo número de ligações dissulfeto. Esses inibidores apresentam uma característica peculiar, como a presença de dois domínios homólogos e simétricos, distinguíveis por ligações dissulfeto contendo cada um uma alça com o sítio reativo para o processo de inibição (Chen et al., 1992). Em 1973, Odani e Ikenaka demonstraram que inibidores BBIs poderiam ser seccionados em duas porções inibitórias, sem perda de atividade.

Em 1977, Nishino e colaboradores sintetizaram o primeiro peptídeo mimético do BBI e demonstraram que suas atividades eram conservadas em fragmentos com poucos resíduos de aminoácidos fechados por uma ligação dissulfeto. Um dos peptídeos derivados dos BBIs mais conhecidos e eficientes é o peptídeo derivado do inibidor de tripsina SFTI-1, extraído de sementes de girassol, que é mais potente do que todos os outros inibidores naturais da família Bowman-Birk (Zablotna et al., 2002), agindo também como um inibidor de catepsina G e matriptase, enzimas comumente relacionadas ao câncer (Long et al., 2001). Desde então, diversos peptídeos derivados de inibidores tem sido testados contra patologias, inclusive peptídeos bivalentes, que podem inibir as proteinases tripsina e quimotripsina simultaneamente (Jaulent et al., 2004).

Resultados recentes com peptídeos derivados específicos do BTCl mostraram que estes conservam a capacidade inibitória e também os efeitos anticarcinogênicos contra células de câncer de mama (Joanitti, 2008). Em outro estudo, foi mostrado que os peptídeos derivados do BTCl, similarmente ao BTCl, inibem a atividade proteolítica do proteassoma 20S, o que indica uma atuação destes peptídeos no ciclo celular (Souza, 2010). Análises computacionais também foram realizadas com estes peptídeos derivados em relação ao seu deslocamento através da bicamada lipídica. Nesse estudo observou-se que este transporte ocorre na ausência de barreira energética, independente de receptores ou carreadores de membrana (Pinheiro, 2009), agindo de forma semelhante aos peptídeos conhecidos com *Cell-penetrating Peptides (CPP)*. Estes peptídeos atravessam a membrana celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* por meio de motivos ricos em resíduos carregados positivamente (Lindsay, 2002). Estes peptídeos tem sido extensivamente estudados devido à possibilidade de conjugação com moléculas de interesse, aumentando a eficiência do transporte intracelular (Schwarze et al., 2000) e, como consequência, aumentando a atividade anti-tumoral do fármaco, por exemplo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados de liberação controlada, contendo o inibidor de proteinases BTCl e peptídeos derivados.

2.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar os peptídeos derivados do BTCl, Pep 1 e Pep 2;
2. Purificar e analisar a atividade inibitória do BTCl e seus peptídeos derivados (Pep 1 e Pep2) contra a tripsina e quimotripsina;
3. Produzir e caracterizar os sistemas particulados contendo BTCl quanto a sua eficácia de encapsulamento, morfologia e estabilidade.

4. Material e Métodos

Reagentes	Fabricante
Acetato de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Acetona	Sigma-Aldrich Co., EUA
Acetonitrila	J.T. Baker, EUA
Ácido acético	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Acido clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Acrilamida	Vetec Química Fina Ltda, BRA
BAPNA	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de cálcio	Reagen Indústria AS, BRA
DIPEA	BD Orapak, BRA
DMF	Synth LTDA, BRA
Etanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Fenol	Sigma-Aldrich Co., EUA
Fosfato de sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
GPNA	Sigma-Aldrich Co., EUA
HBTU	Peptides international, EUA
NaOH	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Piridina	Sigma-Aldrich Co., EUA
PLGA	Sigma-Aldrich Co., EUA
PMSF	Roche Applied Science, EUA
POPC	Sigma-Aldrich Co., EUA
Quimotripsina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Quitosana	Sigma-Aldrich Co., EUA
Sulfato de Amônio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
TCA	Vetec Química Fina Ltda, BRA
TFA	Sigma-Aldrich Co., EUA
TPP	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tripsina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tris	Invitrogen, EUA
Triton-x	Proquímios, BRA

Materiais	Fabricante
Tubos de polietileno de 15 e 50 mL	TPP, ALE
Tubos de polietileno de 1,5 mL	Kartell, ITA
Papel Filtro	J Prolab, BRA
Filtros de poro 0,22 e 0,45 µm	Millex, BRA
Amycons poro 100 Kda	Millipore, EUA
Placa 96 poços	TPP, ALE
Membranas de diálise	BioRad, EUA
Seringa de síntese	BD Orapak, BRA
Ponteiras	Axygen Scientific, EUA

3.1. Purificação do BTCl

3.1.1 Obtenção do extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata*

As sementes de *Vigna unguiculata*, variedade seridó, foram cultivadas na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília. Após três meses do plantio, as vagens maduras foram colhidas e os grãos selecionados manualmente e estocados a 4°C até a produção do extrato bruto.

O extrato bruto do BTCl foi obtido pelo método descrito por VENTURA (1966). As sementes de *Vigna unguiculata* foram separadas das vagens e as impurezas, como terra e folhas secas, foram retiradas. Essas sementes foram descascadas e trituradas. Cerca de 500 gramas dessa farinha foram adicionados a dois litros de água destilada contendo 200 µL de inibidor de proteinases fenilmetilsulfonilfluor (PMSF) 200 mM e deixados sob agitação por cerca de 12 horas, sendo posteriormente homogeneizados em liquidificador.

A suspensão obtida foi filtrada em malha de algodão e precipitada com ácido tricloroacético (TCA) 2,5% e filtrada em seguida. O filtrado foi centrifugado a 8000 g por 30min a 4°C e o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônia 50%. Após uma hora de agitação, o filtrado foi novamente centrifugado a 8000 g por 40min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão e dialisado em água destilada, liofilizado e armazenado a -20°C até o uso.

3.1.2 Cromatografia de troca iônica e pureza da amostra.

O BTCl foi purificado em coluna de troca iônica (3,5 x 23 cm) com a resina DEAE-celulose. Essa resina foi inicialmente ativada com lavagens sucessivas de 150 mL de HCL 0,2 M, 300 mL de água destilada, 150 mL de NaOH 0,2 M e 300 mL de água destilada. A quantidade de 300 mg de extrato bruto foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,3 e aplicados na coluna. A eluição do BTCl foi realizada após lavagem da coluna e aplicação de um gradiente linear de NaCl 0-0,8 M, com o fluxo de 3,5 mL por minuto. As frações eluídas foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro com

leituras da absorbância em 280 nm. As frações correspondentes ao pico do BTCl puro foram dialisadas e liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.2 Obtenção dos peptídeos derivados do BTCl

3.2.1 Síntese dos peptídeos por fase móvel

Os peptídeos Pep1 e Pep2 derivados do BTCl foram sintetizados com base no método de síntese manual em suporte sólido sendo o Pep 1 reponsável pela inibição da tripsina e o Pep 2 da quimotripsina. Primeiramente, foram pesados 392 mg de resina sólida Fmoc (0,2 mmol) ligada ao primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica e colocada em uma seringa para síntese. A desproteção do grupo Fmoc da porção N-terminal do aminoácido foi realizada com solução de piperidina (duas vezes o volume da resina), sob agitação constante por 30 minutos, seguida da lavagem com metanol e N,N-dimetilformamida (DMF), alternadamente, por quatro vezes. Para acoplamento do próximo resíduo, foi utilizado 0,4 mmol de Fmoc- aminoácido, 132 µL de N, N-diisopropiletilamina (DIPEA), 128,4 mg de hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) e 2 mL de DMF, deixando a resina em solução sob agitação por 1:30 hora. Após esse período, a resina foi lavada quatro vezes com metanol e DMF, alternadamente. Esses passos foram repetidos até o acoplamento de todos os aminoácidos.

A eficiência do acoplamento e da desproteção do Fmoc foram analisadas com o teste de ninhidrina, que permite detectar a presença do grupo N-terminal livre a partir da interação desse reagente com o grupo amino. O ensaio é realizado com a fração da resina em solução, na presença dos reagentes A (KCN 2%, piridina 98%), B (fenol 80%) e C (ninhidrina, etanol 5%) na proporção 1:1:2, a 50°C, por dois minutos. A reação positiva da ninhidrina com as amins livres, sem estarem protegidas pelo grupamento Fmoc, resulta uma solução de coloração azulada. Essa reação é esperada depois da desproteção da porção N-terminal para posterior acoplamento do próximo resíduo. Na reação negativa, a solução permanece amarela e indica que as amins dos resíduos de aminoácidos não estão livres, e sim protegidas pelo

grupamento Fmoc. Nesse caso, o acoplamento é considerado bem sucedido, onde o novo resíduo, ainda protegido, reage com a maioria das cadeias peptídicas.

Após o término da síntese, o peptídeo ligado à resina foi retirado a partir da resina parcialmente seca, utilizando nitrogênio gasoso, e depois depositado em um funil de placa porosa. A resina foi lavada várias vezes com éter diisopropílico gelado para precipitação do peptídeo e exclusão dos subprodutos orgânicos. Finalmente, o peptídeo foi extraído da resina com sucessivas lavagens de água e acetonitrila 1:1, sendo este extrato bruto congelado e liofilizado para ser purificado por cromatografia de fase reversa.

3.2.2 Reação de formação das ligações dissulfeto.

A formação da ligação dissulfeto entre os dois resíduos de cisteína presentes em ambos os peptídeos derivados, Pep1 e Pep2, foi realizada por oxidação com oxigênio atmosférico. Para isso, 2 mg do extrato bruto foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 8 e a solução foi deixada à temperatura ambiente, por três dias, em recipiente em contato com o ar.

3.2.3 Purificação dos peptídeos por fase reversa em HPLC.

Os peptídeos sintéticos foram purificados por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa, RP-HPLC, em uma coluna semipreparativa C18 (Vydac 10 x 250 mm 300 Å). Antes da cromatografia a coluna foi lavada com acetonitrila 95% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, durante 20 minutos, e equilibrada com acetonitrila 5% e TFA 0,1%, durante 15 minutos. A amostra de 2 mg do extrato bruto peptídico solubilizados em 500 µL de água Milli-Q foi filtrada em filtro Millipore 0,22 µm e centrifugada a 8000 g por cinco minutos. A amostra aplicada à coluna foi submetida ao gradiente linear de 5 a 95% de acetonitrila, durante 90 minutos, com um fluxo de 2,5 mL/min. O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura da absorbância em 216 nm e 256

nm. As frações foram coletadas manualmente, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

3.2.4 Análise da pureza dos inibidores e oxidação dos peptídeos.

A pureza do BTCl e peptídeos derivados, bem como a oxidação das cisteínas presentes nos peptídeos, foi analisada no espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex II. As amostras foram adicionadas a uma matriz de α -ciano-4-hidroxi-cinamico na proporção de 3:1. Cerca de 1 μ L dessa mistura foi depositada, em triplicata, em uma placa e os dados foram obtidos em modo refletido positivo e analisados com o software FlexAnalysis.

A concentração dos peptídeos purificados foi estimada pelo método de Murphy e Kies (1960), considerando-se as absorbâncias registradas em 205, 215 e 225 nm e a expressão abaixo:

$$(A_{215} - A_{225}) \times 144 = X \quad (1)$$

$$(A_{205}) \times 31 = Y$$

$$[(X + Y) / 2] \times \text{fator de diluição [} \mu\text{g/mL]}$$

Onde A_{215} , A_{225} e A_{205} são as absorbâncias da amostra de peptídeos nos comprimentos de onda 215 nm, 225 nm e 205 nm, respectivamente.

3.3 Ensaios de atividade inibitória

3.3.1 Ensaio de inibição para tripsina

Para os ensaios de inibição da tripsina pelo BTCl e Pep 1, a solução da enzima foi preparada na concentração de 64 μ g/mL em HCl 1mM. O substrato sintético cromogênico específico para tripsina, N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), foi preparado na concentração de 0,43 mg/ml em Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 20 mM pH 8,2. Soluções do BTCl e Pep1 foram preparadas em várias (0 a 20 μ M) concentrações em 40 μ L de tampão de ensaio e incubadas com 40 μ L da solução de enzima em uma placa de 96 poços, à

temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, 200 μ L da solução de substrato foram adicionados à solução de enzima mais o inibidor e a solução foi incubada por mais 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida com a adição de 30 μ L de ácido acético 30%. A inibição enzimática foi acompanhada pelas leituras de absorvância em 410 nm, correspondendo ao produto formado, p-nitroanilida, pela hidrólise do substrato.

3.3.2 Ensaio de inibição para quimotripsina

Para os ensaios de inibição da quimotripsina pelo BTCl e Pep 2, a solução de enzima na concentração de 0,63 mg/mL foi preparada em HCl 1 mM. O substrato sintético cromogênico específico para quimotripsina, N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA), foi preparado na concentração de 0,4 mg/mL em Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM pH 7,6. Soluções do BTCl e Pep 2 foram preparadas em várias concentrações (0 a 50 μ M) em 40 μ L de tampão de ensaio e incubadas com 40 μ L da solução de enzima em uma placa de 96 poços, à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, 200 μ L da solução de substrato foram adicionados a solução de enzima mais o inibidor e incubados por mais 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L de ácido acético 30%. A inibição enzimática foi acompanhada pela leitura da absorvância em 410 nm do produto formado p-nitroanilida, resultante da clivagem do substrato

3.3.3. Determinação das constantes de inibição do BTCl e peptídeos derivados contra as proteinases.

As curvas de inibição foram construídas considerando as atividades enzimáticas relativas versus concentrações do BTCl ou peptídeos. A constante de inibição (K_i) do complexo formado entre BTCl/peptídeos e as enzimas tripsina e quimotripsina foram determinadas utilizando o programa Grafit, com o ajuste das curvas de inibição pela equação de Morrison (2):

$$AE = 1 - \frac{(E + I + K_i) - \sqrt{(E + I + K_i)^2 - 4E \cdot I}}{2E} \quad (2)$$

Onde AE e E representam a atividade enzimática e a concentração da enzima, I a concentração de inibidor e K_i a constante de inibição.

3.4 Efeito da interação entre peptídeos e modelos de membrana.

3.4.1 Síntese e purificação de lipossomas com carboxi-fluoresceína

Os lipossomas foram preparados a partir de 40mg do fosfolípido palmitoil-oleoil-phosphatidil-colina (POPC) dissolvidos em clorofórmio. A solução foi mantida no rotoevaporador por 15 minutos e no liofilizador por mais duas horas, para eliminação de resíduos do solvente. O filme lipídico foi ressuspense em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 contendo 5mg de carboxi-fluoresceína. O encapsulamento da carboxi-fluoresceína foi otimizado utilizando-se a metodologia "freeze-thaw" que consistiu de congelar e aquecer rapidamente essa solução, por sete vezes, até a temperatura de transição do fosfolípido (43°C). O tamanho das vesículas foi padronizado pelo método de extrusão, utilizando-se uma membrana com poros de 100 nm (Persson *et al*, 2004).

Os lipossomas encapsulados foram purificados por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-50. As primeiras frações contendo os lipossomas foram coletadas e as frações posteriores contendo carboxi-fluoresceína livre, identificadas visualmente pela coloração amarela do fluoróforo, foram descartadas.

3.4.2 Interação dos peptídeos com os lipossomas

A interação entre os peptídeos e a membrana dos lipossomas foi monitorada pelo extravasamento de carboxi-fluoresceína dos lipossomas, por meio da análise de fluorescência registradas nos espectros de emissão de 450 a 650 nm ($\lambda_{exc}=480$ nm). Primeiramente, 30 μ l da preparação de vesículas

encapsuladas foram diluídas em tampão fosfato de sódio pH 7,4 100 mM para um volume final de 3 mL. A emissão de fluorescência da amostra sem os peptídeos foi acompanhada, em relação ao tempo, correspondendo à linha de base dos espectros. A interação da membrana das vesículas com cada peptídeo, em diferentes concentrações, foi monitorada pela banda de emissão da carboxi-fluoresceína de 650 a 450 nm. O extravasamento total de carboxi-fluoresceína por rompimento da membrana dos lipossomas, correspondente ao controle positivo, foi realizado com a adição de 120 µL de TRITON 100-X 10%.

3.5 Encapsulamento de BTCl em nanopartículas

3.5.1 Síntese de nanopartículas de ácido poli láctico co-glicólico (PLGA)

As nanopartículas de PLGA foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação. A solução de 1 mg de BTCl dissolvido em 125 µL de migliol foi incubada em banho de ultra-som por 20 minutos, seguido da adição de 10 mL de acetona contendo 40 mg do polímero PLGA 50:50 e 40 mg do surfactante Span60. Nessa solução foi adicionada, lentamente, 20 mL de Tween 80 0,15%. Após 15 minutos de incubação, sob agitação constante, a acetona foi removida por meio de rotoevaporação, a 60°C, e o volume restante foi liofilizado para preservar as nanopartículas.

3.5.2 Síntese de nanopartículas de quitosana

3.5.2.1 Método Químico

Nanopartículas de quitosana contendo o BTCl foram produzidas pelo método de geleificação ionotrópica, onde a molécula de quitosana sofre modificações químicas pela adição de tripolifosfato de sódio (TPP). A suspensão foi preparada com quitosana 0,4% em solução de ácido acético 0,1 M. A mistura foi deixada sob agitação por 60 minutos para a solubilização do polímero e filtrada em filtro de poro 0,22 µm. O BTCl foi adicionado à solução de quitosana filtrada na concentração de 100 µM. Tripolifosfato de sódio

2mg/mL foi adicionado à solução na proporção de quitosana e TPP de 2:1. Essa suspensão foi deixada sob agitação por 5 minutos para homogeneização.

3.5.2.2 Método físico

Para a produção de nanopartículas pelo método físico, foi utilizada uma solução de quitosana 1% em ácido acético 0,2 M. O BTCI nas concentrações de 50, 100 e 200 µM foi adicionado à solução de ácido acético 0,2 M, antes da adição de quitosana, para produção de nanopartículas contendo o inibidor. Para as preparações de partículas no pH 7 e 9, tampão fosfato de sódio 20 mM foi adicionado a solução de ácido acético 0,2 M, nos respectivos pHs. Após a solubilização completa da quitosana, a suspensão foi homogeneizada no vórtex e congelada em nitrogênio líquido para ser liofilizada. O filme de nanopartículas foi ressuspensão em água ou nos devidos tampões e armazenados à -20°C.

3.5.3 Eficiência de encapsulamento do BTCI nas nanopartículas.

O BTCI livre foi separado das partículas para cálculo da eficiência de encapsulamento do inibidor. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3300 g e a 10°C em um tubo de 1,5 mL acoplado a uma membrana de diálise de poro com diâmetro de 100 kDa (Microcon[®]). O sobrenadante contendo apenas o BTCI livre foi liofilizado e quantificado pelo método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

Inicialmente, foi adicionado 1 mL de solução Lowry C, composta da solução Lowry A (Na₂CO₃ 20 mg/mL, NaOH 4 mg/mL, tartarato de Na⁺ e K⁺ 1,6 mg/mL e SDS 10 mg/mL) e Lowry B (CuSO₄.5H₂O 40 mg/mL) na proporção 100:1. As amostras foram incubadas por 30 minutos e adicionadas a 100 µL do reagente Folin e água na proporção 1:1. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 120 minutos em ambiente escuro. Após duas horas, a absorbância de cada amostra foi lida a 730 nm e a concentração da proteína estimada a partir da curva padrão obtida com amostras de albumina sérica bovina. A eficiência de encapsulamento das nanopartículas foi estimada

subtraindo a concentração do BTCI não encapsulado da concentração total de BTCI utilizada na preparação.

3.5.4 Análise das nanopartículas por microscopia de força atômica.

As análises das dimensões e formas das partículas de quitosana e BTCI foram realizadas em um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu, Japão), com scanner de 125 μm , utilizando uma ponteira de nitreto de silício acoplada a um cantilever e operando no modo dinâmico com constante de mola de 0,15 N/m. As amostras das partículas de quitosana e BTCI, em diferentes concentrações e pHs, foram depositadas em uma superfície de mica e analisadas depois de secas. As imagens foram obtidas na resolução de 512 x 512 pixels em uma área de varredura de 5 μM x 5 μM que foram processadas e analisadas utilizando o programa SPM-9600 off-line, com o módulo de análise de partículas.

3.5.5 Análise do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das partículas.

O Espalhamento de Luz Dinâmico é uma técnica que analisa as alterações de intensidade da luz dispersa pela amostra, relacionando o movimento Browniano e o tamanho das partículas analisadas. Além de determinar o diâmetro hidrodinâmico, por meio dessa técnica é possível também determinar o potencial zeta ou carga superficial da partícula. O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento entre a camada de íons ligada à superfície da partícula, a camada difusa e o ambiente circundante, sendo calculado a partir da mobilidade eletroforética da amostra.

As nanopartículas contendo o BTCI foram analisadas quanto à carga e dimensões moleculares em solução (carga superficial e raio hidrodinâmico das nanopartículas) neste trabalho. As amostras com diferentes concentrações de inibidor e pHs foram colocadas em cubetas específicas para obtenção dos dados de espalhamento da luz, utilizando o equipamento de espalhamento de

luz dinâmico (Malvern Zeta Sizer Instrument). Os dados foram obtidos à temperatura ambiente, com um ângulo de espalhamento de 173° e analisados utilizando o programa Zeta sizer nano.

3.5.6. Análises das nanopartículas por dicroísmo circular

As suspensões de nanopartículas foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular na faixa distante do ultravioleta (260-190 nm), utilizando o espectropolarímetro Jasco modelo 815 acoplado a um sistema Peltier de controle de temperatura. As amostras analisadas foram as nanopartículas vazias, BTCl livre, mistura de nanopartículas vazias e BTCl livre e as nanopartículas contendo BTCl, após a purificação. As amostras foram diluídas 1:4 em tampão fosfato-salino PBS 1x pH 7,3 para concentração final de 2,5 mg/mL de quitosana e 0,25 mg/mL de BTCl. As soluções foram lidas em cubeta de quartzo 0,1 cm e os dados convertidos de miligraus (θ) para elipcidade molar ($[\theta]$), considerando a equação 3:

$$[\theta]_{mrv} = \frac{(112. \theta)}{(10.L.C)} \text{ (deg.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Onde θ é o sinal dicroico em miligraus, L o comprimento da cubeta utilizada em centímetros, C a concentração da amostra em mg/mL, e $[\theta]_{mrv}$ a elipcidade molar da amostra. Os espectros obtidos foram analisados quanto a intensidade e posição das bandas dicroicas, antes e após o encapsulamento.

3.5.7. Análises das nanopartículas por fluorescência

3.5.7.1 Associação do BTCl e as partículas analisada por fluorescência estática

Os microambientes do triptofano presente no BTCl, analisados por fluorescência estática, foram considerados para detecção do BTCl não encapsulado e as mudanças conformacionais na vizinhança do resíduo que indicam a interação desse inibidor com a superfície da partícula. O BTCl

encapsulado no interior da partícula apresenta pouco ou nenhum acesso a energia de excitação, não emitindo fluorescência. As leituras foram realizadas no equipamento JASCO FP-6500 a 25 graus, por meio da excitação do triptofano em comprimento de onda de 295 nm e emissão em 300 a 400 nm. Os dados foram analisados utilizando o programa Spectra Analysis-JASCO. As preparações de nanopartículas com BTCI foram diluídas na proporção 1:50, nos seus respectivos tampões. Espectros de emissão do BTCI puro, das partículas vazias e das partículas após a purificação foram registrados. Esses resultados foram comparados com aqueles obtidos a partir da quantificação da proteína pelo método de Lowry.

3.5.7.2 Associação do BTCI com as nanopartículas analisada por supressão da fluorescência do BTCI

A supressão de fluorescência do BTCI foi utilizada para acompanhar a associação do BTCI com as nanopartículas, considerando-se as modificações no ambiente do resíduo de triptofano que refletem as mudanças conformacionais da proteína, decorrentes dessa associação. Nestes ensaios foram utilizados os supressores acrilamida 0-0,8 M, iodeto de potássio 0-0,2 M e cloreto de cério 0-0,8 M que apresentam cargas neutra, negativa e positiva, respectivamente. Na solução do supressor iodeto de potássio foi adicionado tiosulfato de sódio para impedir a formação de triiodeto (I_3^-), que absorve energia no mesmo comprimento de onda de excitação do triptofano.

A supressão de fluorescência do BTCI 200 μ M livre e das suspensões de nanopartículas vazias ou contendo BTCI 200 μ M foram registradas em soluções diluídas de 1:50 em ácido acético 0,2M, tampão acetato de sódio 20 mM pH 3 e tampão fosfato de sódio 20 mM pHs 7 e 9. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de excitação de 295 nm e comprimento de onda de emissão de 400-300 nm. Os gráficos de supressão foram obtidos por meio da redução de intensidade do comprimento de onda máximo da emissão de fluorescência com o aumento da concentração do supressor. A intensidade

de fluorescência da amostra sem supressor foi considerada (I_0) e relacionada às intensidades de fluorescência das amostras em relação a concentração do supressor (I). Para o cálculo das constantes de supressão de Stern-Volmer K_{sv} , que indicam a acessibilidade ao triptofano da proteína pelo supressor, foi utilizada a equação clássica de Stern-Volmer (4):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (4)$$

Onde I e I_0 são intensidades de fluorescência na presença e ausência do supressor, K_{sv} a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ a concentração do supressor.

3.5.8 Ensaios de liberação do BTCl pela nanopartícula

Os sistemas nanoparticulados produzidos pelo método físico contendo BTCl nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M nos pHs 3, 7 e 9 foram analisados quanto a liberação do inibidor encapsulado por meio de fluorescência estática, no comprimento de excitação de 295 nm e de emissão de 300 a 400 nm. As suspensões de partículas foram diluídas em tampão PBS NaCl 150 mM pH 7,3 na proporção de 1:50. As amostras foram incubadas em 37°C e suas intensidades de fluorescência medidas nos tempos 0 a 72 horas. As intensidades de fluorescência das partículas vazias, sob as mesmas condições, foram monitoradas em relação ao tempo e consideradas como a linha de base dos espectros. O sinal no comprimento de onda máximo das nanopartículas contendo BTCl no tempo zero foi considerado como 0% de liberação e subtraído dos espectros de BTCl livre, nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M, para obtenção do valor de 100% de liberação.

4.5.9. Atividade inibitória do BTCl em sistemas nanoparticulados.

O inibidor BTCl livre e associado ao sistema nanoestruturado de quitosana foram testados quanto a capacidade de inibição das proteinases

tripsina e quimotripsina, como já descrito no item 3.3. As amostras de BTCI 100 μM e de nanopartículas contendo a mesma concentração do inibidor, produzidas pelo método físico nos pHs 3, 7 e 9, foram diluídas em tampão PBS 1x pH 7,2 e incubadas a 37°C por 48 horas. Essas amostras foram diluídas nos respectivos tampões de ensaio contra a tripsina e quimotripsina, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respectivamente. A atividade inibitória da proteína pura foi considerada como 100% de atividade e comparada com as taxas inibitórias do BTCI associado às partículas.

4. Resultados

4.1- Purificação do BTCl

O perfil cromatográfico da purificação do BTCl está apresentado na figura 7 e a fração correspondente a proteína purificada está indicada pela seta. O BTCl puro é eluído nas frações correspondentes a descida do último pico, até a absorbância mínima de 0,1. As demais frações do pico em destaque são coletadas e dialisadas para recromatografia. O rendimento final da purificação é influenciado por diversos fatores, dentre eles a safra dos feijões e fatores ambientais como clima e índice pluviométrico. A partir de 500 gramas de sementes trituradas, é esperado um rendimento de 40 a 60 mg de proteína pura.

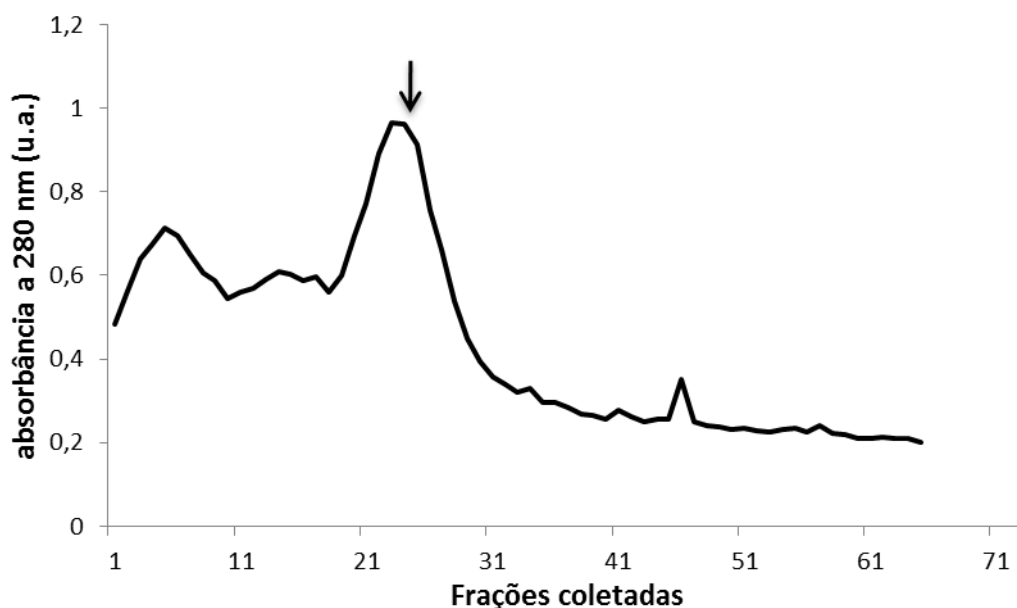


Figura 7. Purificação do inibidor BTCl em cromatografia de troca iônica. Em destaque (seta), o pico onde são coletadas as frações de proteína pura.

As frações da proteína pura foram recolhidas, dialisadas e liofilizadas. Uma alíquota do produto final de cada cromatografia é analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS para avaliação da pureza e massa do BTCl. A figura 8 representa o espectro de massa do BTCl, onde são observados dois picos correspondentes a massa do inibidor e a metade de sua

massa, referente ao BTCI duplamente carregado. A figura 8 comprova o alto grau de pureza do inibidor, que pode ser quantificado e utilizado nos ensaios de atividade e de encapsulamento.

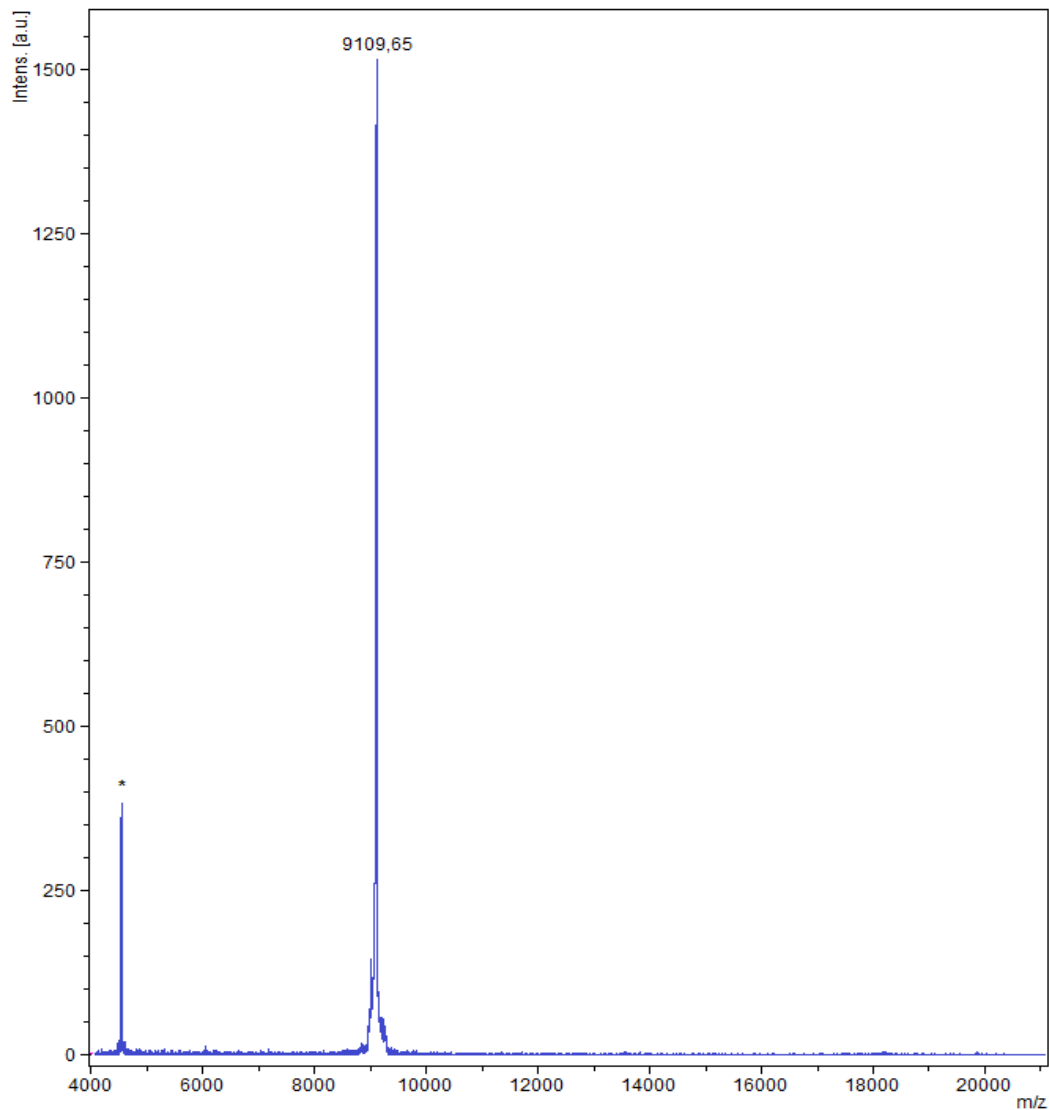


Figura 8. Análise da massa molecular e pureza do inibidor BTCI por espectrometria de massa MALDI-TOF. No gráfico estão representados o pico correspondente ao BTCI ionizado (m/z 9109,65) e o pico (*) correspondente ao BTCI duplamente carregado $[M+2H]^+$.

4.2. Purificação dos peptídeos sintéticos.

Os peptídeos derivados do BTCl, Pep 1 e Pep2, foram sintetizados manualmente por síntese em fase móvel. Após a síntese e clivagem da resina, os peptídeos precisam passar por um processo de oxidação do par de resíduos de cisteína. Ambos os peptídeos apresentam duas cisteínas que devem formar uma ligação dissulfeto fundamental para a conformação ativa da molécula.

As figuras 9 e 10 mostram o perfil cromatográfico do extrato bruto de Pep 1 e Pep 2 em cromatografia de fase reversa (coluna C18). Os peptídeos são eluídos até 26 minutos na concentração do gradiente de acetonitrila de aproximadamente 40%. Conforme mostra o perfil cromatográfico, o peptídeo aparece em maior proporção do que os subprodutos eluídos em até 12 minutos.

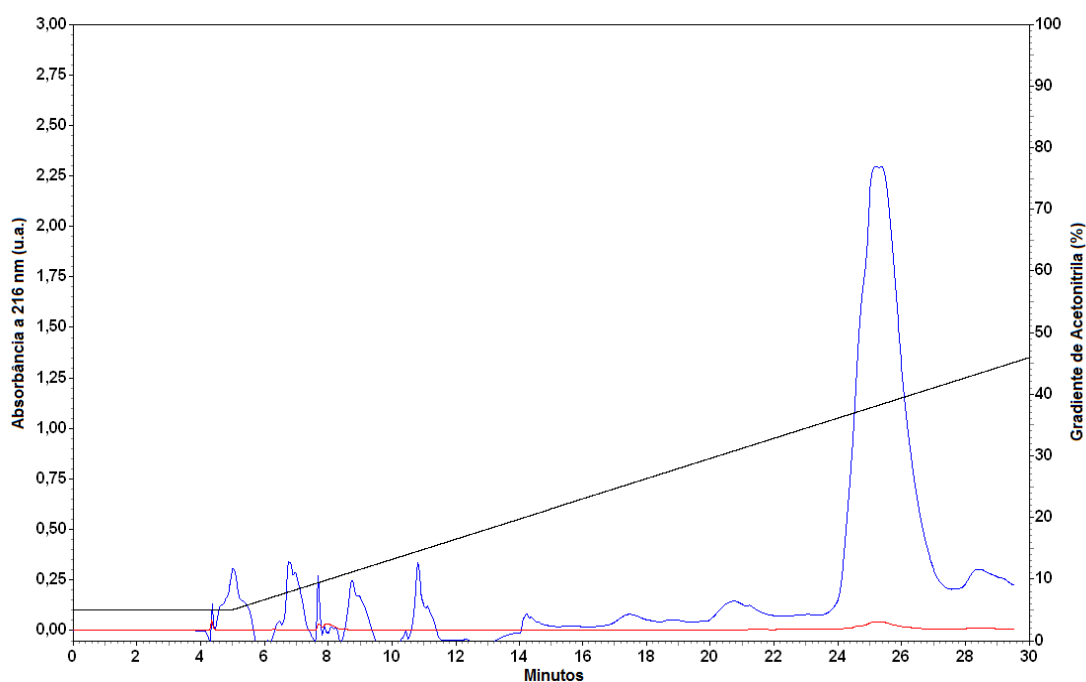


Figura 9. Cromatograma do peptídeo sintético Pep 1 oxidado, produzido por síntese em fase móvel em cromatografia de fase reversa. O gradiente utilizado foi o de acetonitrila de 5-95% (linha preta). A absorbância foi monitorada em 216 (linha azul) e 254 nm (linha vermelha). O pico detectado em 25 minutos representa a fração de peptídeo puro.

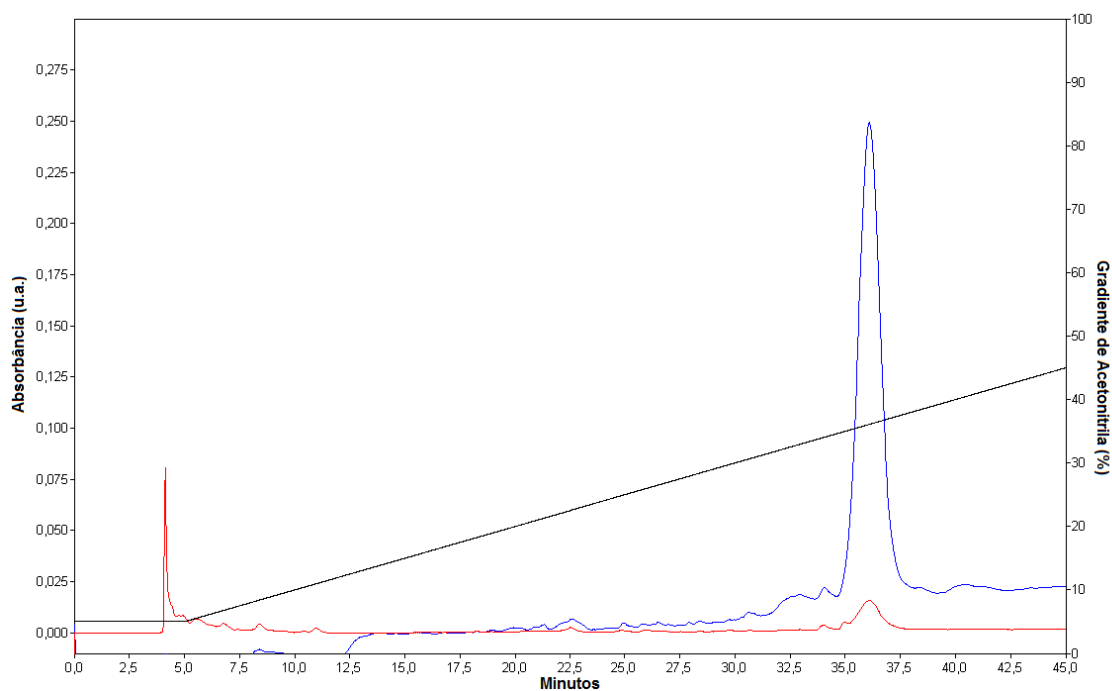


Figura 10: Cromatograma do peptídeo sintético Pep 2 oxidado, produzido por síntese em fase móvel, em cromatografia de fase reversa. Foi utilizado um gradiente de acetonitrila de 5-95% (linha preta). A absorbância foi monitorada em 216 nm (linha azul) e 254 nm (linha vermelha). O pico detectado em 25 minutos representa a fração de peptídeo puro.

Aproximadamente 100 mg do extrato bruto de cada peptídeo foram obtidos a partir de 392 mg de resina Fmoc ligada ao primeiro aminoácido das cadeias peptídicas. A purificação resultou no rendimento superior a 50% para ambos os peptídeos em relação ao extrato bruto aplicado. As figuras 11 e 12 representam os espectros de massa molecular dos Pep 1 e 2, respectivamente, e confirmam a pureza das duas amostras. Três picos predominantes são observados nos dois espectros de MALDI-TOF/MS e representam os peptídeos oxidados na forma livre e na forma de adutos, ligados a Na^+ e a K^+ .

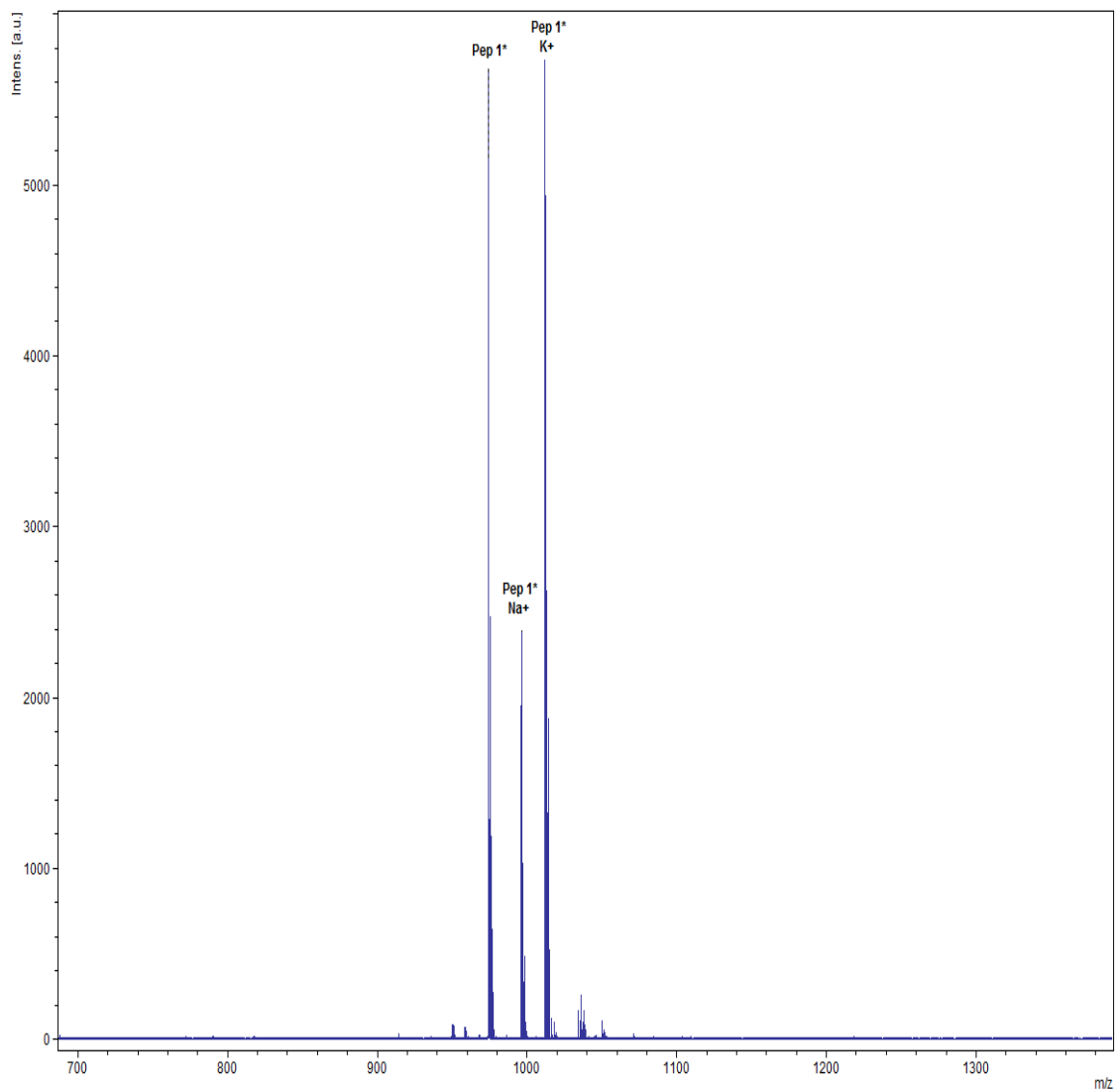


Figura 11. Análise da massa e pureza do peptídeo derivado do BTCl, Pep 1, por espectrometria de massa. No espectro são observados três picos principais, todos correspondentes ao Pep 1. Além da forma livre, são encontrados picos com massa referente ao peptídeo ligado a íons de Na⁺ e K⁺.

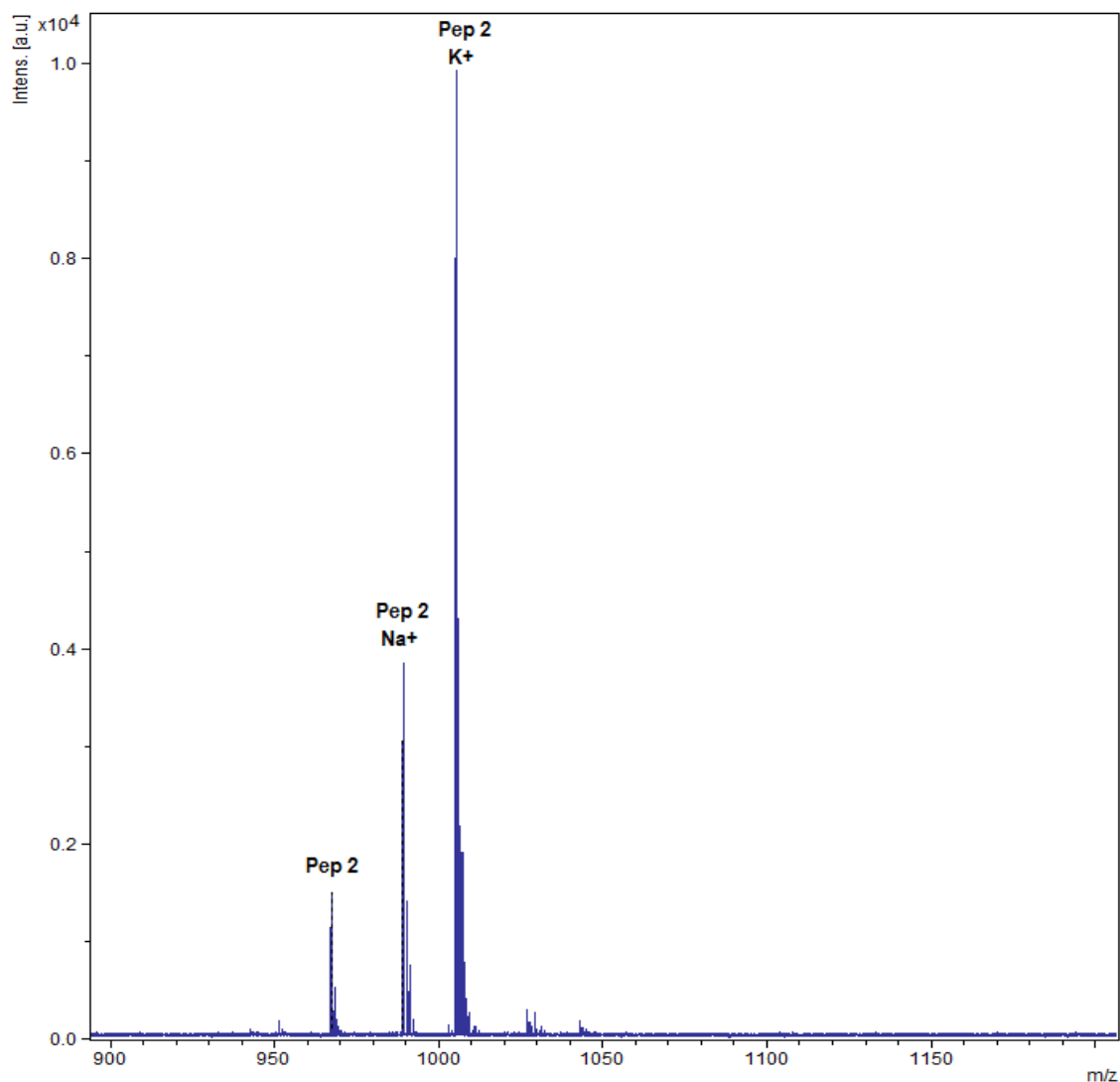


Figura 12. Análise da massa e pureza do peptídeo derivado do BTCl, Pep 2, por espectrometria de massa. No espectro são observados três picos principais, todos correspondentes ao Pep 2. Além da forma livre, é observado no espectro outros dois picos referentes a massa do peptídeo ligado a íons de Na⁺ e K⁺.

4.3- Atividade inibitória do BTCl e peptídeos derivados.

As atividades inibitórias do BTCl e peptídeos derivados contra a tripsina e a quimotripsina estão representadas nas figuras 13 e 14 (BTCl) e figuras 15 e 16 (peptídeos), respectivamente. O Pep 1 foi testado contra a tripsina e o Pep 2 contra a quimotripsina, considerando que os peptídeos apresentam atividade seletiva para apenas uma das enzimas (Joanitti, 2008). Os peptídeos apresentaram atividade inibitória contra as proteinases, demonstrando que sua estrutura e função foram mantidas em relação à proteína nativa.

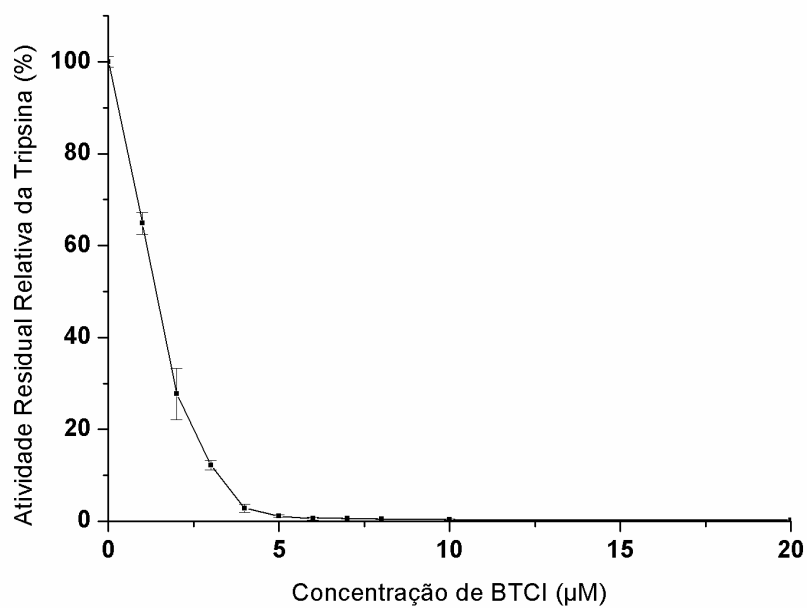


Figura 13. Atividade residual da tripsina na presença do inibidor de proteinases BTCl nas concentrações de 0 a 20 µM. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato cromogênico BAPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorvância a 410 nm.

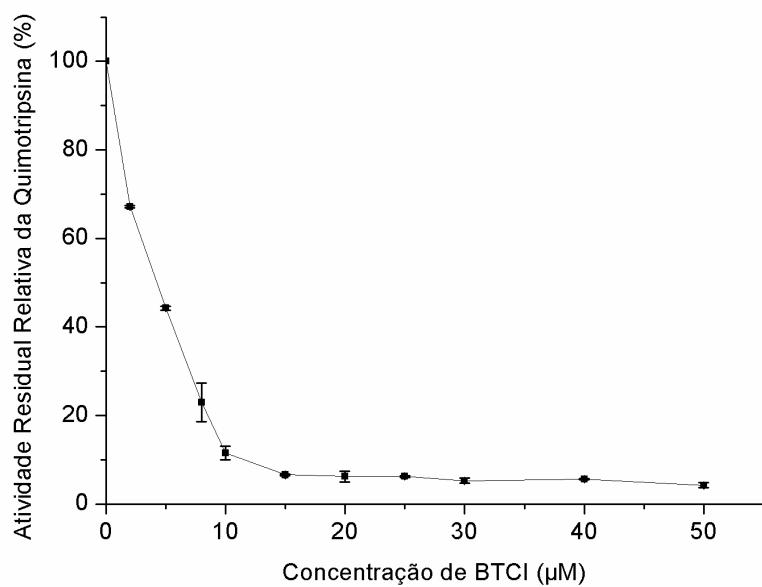


Figura 14. Atividade residual da quimotripsina na presença do inibidor de proteinases BTCl nas concentrações de 0 a 50 µM. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato cromogênico GPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorvância a 410 nm.

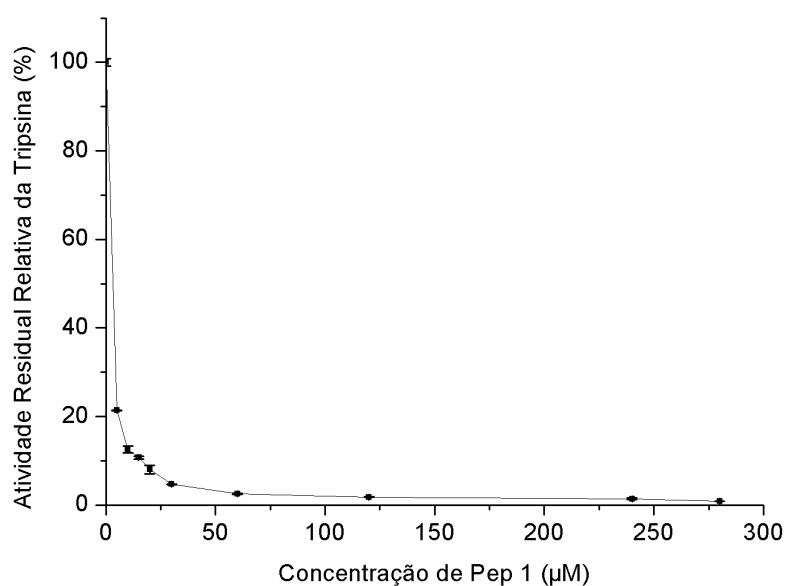


Figura 15. Atividade residual da tripsina na presença do peptídeo derivado do BTCl, Pep 1, nas concentrações de 0 a 160 µM. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato cromogênico BAPNA. A redução da atividade foi monitorada por absorvância a 410 nm.

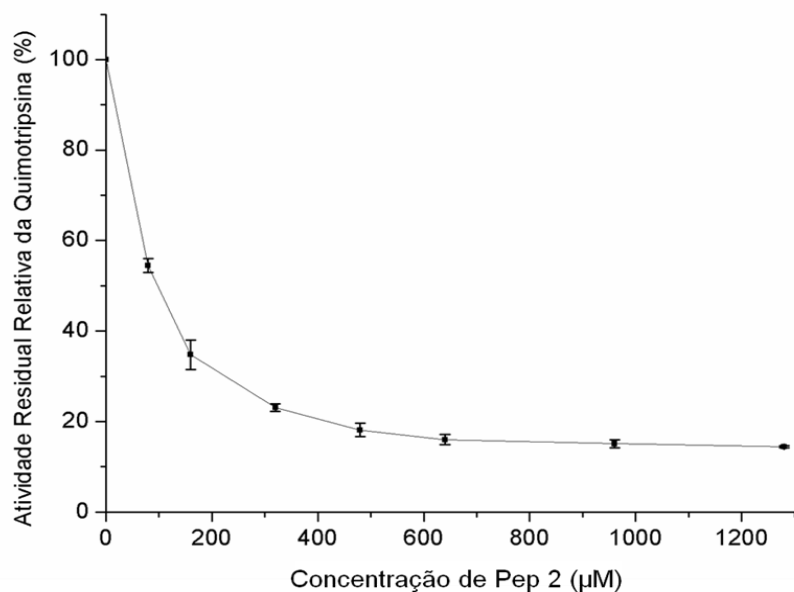


Figura 16. Atividade residual da quimotripsina na presença do peptídeo derivado do BTCl, Pep2, nas concentrações de 0 a 960 µM. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato cromogênico GPNA. A redução da atividade foi monitorada pela absorvância a 410 nm.

Na tabela 1, são apresentadas as constantes de inibição (K_i) do BTCl e peptídeos derivados calculados a partir da equação de Morrison. Os valores das constantes para o BTCl foram à ordem de 10^{-8} e 10^{-6} , o que indica uma alta capacidade inibitória da proteína.

Tabela 1. Constantes de inibição (K_i) do BTCl e peptídeos derivados em relação à tripsina e quimotripsina à temperatura ambiente. As constantes foram calculadas a partir do ajuste das curvas de inibição utilizando o programa Grafitt e a equação de Morrisson.

Constante de Inibição para Tripsina (K _i)		Constante de Inibição para Quimotripsina (K _i)	
BTCl	$2,23 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$	BTCl	$1,01 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$
Pep 1	$1,78 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$	Pep 2	$1,35 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$

4.4. Interação bicamada/peptídeos em modelos de membrana.

Lipossomas POPC encapsulados com carboxi-fluoresceína foram produzidos para analisar os efeitos dos inibidores em modelos de membranas. As vesículas foram sintetizadas e extrusadas para padronização do diâmetro de 100 nm e, posteriormente, purificadas por cromatografia de exclusão molecular. Durante os experimentos, os lipossomas foram capazes de reter o agente fluorescente encapsulado em um período de uma hora. O extravasamento de carboxi-fluoresceína pelos lipossomas na ausência dos peptídeos foi medido para acompanhar a estabilidade das vesículas (Fig. 17). Os lipossomas apresentaram um extravasamento inicial do fluoróforo até o décimo minuto após a purificação, o que pode ser explicado por uma reorganização das vesículas, que podem se partir e se fundir, formando novas vesículas e levando à liberação de carboxi-fluoresceína para o meio externo onde pode ser detectada pelo espectrofluorímetro.

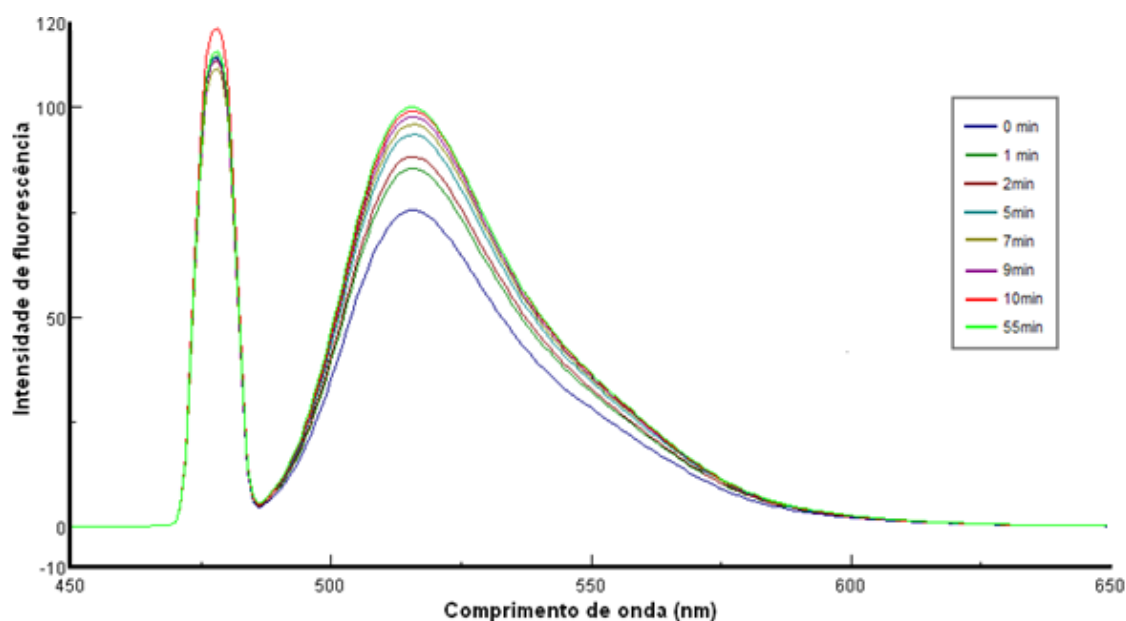


Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na ausência dos peptídeos, em relação ao tempo. Observa-se que no intervalo de 10 a 55 minutos os lipossomas permanecem estáveis, sem alteração do sinal de fluorescência.

O extravasamento de fluorescência é estabilizado a partir do décimo minuto até uma hora após a purificação. Considerando esse dado, todos os experimentos realizados para análise de interação peptídeos/membrana foram realizados no intervalo de 10 a 60 minutos. O sinal de intensidade de fluorescência da suspensão, na ausência dos peptídeos, foi considerado como linha de base para as análises com os inibidores sintéticos. Os ensaios de interação peptídeo/lipossomas demonstraram que os peptídeos interagem com a membrana e a desestabilizam, levando a um extravasamento de carboxi-fluoresceína. A interação entre Pep 1 500 μM e a membrana causou extravasamento de 82% da fluoresceína encapsulada (Fig. 18), enquanto que para o Pep 2 310 μM (Fig. 19) foi de 50%.

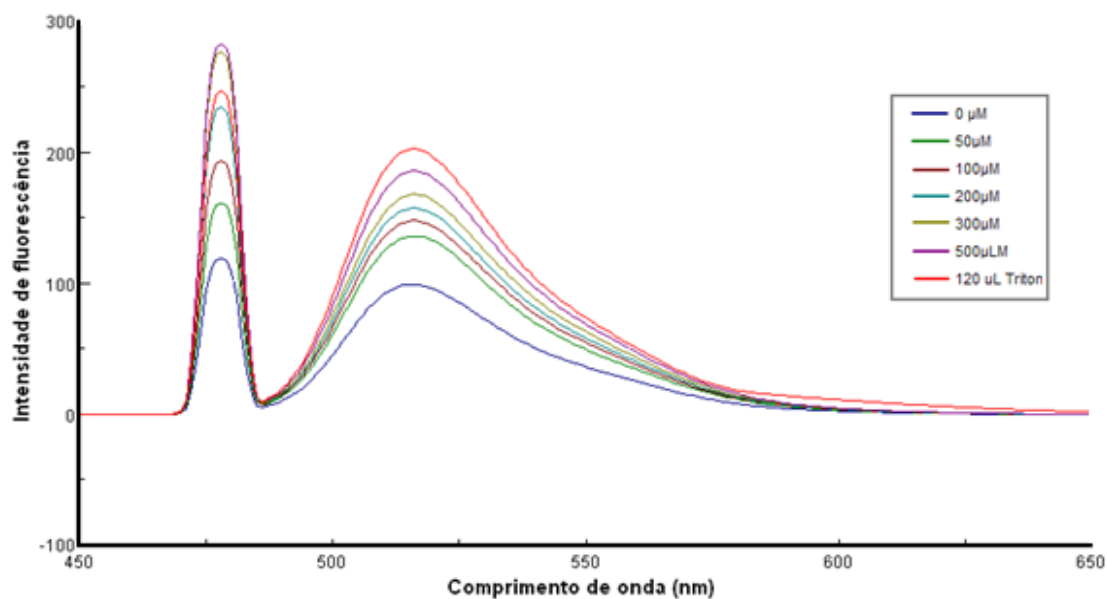


Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na presença de 50-500 μM de Pep1 e o extravasamento total por ruptura dos lipossomas com Triton 100-X. A interação entre a bicamada e Pep 1 causou um extravasamento de até 82% da carboxi-fluoresceína encapsulada.

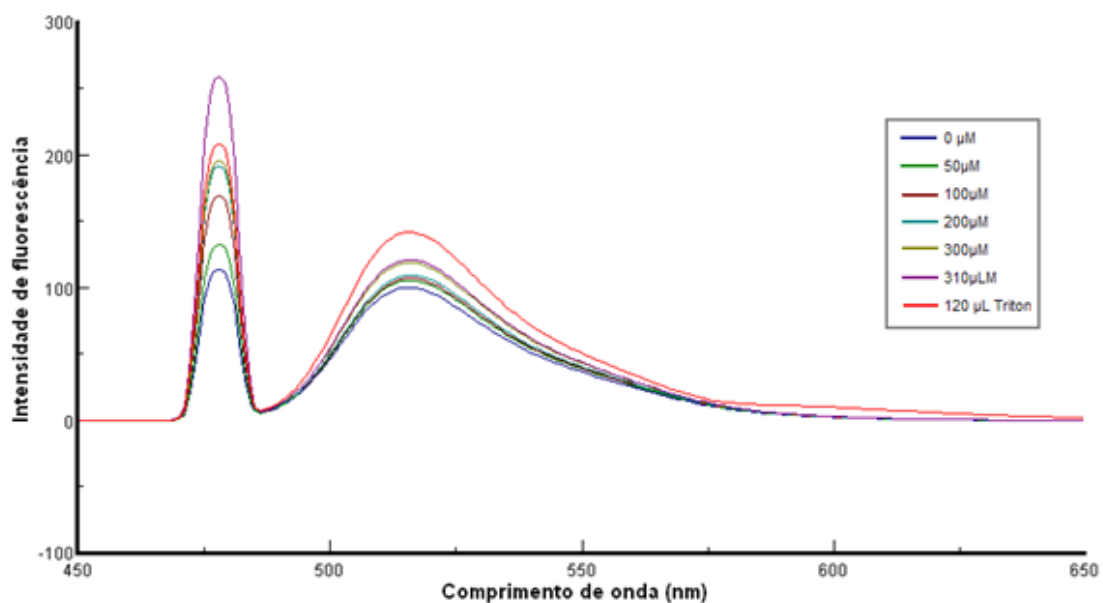


Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência de carboxi-fluoresceína encapsulada em lipossomas POPC, na presença de 50-310 μM de Pep2 e o extravasamento total por ruptura dos lipossomas com Triton 100-X. A interação entre a bicamada e Pep 2 causou um extravasamento de até 50% da carboxi-fluoresceína encapsulada.

4.5- Encapsulamento do BTCl em nanopartículas

Para formulação de sistemas de entrega de drogas contendo o BTCl, foram testados diferentes métodos e polímeros para estruturação de nanopartículas. As nanopartículas podem carregar a molécula de interesse no seu interior, semelhante às vesículas fosfolipídicas, mas também entremeadada entre as suas moléculas poliméricas ou associada a sua superfície externa.

Nanopartículas do polissacarídeo quitosana contendo BTCl foram produzidas pelo método físico e químico, através de modificação química por TPP, com variação de pH e concentração da proteína. Nanopartículas de PLGA foram produzidas pelo método de nanoprecipitação, muito utilizado para encapsulamento de moléculas hidrofóbicas, devido a presença de uma fase oleosa. As suspensões produzidas pelos diversos métodos foram analisadas quanto a morfologia, tamanho, estabilidade e interação do polímero com a o inibidor BTCl, como mostrado nos resultados a seguir.

4.5.1- Microscopia de força atômica

Imagens de microscopia de força atômica foram obtidas para as diferentes preparações de nanopartículas, variando o método, concentração de proteína e pHs (Fig. 21 a 23). O BTCl foi analisado por microscopia de força atômica sob as mesmas condições de produção do método físico (Fig. 20) para diferenciar os agregados de proteína e partículas, já que a formação de agregados é aumentada em pHs mais ácidos.

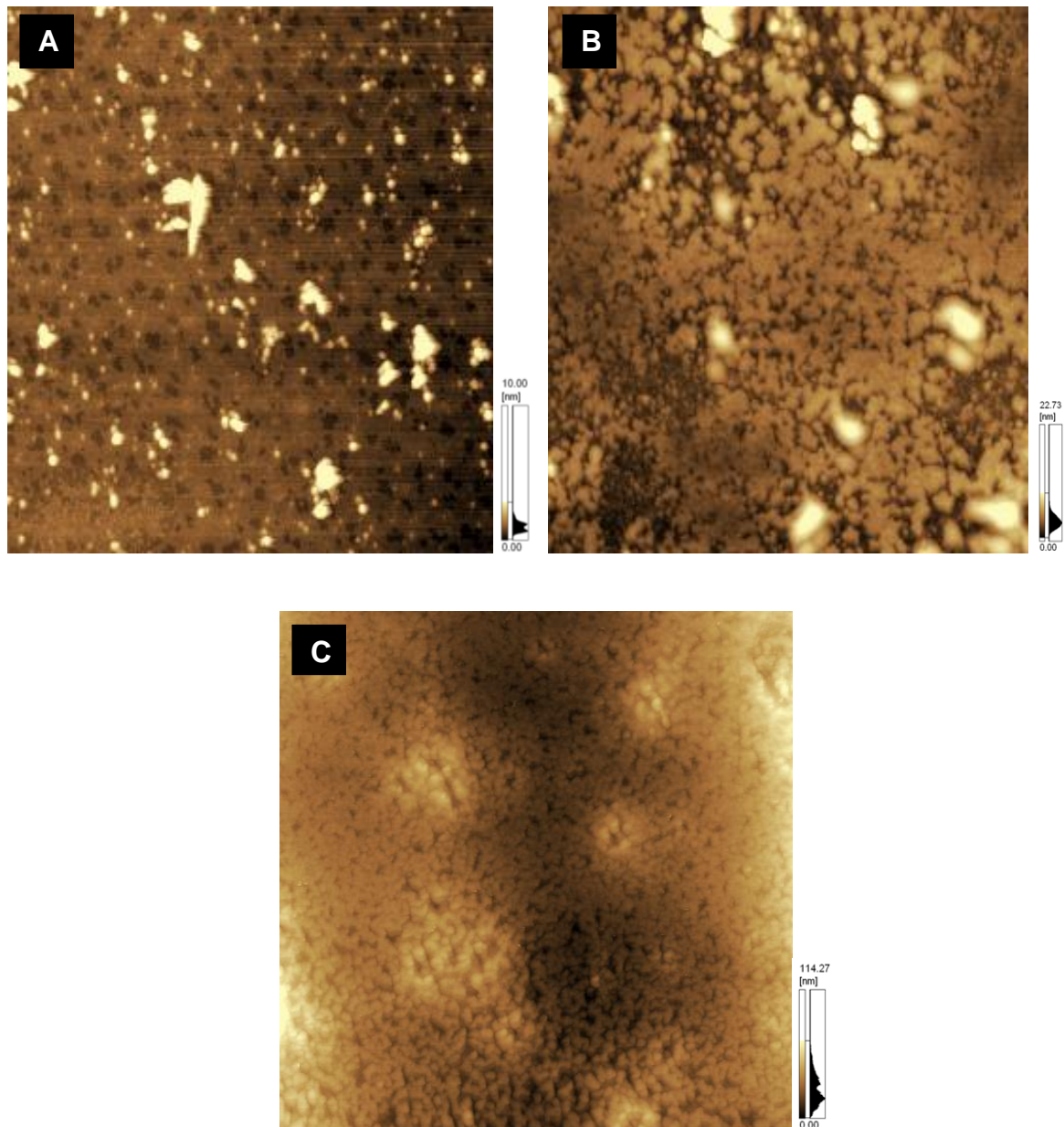


Figura 20. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão controle de BTCI nas concentrações de 50 μM (A), 100 μM (B) e 200 μM (C) produzida pelo método físico, na ausência de quitosana. As estruturas observadas nas imagens de dimensão 5 μm x 5 μm são agregados do BTCI.

Algumas imagens de microscopia de força atômica não puderam ser coletadas, como aquelas correspondentes às partículas vazias produzidas por método físico em pH 3 e pelo método químico, além das partículas de PLGA/BTCI. As partículas vazias, por seu tamanho reduzido, se agrupam formando agregados ou filmes, o que contamina a ponteira do equipamento e

interrompe a aquisição da imagem. No caso das partículas de PLGA, essa interrupção da leitura não se deve ao tamanho dessas estruturas, mas sim à característica do polímero e a presença de fase oleosa mesmo após centrifugação, o que provavelmente impede a aderência das partículas na superfície de mica.

As partículas produzidas pelo método físico em pH 9 estão apresentadas na figura 21. Nessa condição era esperada a formação de menos agregados de BTCl do que em meio ácido, onde a proximidade com o ponto isoelétrico da proteína favorece a agregação. No entanto, as imagens das partículas vazias e com BTCl 100 μM apresentam estruturas disformes e maiores do que as nanopartículas esperadas, que podem representar estruturas micrométricas, agregados de partículas ou agregados de quitosana não estruturada. As estruturas com menos de 200 nm presentes na amostra podem estar mascaradas pela presença dos agregados, mas são encontradas nas imagens com BTCl 50 μM e 200 μM . As partículas produzidas em pH 7 apresentam morfologia e tamanhos distintos em relação às diversas concentrações do inibidor (Fig 22).

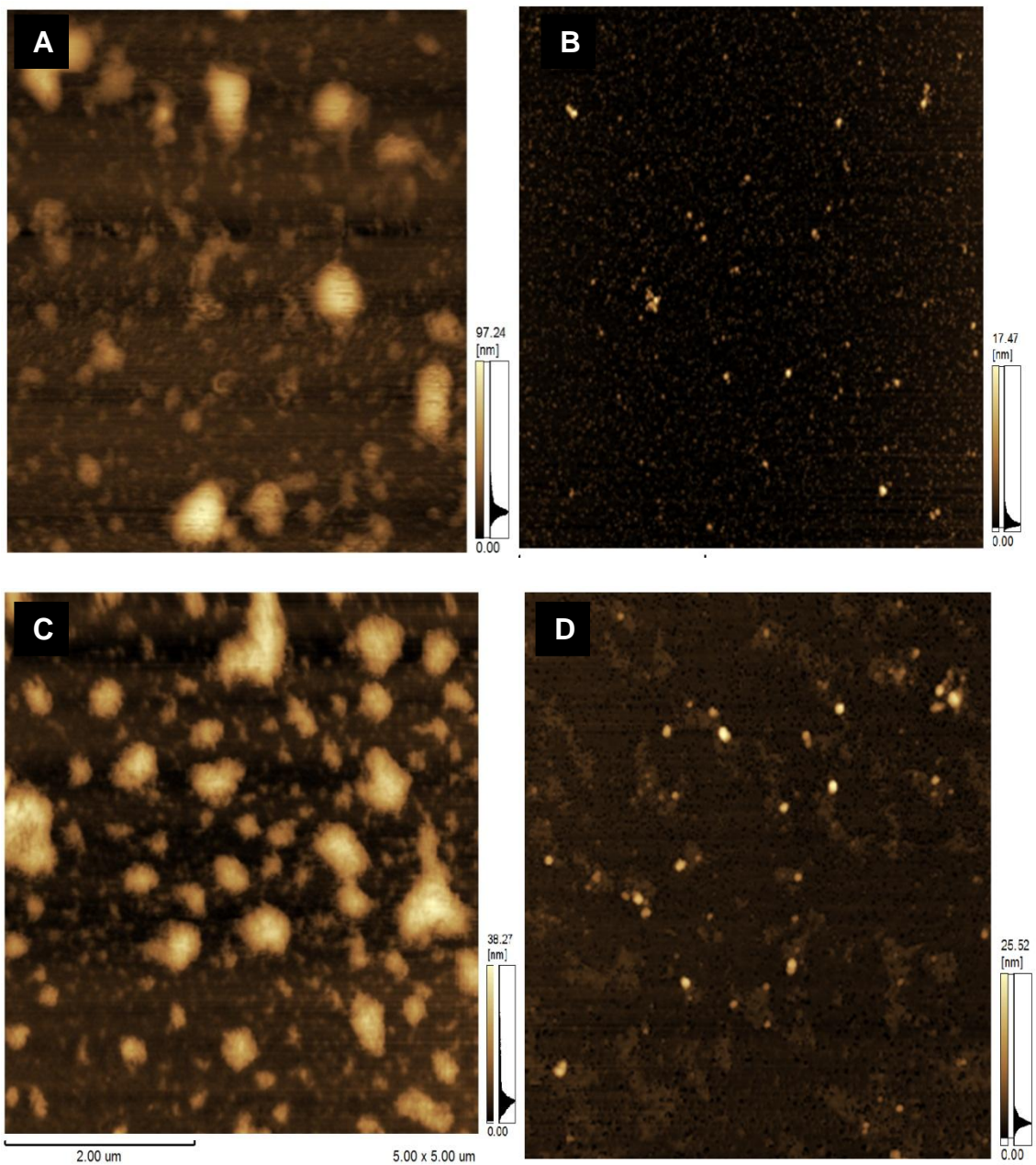


Figura 21. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1% vazia (A); Quitosana 1%/BTCl nas concentrações de 50 μM (B), 100 μM (C) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH 9. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm .

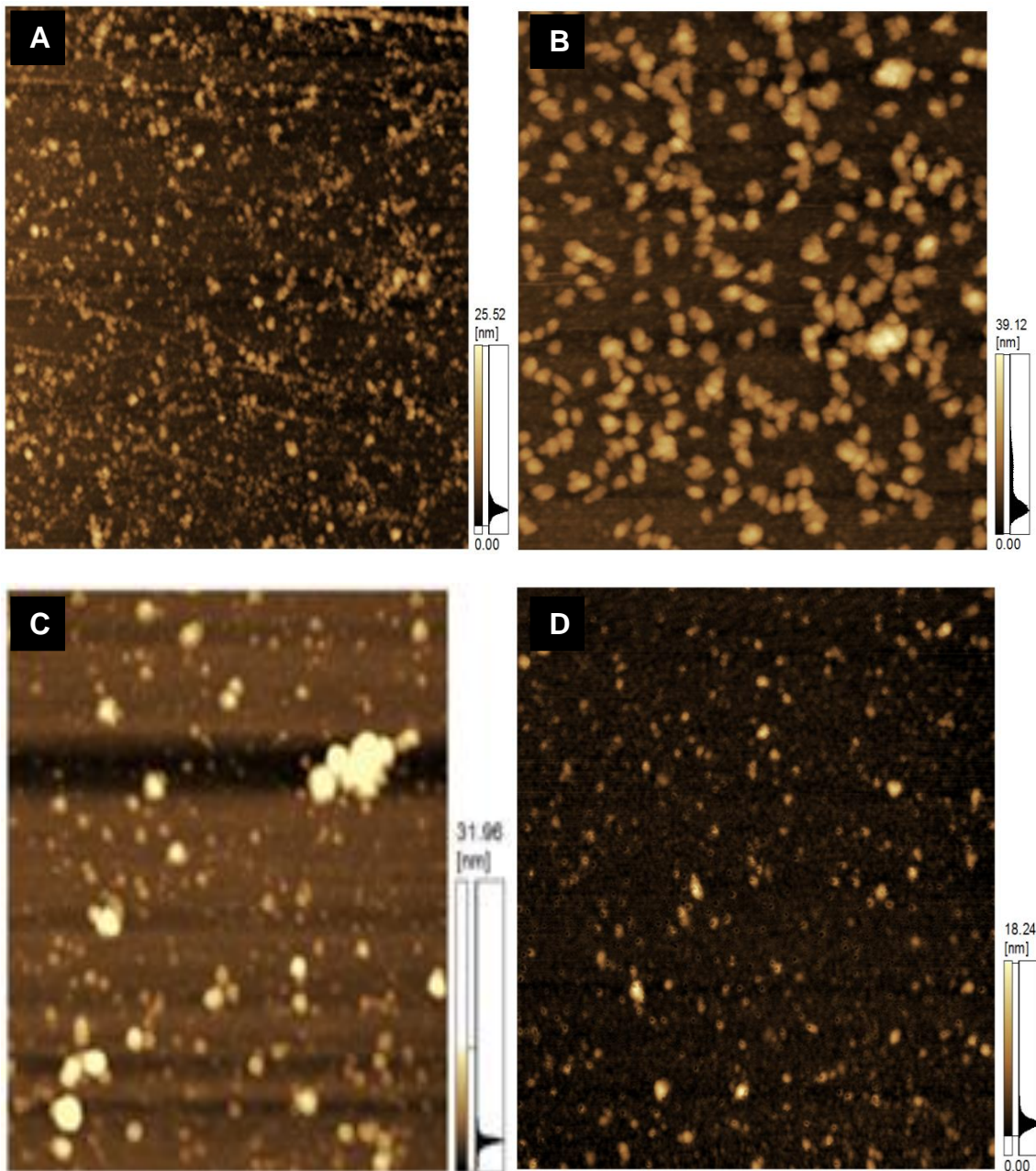


Figura 22. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1% vazia (A); Quitosana 1%/BTCl nas concentrações de 50 μM (B), 100 μM (C) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH 7. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm .

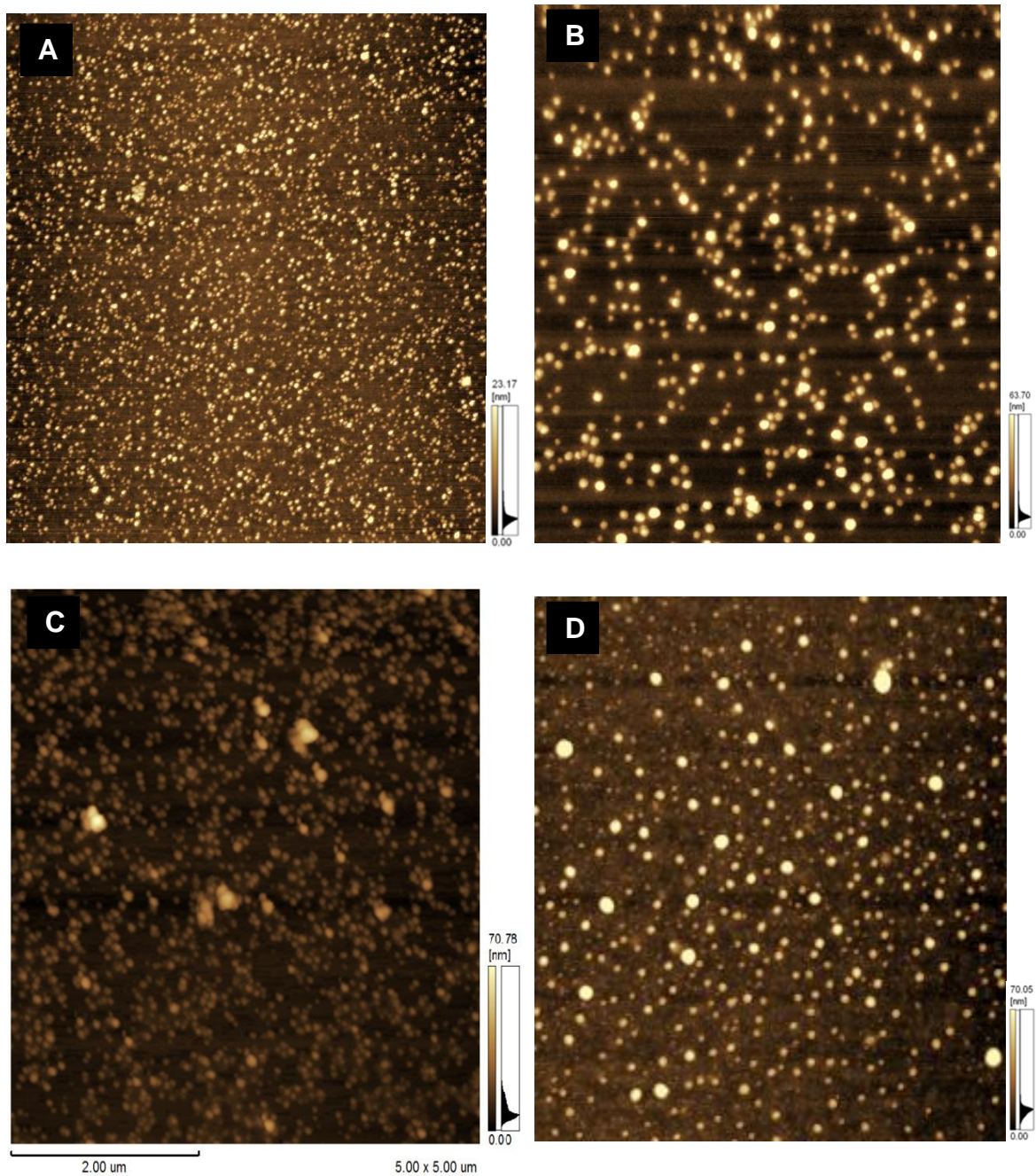


Figura 23. Análise morfológica por microscopia de força atômica da suspensão de nanopartículas de Quitosana 1%/BTCI nas concentrações de 50 μM (A), 100 μM (B) e 200 μM (D), produzida pelo método físico em pH ácido, e nanopartículas Quitosana 1%/BTCI 100 μM produzida pelo método químico. A dimensão das imagens é de 5 μm x 5 μm .

As partículas produzidas pelo método químico e físico em pH 3 e nas concentração de BTCI de 50, 100 e 200 μM são mostradas na figura 23. As nanopartículas produzidas pelo método físico e químico possuem morfologia e

características semelhantes, o que é mostrado e confirmado nos ensaios de espalhamento de luz dinâmica, apresentados adiante.

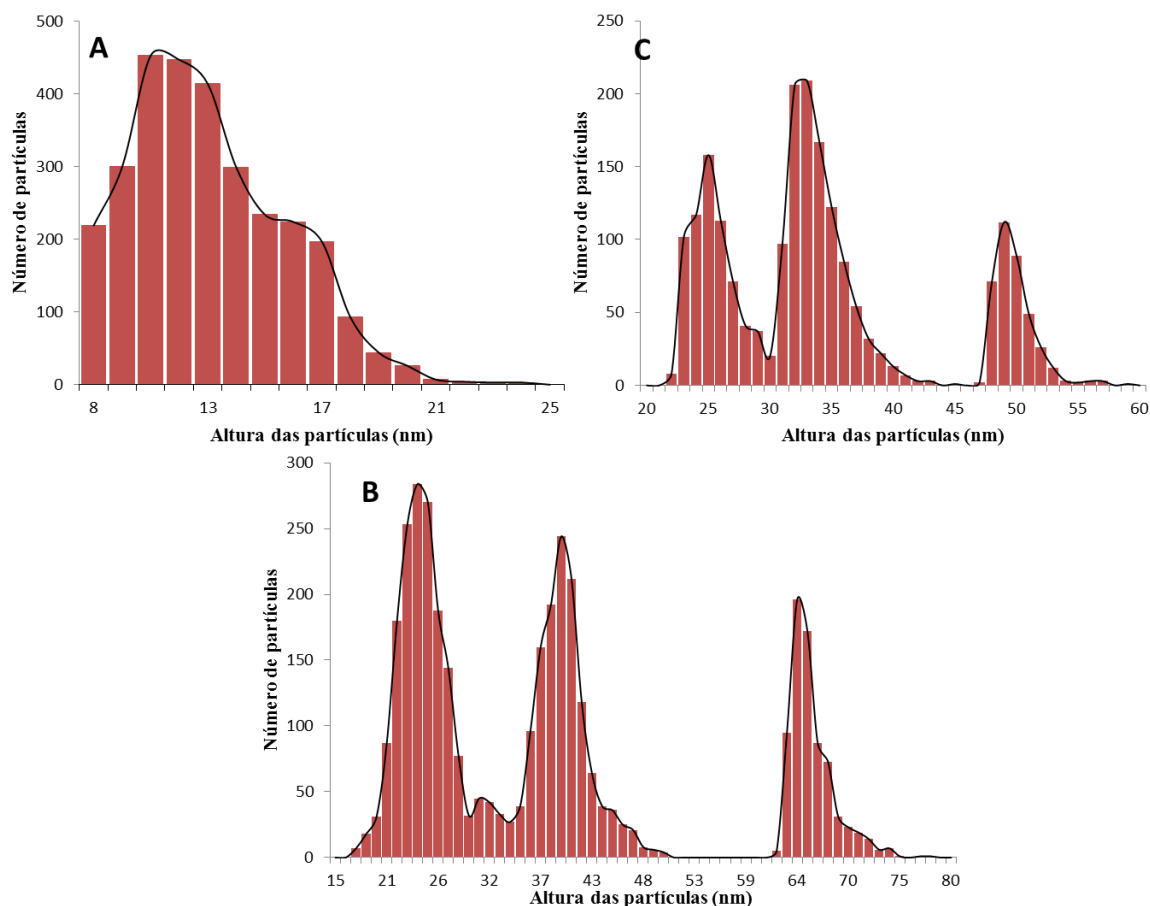


Figura 24. Distribuição do número de nanopartículas contendo BTCI produzidas em pH 3, obtida das imagens de microscopia de força atômica, em relação a altura (nm). (A) Nanopartículas contendo BTCI 50 μ M, (B) nanopartículas contendo BTCI 100 μ M e (C) nanopartículas contendo BTCI 200 μ M.

A distribuição das alturas das nanopartículas produzidas no pH 3 em diversas concentrações, obtidas por microscopia de força atômica, é mostrada na figura 24. As curvas de distribuição de tamanho das partículas nos pHs 7 e 9, bem como as produzidas pelo método químico, não puderam ser construídas devido ao número insuficiente de imagens obtidas sem ruídos.

4.5.2. Espalhamento de luz dinâmico

As dimensões moleculares e hidrodinâmicas das nanopartículas contendo BTCl foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico para analisar o diâmetro hidrodinâmico das preparações produzidas nas diversas condições. As amostras foram inicialmente centrifugadas em membrana de diálise para retirada de agregados de BTCl e quitosana livres.

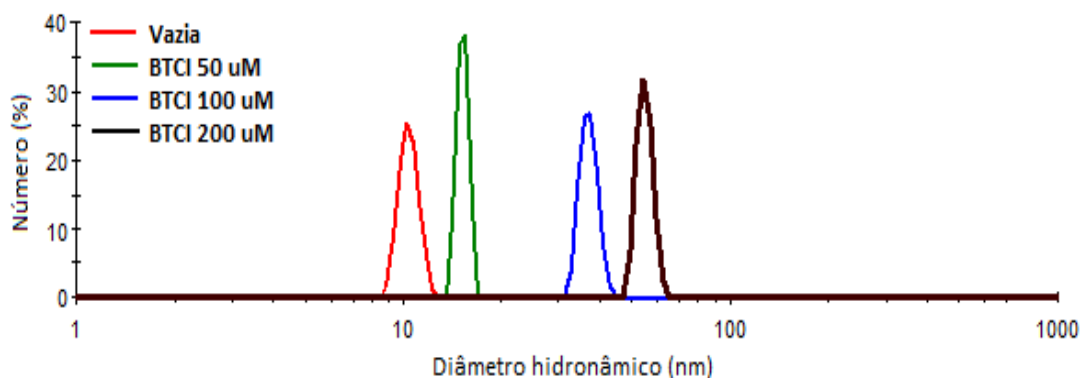


Figura 25. Diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCl, nas concentrações 0 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM, preparadas pelo método físico, em ácido acético 0,2 M tampão fosfato de sódio 20 mM pH 9.

As figuras 25 e 26 mostram os dados obtidos a partir das preparações em tampão fosfato de sódio 20 pH 9 e 7. Na figura 24, observa-se que a concentração do inibidor influencia no tamanho das partículas.

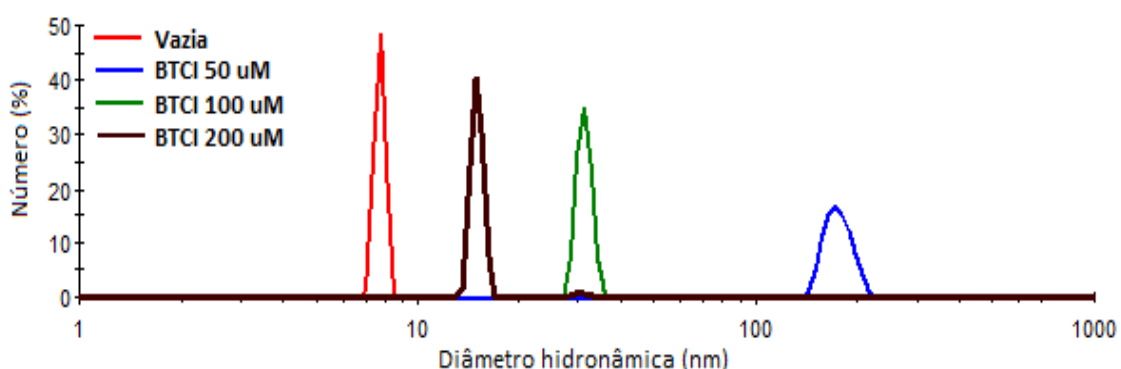


Figura 26. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCl, nas concentrações 0 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM, preparadas pelo método físico em ácido acético 0,2 M tampão fosfato de sódio 20mM pH 7.

As figuras 27 e 29 representam a distribuição do número de partículas em relação ao diâmetro hidrodinâmico das suspensões produzidas pelo método

físico e químico, respectivamente. As partículas apresentaram tamanhos de 10 a 100 nm, influenciados pela concentração da molécula encapsulada. De forma geral, os perfis de espalhamento de luz dinâmico corroboram com as imagens obtidas por microscopia de força atômica. Além disso, as preparações com BTCI 100 μM em pH 3 produziram os melhores resultados, correspondentes às partículas mais homogêneas.

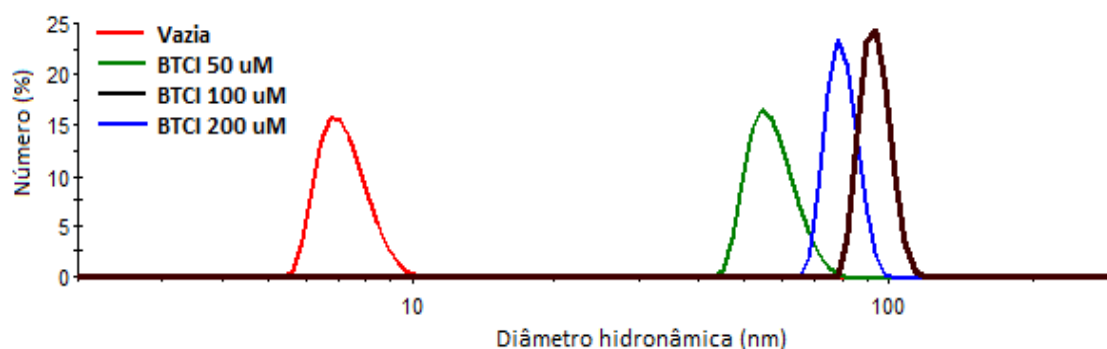


Figura 27. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCI, nas concentrações 0 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , preparadas pelo método físico em ácido acético 0,2 M pH 3.

O diâmetro hidrodinâmico das partículas de PLGA/BTCI 100 μM obtido por espalhamento de luz dinâmico é mostrado na figura 28. A suspensão de nanopartículas apresentou tamanho monodisperso com diâmetro hidrodinâmico de 60 a 500 nm. Considerando essas características, o PLGA pode ser considerado como alternativa para a preparação de sistemas contendo moléculas que não apresentem afinidade pela quitosana.

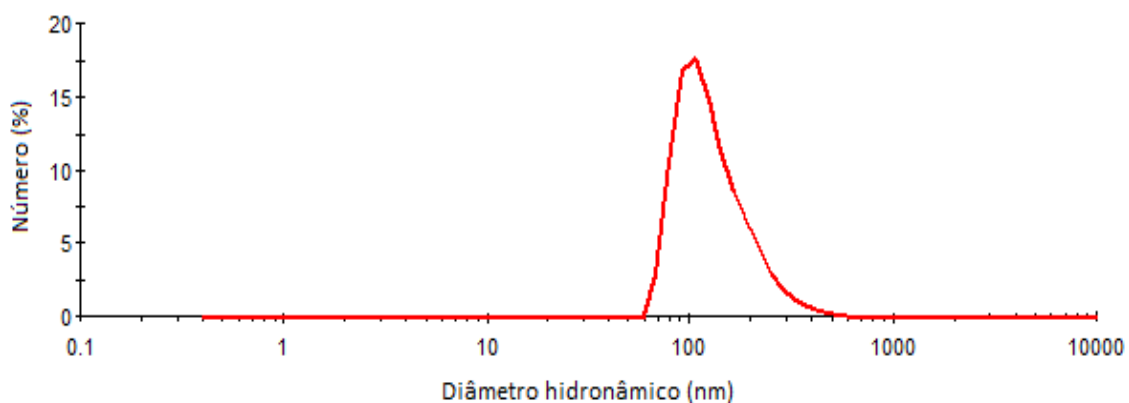


Figura 28. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de PLGA/BTCI na concentração 100 μM preparadas em água pelo método de nanoprecipitação.

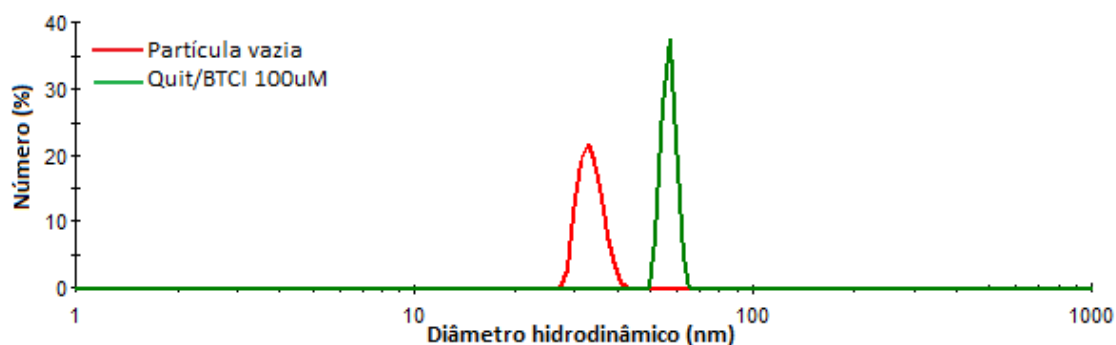


Figura 29. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico em relação ao número de nanopartículas de quitosana/BTCI nas concentrações 0 e 100 μM , preparadas pelo método de geleificação ionotrópica em ácido acético 0,1 M.

Na tabela 2 estão descritos os valores do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta (carga superficial da partícula) de todas as preparações. A carga superficial da partícula está diretamente relacionada à estabilidade e é dependente do pH em solução. Quanto maior o valor da carga superficial, em módulo, maior é a estabilidade da partícula e, em geral esse valor está acima de ± 30 mV (ASTM, 1985). O caráter positivo ou negativo está relacionado a carga do polímero utilizado ou da proteína associada aos sistemas particulados.

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico (D_{hid}), polidispersividade (PDI) e potencial zeta das nanopartículas produzidas pelos diferentes métodos, com variação de pH e concentração do BTCl, obtidos por espalhamento de luz dinâmico.

		D_{hid} (nm)						Potencial Zeta (mV)		
		pH 3	PDI	pH 7	PDI	pH 9	PDI	pH 3	pH 7	pH 9
Método Físico	Partículas vazias	7,8	—	7,7	—	10,6	—	88,6	52,9	68,6
	Quit/BTCl 50 μ M	60,8	0,54	178	0,94	15,2	—	92,6	53,2	78,2
	Quit/BTCl 100 μ M	95,6	0,61	31,3	0,61	37,5	0,42	83,6	74,5	85,4
	Quit/BTCl 200 μ M	81,6	0,66	15,3	—	55,2	—	46,1	57,6	63,9
Método Químico	Partículas vazias	30,1	0,58	---	---	---	---	20,1	---	---
	Quit/BTCl 100 μ M	56,7	0,79	---	---	---	---	15,5	---	---
Nanoprecipitação	PLGA/BTCl 100 μ M	100	0,19	---	---	---	---	-31,1	---	---

4.5.3. Eficiência de encapsulamento

Para escolha de um sistema carreador de drogas é necessário que haja, além de estabilidade e homogeneidade das partículas, alta eficiência de encapsulamento do fármaco. Todas as propriedades farmacocinéticas proporcionadas pelos sistemas nanoparticulados não se aplicam a proteína que não esteja encapsulada. O BTCl não encapsulado foi quantificado utilizando a curva padrão apresentada na figura 30. As alíquotas de proteína livre foram obtidas do sobrenadante produzido pela centrifugação das amostras em membrana de diálise 100 kDa.

4.5.3.1. Quantificação de encapsulamento por Método de Lowry

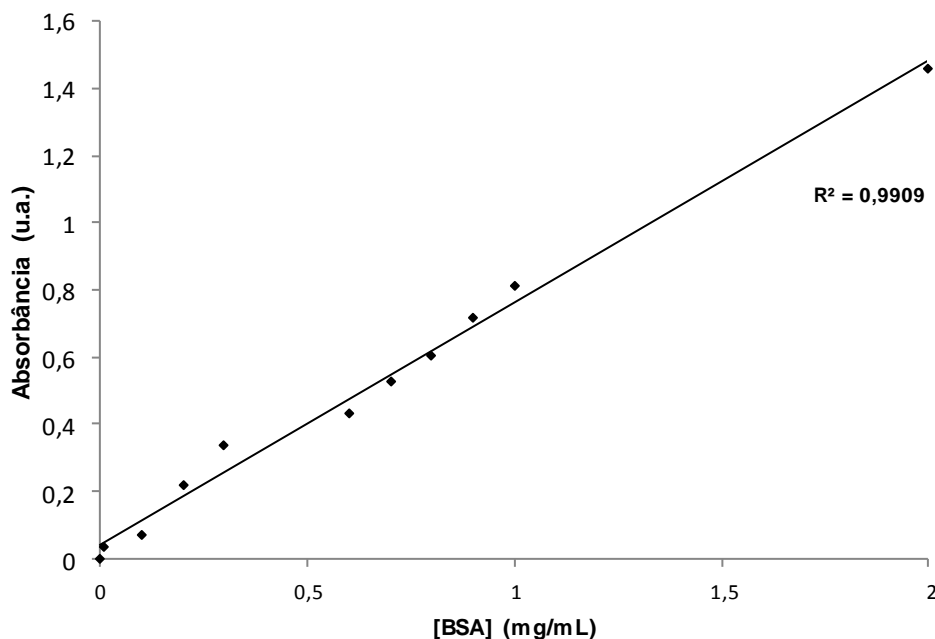


Figura 30. Curva padrão de dosagem de proteína utilizando a soroalbumina bovina (método de Lowry) em concentrações de 0 a 2 mg/mL para quantificação do BTCI encapsulado. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e a absorbância monitorada a 730 nm.

Os valores da eficiência de encapsulamento para as diversas preparações são mostrados na tabela 3. As taxas de eficiência de encapsulamento das preparações foram altas e semelhantes em relação ao pH 3 e 9 e um pouco menores nas suspensões preparadas pelo método físico em pH 7, método químico e nanoprecipitação. As menores taxas de encapsulamento do BTCI em pH 7, obtidas por meio de quantificação duas horas após a síntese das partículas, podem indicar uma menor associação do inibidor ao polímero em pH neutro ou então que, devido ao pH fisiológico, a liberação da proteína esteja ocorrendo.

Tabela 3. Eficiência de encapsulamento (E.E.) do BTCl pelas nanopartículas em diferentes condições monitorada pela dosagem de proteínas

		Quantificação Lowry E.E. (%)		
		pH 3	pH 7	pH 9
Método Físico	Quitosana/BTCl 50µM	82,9	42,6	72,3
	Quitosana/BTCl 100µM	81,5	74,5	82,8
	Quitosana/BTCl 200µM	93,1	84,2	90,1
Método Químico	Quitosana/BTCl 100µM	40,2	---	---
Nanoprecipitação	PLGA/BTCl 100 µM	69,1	---	---

4.5.3.2 Quantificação de encapsulamento por fluorescência

A eficiência de encapsulamento do BTCl foi quantificada também por espectroscopia de fluorescência. Como a molécula de BTCl possui apenas um triptofano, a intensidade de fluorescência das suspensões foi analisada e comparada com a intensidade de fluorescência do BTCl sem presença de nanopartículas. O triptofano encapsulado no interior da partícula apresenta pouco ou nenhum acesso a energia de excitação e por isso não emite sinal a ser detectado pelo equipamento. Na primeira etapa de análise, a intensidade de fluorescência dos sobrenadantes após a purificação, onde são encontradas as moléculas não encapsuladas, foi medida e relacionada com a fluorescência de amostras do BTCl sem a presença de nanopartículas. Os valores obtidos foram similares comparados aqueles estimados pelo método de Lowry (Tabela 4). Embora a relação entre intensidade de fluorescência e a concentração do fluoróforo seja qualitativa, a comparação entre as duas técnicas confirmam os resultados obtidos pela quantificação pelo método colorimétrico.

Tabela 4. Eficiência de encapsulamento do BTCl em diferentes pHs, monitorada pela relação da intensidade de fluorescência da proteína livre/proteína total. A amostra de proteína livre foi obtida por centrifugação em Centricon 100 kDa.

		Eficiência de encapsulamento Proteína encapsulada/ Proteína livre (%)		
		pH 3	pH 7	pH 9
Método Físico	Quitosana/BTCl 50µM	81,6	35,6	58,1
	Quitosana/BTCl 100µM	87,5	75,2	82,8
	Quitosana/BTCl 200µM	93,0	82,4	91,6
Método Químico	Quitosana/BTCl 100µM	52,9	---	---

4.5.4. Análise da quitosana/BTCl por fluorescência intrínseca

Além da análise da proteína livre, foram realizadas leituras da intensidade de fluorescência da suspensão de partículas antes da purificação e também dos precipitados resultantes da centrifugação em membrana de diálise, onde é esperada a presença apenas das partículas e BTCl encapsulado. A espectrofotometria de fluorescência gera informações importantes sobre o ambiente da sonda e, conseqüentemente, da proteína, além de confirmar a eficiência do processo de purificação das partículas por Centricon 100 kDa e descartar a possibilidade de retenção de proteína não encapsulada pela membrana de diálise. A partir desta metodologia, é possível sugerir o modo de associação entre o inibidor e a partícula, ou seja, se o sistema nanoestruturado é formado por nanocápsulas ou nanoesferas. A partir da diferença entre os espectros, é possível distinguir se o inibidor está contido no interior da partícula ou associada à superfície externa, onde o triptofano pode ser excitado e a emissão de fluorescência pode ser detectada pelo equipamento.

Os espectros de emissão das amostras de partículas com BTCI nas concentrações 50, 100 e 200 μM em pHs 3, 7 e 9 são mostradas nas figuras 31, 32 e 33 respectivamente. O espectro de emissão das partículas vazias foi subtraído dos espectros apresentados. O sinal de fluorescência corresponde a emissão do triptofano do BTCI associado externamente às nanopartículas.

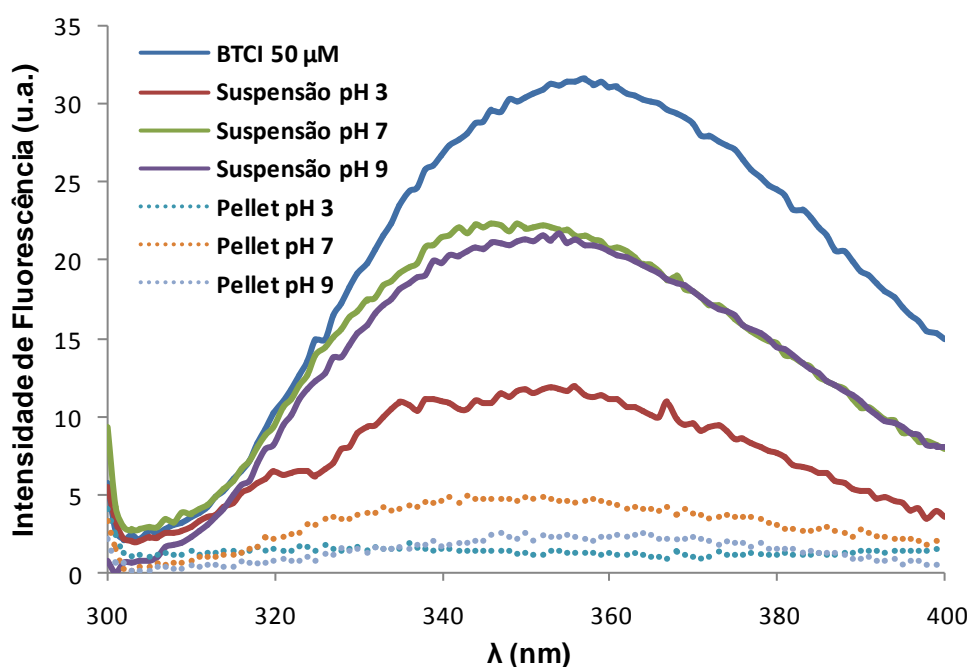


Figura 31. Análise do encapsulamento do BTCI 50 μM em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCI 50 μM na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os *pellets* gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 *g*, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.

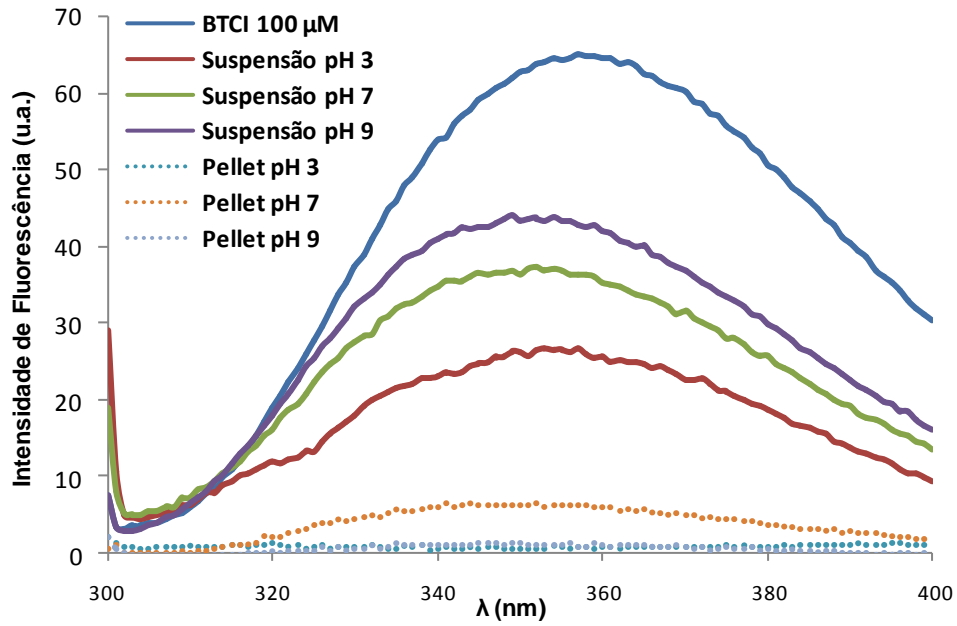


Figura 32. Análise do encapsulamento do BTCl 100 μM em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCl 100 μM na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os *pellets* gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 *g*, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.

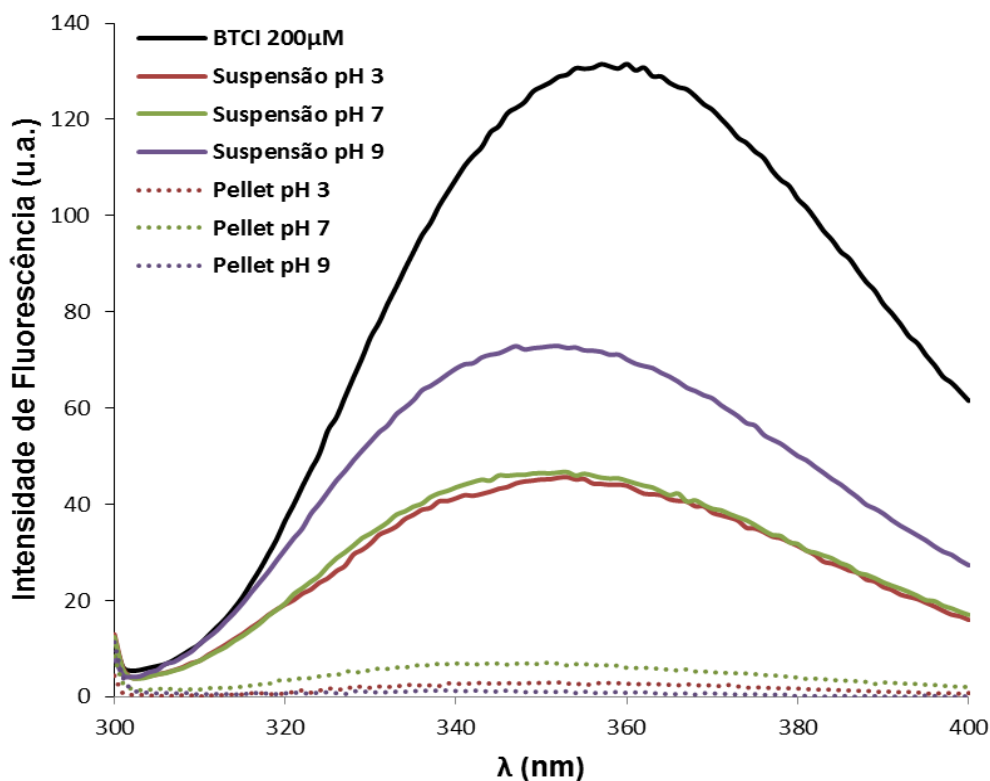


Figura 33. Análise do encapsulamento do BTCl 200 μ M em nanopartículas de quitosana monitoradas por fluorescência em pH 3, 7 e 9. O BTCl 200 μ M na ausência de partículas e as suspensões de partículas antes da purificação estão representadas em linha contínua. Os *pellets* gerados pela purificação por meio de centrifugação a 3300 g, onde são encontradas apenas partículas, estão representados em linha pontilhada.

Além da análise das suspensões contendo BTCl para quantificação do encapsulamento, experimentos de supressão de fluorescência foram realizados para investigar a interação do BTCl e as nanopartículas de quitosana e as possíveis modificações estruturais da molécula causada por essa interação. Os supressores acrilamida (neutro), iodeto de potássio (negativo) e cloreto de céσιο (positivo) foram utilizados para esses ensaios. As curvas de supressão de fluorescência do BTCl livre e encapsulado, nos diferentes pHs, estão representadas nas figuras 34, 35 e 36. Enquanto os dados relacionados ao BTCl livre foram lineares com o aumento da concentração do supressor, os valores de supressão relacionados às partículas foram dispersos devido, provavelmente, a dinâmica da interação entre o inibidor e a partícula.

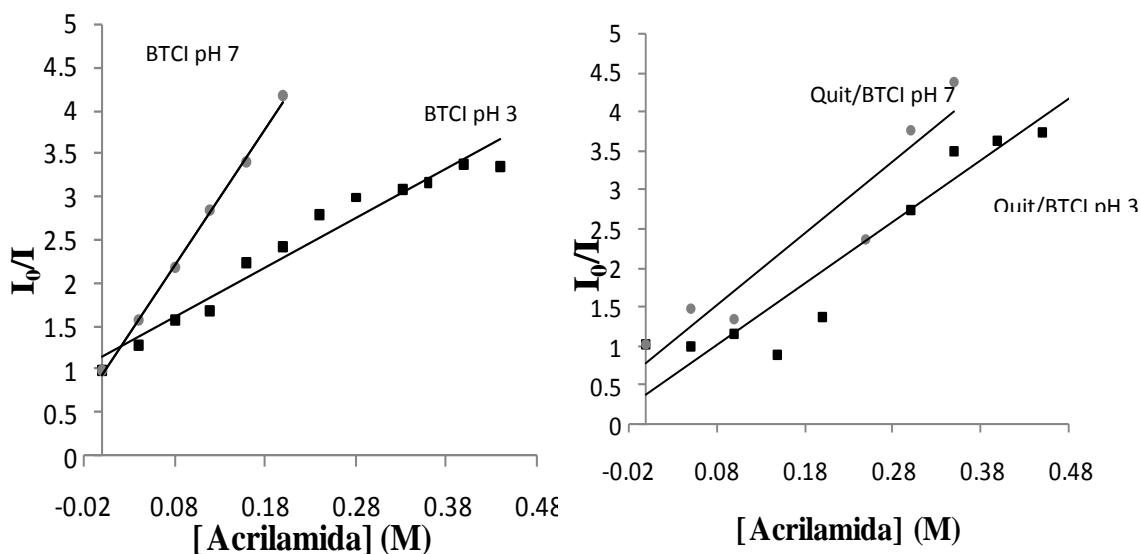


Figura 34. O gráfico de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão de fluorescência do BTCl livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor acrilamida, nos pHs 3 e 7.

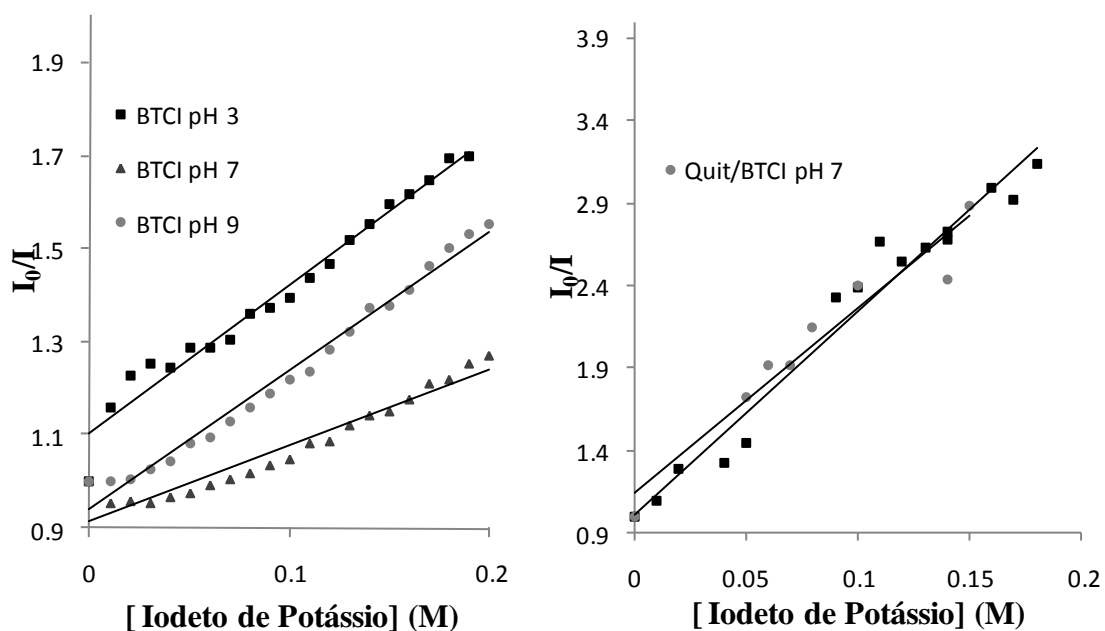


Figura 35. Plot de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão do BTCl livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor iodeto de potássio, nos pHs 3, 7 e 9.

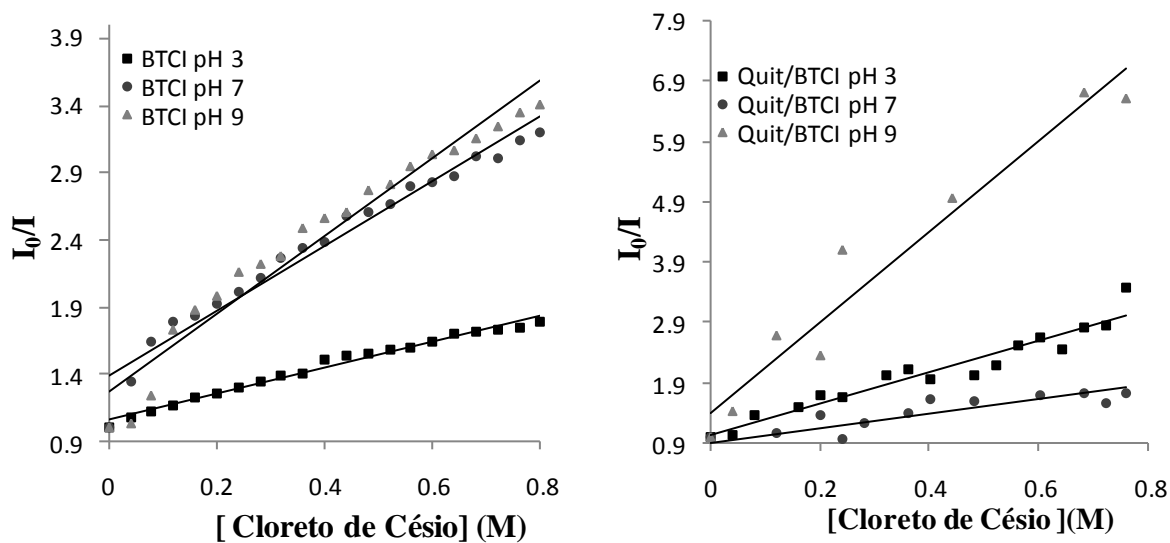


Figura 36. Gráfico de Ster-Volmer (I_0/I) para supressão do BTCl livre e em suspensão de nanopartículas pelo supressor cloreto de césio, nos pHs 3, 7 e 9.

O perfil de supressão do BTCl associado à nanopartícula apresentou diferenças em relação ao perfil do inibidor sozinho. Esses resultados podem ser comparados por meio das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), que estão relacionadas a acessibilidade do fluoróforo pelo supressor e sofrem mudanças em seu valor quando há alterações estruturais da molécula (Tabela 5). O acesso ao triptofano pelos supressores foi maior no BTCl em suspensão de nanopartículas nos pHs 3 e 9. No pH 7, houve redução dessa acessibilidade pelos supressores neutro e positivo. As maiores alterações em relação aos valores das constantes foram encontradas nos resultados com o supressor iodeto de potássio, com um aumento da K_{sv} em todos os pHs.

Tabela 5. Constantes de Stern-Volmer calculadas para a supressão de fluorescência do BTCI livre e em suspensão de nanopartículas pelos supressores acrilamida (neutro), iodeto de potássio (negativo) e cloreto de céσιο (positivo) nos pHs 3, 7 e 9. Em vermelho, condições onde a presença das partículas diminuiu a acessibilidade ao triptofano e, em azul, onde a presença das partículas aumentou a acessibilidade ao triptofano pelos atenuadores.

		Ksv (L.mol ⁻¹) Acrilamida	Ksv (L.mol ⁻¹) Iodeto de Potássio	Ksv (L.mol ⁻¹) Cloreto de Céσιο
pH 3	BTCI	5,7	3,2	1,0
	Quit/BTCI	7,9	12,4	2,6
pH 7	BTCI	15,8	3,0	2,4
	Quit/BTCI	9,2	11,2	1,2
pH 9	BTCI	—	—	2,9
	Quit/BTCI	—	—	7,5

4.5.5 Interação BTCI/Quitosana por dicroísmo circular

Além dos ensaios de fluorescência, as preparações contendo BTCI 100µM em pH ácido foram analisadas em relação as alterações estruturais causadas pela interação com o polímero, por meio de dicroísmo circular. Os espectros obtidos sugerem modificações na estrutura secundária do BTCI e redução de intensidade do sinal devido a incorporação do inibidor pelas nanopartículas.

O espectro das nanopartículas contendo BTCI, antes da separação das proteínas não encapsuladas, apresentou duas bandas distintas, enquanto as nanopartículas vazias apresentaram um pequeno sinal de elipcidade molar. O BTCI livre apresentou a banda típica deste inibidor. Uma das bandas da suspensão de partículas, em aproximadamente 205 nm, se assemelha a banda típica do BTCI, enquanto a segunda banda em 210 nm não é encontrada nos outros espectros.

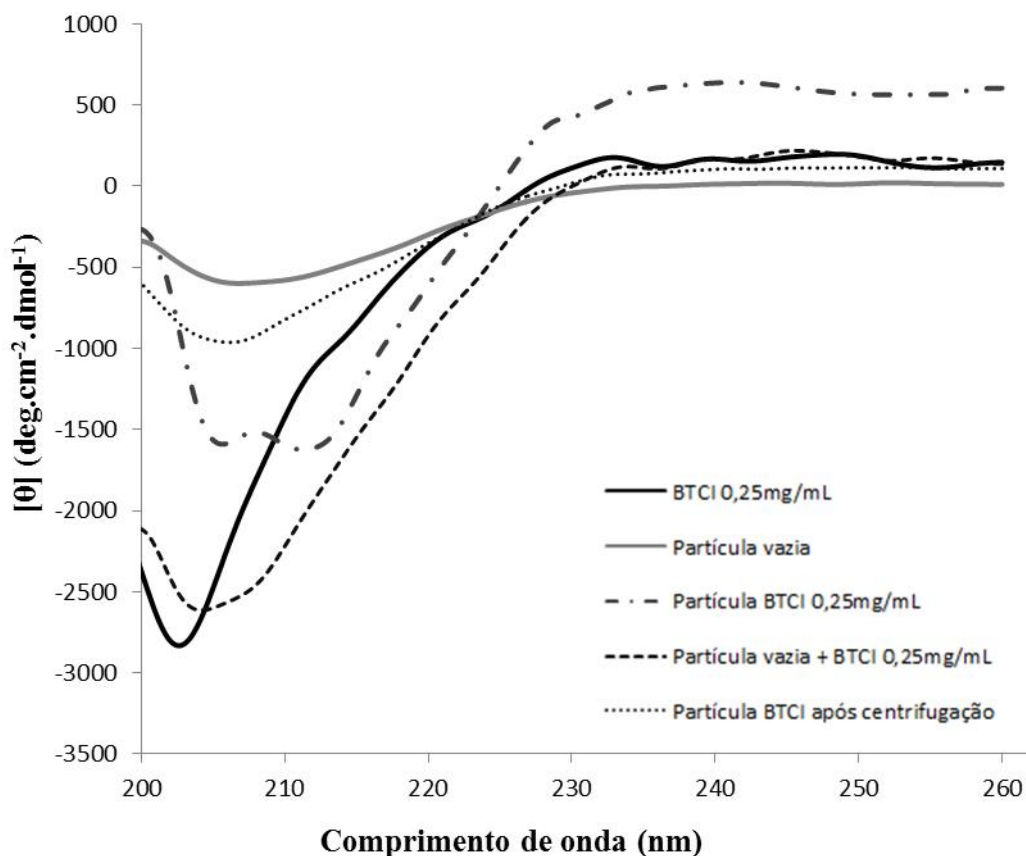


Figura 37. Espectros de dicroísmo circular na região distante do ultravioleta. Mudanças no posicionamento e intensidade das bandas dicróicas são observadas para as amostras contendo BTCl 0,25 mg/mL, partículas de quitosana vazias, partículas de quitosana vazias adicionadas a BTCl 0,25 mg/mL e partículas contendo BTCl, antes e após a centrifugação a 3300 g.

As partículas vazias adicionadas fisicamente a solução de BTCl livre foram também analisadas para comprovar que a modificação do perfil dicróico está relacionada à incorporação da proteína pela partícula e não ao mascaramento do sinal pela presença de polímeros. Nesse espectro a intensidade e o perfil dicróico foram semelhantes ao BTCl livre. Após a centrifugação para retirada do BTCl não encapsulado, o espectro obtido apresentou perfil semelhante ao da partícula vazia com uma banda sutil em comprimento de onda próximo à banda negativa típica do BTCl de 201 nm (Freitas *et al.*, 1997). Como relatado nos ensaios de fluorescência, o processo de centrifugação pode remover o BTCl associado à superfície externa da partícula por meio de liberação da proteína ou de incorporação para o interior

da partícula, onde a molécula não absorve energia da luz circularmente polarizada.

4.5.6. Liberação do BTCl pelas nanopartículas

A liberação do BTCl das nanopartículas foi monitorada por meio de espectroscopia de fluorescência. As amostras produzidas em diferentes pHs e concentração de proteína foram encubadas a 37°C e pH fisiológico, para análises em relação ao tempo (Fig 38, 39, 40).

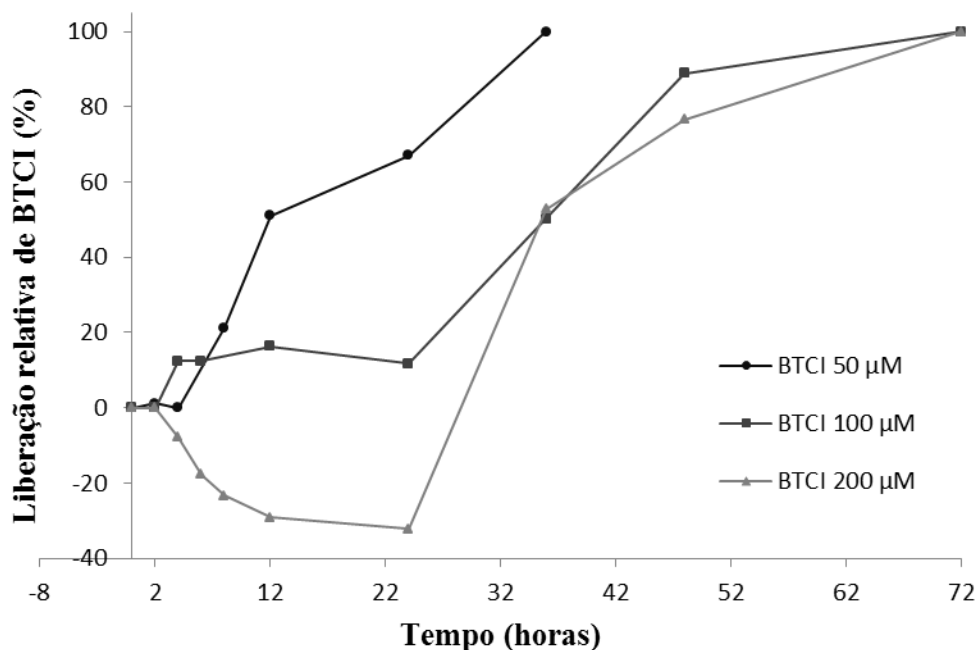


Figura 38. Perfil de liberação do BTCl encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCl nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 3, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano do BTCl.

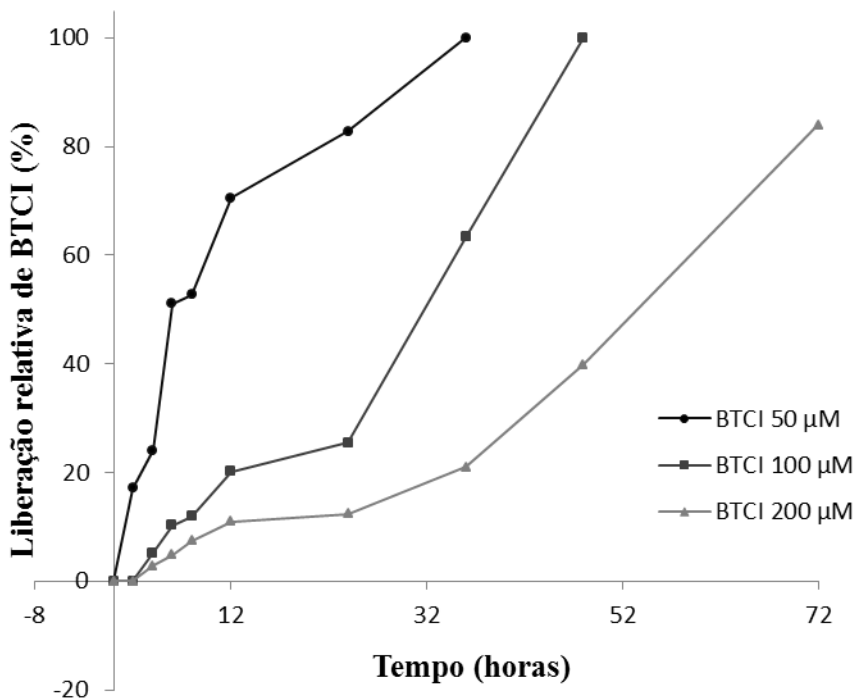


Figura 39. Perfil de liberação do BTCl encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCl nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 7, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da proteína.

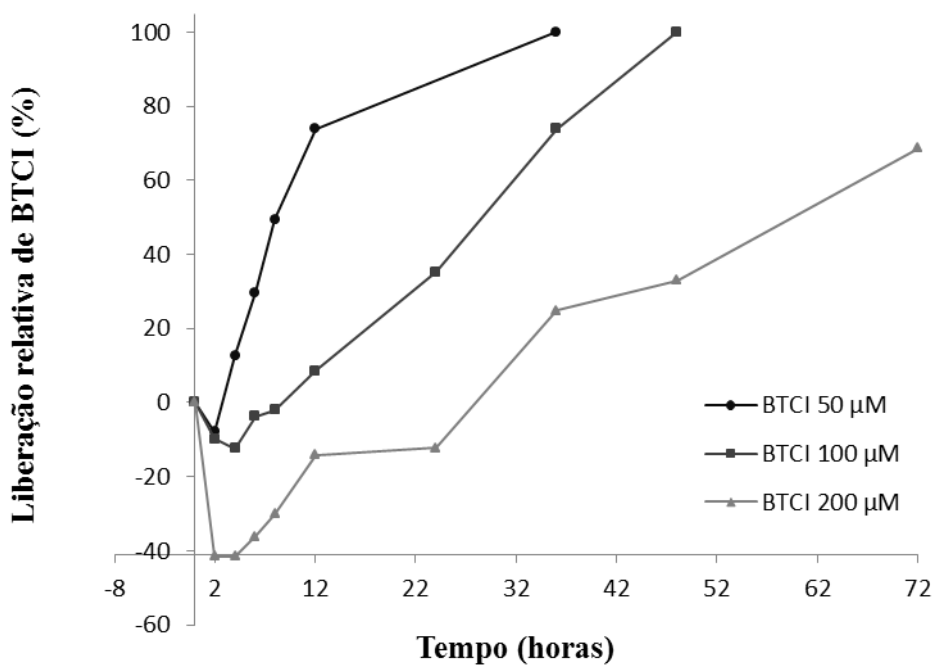


Figura 40. Perfil de liberação do BTCl encapsulado pelas nanopartículas de quitosana nas preparações com BTCl nas concentrações de 50, 100 e 200 µM em pH 9, analisado pela emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da proteína.

Os perfis de liberação para cada concentração de BTCI foram semelhantes independente do pH de produção, como mostram as figuras 38 a 40 dos ensaios de liberação. Enquanto nos sistemas contendo BTCI 50 μM a liberação completa da molécula ocorreu em 32 horas, essa liberação total só ocorreu em 48 horas para os sistemas contendo BTCI 100 μM e 72 horas para os sistemas contendo BTCI 200 μM no pH 3. Embora os sistemas contendo BTCI 200 μM não tenham chegado a 100% da liberação nos pHs de produção 7 e 9, foi observado, no tempo de 72 horas, turbidez da amostra e alto sinal de fluorescência das partículas vazias, possivelmente pela degradação e precipitação dos sistemas nanoestruturados, sendo que as leituras de fluorescência não puderam ser realizadas após esse tempo.

4.5.7. Atividade inibitória do BTCI associado às nanopartículas.

Os resultados obtidos nos ensaios de liberação demonstraram estabilidade do sistema e liberação contínua de BTCI para solução. No entanto, ainda é necessário avaliar a capacidade do BTCI associado às nanopartículas de inibir as serinoproteínases tripsina e quimotripsina. Os testes de atividade com diluições das suspensões contendo BTCI 100 μM foram incubadas a 37°C em pH fisiológico e testadas após 48 horas de incubação (Figura 41).

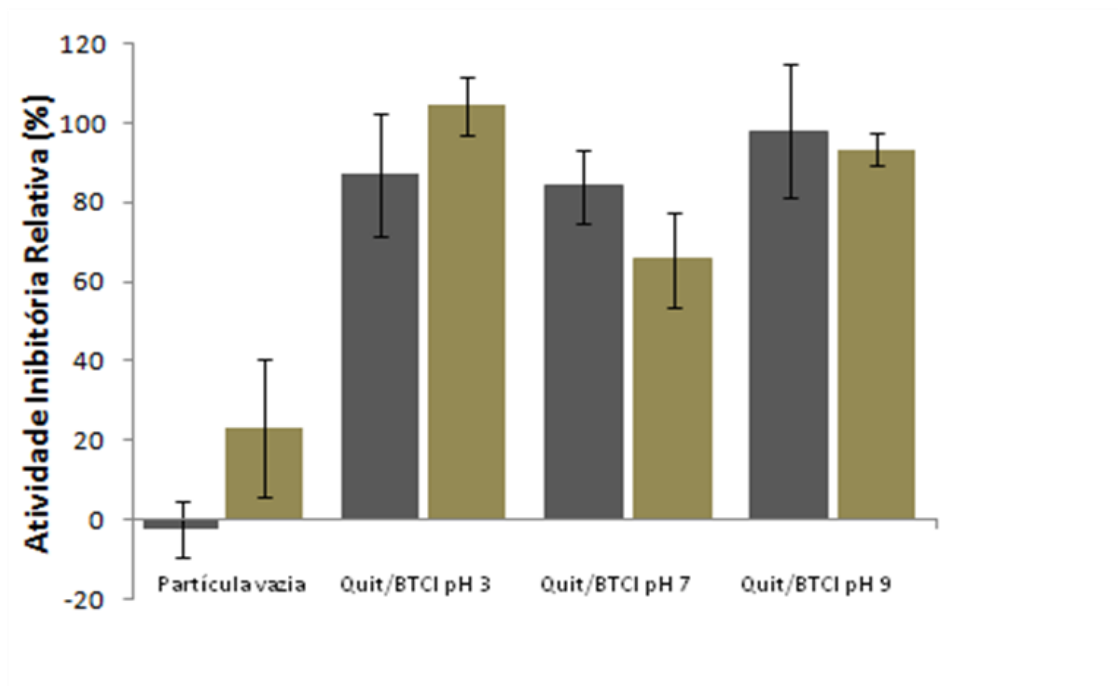


Figura 41. Atividade inibitória do BTCL associado às nanopartículas de quitosana, incubadas por 48 Horas em tampão PBS 1x a 37°C, em relação da atividade do BTCL livre. (cinza) Atividade inibitória contra tripsina e (amarelo) atividade inibitória contra quimotripsina.

As suspensões nos três pHs de produção apresentaram atividade inibitória contra a tripsina e quimotripsina, como observado na figura 41, embora com pequena variação de atividade, principalmente nas suspensões produzidas em pH 7. Em relação à inibição da quimotripsina, a nanopartícula vazia também promoveu uma pequena redução na atividade da tripsina. Esses dados sugerem que as partículas influenciam a atividade do inibidor e da enzima pela interação com essas moléculas em solução.

5. DISCUSSÃO

5.1. Purificação e atividade inibitória do BTCl e peptídeos derivados

O inibidor de proteinases BTCl é uma molécula estável em temperaturas de 25 a 95°C e em pH 3 a 10 e tem sido relacionado a diversos processos biológicos, como controle biológico de pragas em plantas, ação natriurética em ratos e ação anticarcinogênica em culturas de células (Franco et al., 2003; Carvalho et al., 2008; Joanitti et al., 2010). Nesse último caso, o BTCl apresentou efeitos citotóxicos e citostáticos contra células de câncer de mama sem danos às células de mama normais, segundo um mecanismo de ação ainda não elucidado.

Nesta dissertação, algumas características estruturais e funcionais do BTCl e seus peptídeos derivados sintéticos foram analisadas para desenvolvimento de sistemas nanoparticulados. Esses sistemas visam à otimização do potencial farmacológico destas moléculas, favorecendo a biodistribuição e a meia-vida da molécula, além de reduzir a agregação da proteína nativa, que pode ocorrer devido a variações do meio como pH, temperatura e saturação de proteína.

O BTCl foi purificado de acordo com protocolo estabelecido por Ventura (1966) e apresentou alto grau de pureza (figuras 7 e 8) com rendimento de 7% (21 mg a partir de 300 mg de extrato bruto de sementes de *V. unguiculata*). O BTCl purificado apresentou alta atividade inibitória, como indicado pelos valores das constantes de inibição na faixa de 10^{-8} e 10^{-6} M⁻¹, para tripsina e quimotripsina, respectivamente (Tab.2), semelhante aos valores obtidos por Fachetti (1984) e Freitas (1996).

Os peptídeos derivados Pep 1 e Pep 2 foram sintetizados em fase sólida e purificados por HPLC. As constantes de inibição dos peptídeos oxidados foram calculadas e os valores demonstraram uma diminuição da capacidade inibitória em relação ao inibidor nativo (Tabela 2). Essa diferença é relacionada ao menor número de aminoácidos e tamanho reduzido dos peptídeos, em comparação com o BTCl. Esses peptídeos não possuem a região de especificidade formada por alguns resíduos de aminoácidos presentes no

motivo β -*harpin* dos dois domínios no BTCl. Essa região no inibidor, ausente nos peptídeos, contribui para a estabilização do complexo inibidor/enzima e favorece a interação do sítio inibitório do BTCl com o bolsão catalítico e a tríade catalítica da enzima. A interação entre inibidor e enzima depende de características estruturais específicas das moléculas envolvidas, como tamanho, polaridade e presença de ligações dissulfeto. No entanto, outros fatores podem interferir na atividade inibitória dos peptídeos, quando analisada em sistemas mais complexos como é o caso da das células tumorais ou em outros processos fisiológicos.

Como observado na tabela 2, o peptídeo com sítio reativo para a tripsina (Pep 1) apresentou maior atividade do que o peptídeo contendo o sítio reativo para a quimotripsina (Pep 2), resultado esse que foi também obtido para a atividade do BTCl contra as duas enzimas. Mesmo que esses resultados indiquem maior atividade do peptídeo contendo o sítio reativo para a tripsina, a atividade anti-quimotríptica foi a responsável pelos efeitos anticarcinogênicos observados para o BTCl (Joanitti, 2008). Esses ensaios *in vitro* com células de câncer de mama MCF-7 com o BTCl e seus peptídeos derivados mostraram efeitos citotóxicos e citostáticos somente para o Pep 2, responsável pela inibição da quimotripsina, em concentrações de 400 μ M (Joanitti et al., 2010; Joanitti, 2008). As atividades dos peptídeos nesses ensaios *in vitro* podem estar relacionadas às diferenças estruturais das regiões dos sítios reativos para tripsina e quimotripsina no BTCl e, conseqüentemente, dos dois peptídeos derivados, como a polaridade e flexibilidade (Barbosa et al., 2007), bem como ao modo de internalização celular ou à associação dos peptídeos com a bicamada lipídica.

Além dos estudos sobre a ação farmacológica em potencial do BTCl e peptídeos derivados, mecanismos moleculares envolvidos na ação do BTCl e peptídeos, em nível atômico, têm sido alvos de investigação do grupo de biofísica da UnB. Esses estudos estão em andamento e visam compreender o papel da estrutura terciária, da composição de aminoácidos e das ligações não covalentes na formação do complexo do inibidor e peptídeos com uma ou as duas enzimas, simultaneamente. Considerando os resultados que vem sendo obtidos para essas moléculas em estudo, os objetivos dos estudos estruturais

presentes nessa dissertação visam contribuir para o estudo da associação do BTCl e peptídeos derivados com modelos de membrana e o desenvolvimento de nanopartículas contendo essas moléculas. Esses sistemas poderão ser testados, no futuro, em ensaios *in vitro* visando analisar o efeito anticarcinogênico previamente demonstrado do BTCl e Pep 2 encapsulados.

5.2. Interação entre peptídeos e modelos de membrana

Lipossomas constituídos pelo fosfolipídio POPC e contendo carboxi-fluoresceína foram produzidos e utilizados como modelos para o estudo de interação entre os peptídeos derivados do BTCl e a bicamada lipídica das células. O fosfolipídio POPC foi utilizado em estudos computacionais com os peptídeos derivados do BTCl em modelos de membrana (Pinheiro, 2009). No referido trabalho, foi mostrado que o modo de inserção dos peptídeos na membrana é energeticamente favorável.

Nos testes experimentais, a ação dos peptídeos em modelos de membranas foi analisada, acompanhando o perfil de extravasamento do fluoróforo encapsulado nos lipossomas em relação ao tempo (figura 18). As análises foram realizadas no tempo de 10 a 60 minutos após a purificação, quando os sistemas lipossomais apresentaram o extravasamento de carboxi-fluoresceína estabilizado. A estabilidade dos lipossomas e a liberação do conteúdo encapsulado estão relacionadas à composição de membrana do lipossoma, sendo que perfis de liberação distintos são descritos na literatura a partir da variação da composição fosfolipídica (Kato *et al.*, 2008).

A adição dos peptídeos aos sistemas contendo o fluoróforo aumentou, em curto intervalo de tempo, o sinal fluorescente causado pelo extravasamento da carboxi-fluoresceína encapsulada. Esses resultados demonstram que os peptídeos derivados do BTCl interagem com modelos de membrana desestruturando-a. Essa característica foi observada em membranas de células MCF-7, conforme estudos recentes realizados pelo grupo de biofísica da UnB (Souza, 2010). Nesses estudos, foi mostrado que o BTCl atravessa a membrana de células de câncer de mama e co-localiza com o complexo

proteassômico 20S em todo o citoplasma e núcleo, inibindo totalmente a atividade catalítica desse complexo. Adicionalmente, os estudos realizados nesta dissertação confirmam os resultados anteriores em ensaios *in silico* e *in vitro*, que sugeriram que estes peptídeos são capazes de atravessar a membrana celular de forma não assistida, influenciados pelas características físico-químicas das moléculas, semelhante aos *Cell Penetrating Peptides* (CPP). Os CPPs são peptídeos que atravessam rapidamente a bicamada lipídica exercendo sua atividade no citoplasma ou guiando moléculas de interesse conjugadas à sua estrutura (Schwarze et al., 2000; Heitz et al., 2009). Os mecanismos de ação pelos quais estes peptídeos aumentam a permeabilidade da membrana não foram completamente elucidados, mas esse aumento da permeabilidade da membrana tem sido relacionado à interação com fragmentos ricos em arginina e processos endossomais, apresentando muitas vezes também efeito de proteção da molécula conjugada contra a degradação de proteases (Futaki et al., 2005). Como apresentado nas figuras 18 e 19, houve uma diferença de associação entre dois peptídeos derivados e a bicamada lipídica, podendo essa diferença estar relacionada à polaridade das moléculas, como já descrito na literatura (Pinheiro, 2009). Moléculas hidrofílicas se associam predominantemente à região interfacial da água/lipídio, enquanto as hidrofóbicas são estabilizadas preferencialmente no centro da bicamada, (Pinheiro, 2009).

5.3. Produção e caracterização de sistemas nanoestruturados.

Neste trabalho, formulações para sistemas de liberação controlada foram produzidas visando o encapsulamento do BTCl e a alteração de características estruturais e funcionais da molécula que aumentem sua atividade contra as células tumorais. Com esse objetivo, foram escolhidos polímeros para estruturação das nanopartículas, principalmente o polissacarídeo quitosana, derivado da desacetilação da quitina. As nanopartículas produzidas a partir desse polímero apresentam estruturas distintas, podendo carregar a molécula de interesse no seu interior, entremeada entre a matriz polimérica ou associada à sua superfície externa. Formulações contendo nanopartículas de quitosana

são muito utilizadas no transporte de moléculas anti-tumorais, devido à afinidade do polissacarídeo pelas células cancerígenas. Essa afinidade se dá pela alteração do metabolismo da célula relacionada ao processo patológico, que a torna mais ávida por carboidratos. (Um *et al*, 1995).

Um dos principais objetivos do encapsulamento do BTCI neste trabalho foi evitar a agregação ou aglomeração do inibidor que tende a ocorrer em solução, pela presença de muitos sítios hidrofóbicos expostos ao solvente. O BTCI em solução é encontrado predominantemente na forma de dímeros, trímeros e hexâmeros, sendo que os agregados são observados em altas concentrações ou em soluções contendo outros componentes que podem interferir na solubilidade do inibidor, como meio de cultura. O uso de sistemas particulados pode diminuir a exposição da proteína às condições adversas dos fluidos fisiológicos, imobilizando a proteína por meio de encapsulamento no seu interior ou associação à sua superfície externa, (Krishnan *et al.*, 2002).

Devido ao modo de ação do BTCI nas células de câncer e também pela facilidade de produção de nanopartículas, o encapsulamento do BTCI foi realizado em sistemas nanoparticulados contendo os polissacarídeos, que apresentam vantagens como melhor taxa de encapsulamento, maior estabilidade e ausência de resíduos orgânicos, em relação às suspensões lipossomais. As nanopartículas poliméricas são amplamente utilizadas como veículo para distribuição de moléculas e/ou drogas nos sistemas vivos e apresentam vantagens e desvantagens em relação aos lipossomas. Nos lipossomas, os fosfolipídios que os compõe se fundem à bicamada lipídica liberando a droga ou o ativo diretamente no citoplasma não por fagocitose, como ocorre com as nanopartículas, onde o fármaco pode sofrer a ação de lisoenzimas e proteinases. No entanto, como o BTCI e peptídeos derivados são potentes inibidores de proteinases, eles podem atuar nos processos que levam à morte celular, uma vez que não são degradados por esse sistema.

Resultados obtidos anteriormente com o BTCI em células de câncer de mama MCF-7 demonstraram que a morte da célula tumoral é intensificada por um processo de autofagia. Essa autofagia é causada por um aumento excessivo dos lisossomos e conseqüente permeabilização da membrana das

organelas e extravazamento das lisoenzimas para todo o interior da célula (Joanitti *et al*, 2010). Esses resultados indicam que, além do efeito citotóxico do BTCl em outras organelas, o inibidor de proteases fagocitado pelos lisossomas estimula a produção de lisoenzimas que favorecem ainda mais o processo de morte celular. Para produção de sistemas nanoestruturados é necessário a escolha do método de produção com melhor eficiência de encapsulamento e características morfológicas e funcionais das partículas que favoreçam a ação do fármaco. Algumas preparações, diferindo o método de preparação, físico ou químico, foram testadas neste trabalho e os melhores resultados em relação ao tamanho, eficiência de encapsulamento e carga superficial da partícula foram obtidas com as nanopartículas de quitosana produzidas pelo método físico. É descrito na literatura que as partículas preparadas pelo método físico são de tamanho micrométrico (Madhally, 1999), diferentemente das que foram obtidas neste trabalho, com diâmetro máximo em aproximadamente 200 nm (Fig. 28). Essa diferença pode estar relacionada às características físico-químicas e estruturais do BTCl, como hidrofobicidade, que induz a formação de pequenos aglomerados de proteína, ao redor dos quais moléculas de quitosana podem se organizar formando uma nanopartícula.

Além da variação do método, nanopartículas contendo o inibidor foram produzidas a partir de diversas concentrações (BTCl 50, 100 e 200 μM) e pHs (3, 7 e 9). A quitosana é um polímero insolúvel em meios neutros e alcalinos, e por isso as nanopartículas são produzidas em meio ácido, pela adição de ácido acético. A acidificação do meio promove modificações estruturais do inibidor (Esteves, 2010) e, pela proximidade com o ponto isoelétrico do BTCl, pode acentuar o processo de agregação. Isso ocorre porque próximo ao ponto isoelétrico, a proteína apresenta carga total próxima a zero, com uma redução da repulsão eletrostática entre moléculas e conseqüente formação de agregados. Já em pHs neutros e alcalinos, o BTCl apresenta carga total negativa devido a resíduos negativos, especialmente de ácido aspártico, expostos ao solvente. Sendo assim, a produção de nanopartículas em pHs maiores reduziria a agregação e favoreceria a associação do inibidor com as regiões carregadas positivamente da quitosana. A influência do método,

concentração e pH nas partículas foram analisadas por meio de caracterização morfológica e da eficiência de encapsulamento.

Os sistemas nanoestruturados produzidos pelo método físico apresentaram os melhores resultados em relação ao tamanho e morfologia, principalmente em pH ácido, diferentemente do que era esperado (Tabela 2 e 3). As nanoestruturas produzidas em pH ácido foram abundantes e apresentaram formato homogêneo e aproximadamente esférico (Fig. 24). Em contraste, nas preparações contendo o BTCl em pH 7 e 9 (Fig. 22 e 23), agregados de partículas ou polímeros foram observados e estão relacionados à dificuldade de solubilização da quitosana em pHs alcalinos, o que impede a formação de nanopartículas menores e é responsável por uma baixa eficiência de incorporação do polímero pelos sistemas nanoparticulados.

Além da influência das possíveis interações entre os sítios carregados do BTCl e a quitosana, a superfície hidrofóbica do inibidor também exerce influência na associação proteína/polímero, pelo favorecimento de arranjos entre proteína e polímero, reduzindo a exposição das regiões hidrofóbicas do inibidor ao solvente. As interações hidrofóbicas são as principais forças envolvidas no dobramento das proteínas e estas interferem no modo como a proteína interage com a matriz polimérica. Quando associado à quitosana, o BTCl tende a esconder suas porções hidrofóbicas e interagir com a quitosana por meio de suas porções polares, formando as nanopartículas.

As análises por microscopia de força atômica das nanopartículas produzidas pelo método físico e químico nos três pHs e BTCl nas concentrações de 50, 100 e 200 μM demonstram que a variação de concentração também influenciaram a morfologia das partículas (Fig.22 a 24). Esses resultados obtidos por meio das análises em microscopia de força atômica (MFA) foram confirmados nos ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A utilização de diferentes métodos de análises, como a microscopia e espalhamento de luz, é necessária para caracterização do sistema em estudo.

Por um lado, as imagens de microscopia são coletadas a partir das partículas desidratadas e por varredura da superfície da amostra. Essa estratégia, apesar de fornecer dados importantes sobre o tamanho e forma, pode distorcer a proporção entre o diâmetro e a altura das partículas em solução, resultando em uma subestimação do diâmetro. Por outro lado, as imagens por DLS não diferem as partículas de sua camada de solvatação, morfologia e estruturas agregadas. O uso das duas técnicas permitiu uma melhor estimativa das dimensões dos sistemas particulados aqui apresentados, e permitiram evidenciar a solubilização da quitosana e morfologia esférica das nanopartículas em pH ácido.

Além da morfologia e tamanho das nanopartículas, estas foram avaliadas em relação a sua carga superficial, também conhecida como potencial zeta, que representa a estabilidade coloidal da partícula. Quando produzidas, as nanopartículas se organizam em uma dispersão heterogênea em equilíbrio coloidal, onde as forças repulsivas eletrostáticas impedem a agregação das estruturas. Quanto maior a carga superficial das partículas, maior a repulsão entre elas e maior a estabilidade da suspensão. Partículas com potencial zeta acima de 45 mV, em módulo, são descritas como estáveis (ASTM, 1985). As partículas de quitosana produzidas nesse trabalho apresentaram valor de potencial zeta acima de + 45 mV (Tabela 2), principalmente aquelas produzidas pelo método físico, em que a suspensão é congelada e depois liofilizada. Esse processo de congelamento e liofilização remove a fase aquosa da água, que está relacionada à instabilidade coloidal da suspensão (Fessi, 2006), promovendo também uma melhora nas taxas de encapsulamento e incorporação durante a reidratação. Nanopartículas produzidas com outro polímero, o PLGA, também foram analisadas. As análises da carga superficial destas partículas produzidas pelo método de nanoprecipitação apresentaram valores negativos devido à presença de regiões negativas no polímero mencionado.

Em relação às concentrações de BTCl utilizadas, foi observada uma redução no potencial zeta das partículas de quitosana contendo BTCl a 200 μM em todos os pHs. Essa redução da carga superficial das partículas na presença

de alta concentração de inibidor pode estar relacionado, entre outras condições, às moléculas do inibidor associadas eletrostaticamente à superfície externa da partícula, considerando que o BTCl apresenta carga total próxima a zero em pHs próximos ao seu ponto isoelétrico e carga negativa quanto em meios neutros ou alcalinos. Não é possível diferir a carga de diferentes moléculas em uma mesma suspensão por meio do potencial zeta, sendo que os valores observados estão relacionados a uma somatória das cargas das moléculas expostas ao solvente.

Em relação à incorporação do BTCl pelas partículas, as taxas de encapsulamento utilizando a quitosana, pelo método físico, foram superiores a 70%, maiores do que as obtidas pelas partículas produzidas pelo método químico (Tabela 3), em que é utilizado o tripolifosfato (TPP). O TPP é utilizado para aumentar a incorporação de moléculas de quitosana pela partícula por meio de ligação entre o grupamento fosfato do TPP e os grupamentos amina presentes no polímero de quitosana. A diferença nas taxas de encapsulamento entre os dois métodos podem estar relacionadas às características físico-químicas do BTCl e as alterações nas interações não covalentes entre a proteína e o polímero causadas pelo TPP. Em 2006, Boonsongrit mostrou que a presença de TPP não altera a eficiência de incorporação de insulina em preparações com grandes volumes da proteína. A relação entre número de moléculas de TPP e proteína encapsulada influencia no encapsulamento da molécula pela nanoestrutura.

Além do método e coadjuvantes utilizados, é mostrado na literatura que a estabilidade e reprodutibilidade das preparações são influenciadas pelo comprimento e grau da desacetilação da cadeia polimérica da quitosana. Em trabalhos recentes, foi observado que formulações de quitosana com massa molecular média de 55 kDa e 90% de desacetilalação, semelhante à quitosana utilizada nesta dissertação, geravam as partículas menores e mais estáveis, além de maior taxa de eficiência de encapsulamento do fármaco, quando comparadas a outras estruturas de quitosana (Yang e Hon, 2009). Em outro trabalho utilizando sistemas nanoparticulados, nanopartículas com 100 a 200 nm de diâmetro e eficiência de encapsulamento acima de 70% foram obtidas utilizando a mesma molécula de quitosana para encapsulamento de peptídeos

sintéticos pelo método químico (Medeiros, 2011). Neste trabalho, a carga superficial das partículas, conhecida como potencial zeta foi também positiva, embora um pouco menor do que as obtidas na presente dissertação.

As taxas de encapsulamento do BTCl e outros parâmetros morfológicos também foram definidos para as nanoestruturas produzidas a partir de polímeros de PLGA, testadas nesta dissertação. O diâmetro hidrodinâmico dessas partículas foi semelhante aos valores encontrados na literatura para o encapsulamento de outras moléculas (Keum et al, 2011). A carga superficial negativa desse sistema está relacionada à carga negativa do polímero e de regiões expostas do BTCl, quando analisados no pH da água. Ao contrário das nanopartículas de quitosana, os sistemas contendo partículas de PLGA não foram amplamente caracterizados e os resultados apresentados no presente trabalho são ainda preliminares. Mesmo apresentando baixas taxas de encapsulamento em relação ao BTCl, novos ensaios com os sistemas contendo PLGA devem ser realizados para confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos com BTCl e também com os peptídeos derivados.

Além da quantificação do encapsulamento do BTCl pelas partículas, que foi realizada por meio do método colorimétrico de Lowry (tabela 3), as partículas de quitosana contendo BTCl foram analisadas por espectrometria de fluorescência intrínseca, considerando-se que o BTCl possui somente um resíduo de triptofano. Os valores obtidos para eficiência de encapsulamento por fluorescência foram similares aos obtidos pela quantificação colorimétrica (Tabela 4). O resíduo de triptofano do BTCl encapsulado no interior da partícula de quitosana encontra-se em um ambiente com pouco ou nenhum acesso à radiação eletromagnética no comprimento de onda de excitação. Portanto, os espectros de fluorescência das suspensões estão relacionados à emissão de proteínas não encapsuladas presentes em solução (Fig. 34, 35 e 36). O alto valor da intensidade de fluorescência da proteína não encapsulada na suspensão de partículas em relação ao que era esperado pela quantificação da proteína livre é devido, provavelmente, ao BTCl associado à superfície externa da partícula. Essa interação entre o BTCl e a superfície da nanoestrutura resulta em estruturas com características de nanoesferas, ideais

para formulações onde a partícula libera seu conteúdo lentamente sem ser rompida.

Para separação do BTCl livre e encapsulado, e posterior quantificação pelo método de Lowry e por emissão de fluorescência, as suspensões de nanopartículas foram purificadas por centrifugação em membrana de diálise. Os precipitados resultantes da centrifugação, onde há apenas partículas, foram também analisados por fluorescência para excluir a eventual possibilidade de retenção do BTCl livre pela membrana de diálise (Fig. 34, 35 e 36). A baixa intensidade de emissão de fluorescência dos precipitados comprova a eficiência da purificação. A ausência de proteína livre no precipitado sugere que o processo de centrifugação remove parte do BTCl, possivelmente associado à superfície da partícula, ou promove a incorporação da proteína não encapsulada nessa partícula.

Os espectros de fluorescência apresentados nas figuras 31, 32 e 33 mostram que houve também um deslocamento da banda de emissão do BTCl em suspensão para comprimentos de onda menores, quando comparado com a banda de emissão do BTCl na ausência de partículas. O deslocamento da banda de emissão para comprimentos de onda menores sugere alterações no ambiente do triptofano em resposta à diminuição da exposição do resíduo ao solvente. Isso ocorre porque o resíduo aromático de triptofano perde menos energia por meio de processos de relaxação vibracional quando não exposto ao solvente polar e, por isso, emite fluorescência em comprimentos mais energéticos (Laskowski, 2004). A menor exposição do triptofano do BTCl associado à suspensão de partículas, quando comparado com o BTCl na ausência de nanoestruturas, reforça a hipótese de que as moléculas de BTCl se associam à superfície externa das nanopartículas.

Com o objetivo de obter resultados mais quantitativos sobre a associação entre o BTCl e os polímeros de quitosana, ensaios de supressão de fluorescência dos sistemas nanoparticulados foram realizados com os supressores acrilamida (não carregado), iodeto de potássio (carregado negativamente) e cloreto de céσιο (carregado positivamente) para analisar as alterações estruturais do inibidor quando esse interage com a matriz

polimérica. Os valores das constantes de Stern-Volmer obtidos para o BTCI em suspensão de partículas foram diferentes daqueles obtidos para o BTCI na ausência de nanopartículas (Tabela 5). A vizinhança do triptofano no BTCI associado às partículas apresentou uma redução significativa no acesso ao supressor acrilamida. No entanto, esse acesso à vizinhança do resíduo de triptofano foi aumentado quando utilizados os supressores carregados, em relação à proteína não encapsulada (Figura 34, 35, 36).

A redução do acesso da acrilamida ao triptofano indica que o resíduo está menos exposto nas moléculas de BTCI associado às partículas. Já o acesso dos supressores carregados depende não só da exposição do triptofano ao solvente, mas também do comportamento dos grupos carregados próximos ao fluoróforo. O maior acesso ao resíduo de triptofano pelos supressores carregados demonstra que, apesar do enterramento do fluoróforo, mudanças estruturais facilitaram o acesso aos supressores. Esse maior acesso ao triptofano pode estar relacionado à região de enterramento do resíduo, próximo à grupamentos carregados da molécula, ou por uma atração dos supressores pela quitosana associada ao BTCI. O pH da suspensão também influencia o acesso do supressor ao fluoróforo, devido às modificações estruturais da proteína causadas por ionização de alguns grupos de cadeias laterais em decorrência das mudanças de polaridade do solvente. Os ensaios de supressão indicam que a interação entre o inibidor e o polímero causa modificações na estrutura terciária da proteína, sendo essa mudança refletida no ambiente do resíduo de triptofano.

Além dos ensaios de fluorescência, a estrutura secundária do BTCI associado às nanopartículas foi analisada por espectroscopia de dicroísmo circular. Essa técnica foi utilizada para analisar a interferência dos sistemas particulados na estrutura secundária do BTCI e avaliar a incorporação do inibidor pela partícula. Amostras contendo as suspensões de partículas antes e depois da purificação, bem como o BTCI na ausência de nanoestruturas, foram analisadas. Mudanças estruturais do BTCI ocorreram e são indicadas pela redução do sinal dicróico devido à incorporação da proteína nas nanopartículas (figura 37). Além da redução da intensidade do sinal, houve um deslocamento no comprimento de onda da banda máxima, que pode estar relacionado ao

BTCl associado à superfície externa da partícula, por apresentar algumas mudanças estruturais decorrentes dessa interação.

Para analisar se essas alterações na estrutura secundária e terciária do BTCl afetam a atividade inibitória da molécula, ensaios de atividade foram realizados com os sistemas nanoestruturados contendo o BTCl após 48 horas de incubação em temperatura e pH fisiológicos para que o BTCl fosse totalmente liberado (Figura 41). Os resultados demonstram que o BTCl associado às nanoestruturas conservou a atividade inibitória contra as proteinases, no entanto, com uma pequena redução de atividade em relação ao BTCl na ausência de partículas, em algumas condições. A redução da atividade pode estar relacionada à menor disponibilidade de moléculas de BTCl, visto que mesmo após 48 horas, o BTCl pode estar associado à superfície externa da partícula ou associado a moléculas de quitosana livre. Essas moléculas de quitosana podem interferir nas condições de ensaio interagindo com o inibidor, enzima ou substrato, o que altera a atividade inibitória, como observado a partir da variação da capacidade inibitória do BTCl em cada condição. No entanto, esses resultados comprovam que a proteína mantém sua atividade inibitória quando associada às nanopartículas e após liberação, mesmo apresentando modificações estruturais decorrentes desta associação.

Com os sistemas nanoestruturados, contendo o BTCl, já caracterizados em relação a sua morfologia e atividade, ensaios de fluorescência foram realizados para quantificação da liberação do BTCl pelas partículas em condições fisiológicas. Essa metodologia foi utilizada pela incerteza dos efeitos da técnica de centrifugação, utilizada para separação das nanopartículas com o BTCl, nas características das partículas e na reincorporação do BTCl livre na suspensão. Os resultados de liberação do BTCl pelas nanopartículas produzidas nos pHs 3, 7 e 9 foram bem semelhantes, demonstrando que o pH não interfere na taxa de liberação (Fig 38, 39 e 40).

As amostras contendo BTCl 200 μ M apresentaram liberação lenta, com uma diminuição do sinal fluorescente nas primeiras horas de incubação. Essa diminuição inicial sugere a reincorporação do BTCl livre pelas partículas ou

devido à saturação pela alta concentração de proteína em solução, efeito conhecido como efeito filtro (Laskowski, 2004). Após essas primeiras horas, as partículas começaram a liberar seu conteúdo, apresentando perfil de liberação de 36 a 72 horas. Na literatura, são descritas partículas de quitosana com diversos perfis de liberação, podendo liberar seu conteúdo em alguns minutos até vários dias (Boonsongrit et al., 2006)

No presente trabalho, nanopartículas de quitosana e BTCl produzidas pelo método físico apresentaram resultados em relação ao tamanho, eficiência de encapsulamento e estabilidade, compatíveis com os sistemas carreadores descritos na literatura para combate de células tumorais. Além dessa caracterização do sistema, foi observado que o BTCl interage com superfície externa da partícula de quitosana, o que provoca pequenas mudanças conformacionais do inibidor em relação à estrutura secundária e terciária. Apesar destas alterações estruturais, a proteína manteve a atividade contra tripsina e quimotripsina quando associada aos sistemas nanoestruturados.

Como perspectivas deste trabalho, essas formulações poderão ser testadas em ensaios de viabilidade e proliferação celular de células de câncer de mama MCF-7, para verificação da influência das nanoestruturas na entrada e ação do inibidor na célula tumoral. Além da produção de nanopartículas contendo BTCl, os peptídeos derivados do BTCl foram sintetizados e analisados em relação a sua interação com modelos de membrana e capacidade de inibir as serinoproteinases. Os resultados mostram que esses peptídeos podem, no futuro, ser utilizados na forma encapsulada em nanopartículas, para ensaios de viabilidade e proliferação de células de câncer de mama. O próximo passo para elaboração de sistemas de entrega de drogas é o encapsulamento dos peptídeos derivados, para que se possa aliar as vantagens dos peptídeos sintéticos e de sua produção ao uso de veículos carreadores na formulação de um sistema mais eficiente no combate às células tumorais.

6. CONCLUSÕES

1. O BTCl e peptídeos derivados foram purificados e apresentaram atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina. Os valores das constantes de inibição do BTCl para essas enzimas foram na ordem de 10^{-8} e 10^{-6} , respectivamente. Os peptídeos apresentaram uma diminuição da atividade de inibição em relação à proteína nativa.

2. Os peptídeos derivados do BTCl testados em modelos de membrana (lipossomas) desestabilizaram a organização estrutural dos lipídeos, o que corrobora com resultados anteriores que sugerem que estes peptídeos inserem na membrana celular na ausência de receptores.

3- Partículas de quitosana contendo BTCl foram produzidas pelos métodos físico e químico. Os melhores resultados em relação à morfologia e número de partículas foram aqueles obtidos pelo método físico, em pH ácido.

4- As nanopartículas de quitosana e BTCl, em concentrações de 50 a 200 μM produzidas em diversos pHs, apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 25 a 200 nm e carga superficial da partícula acima de 60 mV, o que caracteriza o sistema como estável. As taxas de encapsulamento foram maiores do que 80% para as nanopartículas produzidas em pH ácido.

5- Análises de espectroscopia de fluorescência mostraram que o BTCl interage com a superfície externa da partícula, sofrendo pequenas alterações estruturais, indicadas pelo deslocamento da banda de emissão. Esses resultados foram reforçados por análises de dicroísmo circular, que mostraram alteração na intensidade e comprimento de onda da banda dicróica típica do BTCl, relacionada à estrutura secundária.

6- As nanopartículas de quitosana apresentaram liberação prolongada do BTCl encapsulado, de 36 a 72 horas. Essa suspensão de partículas foi analisada no tempo de 48 horas, em condições fisiológicas, e apresentou atividade de inibição contra tripsina e quimotripsina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. 2006. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **Eur J Pharm Biopharm** 63, 87– 94, 2006.

Agnihotri S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 100, 5 –28, 2004.

American Society for Testing and Materias. Zeta Potential of Colloids in Water und Waste Water. ASTM Standart, 4182-77, 1984.

Azevedo M.M.M. LQES – Lab. Química do Estado Sólido – Inst. de Química – **UNICAMP**, 2002.

Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.23, 27-34. 2007.

Barbosa J.A., Silva L.P., Teles R.C., Esteves G.F., Azevedo R.B., M.M. Ventura, S.M. Freitas. Crystal structure of the Bowman–Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with b-trypsin at 1.55 a resolution and its structural properties in association with proteinases. **Biophys. J.** 92, 1638–1650, 2007.

Barry, M. and Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nat. Rev. Immunol.** 2, 401–409, 2002.

Bergey, D.R.; Howe, G.A.; Ryan, C.A. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93, 12053-12058, 1996.

Birk, Y. The Bowman-Birkinhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 25, 113-131, 1985.

Blondell, J. M. Urban-rural factors affecting cancer mortality in Kentucky, 1950–1969. **Cancer Detect.** 11, 209–223, 1988.

Bode, W.; Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477, 241-252, 2000.

Brannon-Peppas. [http:// www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html](http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html), 2002.

Boonsongrit Y; Mitrevej A; Mueller BW. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 62, 267-274, 2006.

Carvalho, AF, Santos-Neto, MS., Monteiro, HSA., Freitas, SM., Morhy, L., Nascimento, NRF., Fonteles, MC. BTKI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. **Braz. J. Biol.**, 68(1), 149-154, 2008.

Chen P., Rose J., Love R., Wei C.H., Wang B.C. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 267, 1990–1994, 1992

Chi EY., Krishnan S., Randolph TW., and Carpenter JF. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. **Pharmaceutical Research**, 20 (9), 2003.

Cleland J. L., Powell M. F., Shire S. J. The development of stable protein formulations— a close look at protein aggregation, deamidation and oxidation. **Crit. Rev. Ther. Drug** 10, 307–377, 1993.

Clemente, A.; Domoney, C. Biological Significance of Polymorphism in Legume Proteinase Inhibitors from the Bowman-Birk Family. **Current Protein and Peptide Science**, 7, 2006.

Correa, P. .Epidemiologic correlations between diet and cancer frequency. **Cancer Res**. 41, 3685–3690, 1981.

Dev, A.; Mohan, J.C.; Sreeja, V.; Tamura, H.; Patzke, G.R.; Hussain, F.; Weyeneth, S.; Nair, S.V.; Jayakumar, R. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. **Carbohydr.Polym.** 79, 1073–1079, 2010.

Diamandis, E.P. et al. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. **Trends Endocrinol. Metab.** 11, 54–60, 2000.

Dinarvand R., Sepehri N., Manoochehri S., Rouhani H., Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. **International Journal of Nanomedicine**. 6, 877–895, 2011.

Dong A. C., Prestrelski S. J., Allison S. D., Carpenter J. F.. Infrared spectroscopic studies of lyophilization-induced and temperature-induced protein aggregation. **J. Pharm. Sci.** 84, 415–424, 1995.

Esteves GF, Teles RC, Cavalcante NS, Neves D, Ventura MM, Barbosa JA, de Freitas SM. Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.** 63, 1087-1090, 2007.

Esteves GF. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2008.

Esteves GF. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2010.

Fachetti, H. C. S., Mizuta, K., Ventura M.M. Thermodynamics of the association of trypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An. Acad. Brasileira de Ciências.** 56, 311-317, 1984.

Fernández-Urrusuno R., Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J. Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles. **Pharmaceutical Research.** 10, 1576-1581, 1999.

Fessi H., Abdelwahed W., Degobert G. Stainmesse S. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 58, 1688-1713, 2006.

Franco O.L., Santos R.C., Batista J.A.N., Mendes A.C.M., Araújo M.A.M., Monnerat R.G., Grossi-de-Sá M.F., Freitas S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry** 63, 343–349, 2003.

Freitas, S. M. Brasília, 1996. Tese de Doutorado em Biofísica Molecular. Universidade de Brasília.

Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews,** 57, 547–558, 2005.

Garcia-Olmeda, F.; Sakedo, G.; Sanchez-Monge, R.; Gomez, L.; Royo, J.; Carbonero, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteases. **Plant Cell Mol. Biol.** 4, 275-334, 1987.

Gohara D.W. e Di Cera E. Allosterity in trypsin-like proteinases suggests new therapeutic strategies. **Trends in Biotechnology,** 29, 2011.

Goolcharran C., Khossravi M., Borchardt R. T.. Chemical pathways of peptide and protein degradation. In S. Frokjaer and L. Hovgaard (eds.), **Pharmaceutical Formulation and Development of Peptides and Proteins,** Taylor and Francis, London, 70–88, 2000.

Hakkak R, Korourian S, Shelnut SR, Lensing S, Ronis MJJ, et al. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 9, 113–117. 2000.

Hartley B.S. Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. **Nature** (London). 201, 1284-1287, 1964.

Heitz, M.C. Morris, G. Divita. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. **Br. J. Pharmacol.**, 157, 195–206, 2009.

Hénin J, Chipot C. Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**. 121. 2904-2914. 2004.

Herring, P.J. Marine Ecology and natural products. **Pure Appl. Chem**. 1979, 51, 1901–1911.

Hoet PH. Nemmar A, Nemery B.. Health impact of nanomaterials? **J Nanobiotechnology** 12, 2004.

Holm, E., Hagmuller, E., Staedt, U., Schlickeiser, G., Gunther, H-i., Leweing, H., Toku, M. e Kollmar, H. B. Substrate balances across colonic carcinoma in humans. **Cancer Res.**, 55, 1373-1378, 1995.

Hynes DM, Weaver F, Morrow M, et al. Breast cancer surgery trends and outcomes: results from a national department of veterans affairs study. **J Am Coll Surg**. 198, 707–716, 2004.

Ichikawa S., Iwamoto S. Watanabe J. Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of Enzymatic Hidrolysates of Chitosan and Carboxymethyl Cellulose. **Biosci.Biothechnol.Biochem**. 69(9), 1637-1642, 2005.

INCA- Instituto Nacional do Câncer. Estimativa | 2012 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro-RJ, 2011.

Jaulent A.M., Leatherbarrow R.J. Design, synthesis and analysis of novel bicyclic and bifunctional proteinase inhibitors. **Protein Engineering, Design & Selection**. V. 17, 2004.

Joanitti, G.A.; Freitas, S.M.; Silva, L.P. Proteinaceous Proteinase Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, 199-217, 2006.

Joanitti, G.A. Dissertação de Mestrado, 2008. Universidade de Brasília.

Joanitti G.A., Azevedo R.B., Freitas S.M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Lett**. doi:10.1016/j.canlet.2009.12.017, 2010.

Kato K., Walde P., Koine N. Temperature-sensitive nonionic vesicles prepared from Span 80-sorbitan monooleate. 10762-10770, 2008.

Kawashima S, Hopsu-Havu VK, Jarvinen M, Kirschke H. **Biomedical and Health Research**. 13, 447-452. 1997.

Kennedy AR. Overview: anticarcinogenic activity of proteinase inhibitors. In: Troll W, Kennedy AR, eds. **Proteinase inhibitors as cancer chemopreventive agents**. New York: Plenum Press, 9–64, 1993.

Kennedy A.R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**;68, 1998.

Kennedy A. R. Chemopreventive Agents: Proteinase Inhibitors. **Pharmacol. Ther.** 78, 167–209, 1998.

Keum C., Noh Y., Baek J. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. **Inter. Journal of Nanomedicine**. 6. 2011.

Khoushalb F., Yamabhai M. Chitin Research Revisited. **Mar. Drugs**, 8, 1988-2012, 2010.

Kim, J.-Y., Park, S.C., Kim, M.H., Lim, H.T., Park, Y., Hahm, K.-S. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin proteinase inhibitor obtained from potato. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 330, 921-927, 2005.

Kim, J.-Y., Park, S.C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.-W., Hahm, K.-S., Park, Y. Proteinase Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. **Int. J. Mol. Sci.**, 10, 2860-2872, 2009.

Klamt, A. Conductor-Like Screening Model For Real Solvents - A New Approach To The Quantitative Calculation Of Solvation Phenomena. **J. Phys. Chem.** 99, 2224, 1995.

Krishnan S., Chi E. Y., Webb J. N., Chang B. S., Shan D., Goldenberg M., Manning M. C., Randolph T. W., Carpenter J. F.. Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: Characterization and thermodynamic inhibition. **Biochemistry** 41, 6422–6431, 2002.

Laskowski, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer. 2^a ed. 698, 2004.

Lima, K.M. et al. **Biotechnol. Cienc. Desenv.** (Brasil), v.2,10-13, 2000.

Lin, C.Y. et al. Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine proteinase with trypsin-like activity. **J. Biol.Chem.** 274, 18231–18236, 1999.

Lindsay MA. Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. **Current Opinion in Pharmacology.** 2. 587-594. 2002.

Long Y., Lee S., Lin C., Enyedy I.J., Wang S., Li P., Dickson R.B., Roller P.P. Bioorg. Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine proteinase, matriptase. **Med. Chem. Lett.**, 11, 2515–2519, 2001.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193, 265-75, 1951.

Lü J.M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P.H., Yao Q. Chen C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. **Expert Rev Mol Diagn.** doi:10.1586/erm.09.15, 2009.

Lumry R. e Eyring H. Conformation changes of proteins. **J. Phys. Chem.** 58,110–120, 1954.

Lynch I, Dawson K A. Protein–nanoparticle interactions. **Nano Today.** 3, 40–47. 1998.

Madhally, S.V. And Matthew, W.T. Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. **Biomaterials** . 20. 1133-1142, 1999.

Marco MD, Shamsuddin S, Razak KA, Aziz AA, Devaux C, Borghi E, Levy L, Sadun C. Overview of the main methods used to combine proteins with nanosystems: absorption, bioconjugation and encapsulation. **International Journal of Nanomedicine.** 2010:5, 2009.

Mathur, N.K.; Narang, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J. Chem. Educ.**, 67, 938, 1990.

McBride, J. D.; Leatherbarrow, R. J. Synthetic peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor protein. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 909-917, 2001.

Medeiros, K.A. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2011.

Morhy, L., and Ventura, M. M. **An. Acad. Brasil. Cienc.** 59, 71-81.

Mukhopadhyay S, Ballard BR, Mukherjee S, Kabir SM, Das SK Beneficial effects of soy protein in the initiation and progression against dimethylbenz [a] anthracene-induced breast tumors in female rats. **MolCellBiochem** 290, 169–176, 2006.

- Neurath H., Evolution of proteolytic enzymes. **Science** .224, 350-357, 1984.
- Newman D.H. Screening for Breast and Prostate Cancers: moving toward transparency. **J Natl Cancer Inst.**;102:1008–1011, 2010.
- Nishino N., Aoyagi H., Kato T. and Izumiya N. **J. Biochem.** (Tokyo), 82, 901–909, 1977
- Odani S. and Ikenaka T. Studies on soybean trypsin inhibitors **J. Biochem.** (Tokyo), 74, 697–715, 1973.
- Pereira, P.J. et al. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. **Nature**, 392, 306–311, 1998.
- Pinheiro C.G.A. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2009.
- Prakash, B., Selvaraj, S., Murthy, M.R.N., Sreerama, Y.N., Rao, D.R., Gowda, L.R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman–Birk inhibitors. **J. Mol. Evol.** 42, 560–569, 1996.
- Puente, X.S. et al. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. **Biochem. Soc. Trans.** 33, 331–334, 2005.
- Randolph T. W. e Jones L. S.. Surfactant–protein interactions. In J. F. Carpenter and M. C. Mannings (eds.), Rational Design of Stable Protein Formulations, Theory and Practice. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, New York, p. 198, 2002.
- Rates, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- Rui-Feng Q.I., Zhan-Wu S. 1, e Chi .W. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Proteinase Inhibitors and Their Potential Application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 37(5), 283–292, 2005.
- Schaffazick SR; Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quím. Nova** vol.26 no.5, 2003.
- Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. **Trends in Pharmacological Sciences**. 21. 45-48. 2000.
- Silva LP., Leite JR. SA.; Bloch-JR, C. Freitas SM. Thermal Stability of a Black Eyed Pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor (BTCl). **Protein and Peptide Letters**, v. 7, p. 397-401, 2000.

Silva LP, Azevedo RB, Morais PC, Ventura MM, Freitas SM. Oligomerization States of Bowman-Birk Inhibitor by Atomic Force Microscopy and Computational Approaches. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics** 61:642–648, 2005.

Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Mol Cancer Ther.** 5,1909–1917, 2006..

Southern AJ, Pitt-Francis J, Whiteleyb J, Stokeleyc D, Kobashi H, R. Nobes, Kadookad Y., Gavaghan D. Multi-scale computational modelling in biology and physiology. **Biophysics and Molecular Biology.** 96, 60–89, 2008.

Souza, L.C. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2010.

Stamato F.M.L.G., Lango E., Yoshioka L.M. Estudo teórico do sistema de transferência de prótons das serinoproteinases no vácuo. **Química Nova.** Abril, 1984.

Ventura, M. M.; Xavier-Filho, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vignasinensis*).I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p.553–566, 1966.

Ventura MM, Mizuta K, Ikemoto H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution—a study by light-scattering. **An Acad Bras Cienc** 53, 195–201, 1981.

Ventura MM, Mizuta K Ikemoto H. Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An Acad Bras Cienc** 56, 217–220, 1984.

Wang J.H. Facilitated proton transfer in enzyme catalysis. It may have a crucial role in determining the efficiency and specificity of enzymes. **Science.** 161, 328, 1968.

Wang G., Uludag H. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based nanoparticles. **Expert Opin. Drug Delivery.** 5, 499, 2008.

Weinstein IB. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. **Carcinogenesis** 21, 857–864, 2000.

Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heel of cancer. **Science** 297, 63–64, 2002.

Witschi H., Espiritu I. Development of tobacco smoke-induced lung tumors in mice fed Bowman-Birk proteinase inhibitor concentrate (BBIC). **Cancer Letters**. 183, 141–146, 2002.

World Cancer Research Fund. Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: **American Institute for Cancer Research**, 2007.

Yang H.C. e Hon M.H. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. **Microchemical Journal**. 92, 87–9, 2009.

Zablotna E.,Kazmierczak K., Jaskiewicz A., Stawikowski M., Kupryszewski G., Rolka K. Chemical synthesis and kinetic study of the smallest naturally occurring trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds and its analogues. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 292, 855–859., 2002.