

FILMES NANOESTRUTURADOS CONTENDO PEPTÍDEOS BIOATIVOS APLICADOS COMO SENSORES ELETROQUÍMICOS EM MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Bittencourt, C. R.¹; Dionísio, N. A.; Silva¹, V. C.^{1,2}; Araruna, F. B.^{1,3}, Costa, C. H. N.²;
Leite, J. R. S. A. (PQ)¹ e Eiras, C. (PQ)¹.

¹Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso, CMRV, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, 64202020, Brasil; ² Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses, Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela–IDTNP, Teresina, Brasil; ³Campus Parnaíba, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, IFPI, Parnaíba, PI, 64210260, Brasil. * email: carla.eiras.ufpi@gmail.com.

RESUMO

Neste trabalho, propomos a imobilização do peptídeo antimicrobiano, dermaseptina 01 (DS 01) em conjunto com goma natural do cajueiro (GC), para formação de filmes LbL (*layer-by-layer*) em busca de um novo material capaz de detectar a atividade anti-leishmania, além de avaliar o potencial da goma do cajueiro quando intercalado com peptídeo antimicrobiano. A caracterização dos filmes foram conduzidos por Voltametria Cíclica (VC), em contato com células promastigotas de *L. chagasi* em concentrações de 10^3 - 10^6 células/mL em NaCl 0,9%. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de células promoveu uma variação de corrente, evidenciando possivelmente a lise da membrana das células de *L. chagasi*. Esses dados subsidiam a possibilidade de aplicação biotecnológica desses sistemas.

Palavras chave: Filmes, peptídeo, goma do cajueiro, leishmania

INTRODUÇÃO

Uma crescente alternativa para construção de materiais a nível nanométrico tem sido a partir da fabricação de filmes finos, amplamente explorados em diversas áreas desde física à medicina, e engloba compostos orgânicos, poliméricos e biológicos (ARIGA et al., 2006). A montagem desses filmes ultrafinos é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares, sensores, estudos de fármacos, bem como para o desenho de agentes terapêuticos (RUSLING et al., 2008). A técnica *LbL* é mais usada atualmente e baseia-se em interações eletrostáticas de camadas de materiais que possuem cargas elétricas opostas, visando à adsorção alternada entre as espécies

catiônicas e aniônicas sobre substratos sólidos. Dentre os agentes formadores de filmes as gomas naturais, como a goma obtida da árvore do cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) é um heteropolissacarídeo complexo de cadeia longa, biodegradável e atóxico (DE PAULA et al., 1998). Por outro lado, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são biomoléculas encontradas principalmente nas secreções cutâneas de anfíbio do gênero *Phyllomedusa* e constitui uma classe de peptídeo antimicrobiano isolada da pele de anfíbios, com 28-32 resíduos de aminoácidos, capazes de formar estrutura em α -hélices em associação com bicamadas lipídicas, além de serem carregados positivamente, por causa do elevado teor de resíduos de lisina (BRAND et al., 2006).

Neste trabalho propomos a fabricação de sistemas contendo a goma natural do cajueiro intercalada com o peptídeo antimicrobiano (DS 01) através da técnica *LbL* de automontagem. Os filmes preparados foram testados como sensor eletroquímico para atividade anti-leishmania.

MATERIAIS E MÉTODOS

A formação dos filmes foi realizada manualmente pelo processo de automontagem segundo procedimento de deposição por interação eletrostática. Inicialmente o substrato, previamente limpo, foi imerso do polieletrólito aniônico (goma do cajueiro), por 5 minutos em seguida procedeu-se com a lavagem, usando água ultrapura para a remoção do material não adsorvido e posterior secagem com fluxo de nitrogênio. O sistema substrato/monocamada foi imerso em solução do polieletrólito catiônico (DS 01), por 5 minutos em seguida repetiu-se o processo de lavagem e secagem do sistema, como descrito nas etapas a seguir

A arquitetura proposta para o filme contendo a DS 01 foi aquela em que o PAM constituía a camada mais externa, ou seja, ITO/GC/DS 01 com objetivo de facilitar a interação entre a DS 01 e o protozoário *L. chagasi*. Para efeito de comparação também foram estudados os comportamentos eletroquímicos das monocamadas de goma do cajueiro e DS 01 (ITO/GC e ITO/DS 01) assim como do substrato puro (ITO). Nesta etapa, todos os filmes foram preparados com 01 bicamada ou 01 monocamada.

A caracterização dos filmes e os testes de detecção foram conduzidos por Voltametria Cíclica (VC), com auxílio de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (AUTOLAB). Filmes ITO/DS 01/GC foram colocados em contato com células promastigotas de *L. chagasi* disponibilizadas pelo Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela localizado na cidade de Teresina – PI. Inicialmente foi preparado 15 mL de uma solução de NaCl a 0,9% contendo células do protozoário (*L. chagasi*) nas seguintes concentrações: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cél/mL que será usado como eletrólito de suporte e irá interagir com os eletrodos quimicamente modificados (filmes *LbL*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de detecção da atividade antileishmania do filme ITO/(GC/DS 01)₁ foram realizados em meio salino (NaCl 0,9%) para a conservação das células de *L. chagasi*, garantida por seu equilíbrio osmótico, figura 1. O aumento da concentração de células do protozoário promove um aumento progressivo de corrente registrada pelo sistema, figura 1 e 2, este comportamento dose-dependente ressalta a capacidade do filme em perceber até concentrações mínimas de células em suspensão.

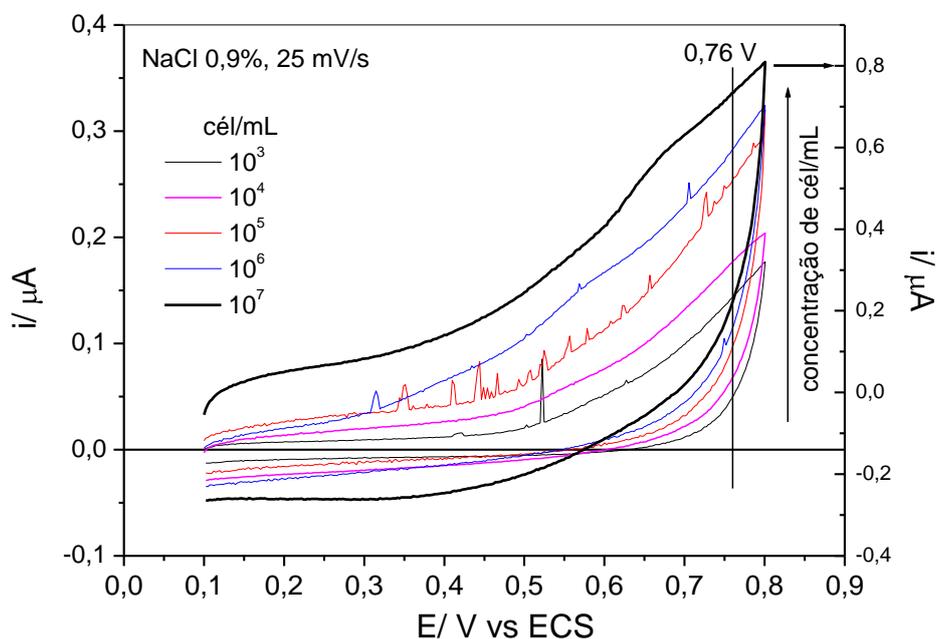


Figura 1. Resposta eletroquímica de filmes (ITO / DS 01), (ITO / GC), e para bicamada (ITO / GC / DS 01), em H_2SO_4 mol L $0,05^{-1}$, $v = 25 \text{ mV} / \text{s}$

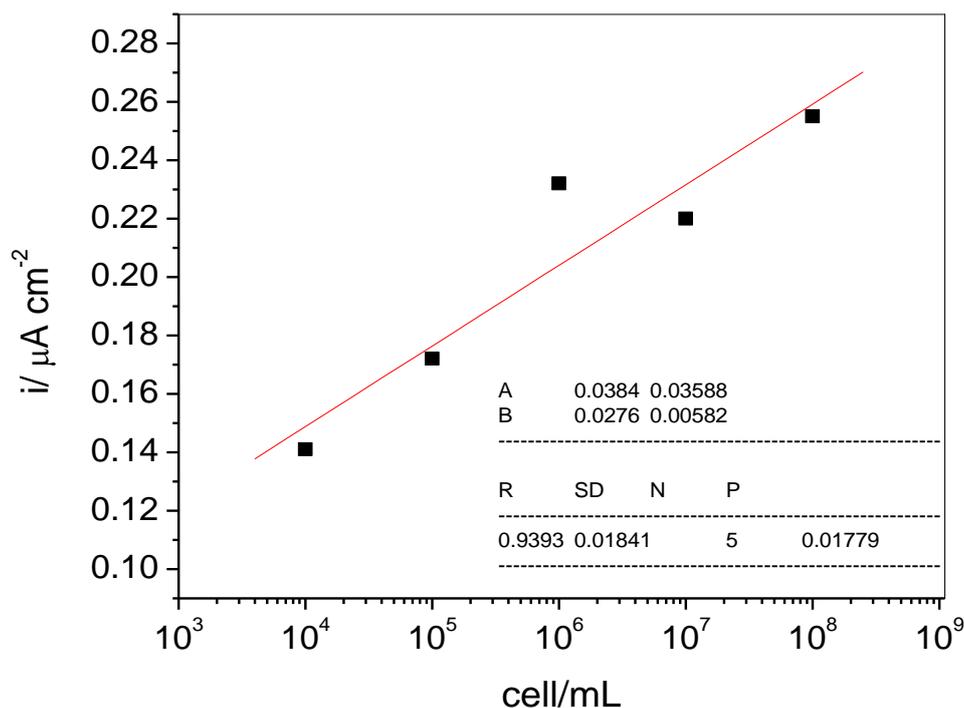


Figura 2. Resposta eletroquímica do filme bicamada ITO/GC/ DS 01 em diferentes concentrações de células de *L. chagasi* em NaCl a 0,9.

Os resultados apresentados, figura 1, podem ser explicados a partir de uma interação entre o peptídeo e a membrana desses protozoários. A ação de PAM em membranas biológicas possui mecanismos ainda não muito bem elucidados, no entanto já foi relatado que peptídeos da classe das dermaseptinas matam células de *Leishmania* pela ruptura de sua membrana celular (GAIDUKOV et al., 2003). Em trabalhos recentes de nossa equipe foram desenvolvidos filmes *LbL* contendo DS 01 em associação com ftalocianina tetrassulfonada de níquel, que também mostrou ser eficiente na detecção da atividade de células de *L. chagasi* (ZAMPA et al., 2009).

Possivelmente o aumento progressivo de corrente, observado na figura 2, seja resultado da ação do peptídeo na membrana das células de *L. chagasi*, causando seu rompimento e conseqüentemente a liberação de eletrólitos do meio intracelular, os quais foram detectados nas medidas voltamétricas uma vez que a presença de íons facilita o transporte de cargas para a superfície do eletrodo.

A escolha da goma foi impulsionada por algumas características intrínsecas deste produto dentre elas uma diversidade de atividades biológicas de interesse, como por exemplo, a atividade bactericida já relatada (MONTHE et al., 2008; TORQUATO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2007; SCHIRATO et al., 2006).

CONCLUSÕES

Os estudos indicaram que é possível a obtenção de filmes contendo peptídeo antimicrobiano (DS 01) e polissacarídeo natural (Goma do cajueiro) capazes de detectar a presença de células de *Leishmania chagasi*, a partir de uma dose-resposta em função da concentração de células. Sendo assim reiteramos a importância da ação do peptídeo antimicrobiano o qual pode ser conjugado com polissacarídeos naturais criando novas possibilidades de aplicação assim como no preparo de nanomateriais com propostas para reparação tecidual.

AGRADECIMENTOS

FAPEPI, CNPq, CAPES/Rede Nanobiomed

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIGA, K.; NAKANISHI, T. MICHINOBU, T. Immobilization of biomaterials to nano-assembled films and their related functions. J. Nanosci. Nanotechnol., 6 (8): 2278-301, 2006.

RUSLING, J. F.; HVASTROVS, E. G.; HULL, D. O.; OSCHENKMAN, J. B. Biochemical applicationn of ultrathin films of enzymes, polyions and DNA. Chem Commun., 14(2): 141-54, 2008.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of Anacardium occidentale exsudate polysaccharide. Polym. Int., 45:27–35, 1998.

BRAND, G. D.; KRAUSE, F. C.; SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MELO, J. A. T.; PRATES, M. V.; PESQUERO, J. B.; SANTOS, E. L.; NAKAIE, C. R.; COSTA-NETO, C. M.; BLOCH JR., C. Peptides., 27: 2137-46, 2006.

CALDAS, A. J. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, A. A. M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 95:1-8, 2001.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. Microb. Pathog. 2005, 38, 147-160.

GAIDUKOV, L.; FISH, A.; MOR, A. Analysis of membrane binding properties of dermaseptin analogues: Relationships between binding and cytotoxicity. *Biochemistry*, 42 (44): 12866 – 74, 2003.

ZAMPA, M. F.; ARAÚJO, I. M. S.; COSTA V.; COSTA, C. H. N.; SANTOS, J. R. S. JR.; ZUCOLOTTI, V.; EIRAS, C.; LEITE, J. R. S. A.; Leishmanicidal Activity and Immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5: 352–358, 2009.

MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, G. M. M.; SILVA, J. B. R.; PORTO, C. S.; CARVALHO, L. B. JR.; FILHO, J. L. L.; LEÃO-CARNEIRO, A. M. A.; CARNEIRO-CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochemistry*, 42: 884–888, 2007.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; FILHO, J. L. L.; LEÃO, A. M. A. C.; PORTO, A. L. F. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Ciência Rural, Santa Maria*, 36 (1): 149-154, 2006.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 505–507, 2004.

MONTE, C. G.; SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. *Medical Nutrition*, 19 (6): 50 – 52, 2008.