



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Dayane dos Santos Alvares

Estudo da formação de domínios em membranas modelo induzidos
por peptídeos antimicrobianos e sua ação interfacial

São José do Rio Preto
2016

Dayane dos Santos Alvares

Estudo da formação de domínios em membranas modelo induzidos
por peptídeos antimicrobianos e sua ação interfacial

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

São José do Rio Preto
2016

Alvares, Dayane dos Santos.

Estudo da formação de domínios em membranas modelo induzidos por peptídeo antimicrobianos e sua ação interfacial / Dayane dos Santos Alvares. -- São José do Rio Preto, 2016
157 f. : il., tabs.

Orientador: João Ruggiero Neto

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Peptídeos antibióticos.
4. Membranas (Biologia) 5. Microscopia de fluorescência.
I. Ruggiero Neto, João. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Dayane dos Santos Alvares

Estudo da formação de domínios em membranas modelo induzidos
por peptídeo antimicrobianos e sua ação interfacial

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino
UNESP – Presidente Prudente

Prof. Dr. Renata Danielle Adati
UTFPR – Curitiba

Prof. Dr. Jorge Chahine
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
2016

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo esforço, dedicação e compreensão
em todos os momentos desta e de
outras caminhadas.*

Agradecimentos

Não encontrei e jamais encontrarei palavras que descrevam suficientemente toda a minha gratidão por aqueles que colaboraram, ao longo desta etapa da minha vida, para alcançar meus objetivos.

Eu agradeço, especialmente, ao meu orientador Prof. João Ruggiero Neto, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém com tanta sabedoria. Obrigada por toda a atenção que tem me dado e pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos em que trabalhamos juntos, me dando sempre liberdade para realizar o trabalho. Estou imensamente feliz por estar trabalhando com você. Obrigada professor pela valiosa orientação. Admiro a sua dedicação pela ciência.

Ao Prof. Marcelo, por ter me dado a oportunidade de entrar em contato com a ciência ainda no primeiro ano da graduação me ensinando as primeiras pipetadas. Gostaria de registrar minha admiração pelo empenho que empregou em minha formação. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo e pela amizade.

À Profa. Fátima, pela amizade, estando sempre disponível para me ouvir, e pelos sábios conselhos.

À Profa. Márcia Perez dos Santos Cabrera por ter me ensinado técnicas para preparação de lipossomos.

À Profa. Karin do Amaral Riske pelo auxílio na utilização dos equipamentos envolvidos para preparação e observação dos lipossomos gigantes. Obrigada pela grande ajuda.

Às Profas. Maria Laura Fanani e Natália Wilke ao Prof. Ernesto Ambroggio pelo grande conhecimento transmitido sobre monocamadas lipídicas e experimentos com vesículas gigantes durante o período que trabalhei em seu laboratório. Obrigada por estarem sempre dispostos em discutir resultados de trabalhos a qualquer hora.

Agradeço aos meus pais, Dionizia e José Roberto, que logo cedo em suas vidas encontraram uma imensa dificuldade para estudar. Mesmo assim lutaram e me ajudaram a chegar até aqui. Não entenderam meus sonhos, mas acreditaram na minha capacidade. É pai, como o senhor sempre dizia: “Um homem pode perder o dinheiro, pode perder a

casa, pode perder a roupa, mas um homem nunca pode perder o seu conhecimento e com ele pode recuperar tudo que perdeu”, o conhecimento é fantástico. Obrigada mamãe, por estar sempre ao meu lado mesmo estando longe, por me ouvir, apoiar e sempre acreditar em mim. Sem vocês mais esta vitória em minha vida não seria possível.

À minha grande amiga e companheira Marta Regina Bernucci que esteve ao meu lado durante todo este trajeto me fazendo acreditar que tudo seria possível. Obrigada por estar ao meu lado me dando sempre muita força.

Aos técnicos de laboratório Paulinho, Barbosa, Marcelino e Bruno, e as secretárias do departamento, Ilva e Valéria, que sempre foram atenciosos e prestativos.

À minha parceira de laboratório Taisa Giordano Viegas (Baladaisa rs!) e à Gabriela Campos Araújo pela amizade.

Aos Profs. Carlos José Leopoldo Constantino, Renata Danielle Adati, Jorge Chahine e Eloi da Silva Feitosa terem aceitado participar da banca de avaliação.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante minha “vida” acadêmica. Em especial à FAPESP por ter financiado todo o trabalho de doutorado e permitido trabalhar ao lado dos grandes pesquisadores, Drs. Maria Laura Fanani, Natália Wilke e Ernesto Ambroggio.

A Deus por sempre me iluminar e acompanhar meu caminho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”.*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos agem diretamente na matriz lipídica da membrana celular perturbando o empacotamento lipídico, criando tensões elásticas e desequilíbrio de massa, que são relaxados pela formação de poros ou defeitos que dão origem ao processo lítico. Polybia-MP1, ou simplesmente MP1, com sequência de aminoácidos IDWKLLDAAKQIL-NH₂, extraído da vespa nativa *Polybia paulista*, é um exemplo destes peptídeos. Além de potente atividade antimicrobiana ele inibe a proliferação celular em culturas de células de câncer de próstata e bexiga. Este efeito inibitório acredita-se ser devido à presença simultânea de aminofosfolipídios fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) nas monocamadas externas das membranas destas células. Investigação da atividade lítica em vesículas unilamelares gigantes (GUVs) revelaram que o peptídeo induziu a formação de regiões fluorescentes densas que foram atribuídas à agregação peptídeo/lipídio ou então à segregação lipídica. A atividade permeabilizadora do MP1 foi também fortemente modulada quando as GUVs continham frações de aminofosfolipídios PS e PE. Foi observado que a permeabilidade induzida pelo MP1 aumentou dramaticamente para vesículas de PC/PE/PS (7:1:2) permitindo influxo de moléculas de 10 kDa. Esta tese investigou a habilidade do MP1 em perturbar o empacotamento lipídico usando monocamadas lipídicas como modelo de membrana. Foram utilizados três fosfolipídios: PC, PE e PS contendo duas cadeias acíclicas. Isotermas de compressão foram obtidas usando cuba de Langmuir conjugadas com microscópios de fluorescência e de ângulo de Brewster. Por meio de isotermas de compressão de filme lipídico foram investigadas a preferência do peptídeo pelas fases lipídicas e seu efeito na coexistência de fases e nas alterações induzidas na forma, tamanho e número de domínios sólidos. Utilizando cadeias acíclicas derivadas de ácidos mirístico e palmítico ligados às cabeças polares PC, PE e PS, foi possível explorar o papel das cabeças polares e o efeito do comprimento das caudas no impacto do peptídeo nos filmes lipídicos. Estes experimentos mostraram que MP1 induziu mudanças na forma e no tamanho dos domínios sólidos. Estas alterações foram dependentes das cabeça polar e das condições da subfase: água pura e solução aquosa de NaCl. É importante destacar que

em condições de subfase nas quais pares iônicos intermoleculares entre os aspárticos e lisinas podem ocorrer, em água e em baixa concentração de sal, o peptídeo co-cristalizou com lipídios de DPPC induzindo significativa mudança na forma de “triskelion” para formas alongadas e no tamanho dos domínios sólidos. Mudanças na forma e no tamanho foram também observados para DMPE e DMPS, mas com mecanismos diferentes. Devido a grande preferência de MP1 por filmes de PS foi observado que parte do filme peptídeo/lipídio foi expelido para a subfase em valores de pressão lateral compatíveis com a de bicamadas, sugerindo micelização do filme lipídico. Estas evidências de mudanças no empacotamento lipídico induzidas pelo peptídeo foram reforçadas investigando o efeito do MP1 no influxo de carboxifluoresceína em GUVs de PC/PS e PC/SM/Chol contendo ou não PS. Nesta última composição, domínios líquido-ordenados (Lo) podem ser visualizados e na presença de PS foi observado a formação de regiões densas na região líquido-desordenado (Ld) na membrana. Na presença de PS o MP1 induziu poros ou defeitos que permaneceram abertos na escala de tempo de minutos. Evidências para segregação lipídicas foram obtidas por experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) usando vesículas de DPPS puro e de misturas POPC/DPPS. Os resultados obtidos mostraram a indução de uma fase rica de peptídeo e lipídios aniônico e outra rica de lipídio zwitteriônico e perturbação no empacotamento lipídico de vesículas de lipídio aniônico puro.

Palavras-chave: Polybia-MP1, atividade antitumoral, peptídeo antimicrobiano, monocamadas lipídicas, DSC, GUVs, BAM, microscopia de fluorescência, aminofosfolipídios, fosfatidiletanolamina, fostatidilserina.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides act directly on the lipid matrix of the cell membrane by perturbing the lipid packing, creating elastic stresses and mass imbalance, that are relieved by the formation of pores or defects resulting in the lytic activity. Polybia MPI, or shortly MPI, with aminoacid sequence IDWKLLDAAKQIL-NH₂, extracted from the native wasp Polybia paulista is an example of these peptides. Beyond a potent antibacterial activity, it inhibits cell proliferation in prostate and bladder cancer cell cultures. This inhibitory effect is believed to be due to the simultaneous presence of aminophospholipids: phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) on the outer leaflet of these cell membranes. Investigations of MPI lytic activity in giant unilamellar vesicles (GUVs) revealed that the peptide induced some dense fluorescent regions on the vesicles that were interpreted as being due to peptide/lipid aggregation or to lipid segregation. The MPI permeabilizing activity was also strongly modulated when fractions of aminophospholipids PS and PE were present in the lipid composition of these GUVs. It was observed that the permeability induced by MPI increased dramatically for vesicles of PC/PE/PS (7:1:2) allowing influx of up to 10 kDa molecules. This thesis investigated the ability of MPI in disturbing lipid packing using lipid monolayers as model membranes. Three diacylated phospholipids: PC, PE and PS were used. Compression isotherms obtained with Langmuir trough in conjunction with fluorescence and Brewster angle microscopies were used to investigate preferences of the peptide for lipid phases and its effects on the phase coexistence and on the changes of the shape, size and number of solid domains. Using diacyl chains derived from myristic and palmitic acids attached to PC, PE and PS polar heads it was possible to explore the role played by head groups and effect of the acyl chain lengths on the impact of the peptide in lipid films. These experiments showed that MPI induced changes in both the shape and the size of solid domains. These changes were dependent on the head group and on the subphase conditions: pure water and aqueous solution of NaCl. It is remarkable that in subphase conditions in which intermolecular ionic pairs among aspartics and lysines are likely to occur, water and low salt concentration, the peptide was able to co-crystallize with DPPC

lipids and induce significant changes in the shapes from “triskelion” to elongated and in the sizes of the solid domains. Change in the shape and size were also observed to DMPS and DMPE, but with different mechanisms. Due to the high preference of MPI for PS films it was observed that part of the lipid/peptide films were irreversibly lost to the subphase, at lateral pressures compatible with that of membranes, suggesting micellization of the lipid film. These evidences for changes in the lipid packing induced by the peptide were reinforced by investigating the effect of MPI on the influx of carboxyfluorescein in GUVs of PC/PS and of PC/SM/Chol containing or not PS. In this last composition liquid ordered (Lo) domains can be observed. In the presence of domains Lo and PS MPI induced changes in the permeability and the formation of aggregates. The pores or defects opened in the PS containing vesicles remains opened in a minute time scale. In addition, evidences for lipid segregation was obtained from differential scan calorimetry (DSC) experiments using pure DPPS and mixed POPC/DPPS lipid vesicles showing the induction of a domain rich in peptide/anionic lipid complex and another rich in zwitterionic ones and perturbation on the lipid packing of pure anionic vesicles.

Keywords: Polybia-MPI, antitumor activity, antimicrobial peptide, monolayers, DSC, GUVs, GUVs, fluorescence microscopy, Brewster angle microscopy, aminophospholipids, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Ilustração de uma célula animal delimitada pela membrana plasmática. O meio interno contém as organelas, como retículo endoplasmático e a mitocôndria, que desempenham diferentes funções. Figura adaptada de: www.animalport.com/animal-cells.html.

Figura 2.2: (A) Seção transversal da membrana com proteínas inseridas na bicamada fosfolipídica. (B) As porções iônicas e polares das proteínas, como indicado pelos sinais +/-, estão em contato com a solução aquosa (citoplasma e/ou líquido intersticial) em torno da bicamada lipídica. A região em que as proteínas estão inseridas é apolar (hidrofóbica), portanto, carece de cargas, conforme indicado pela ausência de símbolos +/- . Figuras retiradas de (Singer and Nicolson 1972).

Figura 2.3: Estrutura dos principais fosfolípidios das biomembranas. Imagem adaptada de <http://slideplayer.com.br/slide/7353961/>.

Figura 2.4: Geometria molecular e estabilidade de fase de moléculas anfipáticas como uma função do parâmetro de empacotamento crítico. Imagem adaptada de (Israelachvili 1992).

Figura 2.5: Desenho esquemático de uma micela (A) e uma bicamada (B). Imagem adaptada de (Azagarsamy et al. 2009).

Figura 2.6: Desenho esquemático de um lipossomo: a bicamada lipídica formada pela agregação dos fosfolípidios separa o interior aquoso da vesícula do meio externo aquoso. Imagem adaptada de <http://www.niolip.com/liposomes/>.

Figura 2.7: Transição de fase lipídica da fase gel (ordenada) para a líquida (desordenada). Quando os lipídios mudam de fase a entalpia e a entropia aumentam. T_m é a temperatura de transição. Imagem adaptada de http://physwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/University_of_California_Davis

Figura 2.8: Diferentes fases lipídicas: cristalina (L_c), gel (L_β), "ripple" (P_β) e líquida (L_α). Imagem adaptada de (Cevc 1991).

Figura 2.9: Tensão superficial – Forças entre as moléculas na subfase e na interface. Imagem retirada de <http://www.kibron.com/surface-tension>.

Figura 2.10: Placa de Wilhelmy parcialmente imersa na subfase aquosa. Imagem adaptada de <http://www.biolinscientific.com/ksvnama/>.

Figura 2.11: Esquema da cuba de Langmuir e seus acessórios necessários para obter filmes de Langmuir. Imagem adaptada de <http://www.bio.iitb.ac.in/~rbanarji/biomatlab/interfaces.html>.

Figura 2.12: Isoterma $\pi - A$ de uma monocamada de DPPC. As regiões I, II, III, IV e V representam as fases gasosa, líquido-expandida (LE), líquido-condensada (LC); condensada ou sólida (S) e o colapso da monocamada, respectivamente. Imagem retirada de (Ferreira et al. 2005).

Figura 2.13: Diagrama de Jablonski representado os níveis de energias e os espectros. As setas sólidas indicam transições radioativa como ocorrem por absorção (violeta, azul) ou emissão (verde) de um fóton. Setas pontilhadas representam transições não radioativas (violeta, azul e verde). Abaixo do diagrama são mostrados os espectros de adsorção e fluorescência. Imagem adaptada de <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>.

Figura 2.14: Ilustração da visualização de domínios na monocamada de DPPC através de um microscópio invertido. Imagem adaptada de <https://www.ibis-sevilla.es/>.

Figura 2.15: Feixe de luz incidente, refletido e transmitido na interface entre dois meios com diferentes índices de refração. Imagem retirada de <http://brasilecola.uol.com.br/fisica/calculo-angulo-limite.htm>.

Figura 2.16: Refletividades R_s^F e R_p^F em função do ângulo de incidência θ_i para uma interface de Fresnel entre dois meios de índices de refração $n_1 = 1$ e $n_2 = 1,33$. Imagem retirada de (Lheveder et al. 2000).

Figura 2.17: Ilustração do princípio da microscopia de ângulo de Brewster. Incidência da luz polarizada no ângulo de Brewster na superfície da água (A) e após a adição da monocamada lipídica (B). Imagem adaptada de (Telesford 2012).

Figura 2.18: Desenho esquemático da célula do calorímetro diferencial de varredura (DSC). Imagem adaptada de <http://www.malvern.com>.

Figura 3.1: Estruturas dos fosfolipídios retirada de <http://avantilipids.com>.

Figura 3.2: Esquema de preparação de lipossomos. Adaptado de www.avantilipids.com

Figura 3.3: Imagem de um extrusor. Adaptado de www.avantilipids.com

Figura 4.1: (A) Isotermas $\pi \times A$ de monocamada de MP1 em água. Escala da esquerda: O primeiro ciclo de compressão-expansão-recompressão foi realizado até 8 mN/m (quadrado aberto:

vermelho representa compressão e preto, expansão) e o segundo, acima da π_{col} (linha contínua). Escala da direita: Evolução do nível de cinza das imagens obtidas com BAM (círculo aberto). As imagens inseridas representam imagens de BAM de filmes de MP1 puro em água nas pressões de superfícies indicadas. Os níveis de cinza foram re-escalados da faixa original de 0-255 para 0-40 para melhor visualização. (B) Isotermas de compressão pressão de superfície vs área molecular média (linha contínua) e potencial de superfície vs área molecular média (círculo aberto) para filmes de MP1 espalhados em água (i) ou em 150 mM NaCl e o pH ajustado com NaOH para 7,4 (ii). A inserção mostra a representação a projeção de Edmundson da sequência do peptídeo configuração de α -hélice (verde representa o resíduo carregado positivamente; vermelho, carregado negativamente; azul, polar não-carregado e amarelo, os hidrofóbicos). Todas as isotermas foram registradas a $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$, com 8,7 nmol de peptídeo espalhado na interface.

Figura 4.2: Isotermas de compressão do filme de MP1 puro em água (mesma curva mostrada na Fig. 4.1) e em 150 mM NaCl nos pH indicados.

Figura 4.3: Cinética de adsorção do peptídeo MP1 (em diferentes concentrações \uparrow 0,5, 1,0 e 1,25 μM) na interface água-ar (A) e 150 mM NaCl-ar (B). (C) Máxima variação da pressão de superfície após a adição de diferentes concentrações de peptídeo na subfase em função da concentração de peptídeo. Símbolo aberto representa subfase com água pura e símbolo fechado em 150 mM de NaCl (pH 7,4).

Figura 4.4: Isotermas de compressão $\pi \times A$ de monocamada de DPPC co-espalhados com frações crescentes de MP1 em água (A) ou em 150 mM NaCl, pH 7,4 (B). As áreas correspondem à área da monocamada total normalizada pela quantidade de lipídio (sem considerar a quantidade de peptídeo). A área de “lift-off”, indicada na isotermas, representa a área em que a pressão de superfície começa a aumentar.

Figura 4.5: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

Figura 4.6: (A) Pressão de superfície correspondente a transição de fase do DPPC em função da fração molar de peptídeo. A linha pontilhada corresponde ao ajuste linear e o erro da medida corresponde a resolução da técnica ($\sim 0,5\text{ mN/m}$). (B) Área molecular média em função da fração molar de MP1 no filme lipídico em diferentes pressões de superfície: $\pi = 2\text{ mN/m}$ (símbolos em vermelho) e $\pi = 15\text{ mN/m}$ (símbolos em preto). O valor médio \pm o desvio padrão de no mínimo 3 medidas independentes são representados. Linhas pontilhadas correspondem a área molecular

média de uma mistura ideal e as linhas contínuas, a área real. Em todos os casos, (i) corresponde a subfase água e (ii) 150 mM NaCl, pH 7,4.

Figura 4.7: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 ($X_{MP1} = 0,072$) (segunda sequência) espalhado em água e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figura 4.8: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 para $X_{MP1} = 0,072$ (segunda sequência) espalhado em água pura e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figura 4.9: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0,024$) espalhados em água pura e registradas a 20 °C e nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figura 4.10: Imagens de AFM para filmes de DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0,072$) transferidos para lamínulas de vidro da interface ar-água a 15 mN/m. Tamanho das imagens: 50 x 50 μm^2 (A), 20 x 20 μm^2 (B) e 8,6 x 8,6 μm^2 (C).

Figura 4.11: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 para $X_{MP1} = 0,072$ (segunda sequência) espalhado em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figura 4.12: Porcentagem de área ocupada pela região cinza clara (linha contínua) ou pela região cinza escuro (linhas pontilhadas) em função da pressão de superfície determinada das imagens de BAM de filmes formados por lipídio puro (círculo fechado) e pela mistura lipídio/peptídeo (círculo aberto) espalhados em 150 mM NaCl, pH 7,4.

Figura 4.12: Porcentagem de área ocupada pela região cinza clara (linha contínua) ou pela região cinza escuro (linhas pontilhadas) em função da pressão de superfície determinada das imagens de BAM de filmes formados por lipídio puro (círculo fechado) e pela mistura lipídio/peptídeo (círculo aberto) espalhados em 150 mM NaCl, pH 7,4.

Figura 4.13: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1} = 0,072$) espalhados em solução de NaCl nas concentrações indicadas (pH 7,4) a 20 °C e em 7 – 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figure 4.14: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira linha) e DPPC/MP1 para $X_{MP1}=0.072$ (segunda linha) espalhados em solução de NaBr nas concentrações indicadas (pH 7.4), registradas durante a compressão a 20 °C e em 7 - 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figure 4.15: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0.072$) espalhados em solução de NaCl nas concentrações e pH indicados, registradas durante a compressão a 20 °C e em 7 - 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μm .

Figura 4.16: Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DPPC em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μM de peptídeo na subfase. A concentração de peptídeo foi escolhida considerando a mínima concentração em que o peptídeo apresentou máxima atividade superficial obtidas a partir da Fig. 4.2C. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

Figura 4.17: (A) e (D) Isotermas de compressão $\pi \times A$ de monocamada de DMPC puro e da mistura DMPC/MP1 ($X_{MP1}=0,06$) em água e em 150 mM NaCl (pH 7,4), respectivamente. (B) e (E) Imagens de BAM de filmes de DMPC e DMPC/MP1 em água e em 150 mM NaCl, respectivamente, na pressão de superfície indicada. (C) e (F) Refletividade média da RE (símbolo fechado) e RC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondentes aos filmes de DMPC puro (vermelho) e filme de DMPC/MP1 (preto) em água e 150 Mm NaCl, respectivamente.

Figura 4.18: Inserção do peptídeo MP1 em monocamada lipídica de DMPC em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μM de peptídeo em água pura. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

Figura 4.19: Isotermas de compressão de filme de DMPE na ausência e presença de peptídeo co-espalhados com lipídio em água pura (A) ou 150 mM NaCl, pH 7,4 (B). As áreas correspondem à área da monocamada total normalizada pela quantidade de lipídios (sem considerar o número de moléculas de peptídeos).

Figura 4.20: (A) Pressão de superfície correspondente a transição de fase do DMPE em função da fração molar de peptídeo. A linha pontilhada corresponde ao ajuste linear e o erro da medida corresponde a resolução da técnica ($\sim 0,5$ mN/m). (B) Área molecular média em função da fração molar de MP1 no filme lipídico em diferentes pressões de superfície: $\pi = 2$ mN/m (símbolos em

vermelho) e $\pi = 15$ mN/m (símbolos em preto). O valor médio \pm o desvio padrão de no mínimo 3 medidas independentes são representados. Linhas pontilhadas correspondem a área molecular média de uma mistura ideal e as linhas contínuas, a área real. Em todos os casos foram calculados para 150 mM NaCl, pH 7,4.

Figura 4.21: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DMPE na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

Figura 4.22: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DMPE puro (A, C) ou DMPE/MP1 ($X_{MP1}=0.060$) (B, D) espalhada em água pura (A, B) ou em 150 mM NaCl (C, D) e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões de superfície indicadas. Tamanho da imagem é: 200 x 200 μ m.

Figura 4.23: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas formadas por DMPE (A) ou DPPC/MP1 para $X_{MP1} = 0,072$ (B) espalhado em água pura e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μ m.

Figura 4.24: Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de DMPE puro (vermelho) e filme de DMPE/MP1 (preto) em água (A) e 150 Mm NaCl (B).

Figura 4.25: Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DMPE (círculo) ou DPPE (quadrado) ou POPE (estrela), em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μ M de peptídeo na subfase. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

Figura 4.26: Isotermas $\pi - A$ de filmes lipídicos de DPPS na ausência e na presença de diferentes frações molares de MP1 co-espalhados com fosfolipídio em água pura (A) ou 150 mM NaCl (pH. 7,4) (B). Monocamadas comprimidas a 5 cm^2/min a $T = 20$ °C.

Figura 4.27: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPS na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

Figura 4.28: Imagens de BAM e FM de monocamadas de DPPS puro (A e A') ou DPPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,060$ (B e B') co-espalhados em água pura e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μ m. (C) Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM

correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em água. (D) Imagem de AFM para filme de DPPS/MP1 ($X_{MP1}=0,06$) transferidos para lamínulas de vidro da interface ar-água a 15 mN/m. Tamanho das imagens: 10 x 10 μm^2 .

Figura 4.29: Imagens de BAM de monocamadas de DPPS puro (A) ou DPPS/MP1 ($X_{MP1} = 0,060$) (B) co-espalhados em 150 mM NaCl, (pH 7,4) e registradas durante compressão a 20 °C nas pressões indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm . (C) Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em 150 mM NaCl.

Figura 4.30: (A) Isotermas de adsorção de MP1 determinada pela diferença da pressão de superfície obtida após 1h de adsorção a monocamada de DPPS em $\pi_i = 10$ mN/m em função da concentração de peptídeo. Linhas contínuas representam o ajuste utilizando a isoterma de adsorção Gibbs-Langmuir. (B) Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DPPS. Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μM de peptídeo. As linhas contínuas representam o ajuste linear. Experimentos em água pura são representados pelo símbolo aberto, e em 150 mM NaCl (pH 7,4), símbolo fechado.

Figura 4.31: Isotermas $\pi - A$ de monocamadas lipídicas de DMPS na ausência e presença de diferentes frações molares de MP1 co-espalhado com fosfolipídio em subfase contendo água pura (A) e 150 mM NaCl (pH 7,4) (B) a $T = 20$ °C. Monocamadas foram comprimidas a 5 cm^2/min .

Figura 4.32: Ciclos de expansão e compressão das monocamadas de DMPS com diferentes frações molares de MP1 co-espalhado com fosfolipídio em água pura. Monocamadas foram comprimidas a 5 cm^2/min a $T = 20$ °C.

Figura 4.33: Micrografias de fluorescência de monocamada de DMPS e DMPS/MP1 ($X_{MP1} = 0,048$) co-espalhados com o lipídio marcado, lissamina rodamina-b-sulfonil PE, em água (A) e 150 mM NaCl (C) e de DMPS co-espalhado com FITC-MP1 ($X_{FITC-MP1} = 0,060$) (B) nas pressões de superfícies indicadas e a 20 °C.

Figura 4.34: Imagens representativas de BAM de monocamadas de DMPS puro (A) ou DMPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,048$ (B) e $X_{MP1} = 0,072$ (C) co-espalhados em água pura e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm .

Figura 4.35: Imagens de AFM para monocamadas DMPS/MP1 ($X_{MP1}=0.060$) transferidas da interface água-ar para substrato de lamínula de vidro na pressão de 15 mN/m. Tamanho das imagens: 100 x 100 μm (A) e 20 x 20 μm (B).

Figura 4.36: Imagens representativas de BAM de monocamadas compostas por DMPS puro (A) ou DMPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,060$ (B) co-espalhados em 150 mM NaCl e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm .

Figura 4.37: Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em água (A) e 150 mM NaCl (B).

Figura 4.38: (A) Isotermas de adsorção de MP1 determinada pela diferença da pressão de superfície obtida após 1h de adsorção a monocamada de DMPS em $\pi_i = 10$ mN/m em função da concentração de peptídeo em água pura (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Linhas contínuas representam o ajuste utilizando a equação de adsorção Gibbs-Langmuir. (B) Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DMPS em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado) e formadas por POPS em 150 mM NaCl (7,4) (triângulo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μM de peptídeo em água pura. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

Figura 4.39: Imagens de fluorescência (primeira sequência) e contraste de fase (segunda sequência) de GUVs compostas por POPC/POPS (3/1) após a adição de 10 μM de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado.

Figura 4.40: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC (A) ou DOPC/SM/Chol (3:3:1 molar ratio) após a adição de 2 μM of MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha).

Figura 4.41: A) Imagens de microscopia de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC/POPS (3:1) após a adição de 2 μM de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha). B) Cinética de influxo do marcador de dentro das GUVs após a adição do peptídeo MP1.

Figura 4.42: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC:POPS (3:1) e MP1 durante “bleaching” (A) e recuperação da fluorescência após “bleach” (B).

Figura 4.43: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC:POPS:BSM:Chol (2.1:0.9:3:1) após a adição de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha). (A-G) Sequência de influx de CF induzido por 2 μ M de MP1. Setas indicam os domínios/defeitos induzidos pelo MP1.

Figura 4.44: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC (A), DOPC:POPS (3:1) (B) e DOPC:POPS:BSM:Chol (2.1:0.9:3:1) (C) após a adição de 2 μ M de peptídeo marcado com MP1 FITC.

Figura 4.45: Termogramas da mistura POPC/DPPS obtidos para vesículas multilamelares (MLVs) em diferentes frações molares de DPPS, concentração total de lipídio = 2,5 mg/ml, a 0,5 $^{\circ}$ C/min.

Figura 4.46: Termogramas da mistura POPC/DPPS (70:30) para: (A) MLVs na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão [L]/[P] = 30 adicionada na hidratação do filme lipídico de MLVs. (B) LUVs na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão [L]/[P] = 40 adicionado nas vesículas formadas.

Figura 4.47: Termogramas de MLVs de DPPS na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão [L]/[P] = 14 adicionado na hidratação do filme lipídico de MLVs. As vesículas foram hidratadas com solução de peptídeo diluído em água e em 150 mM NaCl.

Figura 5.1: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPC em água e em 150 mM NaCl.

Figura 5.2: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DPPC em água e em 150 mM NaCl.

Figura 5.3: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPE em água e em 150 mM NaCl.

Figura 5.4: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPS em água e em 150 mM NaCl.

Figura 5.5: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DPPS em água e em 150 mM NaCl.

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Porcentagem total dos principais componentes lipídicos das biomembranas selecionadas (Gennis 1989).

Tabela 3.1: Especificações dos fosfolipídios utilizados.

Tabela 4.1. Porcentagem de área ocupada por diferentes regiões, área calculada ocupada por cada moléculas e quantidade de domínios em cada condição

Tabela 4.2: Comprimento e pressão lateral dos platôs lipídico e peptídico de monocamadas de DMPS com diferentes frações molares de MP1 em água.

Tabela 5.1 Valores de PMI (mN/m) obtidas em todas as monocamadas investigadas em água e em 150 mM NaCl.

Lista de Abreviações

- PS – Fosfatidilserina
PE – Fosfatidiletanolamina
PC – Fosfatidilcolina
SM – Esfingomielina
Chol – Colesterol
DMPS – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina
DPPS – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina
POPS – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina
DMPE – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
DPPE – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPC – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DPPC – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DOPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-fosfatidilcolina
Rhod-PE – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil)
NBD-PC – 1-palmitoil-2-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)aminododecanoil]-*sn*-glicero-3-fosfocolina
CF – carboxifluoresceína
FITC – Isotiocianato fluoresceína
Lo – líquido-ordenado
Ld – líquido-desordenado
LE – líquido-expandido
LC – líquido-condensado
G – gás
S – sólido
EPP – potencial de par efetivo
 P_{β} – fase “ripple”
 L_{β} – fase gel
 L_{α} – fase fluida

LUVs – vesículas unilamelares grandes

MLVs – vesículas multilamelares

GUVs – vesículas unilamelares gigantes

DSC – calorimetria diferencial de varredura

FM – microscopia de fluorescência

BAM – microscopia de ângulo de Brewster

AFM – microscopia de força atômica

Sumário

CAPÍTULO 1 – Introdução	28
CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento Teórico	36
2.1 Membrana Biológica	36
2.2 Lipídios e Membrana Lipídica	38
2.3 Termodinâmica da Bicamada Lipídica.....	42
2.4 Monocamadas Lipídicas	44
2.4.1 Tensão Superficial na Interface água-ar.....	45
2.4.2 Pressão de Superfície	45
2.4.3 Método de Wilhelmy.....	46
2.4.4 Propriedades das monocamadas de Langmuir.....	47
2.4.5 Interações eletrostáticas nas monocamadas fosfolipídicas	51
2.4.6 Nucleação, crescimento e morfologia dos domínios na região de coexistência.....	54
2.4.7 Técnicas de microscopia para estudar monocamadas.....	56
2.4.7.1 Microscopia de Fluorescência	57
2.4.7.2 Microscopia de Ângulo de Brewster.....	59
2.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	63
CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos	65
3.1 Materiais	65
3.2 Métodos.....	67
3.2.1 Soluções de peptídeo.....	67
3.2.2 Experimentos com monocamadas.....	67
3.2.2.1 Isotermas de compressão.....	67
3.2.2.1.1 Análise das isotermas.....	68
3.2.2.1.2 Estado de ionização do DMPS e DPPS em função do pH da subfase	68
3.2.2.1.3 Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)	69
3.2.2.1.4 Microscopia de fluorescência (FM).....	69
3.2.2.1.3 Microscopia de força atômica (AFM).....	70
3.2.2.2 Experimentos a área constante.....	70
3.2.2.2.1 Atividade de superfície do peptídeo	70

3.2.2.2.2 Adsorção do peptídeo em monocamadas lipídicas.....	71
3.2.3 Experimentos com GUVs.....	71
3.2.3.1 Preparação de GUVs	71
3.2.3.2 Visualização de GUVs	72
3.2.3.3 Marcação do peptídeo	73
3.2.3.4 Determinação da concentração do peptídeo marcado.....	73
3.2.4 Experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC)	73
3.2.4.1 Preparação de vesículas multilamelares (MLVs)	73
3.2.4.2 Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs)	74
3.2.4.3 Experimentos de DSC	75
CAPÍTULO 4 – Resultados	76
4.1 Propriedades Interfaciais do Peptídeo Polybia-MP1	76
4.1.1 Isotermas de compressão do peptídeo Polybia-MP1	76
4.1.2 Atividade interfacial do peptídeo Polybia-MP1	78
4.2 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em monocamadas formadas por lipídios zwitteriônicos	79
4.2.1 Monocamadas de DPPC	79
4.2.1.1 Isotermas da mistura DPPC/MP1 em água e em 150 mM NaCl	79
4.2.1.2 Morfologia dos domínios de monocamadas de DPPC/MP1 por FM, BAM e AFM em diferentes forças iônicas	82
4.2.1.3 Morfologia dos domínios de monocamadas de DPPC/MP1 em solução de pH ácido e básico	89
4.2.1.4 Inserção do peptídeo em monocamadas de DPPC	90
4.2.2 Monocamadas de DMPC	91
4.2.2.1 Isotermas da mistura DMPC/MP1 em água e em 150 mM NaCl e visualizações por BAM.....	91
4.2.2.2 Inserção do peptídeo em monocamadas de DMPC	92
4.2.3 Monocamadas de PE.....	93
4.2.3.1 Isotermas da mistura DMPE/MP1 em água e em 150 mM NaCl	93
4.2.3.2 Morfologia dos domínios de monocamadas de DMPE/MP1 por FM e BAM	95
4.2.3.3 Inserção do peptídeo em monocamadas de DMPE, DPPE e POPE	97
4.3 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em monocamadas de PS	99

4.3.1 Monocamadas de DPPS.....	99
4.3.1.1 Isotermas da mistura DPPS/MP1 em água e em 150 mM NaCl	99
4.3.1.2 Monocamadas de DPPS/MP1 visualizadas por FM, BAM e AFM	100
4.3.1.3 Isotermas de adsorção e inserção do peptídeo em monocamadas de DPPS	102
4.3.2 Monocamadas de DMPS	104
4.3.2.1 Isotermas da mistura DMPS/MP1 em água e em 150 mM NaCl e visualizações por BAM.....	104
4.3.2.2 Monocamadas de DMPS/MP1 visualizadas por FM, BAM e AFM	106
4.3.2.3 Isotermas de adsorção em monocamadas de DMPS e inserção do peptídeo em monocamadas de DMPS e POPS	111
4.4 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em membranas lipídicas contendo PS	113
4.4.1 Visualização de GUVs por microscopia de fluorescência e confocal.....	113
4.4.2 Análise do efeito do peptídeo no comportamento termotrópico de membranas lipídicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	117
4.4.2.1 Mistura POPC/DPPS	117
4.4.2.2 Vesículas de DPPS	118
CAPÍTULO 5 – Discussão	120
5.1 Interação do peptídeo com monocamadas lipídicas na interface água-ar: Influência do comprimento da cadeia acíclica e da estrutura química do grupo polar	121
5.1.1 Efeito do comprimento das cadeias acíclicas	121
5.1.2 Efeito da cabeça polar	128
5.1.3 Efeito da cabeça polar negativa	130
5.2 Afinidade do peptídeo a DMPS e DPPS	134
5.3 Inserção do peptídeo.....	134
5.3.1 Subfase: água	135
5.3.2 Subfase: 150 mM NaCl.....	136
5.4 Domínios lipídicos em GUVs e correlação com a atividade lítica do peptídeo	136
5.5 Impacto do peptídeo no comportamento termotrópico de sistemas lipídicos contendo PS.....	138
CAPÍTULO 6 – Conclusões.....	139

APÊNDICE A – Estratégias para explorar contribuições eletrostáticas e não-eletrostática da interação de peptídeos antimicrobianos helicoidais com membranas modelos.....	142
A.1 Resumo.....	142
APÊNDICE B – Regulação eletrostática das propriedades interfaciais do peptídeo Polybia-MP1 e sua interação com DPPC	144
B.1 Resumo.....	144
APÊNDICE C – Interação de peptídeos helicoidais com membranas modelo acessada por técnicas espectroscópicas	147
C.1 Efeito do ácido aspártico D2 na afinidade do peptídeo Polybia-MP1 a vesículas lipídicas aniônicas	147
C.2 Interação do peptídeo antimicrobiano sintético L1A e seus análogos, por espectroscopia de fluorescência.....	149
REFERÊNCIAS.....	151

CAPÍTULO 1

Introdução

Peptídeos antimicrobianos (PAMs), pequenas sequências com até 50 aminoácidos, ricos em resíduos catiônicos e hidrofóbicos, são moléculas ativas na superfície de membranas lipídicas aniônicas. Sua associação à membrana, sem a necessidade de um receptor específico de membrana, afeta fortemente as propriedades estruturais e dinâmicas dos lipídios, perturbando o empacotamento lipídico (Blondelle et al. 1999). Por essa habilidade de ação na matriz lipídica da membrana, esses peptídeos apresentam um grande potencial farmacêutico, com ação antibacteriana e/ou anticâncer (Yeaman 2003; Hoskin and Ramamoorthy 2008) ou podem ser modelo para o desenho de drogas mais eficientes que tenham como alvo a membrana lipídica.

Em nível macroscópico, existem dois requisitos importantes para peptídeos antimicrobianos: carga líquida positiva e capacidade de assumir estrutura anfipática, na qual as regiões hidrofóbica e hidrofílica estão dispostas em faces opostas desta estrutura.

Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar a atividade destes peptídeos (Nguyen et al. 2011), porém, cada modelo pode explicar os efeitos encontrados para ação de somente alguns peptídeos. Comumente, os eventos iniciais nestes mecanismos são a adsorção do peptídeo na membrana e seu acúmulo até uma concentração na qual a tensão elástica induzida na membrana torna-se crítica e ao ser aliviada resulta na lise celular (Brochard et al. 1976; Puech et al. 2003; Huang et al. 2004). Mecanismos como poro toroidal (Matsuzaki et al. 1997; Brogden 2005; Sengupta et al. 2008), "barrel-stave" (Huang et al. 2004) e tipo detergente são usados para identificar o processo de lise (Shai 1999; Bechinger and Lohner 2006). Na concentração crítica de peptídeos adsorvidos na membrana, pode haver ou não agregação do peptídeo. O estresse elástico imposto na bicamada pode então ser aliviado por formação de poro transitente em que as monocamadas externa e interna da membrana se fundem gerando curvatura positiva, sendo os peptídeos espaçados por lipídios formando um toróide (K. Matsuzaki et al. 1998). Peptídeos, como os que propomos estudar, são bem mais curtos que a espessura da membrana e a possibilidade de formação de poro estável transmembranar pode ser desprezada (Huang, Chen, and Lee 2004). Em concentrações de peptídeo maiores que a crítica, peptídeos

podem, também atuar como detergentes levando à lise por micelização (Bechinger and Lohner 2006). Evidências experimentais mostram que o vazamento induzido por peptídeos pode ser gradual (Pokorny et al. 2002) ou tudo-ou-nada (Parente et al. 1990); peptídeos podem agregar na bicamada, em dímeros ou trímeros em geral, gerando estresse de curvatura na membrana, sendo então translocados para a camada interna, em processo conhecido por “sinking raft”, proposto para descrever o processo de vazamento gradual induzido por peptídeos em vesículas (Pokorny and Almeida 2004). O mecanismo de vazamento tudo-ou-nada é o proposto por Szoka (Parente et al. 1990) que é similar ao poro permanente (Almeida and Pokorny 2009). Peptídeos adsorvidos, mesmo não possuindo uma estrutura anfipática, podem perturbar o empacotamento lipídico da membrana com atividade interfacial e induzir lise celular (Wimley 2010). Para algumas composições lipídicas, o peptídeo pode induzir a formação de fase não lamelar (Haney et al. 2010) e ser translocado através da membrana por formação de micelas reversas (Shai 1999; Bechinger and Lohner 2006). Peptídeos podem ainda induzir a segregação lipídica e, portanto a formação de domínios cuja fronteira é instabilizada, levando à lise (Epanand et al. 2009).

Neste sentido, muitos eventos que ocorrem durante a interação ainda não são completamente compreendidos, sendo um grande desafio científico e tecnológico.

A adsorção do peptídeo à membrana é seguida por sua estruturação, em alfa hélice e envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A adsorção prossegue e os peptídeos adsorvidos na interface, em geral, orientam-se paralelamente à superfície da membrana lipídica com a parte polar em contato com as cabeças polares e a fase hidrofóbica enterrada na região das cadeias acíclicas. Nesta orientação os peptídeos podem modular as propriedades físicas da membrana alvo, como, diminuindo a espessura da membrana (He et al. 1995), modificando o parâmetro de ordem das cadeias acíclicas (Koenig et al. 1999) e alterando o comportamento de fase termotrópico da membrana (Jing et al. 2003). O mecanismo de acúmulo na membrana é decorrente de (1) restrições impostas por propriedades físico-químicas e dinâmicas dos lipídios da superfície da membrana e (2) restrições dimensionais e efeitos de orientação da membrana. A concentração crítica de acúmulo depende fortemente da composição lipídica da bicamada e, portanto, não somente da densidade superficial de cargas, mas de aspectos elásticos tais como módulos de flexão (“bending”) e de compressibilidade (“stretch”) e da curvatura espontânea dos lipídios. A curvatura da membrana é controlada pela sua rigidez que atua como um “sensor” para detectar efeitos de inclusão de moléculas/ions na membrana (Gracià et al. 2010).

Os mastoparanos são uma família de peptídeos catiônicos, extraídos do veneno de himenópteros, especialmente vespas e abelhas. Estes peptídeos, com sequências entre dez e catorze resíduos de aminoácidos possuem em geral de três a quatro lisinas e são ricos em resíduos hidrofóbicos especialmente leucinas e isoleucinas. A amidação, pós-transcricional no C-terminal, os protege de ataque proteolítico proporcionando maior estabilidade à estrutura helicoidal (Andreu and Rivas 1998). Em geral estes peptídeos possuem extensa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, embora alguns possuam atividade hemolítica e citotóxica em células eucarióticas (Matsuzaki et al. 1989; Dos Santos Cabrera et al. 2004).

Polybia-MP1 (MP1), ou simplesmente MP1, é um mastoparano extraído do veneno da vespa nativa *Polybia paulista*. Este peptídeo possui intensa atividade antibacteriana de amplo espectro sem ser citotóxico e hemolítico (Souza et al. 2005). MP1 mostrou efeito inibitório na proliferação de células de câncer de próstata e bexiga (Wang et al. 2008) e contra células leucêmicas multirresistentes a drogas (Wang et al. 2009). Este peptídeo, ainda mostrou seletividade a linfócitos leucêmicos comparados a linfócitos saudáveis e os testes de citometria de fluxo demonstraram que ele possui intensa atividade antitumoral (Dos Santos Cabrera et al. 2012).

Uma importante característica do peptídeo Polybia-MP1 é a presença de dois resíduos de ácido aspártico concomitantemente com três lisinas e o C-terminal amidado conferindo uma carga líquida (+2e), relativamente baixa comparada com outros peptídeos antimicrobianos altamente seletivos, em pH fisiológico. Estudos realizados da interação do MP1 com membranas modelos demonstraram o importante papel dos resíduos ácidos na modulação da afinidade do MP1 a vesículas zwitteriônicas (POPC) e aniônicas (POPC:POPG/7:3) (Dos Santos Cabrera et al. 2008; Leite et al. 2011). A distribuição dos resíduos carregados ao longo da cadeia participa no balanço energético para sua estruturação helicoidal (dos Santos Cabrera et al 2008). A disposição destes grupos carregados é favorável a interações intra-cadeia que podem resultar em alterações do pKa dos grupos ionizáveis gerando diferentes estados de protonação. Dessa maneira, a carga líquida é uma função do pH do meio e do potencial da membrana.

Motivação

1) Presença de PE e PS:

Células sadias são caracterizadas por uma distribuição assimétrica de fosfolipídios que é mantida por uma família de aminofosfolipídios translocases (APTLs) que catalisa o transporte ativo de PS da monocamada externa para a interna da membrana plasmática. Em células tumorais endoteliais essa assimetria é perdida e aminofosfolipídios, fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE), são encontrados em quantidades substanciais na monocamada externa (Zwaal et al. 2005; Stafford and Thorpe 2011; Stafford et al. 2013). Outra característica dessas células apoptóticas é o baixo pH do meio extracelular (Makovitzki et al. 2009).

A atividade lítica do MP1 foi investigada em vesículas compostas por PE e PS em misturas PC/PE, PC/PS e PC/PE/PS por microscopia de fluorescência confocal. Nesta investigação foram usados três marcadores fluorescentes a carboxifluoresceína (CF) de 0,34 kDa e duas dextranas marcadas: cascade blue de 3 kDa e alexafluor de 10 kDa. Vesículas gigantes de DOPC, DOPC/POPE (9:1), DOPC/POPS (8:2) e DOPC/POPE/POPS (7:2:1) foram imersas em um meio contendo simultaneamente os três marcadores e o influxo de cada um deles, induzido pelo peptídeo, foi monitorado por microscopia de fluorescência confocal. Os resultados desta investigação mostraram que os três marcadores são permeados na presença de peptídeo, entretanto, nas vesículas contendo PE especialmente PE e PS a permeabilidade aumentou dramaticamente. Para estas vesículas contendo PE a porcentagem de vesículas com preenchimento foi superior a 80% mesmo para o marcador de maior peso molecular, sugerindo poros grandes. Esta investigação mostrou ainda, por meio de isotermas de adsorção do peptídeo a vesículas grandes por difracto circular, que a afinidade do peptídeo aumenta com a presença de PS mas diminui na presença de PE (Leite et al. 2015). Por meio de supressão de fluorescência do fluoróforo 8-aminonaftaleno-1,3,6-ácido trissulfônico (ANTS) por p-xylenebis (pyridinum) bromide (DPX) (Ladokhin et al. 1995) em vesículas grandes (LUVs) foi possível estimar a fração de fluoróforo que permanece no interior da vesícula e a concentração de fluoróforo que foi liberado pela ação do peptídeo. Surpreendentemente, estes experimentos mostraram que para todas as composições lipídicas investigadas, o processo de vazamento é tudo-ou-nada. Estes resultados foram reforçados com experimentos de influxo de marcadores em GUVs. Os histogramas obtidos para o influxo medido de CF em 50 vesículas gigantes mostraram

percentual de preenchimento acima de 90% e poucas vesículas inferior à 20% sugerindo processo tudo-ou-nada (Leite et al. 2015).

2) *Formação de domínios como um possível mecanismo de ação:*

A interação preferencial de peptídeos biologicamente ativos com membranas fosfolipídicas aniônicas é típica para alguns peptídeos e, em alguns casos, a interação destes com bicamadas aniônicas resulta na segregação da carga ou separação lipídica lateral induzindo, portanto, a formação de domínios. Para exercer suas funções, a membrana celular segrega lateralmente seus constituintes, e existe a evidência da presença de domínios lipídicos na membrana das bactérias com características funcionais (Epanand 2007).

A formação de domínios tem sido enfatizada por Epanand e colaboradores (Epanand et al. 2008; Epanand et al. 2009; Epanand and Epanand 2009b; Epanand et al. 2010) como um possível mecanismo alternativo para a atividade antimicrobiana em bactérias Gram-negativas que possuem composição mista de lipídios zwitteriônicos e aniônicos. Estes autores sugerem que peptídeos poderiam ligar a um destes componentes e segregar o outro em uma fase rica deste outro componente. Observaram ainda que peptídeos que induzem formação de domínios ligam-se preferencialmente a lipídios aniônicos e possuem, em geral, alta densidade de resíduos básicos.

A atividade lítica do peptídeo Polybia MP-1 foi investigada usando a técnica de vesículas únicas. Nesta investigação, vesículas unilamelares gigantes (GUVs) composta de POPC/POPG, foram visualizadas por microscopia de fluorescência e de contraste de fase. Os resultados mostraram perda gradual do contraste de fase das vesículas, sugerindo um processo lítico gradual. Foi observado ainda a formação de regiões fluorescentes densas nas vesículas cuja origem não está bem compreendida, mas pode estar correlacionada à agregação peptídeo/lipídio ou segregação lipídica e possível formação de domínios (Dos Santos Cabrera et al. 2011). Evidências experimentais adicionais foram também obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) em sistema binário que mimetiza membranas de bactérias Gram-negativas (POPE/DOPG (7:3)) mostrando que este peptídeo induz aumento na temperatura de transição da fase gel para líquido-cristalina. A mudança da temperatura de transição da mistura para temperaturas mais altas é decorrente da aglomeração do lipídio com temperatura de transição mais baixo, DOPG, e ou lipídio/peptídeo, sugerindo segregação lipídica. O aumento da

temperatura de transição também pode estar relacionado ao aumento da fase gel indicando que o peptídeo estabiliza o sistema lipídico (Alvares 2011).

A indução de separação de fase lipídica pode estar relacionada ao mecanismo envolvido na atividade antitumoral do peptídeo. Curiosamente, a segregação lipídica e formação de domínios lipídicos induzidos por peptídeos têm sido observados para peptídeos com carga líquida alta, em geral maior que quatro. Uma das motivações deste trabalho foi estudar a formação dos domínios induzidos por um peptídeo com carga líquida +2 (MP1).

Estes resultados evidenciam que os aminofosfolipídios desempenham papel principal na atividade lítica e biológica do MP1. Estes fosfolipídios apresentam duas peculiaridades, a composição da cabeça polar e a forma geométrica da molécula, que podem ser críticas nestas atividades. Na fosfatidiletanolamina (PE) com duas cadeias acíclicas a cabeça polar é zwitteriônica formada por dois grupos ionizáveis, fosfato e amina, que no pH neutro formam um dipolo elétrico assim como a fosfatidilcolina (fosfato e colina). Entretanto na fosfatidiletanolamina a distância entre as cargas é menor do que na fosfocolina. Desta maneira, a fosfatidiletanolamina tem a forma de um cone truncado invertido, quando as cadeias acíclicas são insaturadas, pois o volume da molécula (v) é maior do que o produto da área da cabeça polar (a) e o comprimento das cadeias acíclicas (l) (Israelachvili 1992). PE também pode ter a forma de um cilindro, quando as cadeias acíclicas são saturadas, pois o volume da molécula é similar ao produto entre a área da cabeça polar e o comprimento das cadeias acíclicas ($v \sim al$) (Israelachvili 1992). Para a fosfatidilcolina com duas cadeias acíclicas, o volume da molécula é menor que este produto ($v < al$) e a molécula tem forma de cone truncado (Israelachvili 1992). A cabeça polar também é zwitteriônica em pH neutro como a fosfocolina, mas a diferença é o grupo positivo amina (NH_3^+) ao invés de uma amina quaternária $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ com carga fixa da colina (Yeagle 2016). A cabeça polar da fosfatidilserina (PS) é composta por duas cargas negativas (fosfato e carboxila) e uma positiva (amina) em pH neutro formando, portanto, dois dipolos não colineares e resultam em carga líquida -1. PS também tem volume molecular similar ao produto da área da cabeça pelo comprimento das caldas ($v \sim al$). A forma da molécula de fosfolipídio tem séria implicação na estrutura do auto-arranjo destas moléculas. Fosfolipídios com forma cilíndrica privilegiam a formação de bicamadas lipídicas enquanto moléculas em forma de cones invertidos formam fase hexagonal invertida ou fase não lamelar. As moléculas em forma de secção de cone invertido apresentam curvatura intrínseca negativa que tem forte impacto na formação de poros, pois tanto em poros espontâneos como naqueles induzidos por peptídeos as monocamadas da membrana curvam-se para dentro até se encontrarem formando

curvatura positiva que será a borda do poro. Desta forma, as moléculas com curvatura negativa além de dificultarem a formação de vesículas lipídicas acima de um percentual relativamente baixo ainda dificultam a formação de poros.

Não obstante esta característica, os experimentos de atividade lítica em GUVs evidenciaram a importância da fosfatidiletanolamina em aumentar a permeabilidade induzida pelo peptídeo MP1 (Leite et al. 2015). Este efeito é mais forte quando estão presentes os dois aminofosfolipídios, situação em que parece haver um sinergismo entre eles. Por outro lado, as alterações de propriedades termotrópicas induzidas pelo MP1 em bicamadas lipídicas contendo estes fosfolipídios sugerem segregação lipídica induzida pelo peptídeo o que é curioso visto que este efeito é em geral induzido por peptídeos com alta densidade de carga, ou seja, de grupos básicos, que não é o caso do MP1. Visto que a atividade lítica do peptídeo não é necessariamente decorrente da formação de poros na bicamada, mas também devida aos defeitos induzidos cujas origens sejam provavelmente relacionadas a alterações no empacotamento lipídico, é mandatório entender o efeito do MP1 tanto no empacotamento como na segregação lipídica.

O principal foco desta tese foi utilizar monocamadas lipídicas como modelo de membranas para explorar o empacotamento de fosfolipídios que contêm as cabeças polares que se mostraram importantes na atividade lítica em GUVs. Filmes lipídicos de Langmuir têm se mostrado um excelente sistema modelo para se entender e explorar aspectos importantes do empacotamento lipídico (Dennison et al. 2014; Dennison and Phoenix 2014) e suas alterações induzidas por agentes farmacológicos, proteínas e peptídeos (Maget-Dana and Ptak 1997; Maget-Dana 1999; Stefaniu et al. 2014). Deste modo, a proposta central deste trabalho foi explorar as propriedades interfaciais do peptídeo MP1 e suas interações com DPPC, DMPC, DMPE, DPPS e DMPS em diferentes condições experimentais utilizando monocamadas de Langmuir como sistema modelo. A estratégia foi obter informações termodinâmicas a partir das isotermas de compressão e mudanças na morfologia superficial dos domínios lipídicos induzidas pelo peptídeo usando microscopia fluorescência (MF) e de ângulo de Brewster (BAM) e em alguns casos estas microscopias foram complementadas por microscopia de força atômica (AFM). Por meio de experimentos à área constante, foram obtidas as isotermas de adsorção do peptídeo em monocamadas (isotermas de Gibbs), bem como a inserção do peptídeo em monocamadas zwitteriônicas de DPPC, DPPE, DMPC, DMPE e POPE, e aniônicas de DPPS, DMPS, POPS na presença e ausência de eletrólito suporte com a finalidade de explorar qualitativamente as contribuições eletrostáticas. É importante notar que mesmo as interações de peptídeo com lipídios neutros têm componente eletrostática uma vez que as cabeças polares

destes fosfolipídios são dipolos elétricos que podem interagir com cargas. Além disto, estas monocamadas neutras ou zwitteriônicas favorecem a investigação de interações não coulombianas peptídeo-peptídeo comparadas com monocamadas aniônicas nas quais os termos coulombianos, mais fortes, são dominantes.

A habilidade do peptídeo em perturbar o empacotamento lipídico, especialmente no que concerne a segregação lipídica, foi também investigada nesta tese com o objetivo de obter informações sobre se a perturbação no empacotamento lipídico resulta na segregação ou formação de domínios. Nesta investigação foram utilizados experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Nos experimentos foram utilizadas misturas lipídicas binárias que continham lipídios cujas temperaturas de transição gel-líquido cristalina diferiam em ~ 50 °C. A perturbação induzida pelo peptídeo na bicamada altera as propriedades termotrópicas da mistura e é possível obter evidências se o peptídeo induz segregação lipídica nas bicamadas compostas destas misturas. A investigação da indução de segregação lipídica ou de formação de domínios lipídicos induzidos pelo peptídeo foram complementadas investigando a atividade lítica em GUVs cujas composições lipídicas evidenciam a formação de domínios. Outro objetivo foi investigar se a separação lateral de lipídios está relacionada à atividade lítica. Para tanto GUVs compostas por PC, PS, esfingomielina (SM) e colesterol (Chol) em misturas DOPC, DOPC/DOPS (2:1), DOPC/SM/Chol (3:3:1) e DOPC/DOPS/SM/Chol (2:1:3:1) foram utilizadas para avaliar o influxo de carboxifluoresceína por meio de microscopia de fluorescência confocal. Na mistura DOPC/BSM/Chol, domínios Lo (líquido-ordenado) são formados quando o colesterol associa-se à esfingomielina (SM), obtendo um complexo ordenado Chol-SM; e em mistura com DOPC, um dos sistemas de membrana modelo mais estudados, exibe coexistência de fase Lo/Ld (Líquido-ordenado/líquido-desordenado) (Veatch and Keller 2005). A segregação lipídica também foi investigada por meio de experimentos de contraste de fase visualizando GUVs compostas por POPC/POPS (3:1) por microscopia de fluorescência.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento Teórico

2.1 Membrana Biológica

Todas as células são circundadas por uma membrana celular (membrana plasmática) que controla seletivamente a troca de material. Além da membrana plasmática, as células eucarióticas contêm sistemas internos que possuem membranas formando compartimentos isolados (organelas) dentro do citoplasma como o núcleo e as mitocôndrias. As bases moleculares da estrutura da membrana residem nos seus componentes lipídicos e proteicos; a composição garante uma função específica. A membrana plasmática é o elemento mediador da comunicação entre a célula e o seu meio externo, constituindo uma barreira altamente seletiva, criando um compartimento interno com composição química própria, diferente do meio externo. Além disto, possibilita a captação de sinais extracelulares participando dos processos de reconhecimento e comunicação entre as células (Fig. 2.1).

O modelo de membrana celular aceito atualmente, o modelo do mosaico fluido (Fig. 2.2), foi proposto por Singer e Nicholson em 1972 (Singer and Nicolson 1972). Este modelo consiste de três características, que são:

- A estrutura da biomembrana em bicamada, com os grupos hidrofílicos de lipídios voltados para a face aquosa e as cadeias acíclicas formando um "core" hidrofóbico;
- A inserção de proteínas intrínsecas nesta bicamada, também regida pelas forças intermoleculares (interações eletrostáticas, covalentes e hidrofóbicas, com prevalência das hidrofóbicas), e a adsorção extrínsecas à superfície da membrana principalmente por meio de forças eletrostáticas;
- A bicamada é fluida com livre movimentação dos componentes permitindo uma distribuição aleatória destas moléculas.

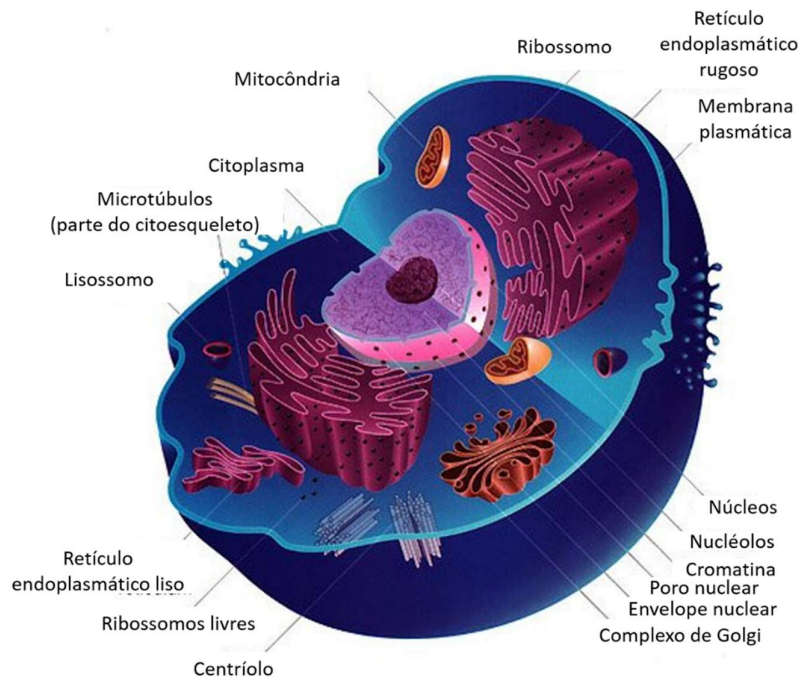


Figura 2.1: Ilustração de uma célula animal delimitada pela membrana plasmática. O meio interno contém as organelas, como retículo endoplasmático e a mitocôndria, que desempenham diferentes funções. Figura adaptada de: www.animalport.com/animal-cells.html.

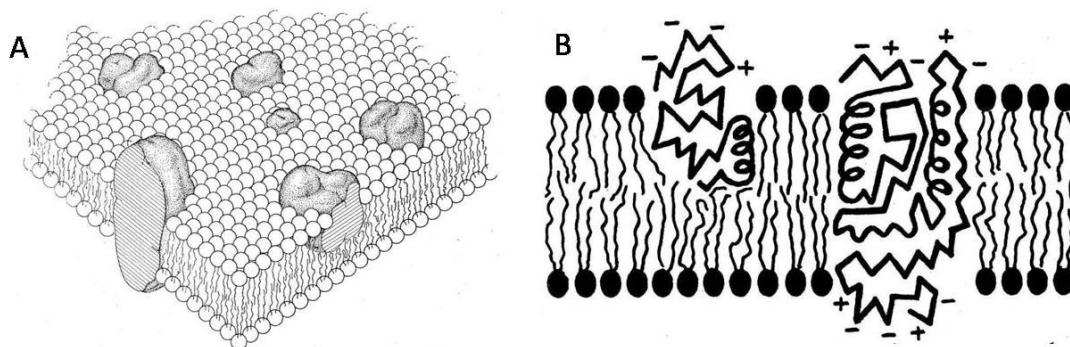


Figura 2.2: (A) Seção transversal da membrana com proteínas inseridas na bicamada fosfolipídica. (B) As porções iônicas e polares das proteínas, como indicado pelos sinais $+/-$, estão em contato com a solução aquosa (citoplasma e/ou líquido intersticial) em torno da bicamada lipídica. A região em que as proteínas estão inseridas é apolar (hidrofóbica), portanto, carece de cargas, conforme indicado pela ausência de símbolos $+/-$. Figuras retiradas de (Singer and Nicolson 1972).

A variedade de lipídios e sua organização espacial, que definem as propriedades biofísicas da membrana, têm um importante papel na função celular. Por exemplo, o comprimento e o grau de insaturação das cadeias acíclicas do fosfolipídio determinam a

espessura e ordenação da região hidrofóbica da membrana; a carga eletrostática dos lipídios aniônicos media interações com regiões catiônicas da membrana associadas a proteínas; e interações específicas com lipídios selecionados, tal como polifosfoinositídeos, são importantes para organização espacial das suas proteínas ligadas (Janmey and Kinnunen 2006).

A composição química das duas monocamadas que formam a bicamada lipídica é complexa e muito diferente uma da outra, podendo gerar domínios. A assimetria da bicamada entre membranas eucariótica e procariótica é essencial para a atividade de fatores endógenos antimicrobianos que rompem as membranas bacterianas, mas são inofensivos para células eucarióticas (Sato and Feix 2006). A composição química da bicamada afeta suas propriedades mecânicas e, reciprocamente, a aplicação de forças na membrana pode alterar sua composição química.

2.2 Lipídios e membrana lipídica

Lipídios são substâncias orgânicas insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Eles constituem aproximadamente 50% da massa da maioria das membranas plasmáticas das células animais, o restante são proteínas. A composição lipídica depende do tipo de membrana e varia largamente de uma célula para outra. Na tabela 2.1 são mostradas as composições lipídicas de algumas membranas biológicas (Wender et al. 2000). Dentre os vários tipos de lipídios existentes, os mais abundantes nas membranas biológicas são os fosfolipídios, que pertencem à classe dos fosfoglicerídeos. Em menor quantidade, são encontrados os esfingolipídios e o colesterol.

Os fosfolipídios apresentam uma cabeça polar, ou hidrofílica, e duas caudas apolares, ou hidrofóbicas. Dessa forma, pelo fato de apresentarem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, os lipídios de membrana são moléculas anfipáticas. A cabeça polar é composta pelo glicerol (um triálcool), um fosfato e um álcool, como a colina, a etanolamina, o inositol, o glicerol ou a serina (Fig. 2.3). As caudas apolares são compostas pelas cadeias carbônicas dos ácidos graxos. Ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa que possuem de 12 a 24 átomos de carbono, embora os mais abundantes nas biomembranas tenham entre 16 e 18 carbonos. Esses ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados. Normalmente, os fosfolipídios apresentam, pelo menos, uma cadeia insaturada em sua composição. Diferenças na quantidade de insaturações dos ácidos graxos são importantes, pois influenciam a aproximação e movimentação dos fosfolipídios e, conseqüentemente, a fluidez das membranas. Se o grupo da cabeça polar do

fosfolípido tem uma serina, glicerol ou inositol ligado no fosfato, a carga líquida da cabeça polar é -1 em pH fisiológico. Quando colina e etanolamina estão esterificadas no fosfato, o fosfolípido resultante é zwitteriônico com carga líquida zero em pH fisiológico.

Tabela 2.1: Porcentagem total dos principais componentes lipídicos das biomembranas selecionadas (Gennis 1989).

	Porcentagem de fosfolípidos total				
	Mitocôndria	Lisossomos	Membrana Plasmática	Membrana Nuclear	Membrana do Golgi
Cardiolipina	18	01	01	04	01
Fosfatidiletanolamina	35	14	23	13	20
Fosfatidilcolina	40	40	39	55	50
Fosfatidilenositol	05	05	08	10	12
Ácido Fosfatídico	-	01	01	02	<1
Lisofosfoglicerídeos	01	07	02	03	03
Esfingomiéline	01	20	16	03	18
Fosfolípidos (mg/mg proteína)	0,175	0,156	0,672	0,500	0,825
Colesterol	0,003	0,038	0,128	0,078	0,078

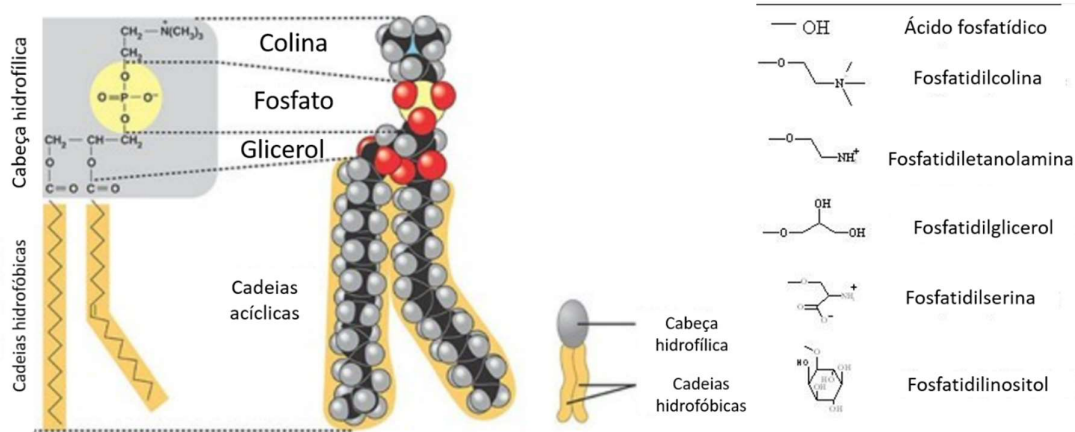


Figura 2.3: Estrutura dos principais fosfolípidos das biomembranas. Imagem adaptada de <http://slideplayer.com.br/slide/7353961/>.

Os lipídios anfipáticos, quando são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se em estruturas macromoleculares. Estas estruturas permitem maximizar as

interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-se da água, e deixam os grupos polares em contato com o solvente, com o qual podem interagir. Tais arranjos moleculares constituem o estado de menor energia livre para esses lipídios em água e resultam da presença de duas regiões com solubilidade diferente na mesma molécula. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Fig. 2.4).

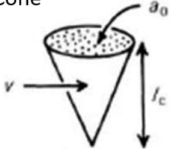




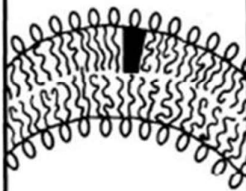

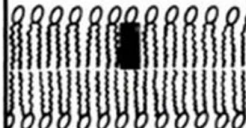

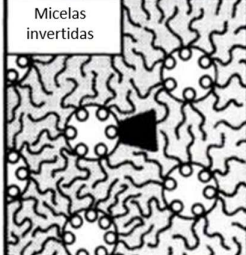
Lipídio	Parâmetro de empacotamento crítico (v/a_0l_c)	Forma do empacotamento crítico	Estruturas formadas
Lipídios com uma cadeia com grande área da cabeça polar: SDS em baixa concentração de sal	$< 1/3$	Cone 	Micelas esféricas 
Lipídios com uma cadeia com pequena área da cabeça polar: SDS em alta concentração de sal	$1/3-1/2$	Cone truncado 	Micelas cilíndricas 
Lipídios com duas cadeias acíclicas com grande área da cabeça polar: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina	$1/2-1$	Cone truncado 	Bicamadas flexíveis, vesículas 
Lipídios com duas cadeias acíclicas com pequena área da cabeça polar: fosfatidilserina + Ca^{+2} , fosfatidiletanolamina com as cadeias acíclicas saturadas	~ 1	Cilindro 	Bicamadas planas 
Lipídios com duas cadeias acíclicas com pequena área da cabeça polar: cardiolipina + Ca^{+2} , fosfatidiletanolamina com as cadeias acíclicas insaturadas, colesterol	> 1	Cone truncado invertido 	Micelas invertidas 

Figura 2.4: Geometria molecular e estabilidade de fase de moléculas anfipáticas como uma função do parâmetro de empacotamento crítico. Imagem adaptada de (Israelachvili 1992).

Lipídios com uma única cadeia hidrocarbônica, como sabões e detergentes, possuem a forma cônica e afilada e formam, preferencialmente, micelas. Nesta estrutura esférica, as cadeias de hidrocarboneto organizam-se no interior, isolando-se do meio aquoso, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa interagindo com o solvente (Fig. 2.5A). A maioria dos fosfolipídios forma, em vez de micelas, uma dupla camada de moléculas, chamada bicamada lipídica. Esta estrutura permite agregação mais estável destas moléculas, que apresentam uma forma cilíndrica (ver Fig. 2.4), devido à presença de duas cadeias acíclicas. As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, formando duas monocamadas; as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente, de modo a formar um domínio hidrofóbico no meio da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com o meio aquoso (Fig. 2.5B).

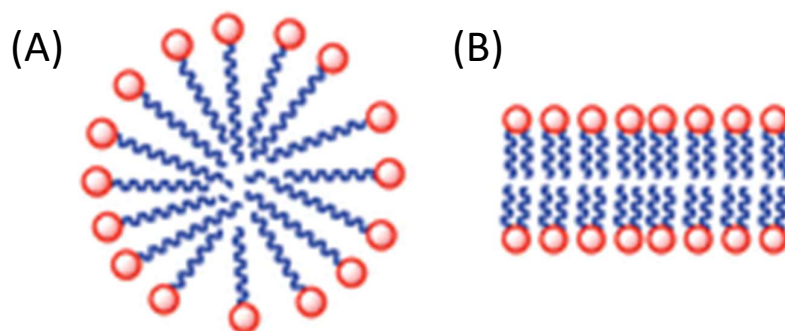


Figura 2.5: Desenho esquemático de uma micela (A) e uma bicamada (B). Imagem adaptada de (Azagarsamy et al. 2009).

Bicamadas lipídicas tendem a se fechar formando vesículas contendo solvente no seu interior. Estas estruturas fechadas são mais estáveis, porque não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Experimentalmente, demonstrou-se a formação dessas vesículas lipídicas, também chamadas de lipossomos. Lipossomos são, portanto, vesículas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente (Fig. 2.6). Eles podem ser formados de moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos.

Esses agregados vesiculares são normalmente classificados de acordo com seu tamanho, lamellaridade (número de bicamadas) e pelo método de formação, conforme descrito a seguir:

- Vesículas Unilamelares pequenas (SUVs): diâmetro entre 20 – 50 nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por sonicação de suspensões

lipídicas em meio aquoso,

- Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs): diâmetro entre 50 – 500 nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por extrusão de suspensões aquosas,
- Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs): diâmetro entre 500 nm – 300 μm , apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas, especialmente, por hidratação de filme lipídico e por eletroformação,
- Vesículas Multilamelares (MLVs): 200 nm – ordem de micrômetros, apresentando duas ou mais lamelas. São formadas, principalmente, por hidratação de filmes lipídicos.

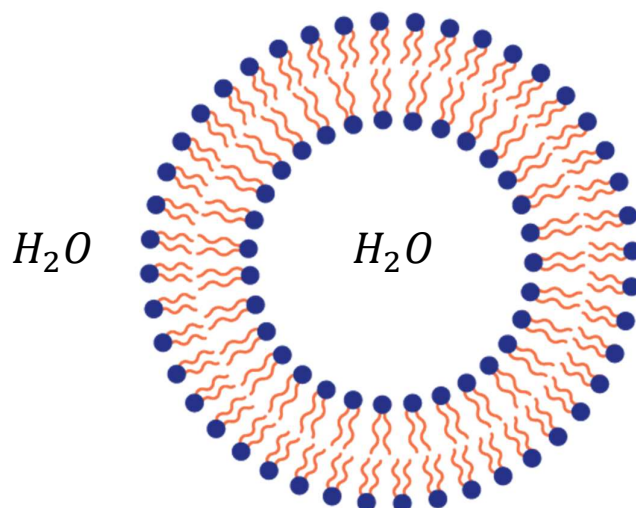


Figura 2.6: Desenho esquemático de um lipossomo: a bicamada lipídica formada pela agregação dos fosfolípidios separa o interior aquoso da vesícula do meio externo aquoso. Imagem adaptada de <http://www.niolip.com/liposomes/>.

2.3 Termodinâmica da Bicamada Lipídica

As moléculas lipídicas podem arranjar-se com diferentes tipos e grau de ordem, correspondendo a diferentes fases, que são caracterizadas por um arranjo espacial e liberdade de movimentação de cada lipídio em relação ao seu vizinho. A fase reflete a ordem do sistema e sua alteração pode ser induzida por variação de temperatura. O número e o tipo de estados de fases lipídicas possíveis variam dependendo do lipídio. Há duas fases lipídicas principais: uma fase gel altamente ordenada e uma fase fluida desordenada (Fig. 2.7).

Se as cadeias de hidrocarbonetos são saturadas, as rotações ao redor de todas as ligações C-C são possíveis. Quando nenhuma das ligações C-C são rotacionadas (denominada configuração totalmente trans) os lipídios têm energia interna minimizada e as cadeias de hidrocarbonetos são paralelas e totalmente estendidas. Essa fase é chamada de fase gel (L_β). A configuração total-trans seria a única no caso ideal ($S=0$); esta configuração teria a mínima entropia, pois $S = k_B \cdot \ln(g)$ onde g é o número de estados acessíveis e k_B a constante de Boltzmann, porém na natureza isso não pode ser aplicado. Quando a temperatura é aumentada o número de estados acessíveis aumenta, aumentando, assim, a entropia, devido à rotação da ligação C-C. As rotações fazem as cadeias de hidrocarbonetos retorcerem resultando no estado fluido (L_α) aumentando a área da membrana e diminuindo sua espessura comparada com a fase gel quando a cadeia está mais rígida.

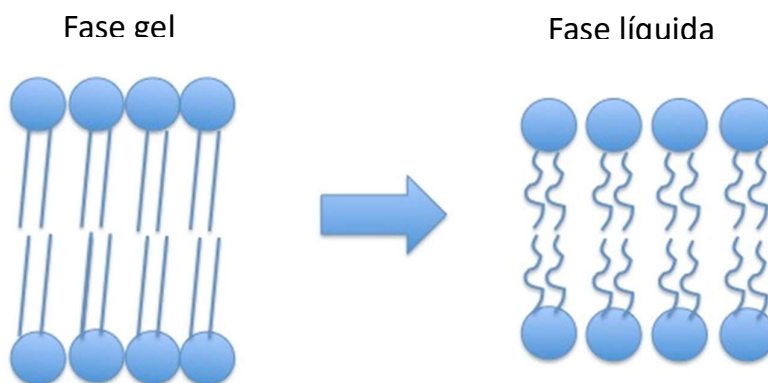


Figura 2.7: Transição de fase lipídica da fase gel (ordenada) para a líquida (desordenada). Quando os lipídios mudam de fase a entalpia e a entropia aumentam. T_m é a temperatura de transição. Imagem adaptada de http://physwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/University_of_California_Davis

Há diferentes subclasses de fases gel e líquida que são (Fig. 2.8) (Cevc 1991):

- L_c : fase cristalina ou "nativa".
- L_β : fase sólida ordenada ou "gel". As cadeias lipídicas são empacotadas altamente ordenadas e inclinadas.
- P_β : fase "ripple". Lipídios estão no estado altamente ordenado, mas mostra defeito de linha (ondulação).
- L_α : fase líquida desordenada ou "fluida". Cadeias lipídicas estão desordenadas e distribuídas aleatoriamente na membrana.

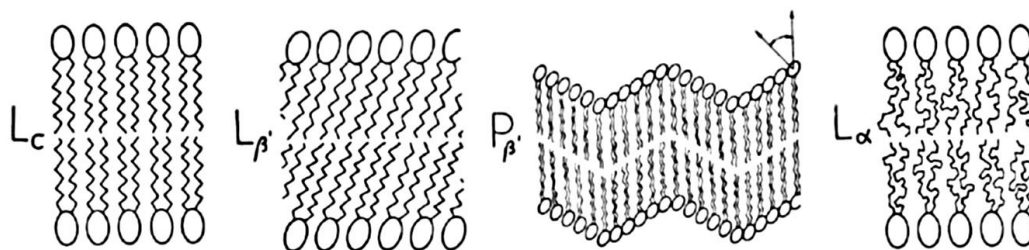


Figura 2.8: Diferentes fases lipídicas: cristalina (L_c), gel (L_{β}), "ripple" (P_{β}) e líquida (L_{α}). Imagem adaptada de (Cevc 1991).

A transição gel-fluido é um processo endotérmico no qual o calor absorvido é relativamente grande. Com a mudança entrópica a membrana aumenta o volume e a bicamada diminui a espessura. Medindo a absorção de calor pelos lipídios em função da temperatura, pode-se verificar se existe transição de fase. A capacidade térmica é definida como a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de um sistema por um dado incremento de temperatura ($C_p = \Delta Q/\Delta T$). Em geral, observa-se um pico bastante pronunciado da capacidade térmica em função da temperatura, que corresponde à transição de fase. Deste modo, medir a variação da capacidade térmica é uma maneira de determinar transições de fase. Fases lipídicas não variam somente a conformação dos lipídios, mas também toda a geometria do agregado lipídico.

2.4 Monocamadas Lipídicas

Monocamadas de Langmuir são formadas quando uma solução de moléculas anfifílicas insolúveis é espalhada na interface água-ar. Quando o solvente orgânico evapora, um filme monomolecular é formado na superfície da água. Assim, fosfolipídios espalhados na interface água-ar podem formar um filme monomolecular. A formação da monocamada é um processo termodinamicamente favorável devido ao carácter anfifílico das moléculas de lipídios. Na interface, essas moléculas estão orientadas de tal maneira que os grupos polares estão em contato com a água, enquanto as cadeias acíclicas são orientadas para o ar. A estrutura é estabilizada através de interações hidrofóbicas entre as cadeias acíclicas e interações entre grupo polar-grupo polar e grupo polar-subfase. Essa orientação de lipídios na interface água-ar resulta em mínima energia superficial levando a redução da tensão superficial.

2.4.1 Tensão superficial na interface água-ar

Forças coesivas entre as moléculas do líquido são responsáveis pelas propriedades conhecidas como tensão superficial, definida como a energia necessária para expandir a superfície de um líquido por unidade de área. Moléculas no interior de um líquido interagem igualmente com outras moléculas em todas as direções sentindo uma força líquida nula, porém, as moléculas da superfície não são simetricamente solvatadas e, assim, sofre uma força resultante atrativa na superfície líquida (Fig.2.9). Portanto, as moléculas da superfície se comportam de formas diferentes tentando ocupar a menor área possível. Essa é a origem da tensão superficial. Em líquidos polares, como a água, as moléculas participam de fortes interações intermoleculares resultando em alta tensão superficial, assim, qualquer fator que diminua a força das interações intermoleculares ou que forneça uma estrutura alternativa da superfície diminuirá a tensão superficial (Petty 1996; Hiemenz and Rajagopalan 1997).

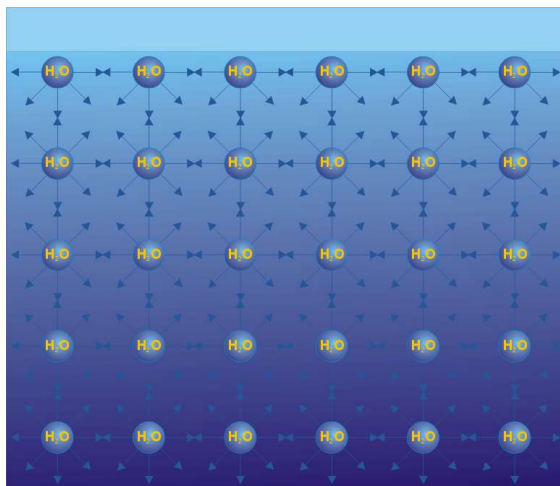


Figura 2.9: Tensão superficial – Forças entre as moléculas na subfase e na interface. Imagem retirada de <http://www.kibron.com/surface-tension>.

2.4.2 Pressão de superfície

A pressão de superfície (π) é definida como a diferença da tensão superficial entre a subfase na ausência das moléculas anfipáticas (γ_0) e a subfase com a monocamada lipídica espalhada (γ), como representado na eq. 2.1.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.1)$$

Uma cuba de Langmuir possui duas barreiras móveis tal que a pressão de superfície dada pela diferença na tensão superficial entre as duas barreiras ($\gamma_0 > \gamma$) pode ser continuamente variada à medida que a área da monocamada é reduzida. A densidade superficial das moléculas aumenta, diminuindo então γ e aumentando π . Ao construir o gráfico de π versus área por molécula (A), π aumenta à medida que a área disponível na cuba diminui.

A pressão de superfície pode ser monitorada medindo-se a força por unidade de comprimento sobre uma placa de Wilhelmy acoplada a uma eletrobalança. A pressão mínima medida é zero, e a máxima – para monocamadas estáveis – aproxima-se da tensão superficial da subfase, que é cerca de $72,5 \text{ mN/m}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) para a água pura (Petty 1996).

2.4.3 Método de Wilhelmy

O método de Wilhelmy é uma medida absoluta das forças que agem em uma placa, feita de platina ou papel de filtro, parcialmente imersa na subfase aquosa. A placa é conectada a uma eletrobalança que funciona com um sensor na interface água-ar da monocamada. O sensor sofre uma ação da força gravitacional, da tensão superficial do material que compõe a subfase e do empuxo.

Para um sensor retangular de dimensões l , w e t feito de um material com densidade ρ_w e imerso a uma profundidade h em um líquido de densidade ρ_L (Fig. 2.10), a força resultante é:

$$F = \rho_w g l w t - \rho_L g h w t + 2\gamma(t + w)\cos\theta \quad (2.2)$$

onde γ é a tensão superficial do líquido, θ é o ângulo de contato do sensor sólido e g é a aceleração da gravidade.

A pressão de superfície é determinada medindo a mudança de F a partir de um sensor estacionário (Birdi 1989; Petty 1996). ΔF é determinado entre a superfície limpa e a mesma superfície com a monocamada formada. Se a placa está completamente perpendicular ao líquido ($\theta = 0 \rightarrow \cos\theta = 1$) a pressão superficial é então obtida pela seguinte equação:

$$\Delta\gamma = \Delta F / 2(t + w) \quad (2.3)$$

Se o sensor for muito fino tal que $t \ll w$, então $\Delta\gamma = \Delta F / 2w$.

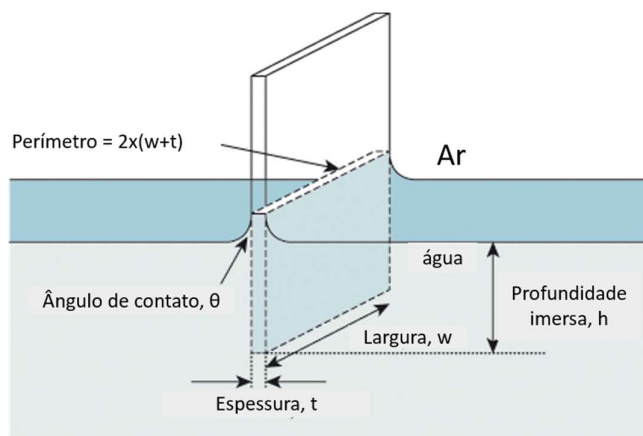


Figura 2.10: Placa de Wilhelmy parcialmente imersa na subfase aquosa. Imagem adaptada de <http://www.biolinscientific.com/ksvnama/>.

2.4.4 Propriedades das monocamadas de Langmuir

Utilizando uma cuba de Langmuir (Fig. 2.11), é possível acompanhar a mudança na pressão superficial com a variação da área molecular mantendo a temperatura constante, obtendo assim uma isoterma $\pi - A$.

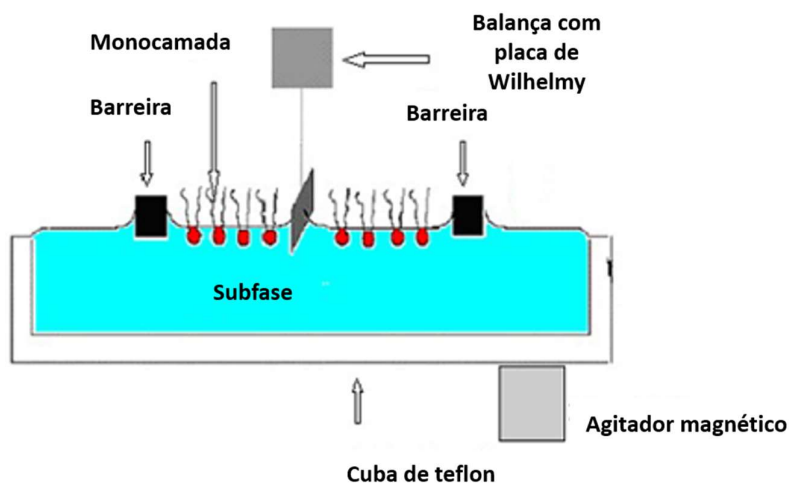


Figura 2.11: Esquema da cuba de Langmuir e seus acessórios necessários para obter filmes de Langmuir. Imagem adaptada de <http://www.bio.iitb.ac.in/~rbanarji/biomatlab/interfaces.html>.

A formas das isotermas de pressão de superfície versus área por molécula fornecem informações sobre o empacotamento lipídico, da área molecular média das moléculas do filme, da estabilidade da monocamada, de interações que existam entre diferentes moléculas na monocamada mista, bem como a verificação da presença de distintas fases na monocamada durante a compressão. Isotermas $\pi - A$ são uma medida direta da força da interação física entre as cadeias acíclicas, das cabeças polares e entre as cabeças polares e o líquido da subfase. Quando as moléculas se aproximam na monocamada há uma mudança nas forças de interação que resulta em mudanças da orientação e da densidade de empacotamento da monocamada. As isotermas $\pi - A$ para um filme são análogas às isotermas $\pi - V$ para um gás (Chattoraj and Birdi 1984). Assim, aumentando a pressão de um gás em um determinado volume conduz a mudanças de fase do gás. Neste sentido, o aumento da pressão de superfície no filme também induz o aparecimento de diferentes fases. Apesar desta analogia, as moléculas de gás em um sistema 3D, por estarem próximas, mantêm contato com as moléculas vizinhas podendo interagir com outras moléculas. Em contrapartida, moléculas anfifílicas em uma monocamada em 2D interagem menos entre si uma vez que as cabeças polares estão orientadas para a subfase e as cadeias acíclicas para o ar.

A natureza química das moléculas anfifílicas determina a magnitude das forças que agem na monocamada, como por exemplo, interações de van der Waals entre as cadeias acíclicas, interações eletrostáticas repulsivas entre as cargas das cabeças polares bem como outras forças como ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e entre estas e as moléculas de água da subfase. A somatória destas forças determina a forma das isotermas $\pi - A$ e do diagrama de fases. Assim, a pressão de superfície resulta em:

$$\pi = \pi_{cinética} + \pi_{eletrostática} + \pi_{van\ der\ waals} + \pi_{outras} \quad (2.4)$$

Onde $\pi_{cinética}$ é decorrente do movimento cinético do filme, $\pi_{eletrostática}$ das interações repulsivas entre as cabeças polares, $\pi_{van\ der\ waals}$ das forças de van der Waals entre as cadeias polares e π_{outras} das ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água da subfase, impedimento estérico, etc.

Para um filme ideal $\pi_{cinética}$ é determinado por (Maget-Dana 1999):

$$\pi_{cinética} = kT/A \quad (2.5)$$

onde k é a constante de Boltzman, T é a temperatura e A é a área por molécula.

De acordo com o modelo de Gouy-Chapman, o termo $\pi_{\text{eletrostática}}$ é dado por (Maget-Dana 1999):

$$\pi_{\text{eletrostática}} = \int_0^{\psi_0} q d\psi \quad (2.6)$$

Onde q é a densidade de carga na interface e ψ_0 é o potencial elétrico médio no plano da monocamada originado pelas cabeças polares das moléculas do filme determinado a partir do potencial de superfície da interface líquida por (Maget-Dana 1999):

$$\Delta V = 4\pi \sum (n\mathcal{M}_{\perp}/\epsilon) + \psi_0 \quad (2.7)$$

Onde n é o número de dipolos, \mathcal{M}_{\perp} é a componente normal do momento de dipolo da superfície e ϵ é a permissividade do meio.

A expressão quantitativa da $\pi_{\text{eletrostática}}$ também pode ser escrita de acordo com a equação de Davis é derivada como (Davies 1951):

$$\pi_{\text{eletrostática}} = \sqrt{\frac{\epsilon N k^3 T^3 A}{125\pi e^2}} [\cosh(\psi_0) - 1] \quad (2.8)$$

A Fig. 2.12 mostra uma isoterma $\pi - A$ em que todas as fases são observadas.

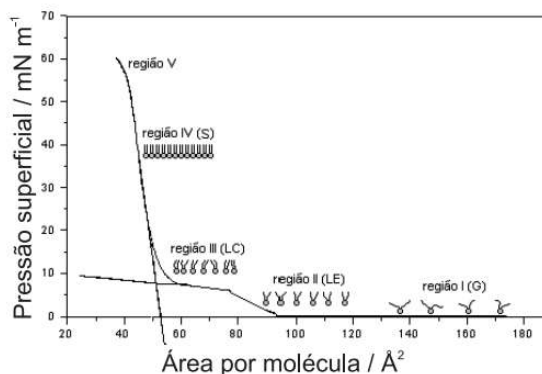


Figura 2.12: Isoterma $\pi - A$ de uma monocamada de DPPC. As regiões I, II, III, IV e V representam as fases gasosa, líquido-expandida (LE), líquido-condensada (LC); condensada ou sólida (S) e o colapso da monocamada, respectivamente. Imagem retirada de (Ferreira et al. 2005).

Fase gasosa (G)

Em uma monocamada de Langmuir, as moléculas espalhadas na interface água-ar estão, usualmente, na fase gasosa, em que as forças de van der Waals e as interações eletrostáticas entre os grupos polares são desprezíveis. As moléculas na fase gasosa possuem uma energia cinética média, $\frac{1}{2} kT$ para cada grau de liberdade. Assim, o comportamento de um gás ideal é observado somente quando a distância entre as moléculas anfífilas é muito grande e como resultado o valor de π é muito pequeno ($<0,5$ mN/m).

$$\pi A = kT \quad (2.9)$$

Fases Líquidas (LE e LC)

Com a compressão da monocamada a área da superfície é reduzida aparecendo a fase líquido expandida (LE) com alta compressibilidade. Quando as barreiras da cuba são comprimidas, as moléculas na monocamada se aproximam uma das outras resultando no aumento das interações entre as cadeias acíclicas e entre as cabeças polares. No início da transição G-LE, o lift-off (valor de área em que $\pi > 0$) é observado.

Com o aumento da compressão da monocamada a fase líquido condensada (LC) é observada em que as interações entre as cadeias acíclicas aumentam e a compressibilidade do filme é reduzida. Nesta fase, as cadeias acíclicas estão, relativamente, bem ordenadas.

Monocamadas lipídicas no estado líquido obedecem a equação de estado de van der Waals (Chattoraj and Birdi 1984):

$$(\pi - \pi_a)(A - A_0) = kT \quad (2.10)$$

Onde π_a é pressão atribuída às forças de forte coesão das cadeias acíclicas e A_0 é a área excluída por molécula.

Coexistência entre as fases LE-LC

A coexistência de fases nas isotermas $\pi - A$ é representada por um platô horizontal em que as fases LE e LC estão em equilíbrio. Fisicamente, quando duas fases estão em equilíbrio

a energia livre de Gibbs para cada fase é igual a zero. Assim essa transição é chamada transição de fase de primeira ordem. De acordo com a classificação de Ehrenfest a transição de fase é de primeira ordem quando a primeira derivada do potencial químico em relação a temperatura é descontínua (de Paulo and Atkins 2006). Em um sistema 2D a densidade de lipídios nas duas fases é diferente, e então, a região de coexistência tem uma densidade que é intermediária entre elas. Nesta transição não ocorre mudança na energia livre de Gibbs, mas existe uma mudança na entalpia e na área molecular em que são indicadas por uma mudança de inclinação do potencial químico da diferença de fases em ambas as transições.

Fase sólida (S)

A fase sólida é observada quando as moléculas na interface água-ar aderem-se através de forças de Van der Waals entre as cadeias acíclicas, forças estéricas entre os grupos polares e ligações de hidrogênio entre a cabeça polar e a subfase. Nesta fase, as cadeias acíclicas e as cabeças polares são altamente ordenadas. Uma monocamada na fase sólida obedece a equação de estado:

$$A\pi = b - A \quad (2.11)$$

onde a e b são constantes.

Colapso

O colapso ocorre quando o ordenamento molecular é destruído e a monocamada pode então: romper, deformar ou perder material para a subfase. O colapso depende de muitos fatores, como a velocidade em que a monocamada é comprimida, a natureza das moléculas espalhadas na interface e a interação entre a subfase e a cabeças polares das moléculas.

2.4.5 Interações eletrostáticas nas monocamadas fosfolipídicas

Fosfolipídios como fosfatidilcolina (PC) ou fosfoetanolamina (PE) são zwitteriônicos, enquanto que outros como, fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfático (PA) e fosfatidilserina (PS) são carregados negativamente. O grau de ionização de monocamadas formadas por lipídios

negativos depende de ambos, pH e força iônica da subfase. Desta forma, conhecer as interações eletrostáticas em monocamadas é necessário para compreender as interações entre peptídeos/proteínas com lipídios carregados.

A presença de moléculas carregadas na interface água-ar resulta na formação de uma dupla camada de contra-íons atraídos da subfase e esse processo pode ser descrito pela teoria de Gouy-Chapman com algumas aproximações (Lakhdar-Ghazal et al. 1983; Miranda et al. 1998; Le Calvez et al. 2001; Johann et al. 2001).

O valor do potencial elétrico φ no espaço preenchido por cargas obedece a equação de Poisson:

$$\varepsilon\varepsilon_0\nabla^2\varphi = -\rho = -\sum_i n_i z_i e \quad (2.12)$$

onde, ε é a constante dielétrica da água na vizinhança de uma monocamada, e ε_0 é a permissividade elétrica do vácuo, ρ é a densidade de carga elétrica, n_i é a concentração do i -ésimo íon com carga $z_i e$. A teoria de Gouy-Chapman assume que a distribuição de Boltzmann de íons próximos à superfície carregada:

$$n_i = n_{i0} \exp\left(-\frac{z_i e \varphi(x)}{kT}\right) \quad (2.13)$$

Onde n_{i0} é a concentração do i -ésimo espécie iônica da subfase. Combinando as eq. 2.12 e 2.13, tem-se a equação de Poisson Boltzmann (Shchukin, E.D. 2011):

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{1}{\varepsilon\varepsilon_0} \sum_i z_i e n_{i0} \exp\left(-\frac{z_i e \varphi(x)}{kT}\right) \quad (2.14)$$

Para um eletrólito simétrico ($z_+ = z_- = z$) a equação de Poisson-Boltzmann pode ser escrita da seguinte forma:

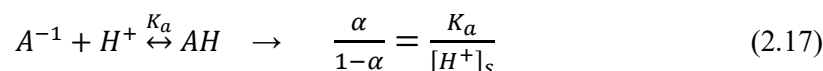
$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon\varepsilon_0} = \frac{2ze n_0}{\varepsilon\varepsilon_0} \sinh\left(\frac{ze\varphi(x)}{kT}\right) \quad (2.15)$$

que pode ser transformada em:

$$\varphi_0 = \frac{2kT}{ze} \sinh^{-1}\left(\frac{\rho}{8\varepsilon\varepsilon_0 kT_0}\right), \text{ se } x \rightarrow \infty, \varphi \rightarrow 0 \text{ e } \frac{d\varphi}{dx} \rightarrow 0 \quad (2.16)$$

onde φ_0 é o potencial da superfície carregada.

Apesar do tamanho dos íons não ser levado em consideração, a teoria de Gouy-Chapman é válida para muitos sistemas. Neste sentido, a adsorção específica de contraíons à superfície carregada pode ser adicionada à teoria de Gouy-Chapmann, e a teoria é chamada de Gouy-Chapmann-Stern. Nesta modificação φ_0 é o potencial elétrico da camada de Stern (o potencial é reduzido pelos contraíons adsorvidos). Outra importante consideração é a alta concentração de contraíons na vizinhança da superfície carregada, como por exemplo, uma monocamada fosfolipídica. Se a monocamada é carregada negativamente, os contraíons podem ser um íon de metal alcalino e/ou um próton, o que poderia levar a um aumento na concentração de próton próximo a monocamada. O grau de ionização da monocamada, α , é determinado pela concentração de próton da superfície, $[H^+]_s$, e a pela constante de equilíbrio, K_a , para a dissociação do grupo ácido.



A concentração de próton da superfície pode ser calculada se a concentração de próton da solução, $[H^+]_b$ é conhecido usando a equação de Boltzmann:

$$[H^+]_s = [H^+]_b \exp\left(-\frac{ze\varphi_0}{kT}\right) \quad (2.18)$$

A teoria de Gouy-Chapman é então usada para relacionar φ à densidade de carga na interface (Miranda et al. 1998) considerando que a densidade de carga da monocamada (ρ) é igual a αeA (onde A é área ocupada por uma molécula de lipídio):

$$\varphi = \frac{2kT}{e} \sinh^{-1}\left(\frac{1,38\alpha}{A\sqrt{c}}\right) \quad (2.19)$$

Onde c é a concentração de cátions. Combinando as eq. 2.17, 2.18 e 2.19 obtém-se a seguinte relação que pode ser escrita na forma logarítmica como:

$$pH_b = pk_a + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) + 0,87 \sinh^{-1}\left(\frac{1,38}{A\sqrt{c}}\right) \quad (2.20)$$

2.4.6 Nucleação, crescimento e morfologia dos domínios na região de coexistência

Por meio da visualização de monocamadas lipídicas por microscopia de fluorescência (Miller et al. 1986; Heckl et al. 1987) e microscopia de ângulo de Brewster (Honig et al. 1992; Siegel et al. 1992) foi demonstrada a presença de domínios na região de coexistência de fases LE-LC.

A nucleação envolve o processo de criar um núcleo mais denso na presença de fase menos densa (subfase) podendo ocorrer somente na região de transição de primeira ordem. O processo de nucleação é iniciado por flutuações aleatórias que são capazes de superar a barreira de energia para a transição de fase. Uma vez que essa barreira é superada o processo de crescimento torna-se energeticamente mais favorável.

Antes da área crítica ser atingida na isoterma, a monocamada é homogênea. Quando a área crítica é atingida, o sistema se torna heterogêneo com a formação de uma fase densa. Desta maneira, o núcleo só será criado se a energia gerada pela criação da fase densa for maior que a energia necessária para criar uma interface. A equação que determina se a nucleação ocorrerá é:

$$\Delta G = -n\Delta\mu + 2\pi r\lambda \quad (2.21)$$

onde n corresponde ao número de moléculas no domínio, $\Delta\mu$ é a diferença de potencial químico entre as fases LE e LC e r é o raio do domínio e λ é a tensão de linha entre as duas fases. O processo de nucleação é então, afetado pela tensão de linha e pela diferença do potencial químico.

A tensão de linha tem dependência com a temperatura. Um aumento na temperatura reduz a tensão de linha e então aumenta o número de núcleos (Arnold et al. 2005). Com o aumento da velocidade de compressão as moléculas na monocamada sofrem mais colisões aumentando também a probabilidade de nucleação. A teoria de nucleação clássica prediz que a taxa de nucleação diminui espontaneamente com λ e o tamanho de um núcleo crítico aumenta linearmente com λ . Então, a tensão de linha influenciará o número de núcleos (densidade de núcleos) e, assim, a distância entre eles (Wilke 2014).

A teoria mais conceituada para o crescimento de um domínio assume a competição de duas interações moleculares: a tensão de linha, λ , que favorece domínios circulares compactos e repulsão eletrostática, F_{el} , que favorece domínios alongados (Heckl et al. 1986; Keller et al.

1986; McConnell 1990; McConlogue and Vanderlick 1999; Krüger and Lösche 2000). Então, a forma de um domínio sólido individual é determinada por:

$$E = \lambda p + E_{el} \quad (2.22)$$

onde p é o perímetro do domínio sólido. A tensão de linha é definida como a energia livre por unidade de comprimento da fronteira entre a coexistência de fases no sistema molecular em 2D sendo determinada pelo comprimento das cadeias acíclicas, que quanto mais longas maior são as forças de van der Waals. A tensão de linha é resultado das forças de coesão entre as moléculas lipídicas que favorecem domínios circulares reduzindo o perímetro dos domínios e então, a energia de linha.

A energia eletrostática livre de um domínio dipolar é dada por (Lösche et al. 1983; Vanderlick and Mohwald 1990):

$$E_{el} = \frac{1}{2} \tau^2 \iint \left[|r - r'|^{-3} + \frac{4\pi}{3} \delta^3(r) \right] dA dA' \quad (2.23)$$

Onde $\tau = \tau_{LC} - \tau_{LE}$ corresponde à diferença de momento de dipolo por unidade de área entre as fases LE e LC, δ é a função delta de Dirac, e $r - r'$ corresponde à distância entre pontos no interior do domínio e dA é a área no interior da fase LE e dA' é a área na fase LC. Cada molécula conduz um pequeno momento de dipolo resultante dos momentos de dipolo das cadeias acíclicas, das cabeças polares e das moléculas de água polarizadas na sua vizinhança. Assim, a monocamada lipídica pode ser visualizada como um conjunto de dipolos na interface (Keller et al. 1986).

Em uma monocamada a orientação das moléculas de lipídio terá impacto na forma dos domínios na região de coexistência. Moléculas lipídicas que são paralelas e altamente alinhadas à superfície são mais repulsivas. Desta maneira, as interações repulsivas na região LC podem ser reduzidas pela alongação da estrutura do domínio aumentando o perímetro do domínio. Esse processo de alongação é regulado negativamente pelo aumento da energia interfacial (Keller et al. 1987; Vanderlick and Mohwald 1990).

Quando uma monocamada é comprimida na região de coexistência os domínios formados não estão em equilíbrios e então, a forma muda durante a compressão. Se um domínio inicia com uma forma circular e alcança a área crítica em que não é estável, este sofrerá outra transição de forma podendo resultar em forma ramificada.

Através de simulações da forma dos domínios sólidos do DPPC, Krüger e Lösche (Krüger and Lösche 2000) observaram que a redução da tensão de linha normalizada pela repulsão eletrostática entre os momentos de dipolos nas moléculas é necessária, porém não é uma condição suficiente para determinar a forma de domínios alongados. Assim, estes autores introduziram um terceiro termo no balanço energético para a formação dos domínios baseado no conceito da curvatura espontânea, que contribui para a energia livre do sistema sendo responsável pela estrutura interna dos domínios. Desta maneira, a energia livre que determina a forma de um domínio de lipídio quiral na monocamada é dada por:

$$E = \lambda p + E_{el} + E_{quiral} \quad (2.24)$$

Para formular a quiralidade molecular para a energia livre total, Krüger and Lösche (Krüger and Lösche 2000) utilizaram a teoria do potencial de par efetivo (EPP), ou seja, sua assimetria e o fato que existe pelo menos um mínimo. Levando-se em conta que uma das coordenadas é escolhida arbitrariamente, um ângulo que corresponde ao mínimo de energia é determinado. Colocando a molécula dentro de uma célula pseudo-unitária introduz-se duas distâncias intermoleculares, Δ_1 e Δ_2 . Uma célula pseudo-unitária contendo a molécula vizinha está necessária desalinhada com relação a primeira, e uma tentativa de alinhamento induz ao aumento na energia. Assim, somente quando o EPP é simétrico uma célula unitária pode se alinhar com uma ou mais molécula e conduzir a formação de uma estrutura de cristal. O ângulo de desalinhamento na conexão com Δ_1 e Δ_2 produz duas curvaturas espontâneas $k_{1,0}$ e $k_{2,0}$.

A forma dos domínios depende dos componentes da monocamada e das condições experimentais (pH, condições iônicas, temperatura, etc) sendo governada por interações intermoleculares entre as moléculas lipídicas.

2.4.7 Técnicas de microscopia para estudar monocamadas

Mudanças morfológicas de domínios condensados na região de coexistência em monocamadas podem ser investigadas por técnicas microscópicas, como microscopia de fluorescência (FM), microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e microscopia de força atômica (AFM). FM e BAM são considerados métodos principais, porém possuem resolução limitada. Para melhor resolução é necessário a transferência da monocamada para um substrato sólido para visualização por AFM. A seguir serão apresentados os princípios básicos e simplificados

das técnicas de FM e BAM, que são sensíveis a diferentes propriedades da monocamada apresentando suas vantagens e limitações. Uma vantagem para ambas as técnicas é que são relativamente fáceis de utilizá-las, as fases são bem distintas e permitem facilmente acompanhar as mudanças morfológicas dos domínios durante toda a compressão.

2.4.7.1 Microscopia de Fluorescência

Microscopia de fluorescência pode ser compreendida observando o espectro de excitação e emissão de uma molécula. O átomo é excitado quando absorve energia $h\nu$ (fóton), sendo h a constante de Planck e ν frequência da radiação; o elétron, após absorver esta energia, transita do seu estado fundamental (energia E_0) para um nível energético superior (energia E_n); ao retornar ao seu estado inicial, parte desta energia é perdida, e o elétron emite um fóton com energia $h\nu = E_n - E_0$ Fig. (2.13).

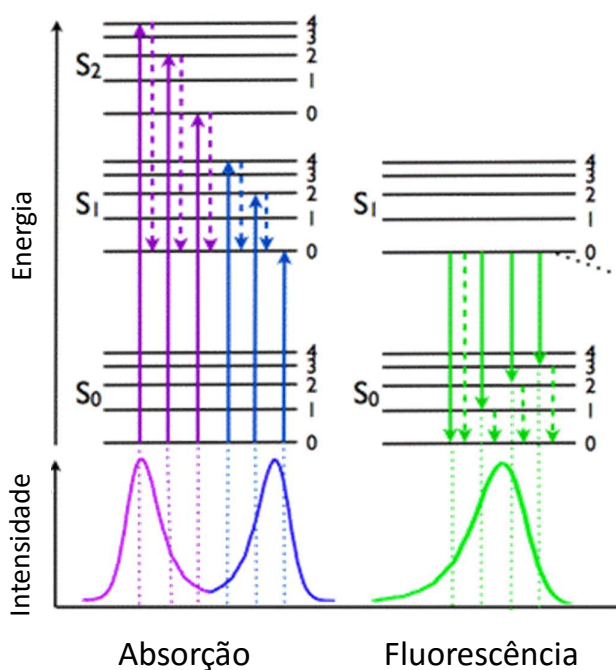


Figura 2.13: Diagrama de Jablonski representado os níveis de energias e os espectros. As setas sólidas indicam transições radioativa como ocorrem por absorção (violeta, azul) ou emissão (verde) de um fóton. Setas pontilhadas representam transições não radiativas (violeta, azul e verde). Abaixo do diagrama são mostrados os espectros de adsorção e fluorescência. Imagem adaptada de <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>.

Desta forma, o papel do microscópio de fluorescência consiste em permitir que a luz de excitação irradie a amostra e depois separe a luz emitida mais fraca para formar a imagem. Assim, primeiro, a luz, originária da fonte de luz colocada num extremo do microscópio, encontra-se frente a um filtro de excitação que apenas vai deixar passar a radiação com o comprimento de onda de excitação dos fluoróforos presentes na amostra. A radiação depois passa pelo espelho dicromático, que faz com que rode 45° colidindo então com os átomos da amostra, o que leva a que os elétrons sejam excitados para um nível energético superior (Fig. 2.14). Quando estes átomos perdem a energia de excitação, retomam o nível energético de repouso e emitem luz (fótons).

Para se tornar visível, a luz emitida torna a passar pelo espelho dicromático sendo depois separada da luz de excitação (absorção) mais brilhante num filtro de barreira. As áreas fluorescentes são então exibidas e podem ser observadas visualmente ou detectadas pela câmara CCD.

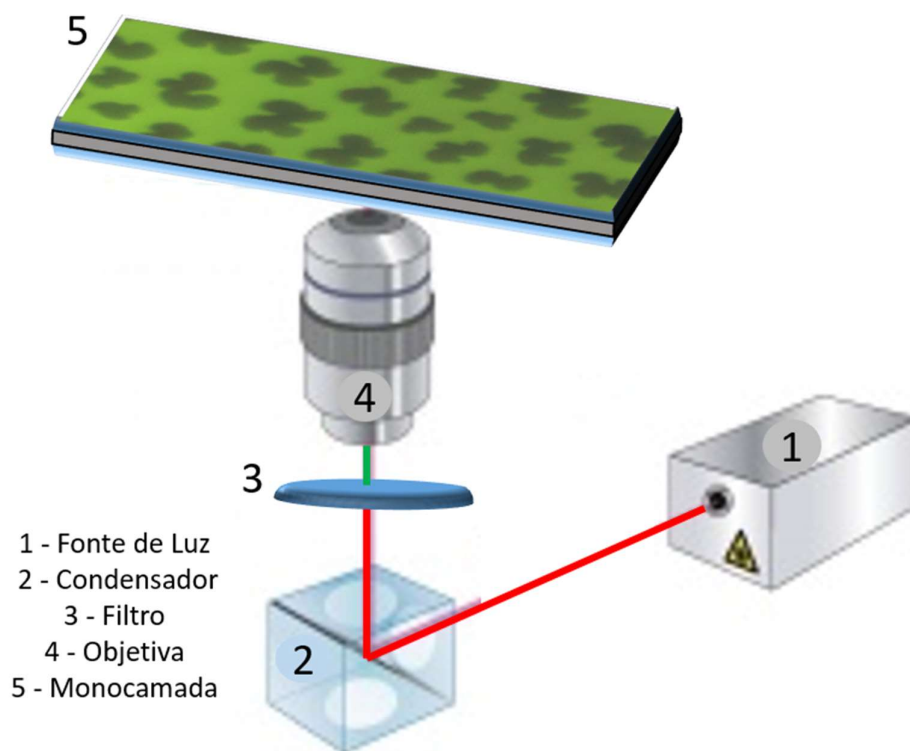


Figura 2.14: Ilustração da visualização de domínios na monocamada de DPPC através de um microscópio invertido. Imagem adaptada de <https://www.ibis-sevilla.es/>.

Como lipídios não são moléculas fluorescentes, grupos fluorescentes como, NBD, Texas Red, Bodipy, Rodamina-PE, são adicionados nas cadeias acíclicas ou nas cabeças polares. O grupo fluorescente é grande e muda as propriedades das fases das moléculas lipídicas (11-14), assim, somente uma pequena quantidade, 0,5-1,0%, de lipídios marcados é adicionada à mistura lipídica. Os marcadores fluorescentes particionam somente na fase fluida, permitindo a visualização das diferentes fases. Uma desvantagem do uso de marcadores fluorescente em filmes lipídicos é que muitas vezes estes comportam-se como impurezas podendo alterar o comportamento das fases e a morfologia da monocamada.

2.4.7.2 Microscopia de ângulo de Brewster

Microscopia de ângulo de Brewster (BAM) é baseada nas propriedades de refletividade da luz nas interfaces o que permite obter imagens de filme finos como filmes monomoleculares, por exemplo, monocamadas de moléculas anfifílicas na interface água-ar (monocamadas de Langmuir).

Considerando uma interface entre dois meios transparentes e não absorventes um feixe de luz incidente de intensidade I_0 é parcialmente refletida e parcialmente transmitida na interface. A intensidade refletida, I_R , é uma função do ângulo de incidência, θ_i , da polarização da luz e dos detalhes da interface. A refletividade é a razão da intensidade refletida pela incidente: $R = I_R/I_0$ (Lheveder et al. 2000).

Para uma interface de Fresnel (Fig. 2.15), isto é, uma interface plana entre dois meios isotrópicos, em que o índice de refração muda abruptamente quando $z = 0$ de n_1 , índice de refração do meio incidente, para n_2 , índice de refração do segundo meio, a refletividade é dada pelas fórmulas de Fresnel: eq. 2.25A, para uma polarização p do feixe incidente (campo elétrico no plano de incidência) e eq. 2.25B, para a polarização s do feixe de incidência (campo elétrico perpendicular ao plano de incidência) (Lheveder et al. 2000).

$$R_p^F = \left(\frac{\tan(\theta_i - \theta_r)}{\tan(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad (2.25A)$$

$$R_s^F = \left(\frac{\sin(\theta_i - \theta_r)}{\sin(\theta_i + \theta_r)} \right)^2 \quad (2.25B)$$

Onde θ_r é o ângulo de refração e: $n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r$.

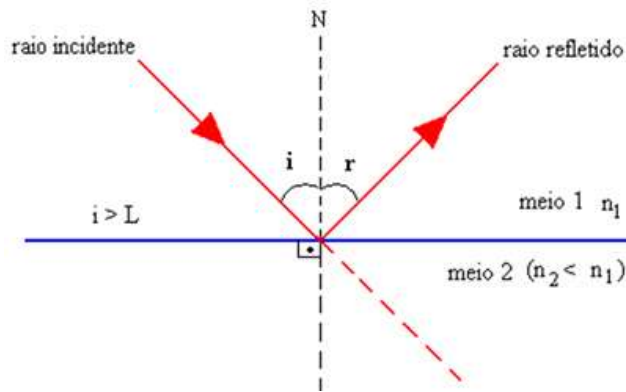


Figura 2.15: Feixe de luz incidente, refletido e transmitido na interface entre dois meios com diferentes índices de refração. Imagem retirada de <http://brasilecola.uol.com.br/fisica/calculo-angulo-limite.htm>.

A Fig. 2.16 mostra as refletividades R_s^F e R_p^F em função do ângulo de incidência θ_i , para $n_1 = 1$ (índice de refração do ar) e $n_2 = 1,33$ (índice de refração da água). R_s^F aumenta de $[(n_2 - n_1)/(n_2 + n_1)]^2$ para 1 com o ângulo de incidência, e R_p^F primeiro decai a zero, e então, aumento para 1. R_p^F desaparece no ângulo de incidência θ_B chamado de ângulo de Brewster. A eq. 2.26A mostra que isso acontece quando $\tan(\theta_i + \theta_r)$ torna-se infinito, ou seja, quando $\theta_i + \theta_r = \pi/2$, ou quando os feixes refletido ou refratado são perpendiculares entre si. Neste ângulo, o momento dipolar induzido pelo campo magnético do feixe incidente no segundo meio apontar em direção da reflexão e conseqüentemente, não radia nesta direção. Considerando as equações, $n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r$ e $\theta_i + \theta_r = \pi/2$ no ângulo de Brewster, permite escrever que $\tan \theta_B = n_2/n_1$.

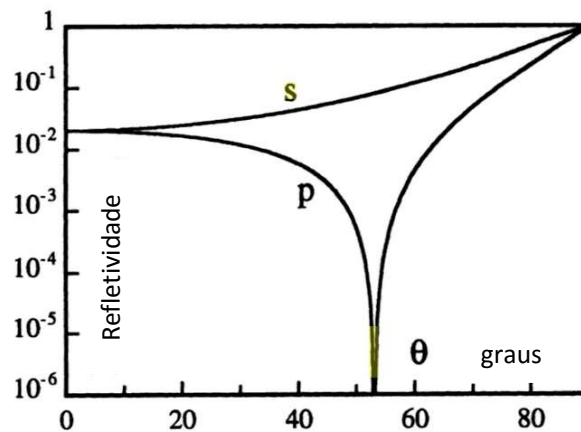


Figura 2.16: Refletividades R_s^F e R_p^F em função do ângulo de incidência θ_i para uma interface de Fresnel entre dois meios de índices de refração $n_1 = 1$ e $n_2 = 1,33$. Imagem retirada de (Lheveder et al. 2000).

Para uma interface real, R_p decai para um valor mínimo no ângulo de Brewster, mas não desaparece. A origem desta discrepância é a estrutura da região interfacial, que pode ser densa (o índice de refração varia suavemente de n_1 para n_2 com uma distância l), irregular (o índice de refração na interface depende das coordenadas x e y), ou opticamente anisotrópica (as moléculas na interface têm uma orientação preferencial). Quando a região interfacial é muito mais fina do que o comprimento de onda da luz, $l \ll \lambda$, e não há anisotropia óptica ou é opticamente uniaxial com um eixo simétrico normal à interface, as propriedades ópticas das interfaces reais por ser caracterizadas pela elipticidade $\bar{\rho}$. Para $\bar{\rho} \ll 1$ e na vizinhança do ângulo de Brewster a refletividade difere da refletividade de Fresnel por (Lheveder et al. 2000):

$$R_p = R_p^F + R_s^F \bar{\rho}^2 \quad (2.26)$$

Onde $\bar{\rho}$ pode ser medida por uma elipsômetro e seu valor medido no ângulo de Brewster ($53,1^\circ$) na interface água-ar é -40×10^{-5} . Isto significa que a refletividade-p na interface água-ar no ângulo de Brewster é muito pequena, $R_p \sim 10^{-8}$, mas não desaparece (Lheveder et al. 2000).

Drude (Drude 1963) foi o primeiro a dar uma explicação para a discrepância entre a fórmula de Fresnel e as medidas nas interfaces reais calculando a elipticidade para uma interface fina em que o índice de refração $n(z)$ varia ao longo da normal z da interface na distância $l \ll \lambda$:

$$\bar{\rho} = \frac{\pi}{\lambda} \frac{\sqrt{n_1^2 + n_2^2}}{n_1^2 - n_2^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{[n_1^2 - n(z)^2][n_2^2 - n(z)^2]}{n(z)^2} dz \quad (2.27)$$

Considerando um modelo em que o filme interfacial é um meio homogêneo de espessura l e índice de refração n , a eq. 2.27 reduz-se a:

$$\bar{\rho} = \frac{\pi}{\lambda} \frac{\sqrt{n_1^2 + n_2^2}}{n_1^2 - n_2^2} \frac{[n_1^2 - n^2][n_2^2 - n^2]}{n^2} \quad (2.28)$$

Desta maneira, quando o ângulo incidente da luz na interface corresponde ao ângulo de Brewster a refletividade $R_p^F \ll 1$ e é desprezível. Para uma superfície com água pura o ângulo de Brewster é aproximadamente, $53,1^\circ$ de acordo com a equação de Fresnel e considerando os índices de refração do ar e da água de 1 e 1,33, respectivamente. Incidindo um feixe de luz polarizada na interface água-ar não ocorrerá reflexão. Assim, a formação de uma monocamada na interface com índice de refração diferente da água modifica as condições do ângulo de Brewster na interface e a refletividade e, conseqüentemente, a espessura da monocamada podem ser estimadas (Fig. 217). Considerando as eq. 2.25A, 2.25B, 2.26 e 2.28 a espessura do filme é dada por (Lheveder et al. 2000):

$$l = \frac{\sqrt{R_p}}{\sin(2\theta_B - 90)} \frac{\lambda}{\pi} \frac{n_1^2 - n_2^2}{\sqrt{n_1^2 + n_2^2}} \frac{n^2}{[n_1^2 - n^2][n_2^2 - n^2]} \quad (2.39)$$

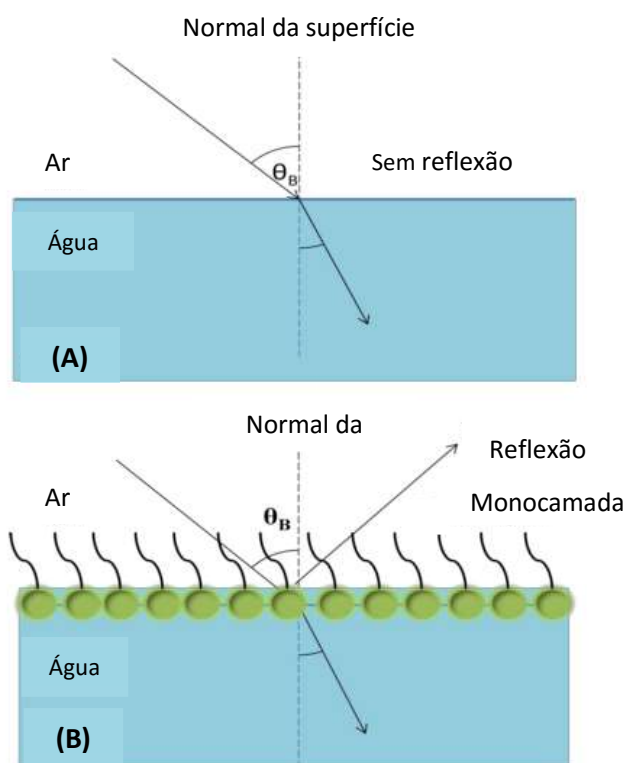


Figura 2.17: Ilustração do princípio da microscopia de ângulo de Brewster. Incidência da luz polarizada no ângulo de Brewster na superfície da água (A) e após a adição da monocamada lipídica (B). Imagem adaptada de (Telesford 2012).

2.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica utilizada para o estudo de transições termicamente induzidas e, particularmente, transições conformacionais de macromoléculas biológicas (Epanand 2007).

O princípio do DSC é simples. Duas células são isoladas adiabaticamente. Uma célula contém a amostra enquanto a outra contém a solução de referência (Fig. 2.18). Durante a varredura a temperatura é regulada em uma taxa de varredura constante até que a diferença de temperatura entre as duas células seja zero (Jordo 2007). Quando um processo, iniciado termicamente, ocorre na célula da amostra, o sistema de controle responde aumentando ou reduzindo o fornecimento de calor para a célula de amostra de modo que sua temperatura seja igual à da célula de referência. Os dados de saída do calorímetro é o correspondente excesso de potência fornecida, apresentado como uma função da temperatura.

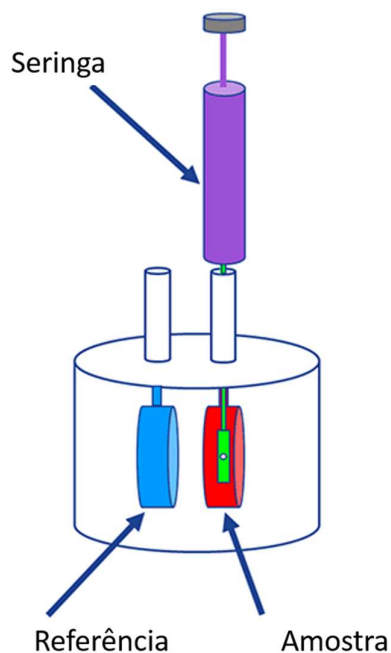


Figura 2.18: Desenho esquemático da célula do calorímetro diferencial de varredura (DSC). Imagem adaptada de <http://www.malvern.com>.

O equipamento utilizado registra o excesso de potência (ΔP), o tempo (t) e a temperatura (T). A diferença das potências não é igual a zero ($\Delta P = P_{amostra} - P_{referência} \neq 0$). Em seguida o excesso de calor (ΔQ) necessário para mudar a temperatura e a diferença da

capacidade térmica, ΔC_p , (a pressão constante) entre a amostra e a referência são calculados. A diferença de calor, ΔQ é proporcional à diferença da potência ΔP . Assim:

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P dt \cong \Delta P \Delta T \quad (2.30)$$

ΔQ é, por sua vez, proporcional ao excesso de capacidade térmica, ΔC_p pela seguinte relação termodinâmica:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta Q}{\delta T} \right)_p \approx \frac{\Delta Q}{\Delta T} \approx \frac{\Delta P \Delta t}{\Delta T} \approx \frac{\Delta P}{\Delta T / \Delta t} \quad (2.31)$$

onde $\Delta T / \Delta t$ é a taxa de varredura.

Se o evento térmico que ocorre é endotérmico, então, mais calor é necessário e há uma inflexão para cima da curva de DSC. Se o processo é exotérmico a inflexão é para baixo (McElhaney 1982).

A mudança de entalpia, ΔH , pode ser obtida pela integração da curva de C_p , desde que:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta H}{\delta T} \right)_p \quad (2.32)$$

seja um processo reversível.

A mudança da entalpia pode ser usada para calcular o módulo de flexão da membrana na transição de fase principal.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os lipídios utilizados nos diferentes experimentos foram: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DMPS), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS), Colesterol (Chol) e esfingomielina de cérebro bovino (BSM) e lipídios com sondas fluorescentes 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) e 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhod-PE) foram adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, al). O lipídio com marcador fluorescente, ceramida Bodipy-TR e o marcador carboxifluoresceína (CF) foram adquiridos da Sigma. O marcador fluorescente Isotiocianato fluoresceína (FITC) usado para marcar o peptídeo, foi adquirido da Molecular Probes (Life Technologies). As especificações dos lipídios e as estruturas químicas são mostradas na tabela 3.1 e na Fig. 3.1, respectivamente.

Peptídeo Polybia-MP1, extraído de vespa brasileira *Polybia paulista* foi sintetizado pela Biosynthesis (Lewisville, TX, USA) com grau de pureza RP-HPLC >98%.

Clorofórmio e metanol com grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Cloreto de sódio, hidróxido de sódio e sacarose foram obtidos de Sigma Aldrich. Brometo de sódio da Anedra e HCl da Merck. Todos os demais reagentes possuíam grau analítico. Água ultrapura (Millipore Milli-Q-system, ~18 MΩ cm) foi utilizada em todos os experimentos.

Tabela 3.1: Especificações dos fosfolípidios utilizados.

Fosfolípido	Tamanho da cadeia	Temperatura de Transição	Peso molecular
POPC	16:0 / 18:1	-2 °C	760,1 g/mol
DOPC	18:1 / 18:1	-17 °C	786,1 g/mol
DPPC	16:0 / 16:0	41 °C	734,0 g/mol
DMPC	14:0 / 14:0	24 °C	677,9 g/mol
POPE	16:0 / 18:1	25 °C	718,0 g/mol
DPPE	16:0 / 16:0	63 °C	692,0 g/mol
DMPE	14:0 / 14:0	50 °C	635,9 g/mol
POPS	16:0 / 18:1	14 °C	784,0 g/mol
DPPS	16:0 / 16:0	54 °C	758,0 g/mol
DMPS	14:0 / 14:0	35 °C	701,8 g/mol

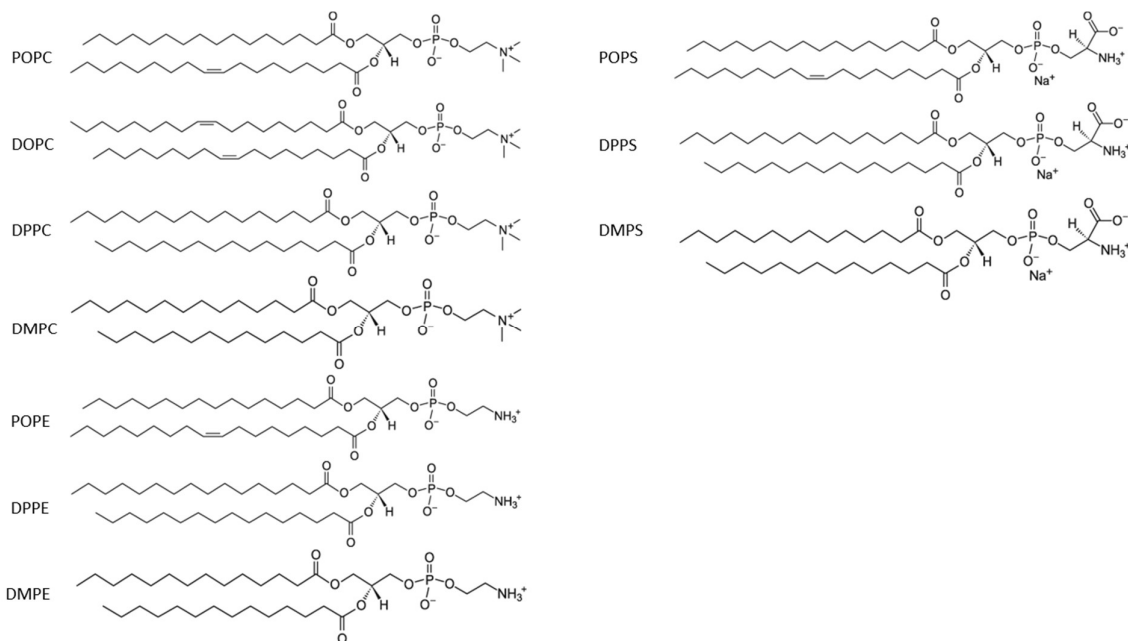


Figura 3.1: Estruturas dos fosfolípidios retirada de <http://avantilipids.com>.

3.2 Métodos

3.2.1 Soluções de peptídeo

Para experimentos de compressão de monocamadas, peptídeo foi dissolvido em metanol (Dennison et al. 2009), e para experimentos de penetração, GUVs e calorimetria peptídeo foi dissolvido na mesma solução em que foi utilizada em cada experimento. A concentração de todas as soluções foi determinada pelo espectro de absorção UV a 280 nm usando coeficiente de absorvidade molar $5570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hinz and Galla 2005). O espectro foi coletado com um espectrofotômetro Varian 2300 (Palo Alto, CA, USA).

3.2.2 Experimentos com monocamadas

3.2.2.1 Isotermas de compressão

Isotermas de compressão de monocamadas de peptídeo, lipídio ou misturas lipídio/peptídeo foram realizadas em cubas de Teflon (volume de 180 mL e área de superfície de 243 cm^2) contendo água ou solução salina. A pressão de superfície (π) foi determinada utilizando uma placa de platina (Pt) pelo método de Wilhelmy, e a área total do filme foi continuamente registrada usando um aparelho KSV minitrough (KSV, Helsinki, Finlândia) em uma caixa de acrílico fechada. Monocamadas de peptídeo puro foram preparadas espalhando uma solução de peptídeo em metanol na superfície de uma subfase contendo água pura ou solução salina usando uma microseringa Hamilton (Reno, NV, USA). Isotermas de compressão de monocamadas de peptídeo foram realizadas com taxa de compressão de $0,2 - 0,5 \text{ \AA}^2 \text{ molécula}^{-1} \text{ s}^{-1}$, isto é, 7-20 mm/min. Potencial de superfície em função da área ($\Delta V - A$) e isotermas ($\pi - A$) foram registradas simultaneamente; o potencial de superfície foi determinada usando o método Kelvin com um aparelho KSV (KSV, Helsinki, Finlândia).

Para monocamadas de lipídio ou mistura peptídeo/lipídio, fosfolípidios foram dissolvidos em clorofórmio/metanol (2:1 (v:v)) para uma concentração de 2,5 mM. Pequenas gotas das soluções de lipídio ou da mistura (peptídeo/lipídio) na proporção desejada foram diretamente espalhadas na superfície. Antes da compressão esperou-se 10 min para que o solvente orgânico evaporasse; e as monocamadas foram comprimidas a 7 mm/min.

Todos as medidas foram realizadas a 20 °C. As áreas moleculares médias foram altamente reprodutíveis com desvio padrão menor do que 3% obtido para no mínimo 3 isotermas de compressão para cada condição.

3.2.2.1.1 Análise das isotermas

O comportamento da mistura de lipídios e peptídeos foi analisado comparando a área molecular média da mistura com a área de uma mistura ideal calculada como (Ali et al. 1994):

$$A_{12} = A_1X_1 + A_2X_2 \quad (3.1)$$

onde X_1 e X_2 são as frações molares do componente 1 (lipídio) e componente 2 (peptídeo), respectivamente, e A_1 e A_2 são as áreas moleculares média dos componentes 1 e 2 em uma determinada pressão de superfície. Para comportamento ideal, a variação entre a área molecular média com a fração molar de cada componente resulta em uma relação linear.

O comportamento elástico do filme foi investigado através do módulo de compressibilidade, C_s^{-1} (Ali et al. 1991).

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (3.2)$$

3.2.2.1.2 Estado de ionização do DMPS e DPPS em função do pH da subfase.

As monocamadas formadas por moléculas carregadas conduzem a formação de uma dupla camada de íons, que por sua vez, atrai prótons para a superfície induzindo a diminuição do pH da superfície (pH_{sf}) (Gaines 1966):

$$pH_{sf} = pH_{sb} + F\psi_0/(2,3RT) \quad (3.3)$$

Onde F é a constante de Faraday e RT é a energia térmica. ψ_0 é uma função da força iônica e da densidade superficial de carga (Mercado et al. 2011) que por sua vez depende do pH_{sf} . Por outro lado, como o pH_{sf} depende de ψ_0 (Tocanne and Teissié 1990) e uma regulação mútua é estabelecida.

$$[H^+]_{sf} = [H^+]_{sb} \exp(-e\psi_0/kT) \quad (3.4)$$

Onde $[H^+]_{sf}$ e $[H^+]_{sb}$ são as concentrações de prótons na superfície e na subfase, respectivamente, e é a carga do elétron, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Considerando a equação de Poisson-Boltzmann para a densidade superficial de carga a relação entre o grau de dissociação (α), ψ_0 e pH_{sb} pode ser obtida:

$$\sqrt{2RT\varepsilon\varepsilon_0}[\sum_i C_i^{sb} \exp(-Fz\psi_0/RT) - \sum_i C_i^{sb}]^{1/2} + \frac{F}{A} \left[\frac{K_a}{K_a + [H^+]_{sb} \exp(-F\psi_0\alpha/RT)} \right] = 0 \quad (3.5)$$

Onde ε é a permissividade do meio (80), ε_0 é a permissividade do vácuo, C_i^{sb} é a concentração de íons na subfase, K_a é a constante de dissociação ácida, A é a área molecular média do fosfolipídio e z é a carga do íon. Desta maneira, ψ_0 e α podem ser calculados numericamente a partir da eq. 3.5

3.2.2.1.3 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM)

Monocamadas de Langmuir foram preparadas, como descrito acima, em uma cuba com uma balança montada com um elipsômetro de imagem automatizado Nanofilm EP3 (Accurion Goettingen, Alemanha), operando no modo microscopia de ângulo de Brewster (BAM). Reflexão mínima foi fixada com um laser polarizado ($\lambda = 532$ nm) incidente na superfície ar-água no ângulo de Brewster ($53,1^\circ$) calibrado experimentalmente. Após a formação da monocamada e durante a compressão, a luz refletida foi coletada através de uma objetiva 20x. A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ (NIH free ImageJ). Para melhor visualização das imagens, a faixa do nível de cinza foi reduzida da faixa original de 0-255 para 0-80 para imagens de lipídio e lipídio/peptídeo e para 0-40 para imagens de peptídeo. O cálculo da porcentagem de área de cada fase foi realizado como detalhado por Caruso et al. (Caruso et al. 2013).

3.2.2.1.4 Microscopia de fluorescência (FM)

Experimentos de compressão de monocamadas formadas de lipídios ou lipídios/peptídeos também foram acompanhados por microscopia de fluorescência, usando a cuba de Langmuir (KSV-NIMA, mini trough) com janela óptica montada no microscópio

Olympus IX-71. Pequena fração (~0.5 a 1 mol%) de lipídio com sonda fluorescente, que particiona na fase lipídica fluida, foi adicionada a solução a ser espalhada na interface. Como a sonda fluorescente exclui-se da fase condensada, os domínios LC são negros podendo ser observados na transição de fase.

3.2.2.1.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Monocamadas transferidas foram preparadas como detalhado em Mangiarotti et al. (Mangiarotti and Wilke 2015). Brevemente, o substrato hidrofílico (lâminas de vidro) foi tratada com solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1 v/v) a 90 °C por 60 min e enxaguado com água Milli-Q. Em seguida, a solução de lipídio/peptídeo foi espalhada na interface e comprimida até 15 mN/m. A monocamada foi mantida nesta pressão por ~200s para checar a ausência de vazamento ou rearranjos, e então, assim, a área permanecendo constante, o filme foi transferido pela técnica de Langmuir-Blodgett para um substrato previamente submerso (orientado perpendicular à cuba) na taxa de 5 mm/min, mantendo a pressão de superfície constante. A monocamada transferida permaneceu no ar durante a varredura com um microscópio de força atômica AFM Innova (Bruker, Billerica, Massachusetts), usando uma sonda de silicone com fonte nominal constante de 40 N/m e uma frequência de ressonância de 300 kHz em temperatura ambiente (~20 °C).

3.2.2.2 Experimentos a área constante

3.2.2.2.1 Atividade de superfície do peptídeo

A atividade de superfície do peptídeo foi realizada em um poço circular de Teflon com diâmetro de 5 cm e espessura de 0,5 cm. A pressão de superfície foi registrada usando uma microbalança equipada com placa de Wilhelmy. O sensor de pressão foi calibrado usando a pressão de superfície da água ultrapura (~72 mN/m) e do ar (0 mN/m) como ponto de referência. A subfase foi agitada durante o experimento usando um pequeno agitador magnético para acelerar a difusão do soluto adicionado. Volumes crescentes de uma solução de peptídeo concentrada foram injetados na subfase água pura ou 150 mM NaCl e a variação da pressão de superfície foi registrada em função do tempo até que a máxima pressão atingida permanecesse estável.

3.2.2.2 Adsorção do peptídeo em monocamadas lipídicas

A mesma cuba descrita acima foi utilizada neste estudo. Experimentos de adsorção de peptídeo a monocamadas lipídicas foram realizadas de duas maneiras diferentes.

(1) Isotermas de adsorção do peptídeo a monocamadas lipídicas foram determinadas injetando quantidades diferentes de uma solução de peptídeo na subfase sob a monocamada lipídica espalhada na interface água-ar (ou 150 mM NaCl-ar) com uma pressão de superfície inicial de 10 mN/m. As curvas de adsorção foram ajustadas utilizando a isoterma de adsorção de Gibbs-Langmuir:

$$\Delta\pi = \Gamma_{max}RT\ln(1 + K_d^{-1}c) \quad (3.6)$$

Onde Γ_{max} é a concentração em excesso de peptídeo na superfície, K_d a constante de dissociação, R a constante dos gases e T a temperatura na qual o experimento foi realizado.

(2) Solução de lipídio foi espalhada na interface água-ar (ou 150 mM NaCl-ar), até alcançar um valor desejável de pressão superficial inicial (π_i). Após tempo de evaporação de solvente, peptídeo, à concentração de 1,25 μ M (mínima concentração em que o peptídeo adquire máxima atividade de superfície (Dennison et al. 2014)), é injetado na subfase, por meio de seringa Hamilton e a variação na pressão de superfície é monitorada em função do tempo até atingir equilíbrio. Variações totais de pressão de superfície ($\Delta\pi$) foram obtidas no equilíbrio para cada valor de π_i . Por meio de gráficos $\Delta\pi$ vs π_i obtemos o valor de pressão de superfície na saturação (PMI), ou seja, o valor máximo de π_i acima do qual o peptídeo não é mais adsorvido na monocamada, e quantificar a penetração do peptídeo na mesma.

3.2.3 Experimentos com GUVs

3.2.3.1 Preparação de GUVs

Vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foram preparadas pela técnica de eletroformação como descrito por Angelova e Dimitrov (Angelova and Dimitrov 1986). Resumidamente, 20 μ l de uma solução lipídica de uma determinada composição, com ou sem

marcador fluorescente, em clorofórmio/metanol (2:1) a 2 mg/ml foi espalhada na superfície de duas placas condutoras (revestida com óxido de estanho, índio ITO) e foram deixadas no vácuo por algumas horas para remover o excesso de solvente orgânico. As placas revestidas de fosfolípido foram separadas por um separador de teflon com 2 mm de espessura para formar uma câmara que foi preenchida com uma solução de sacarose. As placas condutoras, foram então, conectadas com um gerador de função (Minipa, MFG-4202), e uma tensão de amplitude ~ 1 V e frequência de 10 Hz foi aplicada por 3-4 h. Para experimentos de vazamento com GUVs as vesículas foram diluídas em solução iso-molar de tampão (20 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7,4) contendo 5 μ M de marcador fluorescente (carboxifluoresceína) ou em solução de glicose com a mesma osmolaridade da solução de sacarose. Em seguida, a solução de peptídeo foi injetada e a atividade lítica, isto é, o aumento da fluorescência ou diminuição do contraste de fase no interior dos lipossomos, foi registrada ao longo do tempo.

3.2.3.2 Visualização de GUVs

GUVs de DOPC, DOPC:POPS (3:1), DOPC:BSM:Chol (3:3:1) e DOPC:POPS:BSM:chol (2,1:0,9:3:1) com a membrana contendo ceramida Bodipy-TR e com 310 mM de sacarose no seu interior, foi diretamente observada por um microscópio confocal de fluorescência. Brevemente, as GUVs foram diluídas em 400 μ L de tampão (20 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7,4) com 5 μ M de carboxifluoresceína (CF). Para observação da GUVs foram utilizadas câmaras Lab-Tek contendo 8 “poços”. GUVs formadas por POPC/POPS (3:1) foram observadas por um microscópio óptico invertido. Antes da observação, a solução de vesícula foi diluída, ~ 7 vezes, em uma solução de glicose cuja osmolaridade é idêntica à da sacarose para criar uma assimetria de densidade e índice de refração entre o meio interno e externo da vesícula para serem visualizadas por microscopia de contraste de fase. Uma vez que as GUVs foram localizadas, imagens em um tempo definido entre cada uma foi registrada antes e após a adição do peptídeo. Adicionalmente, MP1 foi marcado com isotiocianato-FITC afim de visualizar sua interação com a membrana de DOPC, DOPC/DOPS (3:1), DOPC/SM/Chol (3:3:1) e DOPC/POPS/SM/Chol (2,1:0,9:3:1) por microscopia confocal. A mudança no sinal de fluorescência no interior das vesículas foi monitorada e quantificada com o software ImageJ.

3.2.3.3 Marcação do peptídeo

Brevemente, 175 nmol de peptídeo foi dissolvido em 580 μ L de 0,1 M de tampão bicarbonato de sódio, pH 9,0. Em seguida, 257 nmol de marcador fluorescente isotiocianato fluoresceína (FITC) foi dissolvido em 20 μ L DMSO e foi adicionado na solução de peptídeo. A reação de acoplamento foi realizada por 3h em temperatura ambiente. Após a reação, o peptídeo marcado foi separado do peptídeo não-marcado e do marcador não ligado por HPLC de fase reversa (coluna C18 HPLC).

3.2.3.4 Determinação da concentração do peptídeo marcado

A concentração de peptídeo marcado foi determinada medindo a absorbância em 280 nm (devido a presença de um resíduo de triptofano) e a absorbância do FITC em 280 nm e 490 nm. A absorbância do peptídeo marcado foi corrigida usando a relação: $A_{\text{peptídeo}} = A_{280} - A_{\text{max}}$ (FITC), onde $\text{FITC} = A_{280 \text{ marcador livre}} / A_{\text{max marcador livre}}$. Em seguida, a concentração do peptídeo foi calculada usando a lei de Beer-Lambert.

3.2.4 Experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

3.2.4.1 Preparação de vesículas multilamelares (MLVs)

Filmes de fosfolipídios na composição e concentração desejadas foram obtidos dissolvendo os mistura clorofórmio/metanol (2:1/v:v) em tubos de vidro de fundo arredondado seguido de evaporação do solvente sob fluxo de N_2 . Excesso de solvente orgânico foi retirado sob vácuo por no mínimo 3 horas. Vesículas multilamelares (MLVs) foram obtidas por hidratação do filme lipídico pela adição de tampão (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4), com ou sem peptídeo, a ~ 10 °C acima da temperatura de transição de fases gel – líquido cristalina, seguido de vórtex nesta temperatura. A Fig. 3.2 ilustra a preparação das vesículas.

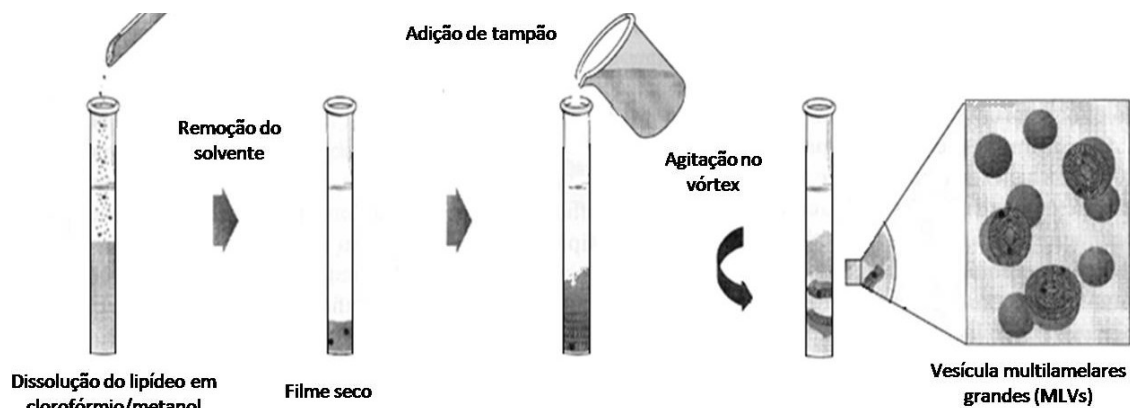


Figura 3.2: Esquema de preparação de lipossomos. Adaptado de www.avantilipids.com

3.2.4.2 Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

A suspensão de MLV, obtida como descrito acima, foi submetida à extrusão, através de membrana dupla de policarbonato de 0,2 μm (Nuclepore Track-tech Membrane, Whatman Nuclepore, PCMB 19 mm 0,2 μm) em um total de 11 extrusões utilizando um extrusor Avanti Mini-Extruder (Fig. 3.3). O tamanho médio das vesículas foi determinado por espalhamento de luz (DLS) usando Nanozetasizer NS-90 (Malvern Instruments).



Figura 3.3: Imagem de um extrusor. Adaptado de www.avantilipids.com

3.2.4.3 Experimentos de DSC

Medidas foram realizadas com MLVs ou LUVs no calorímetro diferencial de varredura (Nano DSC, Model CDC 6300, USA). Neste experimento as células calorimétricas, com volume de 300 μ l foram pressurizadas em aproximadamente 3 atm para evitar bolhas no aquecimento, e perda do solvente por evaporação. As varreduras de aquecimento e resfriamento foram registradas numa mesma taxa de 0,5 $^{\circ}$ C/min com uma espera de 10 min para equilíbrio. A concentração total de lipídios das MLVs nas amostras em estudos foi mantida entre 1-3 mg/ml. Os termogramas, curvas de potência em função da temperatura, foram obtidas com Origin, versão 8.5 e analisadas pelo programa DSCRun.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1 Propriedades Interfaciais do Peptídeo Polybia-MP1

4.1.1 Isotermas de compressão do peptídeo Polybia-MP1

A Fig. 4.1A mostra as isotermas de compressão de filmes do peptídeo Polybia-MP1 na interface água-ar. O peptídeo formou monocamadas estáveis, como demonstrado por ciclos de compressão-expansão (Fig. 4.1A). Quando o filme foi comprimido até valores baixos de pressão de superfície, a isoterma de re-compressão foi similar à de compressão; como um exemplo, os resultados para compressão até 8 mN/m são mostradas na Fig. 4.1A (quadrado aberto). No entanto, quando a compressão foi realizada até a pressão de ~17 mN/m, a segunda compressão deslocou-se para áreas menores, evidenciando perda irreversível de peptídeo para a subfase (ver linhas contínuas na Fig. 4.1A).

A organização das monocamadas de peptídeo puro na escala de microns foi estudada através de imagens da superfície obtidas por BAM durante a compressão. As imagens registradas em água pura mostraram um filme homogêneo em todo intervalo de pressão de superfície (ver imagens inseridas na Fig. 4.1A).

A isoterma de compressão evidencia um platô em, aproximadamente, 17 mN/m. Esse tipo de platô nas isotermas de compressão do peptídeo foi atribuído à formação de uma bicamada (Malcolm 1973; Volinsky et al. 2006) ou ao colapso da monocamada com exclusão do material do filme para a subfase (Maget-Dana et al. 1999; Birdi 2006). Uma vez alcançado o platô, o nível de cinza das imagens de BAM também atingiu o valor máximo, permanecendo constante com a compressão (ver círculos abertos na Fig. 4.1A). Este resultado junto com o deslocamento para áreas menores observados nos ciclos de compressão-expansão indicam que para filmes de MP1, o platô a 17 mN/m corresponde ao colapso do filme (π_{col}).

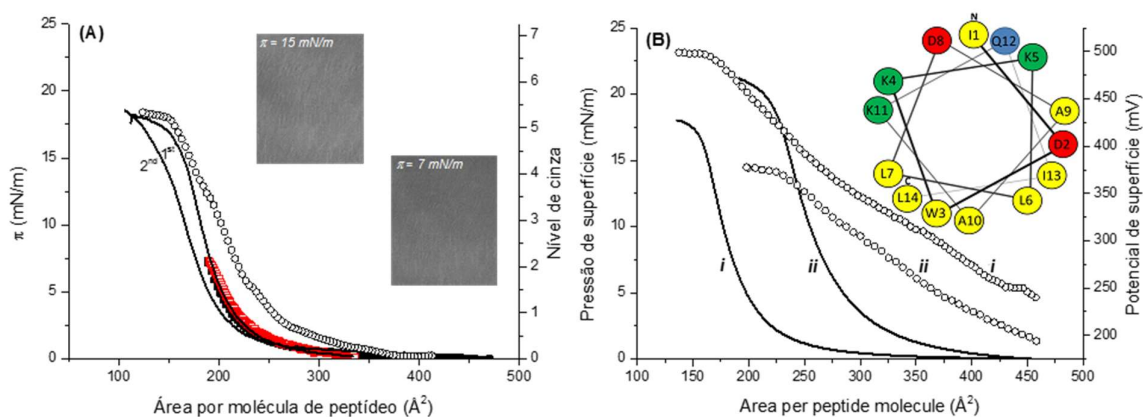


Figura 4.1: (A) Isotermas $\pi \times A$ de monocamada de MP1 em água. Escala da esquerda: O primeiro ciclo de compressão-expansão-recompressão foi realizado até 8 mN/m (quadrado aberto: vermelho representa compressão e preto, expansão) e o segundo, acima da π_{col} (linha contínua). Escala da direita: Evolução do nível de cinza das imagens obtidas com BAM (círculo aberto). As imagens inseridas representam imagens de BAM de filmes de MP1 puro em água nas pressões de superfícies indicadas. Os níveis de cinza foram re-escalados da faixa original de 0-255 para 0-40 para melhor visualização. (B) Isotermas de compressão pressão de superfície vs área molecular média (linha contínua) e potencial de superfície vs área molecular média (círculo aberto) para filmes de MP1 espalhados em água (i) ou em 150 mM NaCl e o pH ajustado com NaOH para 7,4 (ii). A inserção mostra a representação a projeção de Edmondson da sequência do peptídeo configuração de α -hélice (verde representa o resíduo carregado positivamente; vermelho, carregado negativamente; azul, polar não-carregado e amarelo, os hidrofóbicos). Todas as isothermas foram registradas a $T = 20^\circ\text{C}$, com 8,7 nmol de peptídeo espalhado na interface.

O efeito do sal nas isothermas de compressão dos filmes de peptídeo foi analisado espalhando peptídeo em solução aquosa de NaCl 150 mM em pH neutro, ajustado com NaOH. A Fig. 4.1B compara as isothermas de compressão (potencial e pressão vs área molecular) dos filmes de MP1 em água e em 150 mM NaCl (pH 7,4). O peptídeo também formou monocamada estável em solução salina, sendo que nesta condição as imagens de BAM mostraram topografia semelhante à observada em água (ver imagens inseridas na Fig. 4.1A). Na presença de sal, as isothermas deslocaram para áreas maiores e o platô correspondente ao colapso foi observado em ~ 21 mN/m (Fig. 4.1B). Características similares foram relatadas para outros peptídeos como bombolitina (Maget-Dana 1999) e fragmento 8-26 da melitina (Gevod and Birdi 1984). Na região em que o peptídeo assume o máximo empacotamento molecular, o potencial de superfície muda de ~ 500 mV em água pura para ~ 370 mV em 150 mM NaCl.

As isotermas de compressão de monocamadas de peptídeo puro, também foram obtidas em solução ácida e básica contendo 150 mM NaCl (Fig. 4.2). Em pH 2 e 4 (peptídeo estava totalmente e parcialmente protonado, respectivamente) e em pH 10 (peptídeo, parcialmente desprotonado) a área ocupada pelo peptídeo foi maior do que em água. Em pH 2 a pressão de colapso foi menor do que a observada nas outras condições, provavelmente, decorrente de interação repulsiva peptídeo-peptídeo.

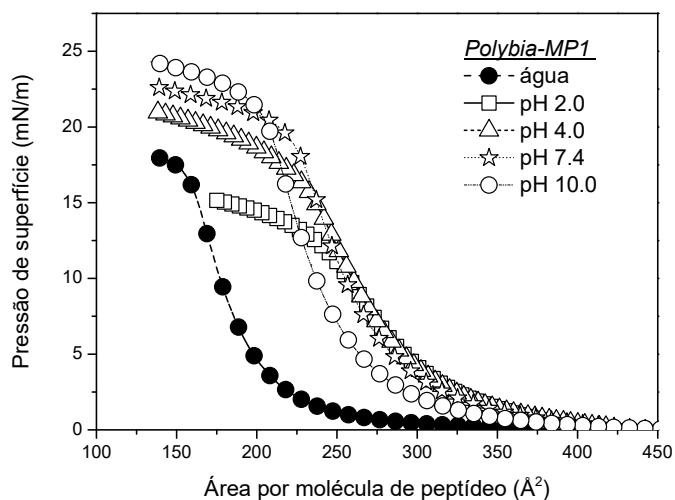


Figura 4.2: Isotermas de compressão do filme de MP1 puro em água (mesma curva mostrada na Fig. 4.1) e em 150 mM NaCl nos pH indicados.

4.1.2 Atividade interfacial do peptídeo Polybia-MP1

A atividade interfacial do MP1 foi investigada injetando quantidades crescentes de peptídeo em água pura (Fig. 4.3A) ou 150 mM NaCl, pH 7,4 (Fig. 4.3B), e medindo a variação da pressão superficial em função do tempo. Em água, foi observado que a adsorção do peptídeo na interface foi lenta quando a concentração de peptídeo na subfase foi de 0,5 μM , e a máxima pressão de superfície foi atingida após 40 min. Aumentando a concentração de peptídeo, sua incorporação na interface foi mais rápida e a máxima variação de pressão observada foi de 21 mN/m. Em 150 mM NaCl, o tempo de incorporação do peptídeo na interface foi reduzido, considerando a mesma concentração de peptídeo, comparado em água. A Fig. 4.3C mostra que, em ambas as subfases, a atividade interfacial depende da concentração de peptídeo, induzindo máxima variação de pressão de superfície de 6 mN/m maior do que em água pura, indicando que a presença de sal influencia a atividade do peptídeo.

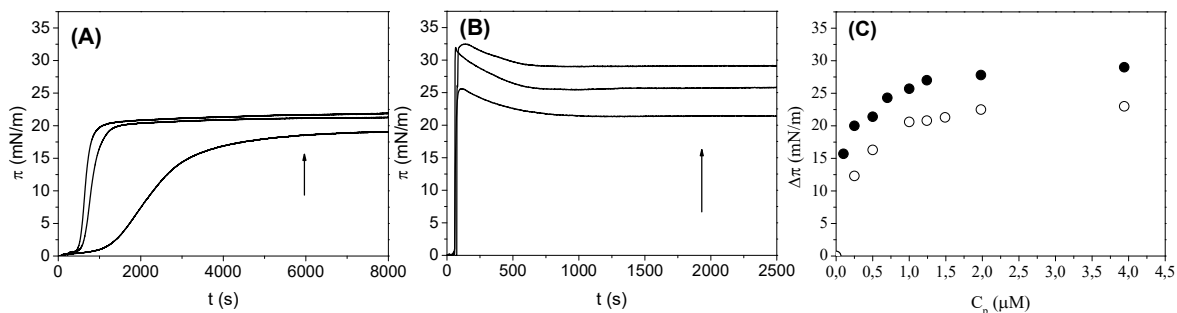


Figura 4.3: Cinética de adsorção do peptídeo MP1 (em diferentes concentrações \uparrow 0,5, 1,0 e 1,25 μ M) na interface água-ar (A) e 150 mM NaCl-ar (B). (C) Máxima variação da pressão de superfície após a adição de diferentes concentrações de peptídeo na subfase em função da concentração de peptídeo. Símbolo aberto representa subfase com água pura e símbolo fechado em 150 mM de NaCl (pH 7,4).

4.2 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em monocamadas formadas por lipídios zwitteriônicos

4.2.1 Monocamadas de DPPC

4.2.1.1 Isotermas da mistura DPPC/MP1 em água pura e em 150 mM NaCl

As isotermas de compressão de DPPC puro e co-espalhado com frações de MP1 entre 2,4 e 7,2 mol% são mostradas na Fig. 4.4A. A área molecular média corresponde a área por lipídio, sem considerar a quantidade de peptídeo adicionada, pois não se pode garantir que todos os peptídeos estejam na interface e este procedimento foi utilizado em todas as isotermas que serão apresentadas.

A isoterma de compressão do filme de DPPC puro na interface água-ar mostrou um comportamento típico, com uma transição de fase do estado líquido-expandido (LE) para o líquido-condensado (LC) em 4 mN/m (π_t) em acordo com os resultados reportados por Dyck e Lösche (Dyck et al. 2006). A adição de quantidades crescentes de peptídeo no filme lipídico induziu aumento na área molecular de fosfolipídio, aumento nos valores da pressão no platô de coexistência de fase, π_t (ver Fig. 4.6A) e o aparecimento de um segundo platô a 18 mN/m, próximo a pressão de colapso do filme de peptídeo puro, mostrada na Fig. 4.1. Na pressão de 40 mN/m as áreas moleculares médias apresentaram os mesmos valores da que foi obtida para o filme de lipídio puro, sugerindo que o peptídeo foi excluído do filme. Isso foi confirmado efetuando ciclos de compressão e descompressão, em que foi observado deslocamento

significativo de área molecular, indicando que o peptídeo foi expelido para a subfase nesta pressão de superfície.

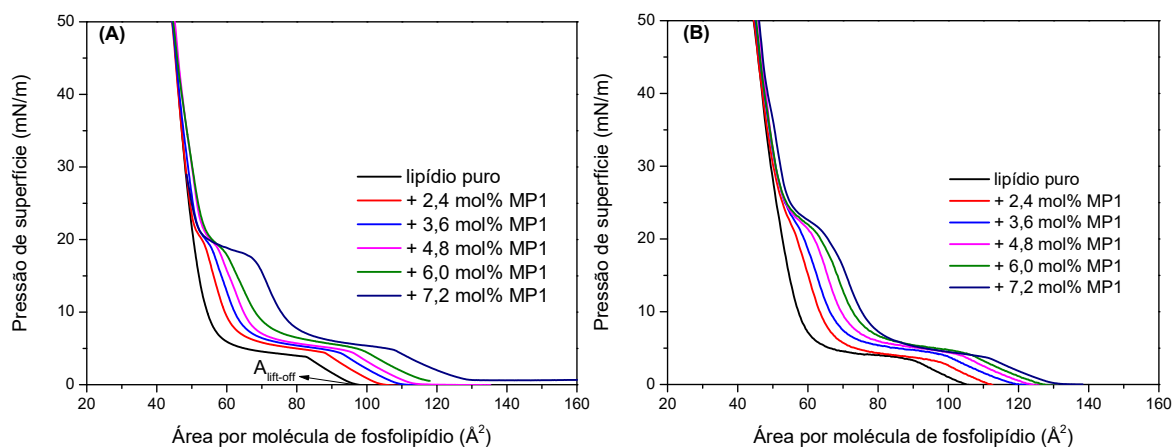


Figura 4.4: Isotermas de compressão $\pi \times A$ de monocamada de DPPC co-espalhados com frações crescentes de MP1 em água (A) ou em 150 mM NaCl, pH 7,4 (B). As áreas correspondem à área da monocamada total normalizada pela quantidade de lipídio (sem considerar a quantidade de peptídeo). A área de “lift-off”, indicada na isotermas, representa a área em que a pressão de superfície começa a aumentar.

Em 150 mM NaCl, pH 7,4 a isoterma π -A de DPPC puro foi deslocada para áreas moleculares ligeiramente maiores das que foram observadas na interface água-ar (Fig. 4.4B) devido a presença de íons na subfase aquosa. Nesta interface, a presença de quantidades crescente de peptídeo não alterou os valores de π_t (ver Fig. 4.6A). Um segundo platô também foi observado na presença do peptídeo em 150 mM NaCl no mesmo valor de pressão de superfície correspondente ao colapso do filme de peptídeo puro em subfase similar (~21 mN/m). A superposição das isotermas nas pressões acima de 40 mN/m sugerem que o peptídeo também foi excluído do filme para a subfase.

A transição de fase LE-LC e os platôs formados após a adição de peptídeo também podem ser analisados calculando o módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície a partir das isotermas de compressão (Fig. 4.4), como mostrado na Fig. 4.5. De acordo com Davies e Rideal (Davies and Rideal 1963) os valores de C_s^{-1} na faixa de 12,5 a 50 mN/m corresponde a fase LE e de 100 a 250 a fase LC. Um aumento em C_s corresponde ao aumento da rigidez, ou seja, diminuição da compressibilidade da monocamada (Vollhardt and Fainerman 2006).

Analisando as curvas de C_s^{-1} vs π mostradas na Fig. 4.5 pode ser claramente observado que em água pura (Fig. 4.5A) o módulo de compressibilidade diminuiu na região em que os peptídeos foram excluídos do filme, ou seja, no processo de exclusão de peptídeo da interface a monocamada encontra-se no estado fluido, e na região entre 20 a 55 mN/m o C_s^{-1} observado foi menor do que no filme de lipídio puro, que se encontra no estado LC. Em 150 mM a diminuição do C_s^{-1} foi observado somente na região de exclusão de peptídeo.

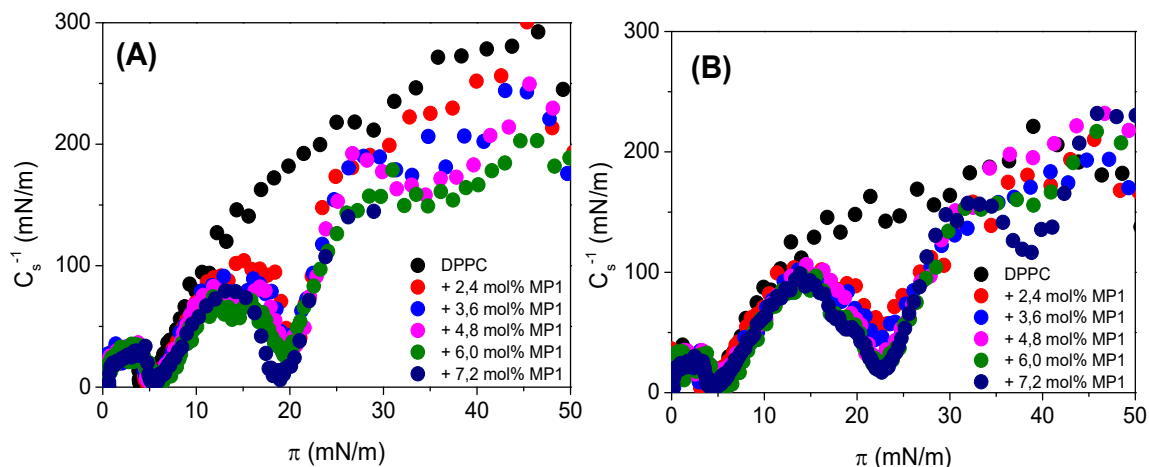


Figura 4.5: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPC na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

Para isotermas de compressão de filmes misto (DPPC/MP1), a área molecular média, em uma pressão de superfície fixa, foi disposta em gráfico em função da porcentagem em mol de peptídeo mostrado na Fig. 4.6B (para as duas subfases estudadas). Note que para estes cálculos a área média/molécula foi recalculada considerando o número total de moléculas na interface (lipídio e peptídeo) e que todas as moléculas de peptídeo estão na interface. Em água, desvios positivos da idealidade foram observados em todas as pressões de superfície analisadas, indicando que as interações peptídeo-lipídios são menos atrativas do que as interações peptídeo-peptídeo e lipídio-lipídio; e ainda, indica que existe mistura dos componentes, pelo menos, parcialmente. Em 150 mM NaCl, nenhum desvio foi observado da regra da aditividade, sugerindo miscibilidade ideal ou imiscibilidade total entre os componentes do filme.

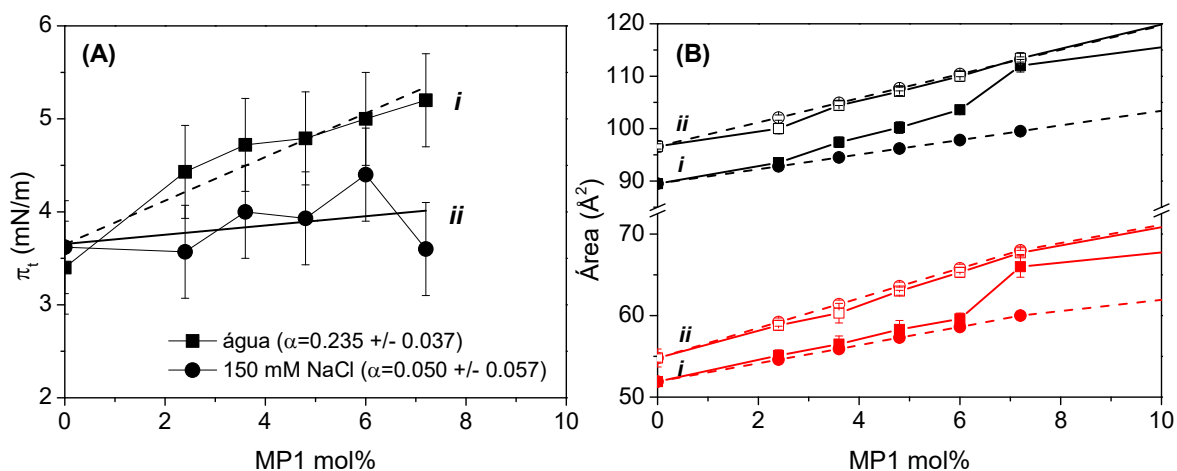


Figura 4.6: (A) Pressão de superfície correspondente a transição de fase do DPPC em função da fração molar de peptídeo. A linha pontilhada corresponde ao ajuste linear e o erro da medida corresponde a resolução da técnica ($\sim 0,5$ mN/m). (B) Área molecular média em função da fração molar de MP1 no filme lipídico em diferentes pressões de superfície: $\pi = 2$ mN/m (símbolos em vermelho) e $\pi = 15$ mN/m (símbolos em preto). O valor médio \pm o desvio padrão de no mínimo 3 medidas independentes são representados. Linhas pontilhadas correspondem a área molecular média de uma mistura ideal e as linhas contínuas, a área real. Em todos os casos, (i) corresponde a subfase água e (ii) 150 mM NaCl, pH 7,4.

4.2.1.2 Morfologia dos domínios de monocamadas de DPPC/MP1 determinada por FM, BAM, e AFM em diferentes forças iônicas

As características morfológicas dos domínios sólidos que são formados na transição de fase lipídica e as alterações induzidas pelo peptídeo na formação de domínios na presença e ausência de sal foram estudadas por microscopia de fluorescência. Neste experimento, 0,5 mol% de lipídio marcado com a sonda fluorescente NBD-PE foi adicionado à solução de lipídio e lipídio/peptídeo. A sonda particiona na fase lipídica, sendo excluída da fase condensada, gerando domínios escuros que correspondem às moléculas no estado LC. Em água, o filme de DPPC puro mostrou domínios sólidos com formas de “triskelion” (Fig. 4.7), em excelente acordo com os resultados obtidos por Weis e McConnell (Weis and McConnell 1984). A nucleação ocorreu a ~ 4 mN/m, e com o aumento da pressão, foi observado o crescimento dos domínios até a pressão de 6 mN/m, e a 11 mN/m ocorreu a percolação. Quando 7,2 mol% de MP1 foi co-espalhado com DPPC na interface água-ar, a nucleação LC ocorreu em pressão de superfície mais alta (em acordo com a mudanças nos valores de π_t), e os domínios apresentaram estruturas mais alongadas comparadas àquelas observadas na ausência de peptídeo (Fig. 4.7).

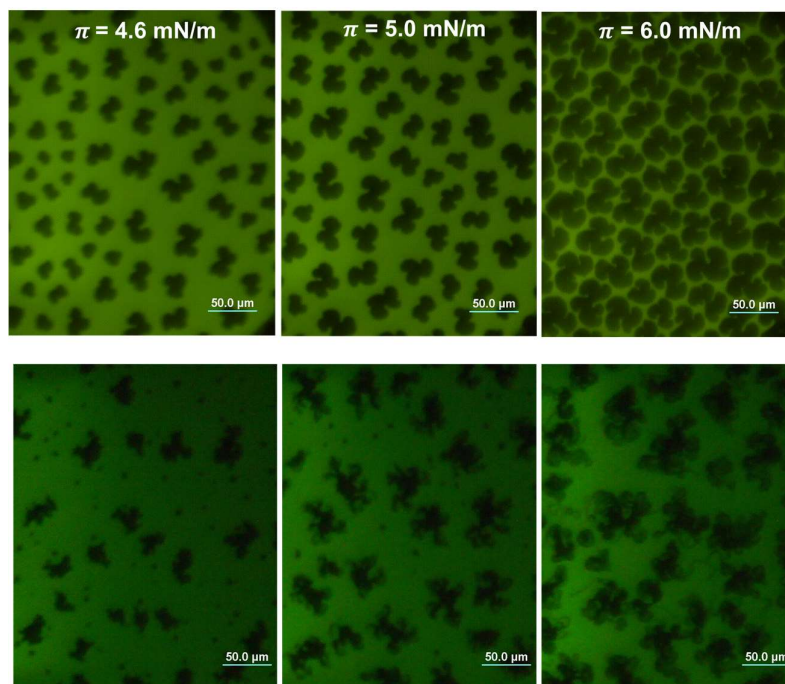


Figura 4.7: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 ($X_{MP1} = 0,072$) (segunda sequência) espalhado em água e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

As mudanças morfológicas dos domínios induzidas pelo peptídeo também foram investigadas por microscopia de ângulo de Brewster (BAM). Em água, os domínios sólidos observados para filme de DPPC puro apresentou formas de “triskelion” com diferentes níveis de cinzas (Fig. 4.8), em excelente acordo com os observados por microscopia de fluorescência (Fig. 4.7). Na presença de 7,2 mol% de MP1 co-espalhado com DPPC na interface água-ar os domínios apresentaram estruturas mais alongadas, longas e curvadas, comparadas àquelas observadas na ausência de peptídeo. Este fenômeno também foi observado em proporções menores de MP1, 2,4 mol%, porém de uma forma menos acentuada (ver Fig. 4.9).

A resolução da técnica de FM e BAM não nos permitiu descrever a estrutura do núcleo e características do centro dos domínios; dessa maneira, filmes da mistura DPPC/MP1 foram transferidos para superfície de vidro em 15 mN/m e analisados por AFM como descrito na seção de materiais e métodos. Nesta pressão, o peptídeo ainda não havia sido expulso para a subfase e permitiu uma boa transferência do filme. A Fig. 4.10 mostra as imagens de AFM obtidas. Em baixa amplificação (Fig. 4.10A), o filme transferido mostrou domínios com ramificações com características similares aos observados na interface água-ar por BAM. Amplificações maiores mostraram que o centro dos domínios também era composto por domínios alongados (Fig. 4.10B e C).

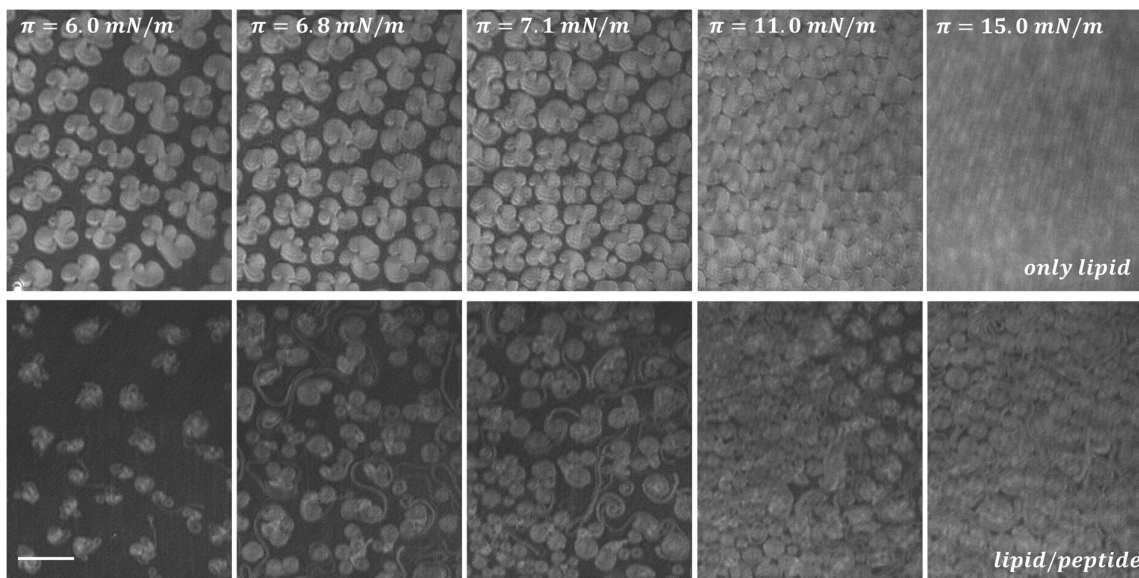


Figura 4.8: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 para $X_{MP1} = 0,072$ (segunda sequência) espalhado em água pura e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

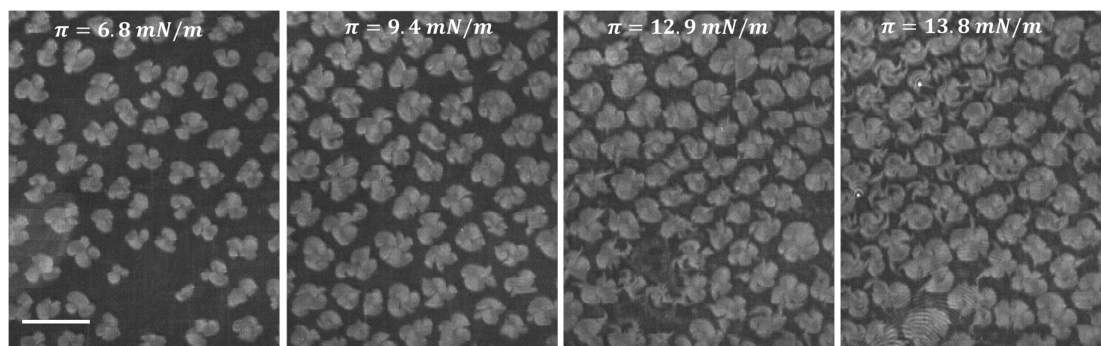


Figura 4.9: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0,024$) espalhados em água pura e registradas a 20 °C e nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

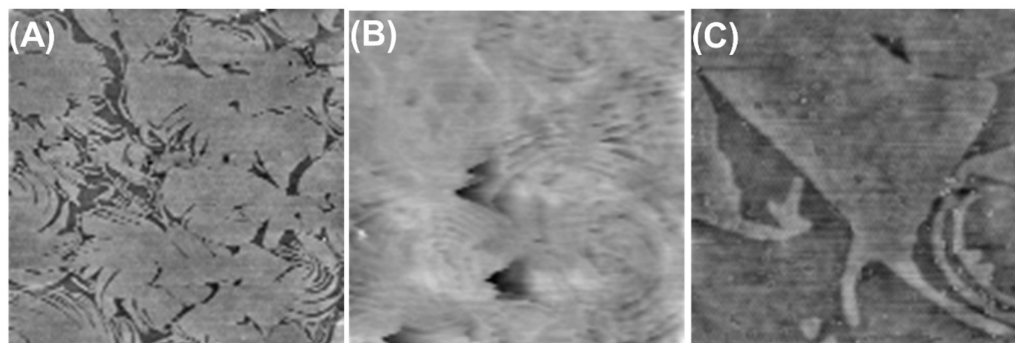


Figura 4.10: Imagens de AFM para filmes de DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0,072$) transferidos para lamínulas de vidro da interface ar-água a 15 mN/m. Tamanho das imagens: 50 x 50 μm^2 (A), 20 x 20 μm^2 (B) e 8,6 x 8,6 μm^2 (C).

As imagens de BAM também foram obtidas da compressão de filmes de DPPC e da mistura DPPC/MP1 em 150 mM NaCl, pH 7,4 (Fig. 4.11). Nesta condição, a formação de domínios LC ocorreu na mesma pressão de superfície observada na ausência de peptídeo, em bom acordo com os dados mostrados na Fig. 4.4A. A forma dos domínios em 150 mM NaCl foi muito similar àsquelas observadas em filme de DPPC puro. Neste sentido, a presença de MP1 não perturbou a nucleação e o crescimento dos domínios. A fusão de domínios ocorre em valores de pressões de superfície acima de 24 mN/m (filme de DPPC puro a fusão ocorreu em pressão mais baixa ~ 11 mN/m), e somente a fase LC foi observada no filme.

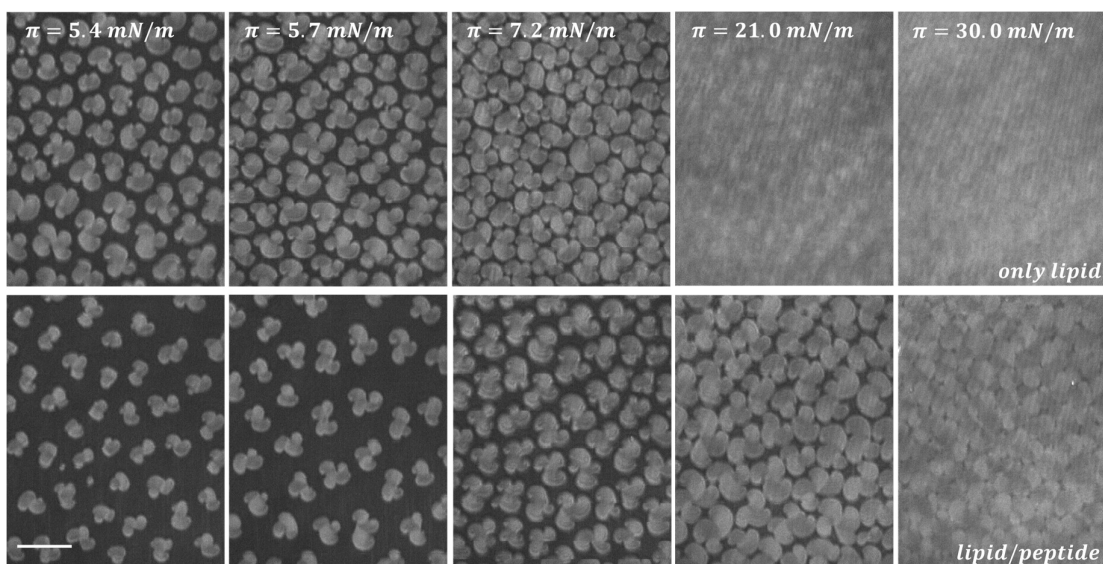


Figura 4.11: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira sequência) ou DPPC/MP1 para $X_{MP1} = 0,072$ (segunda sequência) espalhado em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

A comparação destas imagens, na presença e na ausência de peptídeo, e em valores similares de pressão de superfície sugere que o peptídeo permaneceu, provavelmente, na região menos densa do filme (região escura nas imagens de BAM), uma vez que essa região ocupa área maior na presença de peptídeo. Para melhor quantificar esse efeito, a porcentagem de cada região (região de cinza escuro e claro) foi calculada para as imagens da Fig. 4.11 e dispostas em função da pressão de superfície na Fig. 4.12. Esta figura mostra que a porcentagem da região escura (RE) diminuiu e a porcentagem da região clara (RC) aumentou quando o filme foi comprimido, como esperado. Na presença de MP1, a área RE foi maior do que a ocupada pela fase LE no filme de lipídio puro, em pressões de superfície comparáveis, até o valor de ~ 22 mN/m, que corresponde a pressão em que o peptídeo foi excluído do filme para a subfase.

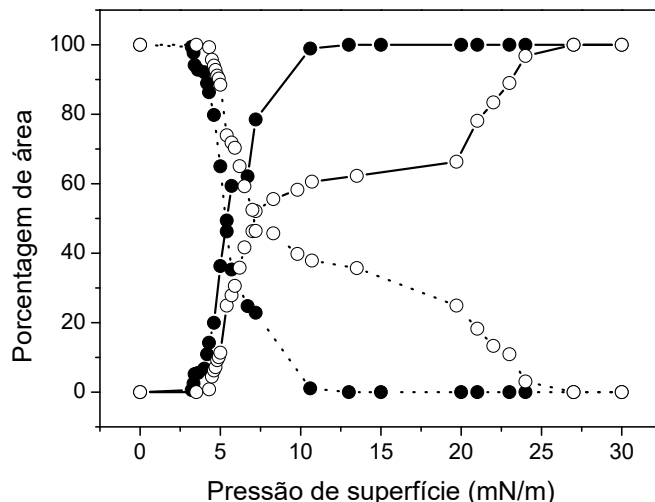


Figura 4.12: Porcentagem de área ocupada pela região cinza clara (linha contínua) ou pela região cinza escuro (linhas pontilhadas) em função da pressão de superfície determinada das imagens de BAM de filmes formados por lipídio puro (círculo fechado) e pela mistura lipídio/peptídeo (círculo aberto) espalhados em 150 mM NaCl, pH 7,4.

Para verificar se o peptídeo estava totalmente ausente na fase LC em 150 mM NaCl, a porcentagem de área que o lipídio ocuparia foi calculada usando a área molecular média da isoterma de compressão de DPPC puro na solução de NaCl (Fig. 4.4B), que de acordo com a Fig. 4.6B é uma boa aproximação pois a área da mistura mostrou comportamento ideal. Os resultados e os detalhes dos cálculos são mostrados na Tabela 4.1. Cálculos similares foram realizados para filmes espalhados em água pura usando as imagens como aquelas na Fig. 4.7 e as áreas moleculares média, das isotermas de DPPC puro em água e a 15 mN/m (Fig. 4.4A). A determinação das porcentagens de área das imagens não é tão precisa neste caso, visto que as “ramificações” dos domínios são muito finas dificultando a produção de uma imagem binária. Além disso, usando a área molecular média das isotermas do lipídio puro introduz-se um erro, já que a mistura envolveu a expansão dos componentes como mostrado na Fig. 4.6B, mas esses cálculos nos permitiram ter uma visão geral da diferença na composição das regiões clara e escura com as obtidas em solução de NaCl.

Tabela 4.1. Porcentagem de área ocupada por diferentes regiões, área calculada ocupada por cada moléculas e quantidade de domínios em cada condição

Condição	Imagens de BAM		^b % Área do lipídio	^c Número de domínios
	^a região de cinza claro	^a região de cinza escuro		
pH 7,4; 150 mM NaCl	65 ± 1	35 ± 1	71	63 ± 7
Água	88 ± 2	12 ± 2	69	--
pH 2,0; 150 mM NaCl	54 ± 2	48 ± 2	60	184 ± 12
pH 4,0; 150 mM NaCl	63 ± 4	37 ± 4	79	170 ± 15
pH 10,0; 150 mM NaCl	70 ± 2	30 ± 2	72	60 ± 5

^aPorcentagem de área ocupada pelas fases RC e RE das imagens de BAM a 15 mN/m. Os dados representam a média ± o desvio padrão de no mínimo 5 imagens. ^bPorcentagem de área ocupada pelo lipídio calculada como: $\%A_L = x_L MMA_L / MMA_T \times 100$, onde x_L é a fração molar de lipídio na mistura, MMA_L é a área molecular média do lipídio puro (correspondente a pressão de 15 mN/m da isoterma de compressão) e MMA_T é a área molecular média do filme misto (área da cuba em 15 mN/m dividida pela quantidade de moléculas espalhadas). ^cNúmero de domínios em 50000 μm^2 determinado das imagens de BAM de 6-8 mN/m e em cada condição.

No intuito de determinar se o efeito provocado pelo sal na forma dos domínios de DPPC foi devido à blindagem de carga, a morfologia dos domínios foi investigada por BAM em concentração crescente de NaCl na subfase (Fig. 4.13). Em filmes de DPPC puro, a adição de 0,1 ou 1,0 mM NaCl na subfase não mostrou efeitos nas propriedades dos filmes. No entanto, no caso de filmes de DPPC/MP1, o aumento da concentração de sal na subfase afetou a morfologia dos domínios, sendo que as ramificações na forma dos domínios diminuíram com o aumento da concentração de sal. A presença de 7,2 mol% de MP1 no filme de DPPC em 0,1 mM NaCl induziu, parcialmente, a formação de domínios ramificados, semelhantes àqueles observados em água pura com 2,4 mol% de peptídeo (ver Fig. 4.7).

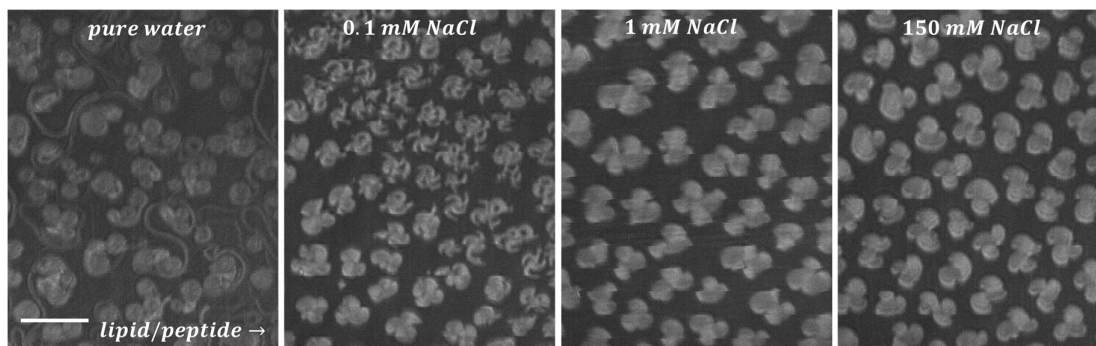


Figura 4.13: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1} = 0,072$) espalhados em solução de NaCl nas concentrações indicadas (pH 7,4) a 20 °C e em 7 – 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μ m.

A presença de ânion na subfase foi mostrado influenciar a topografia do filme lipídico, como reportado por Aroti et al (Aroti et al. 2004). Portanto, com o propósito de avaliar se o efeito de sal foi devido a de interações específicas ou meramente à blindagem eletrostática, experimentos foram realizados usando NaBr na subfase ao invés de NaCl. Concentrações crescentes de NaBr foram adicionadas na subfase e os filmes formados por lipídio puro ou lipídio + 7,2 mol% de MP1 foram observados por BAM durante a compressão (Fig. 4.14). As imagens obtidas mostraram que NaBr levou a filmes com características similares às aquelas observadas em NaCl na mesma concentração de sal, indicando que o efeito de sal é não-específico decorrente de blindagem de carga.

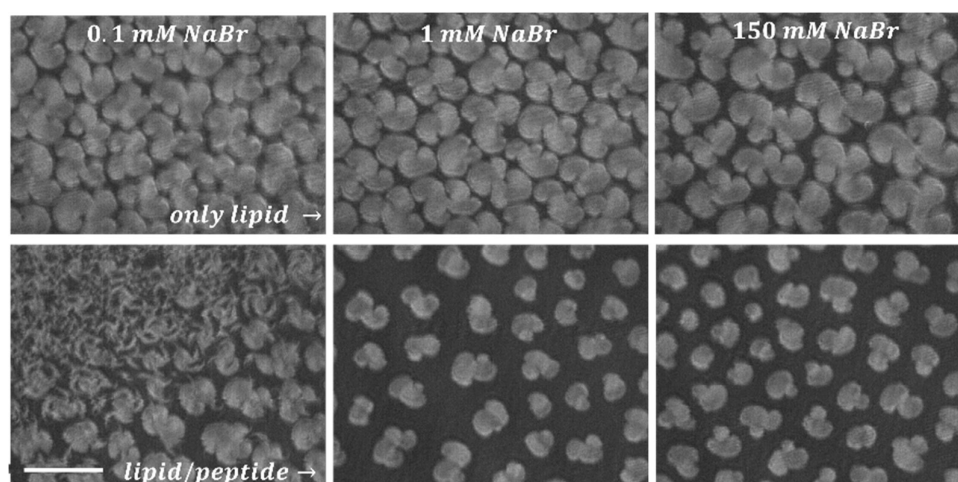


Figure 4.14: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC (primeira linha) e DPPC/MP1 para $X_{MP1}=0.072$ (segunda linha) espalhados em solução de NaBr nas concentrações indicadas (pH 7.4), registradas durante a compressão a 20 °C e em 7 - 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μ m.

4.2.1.3 Morfologia dos domínios de monocamadas de DPPC/MP1 em solução de pH ácido e básico

O efeito da mudança da carga líquida do peptídeo foi investigado analisando o impacto do peptídeo nas monocamadas de DPPC em pH ácido e básico em duas concentrações de NaCl, 0,1 mM e 150 mM. A Fig. 4.15 mostra as imagens de BAM do filme misto (DPPC/MP1) em cada pH e concentração de sal.

Em pH 2 e 4, os domínios mostraram formas mais arredondadas do que em outras condições. A comparação das porcentagens de áreas RE e RC com a área calculada ocupada pelo lipídio, usando a área molecular média das isotermas de lipídio puro em cada condição, sugere que o peptídeo permaneceu na RE e que os domínios eram formados de lipídio puro na fase LC (Tabela 4.1).

Em pH 10, o peptídeo estava parcialmente desprotonado e, similar ao filme na subfase ácida, a RC foi formada por, somente, lipídio puro e a RE, quase que totalmente, por peptídeo (Tabela 4.1).

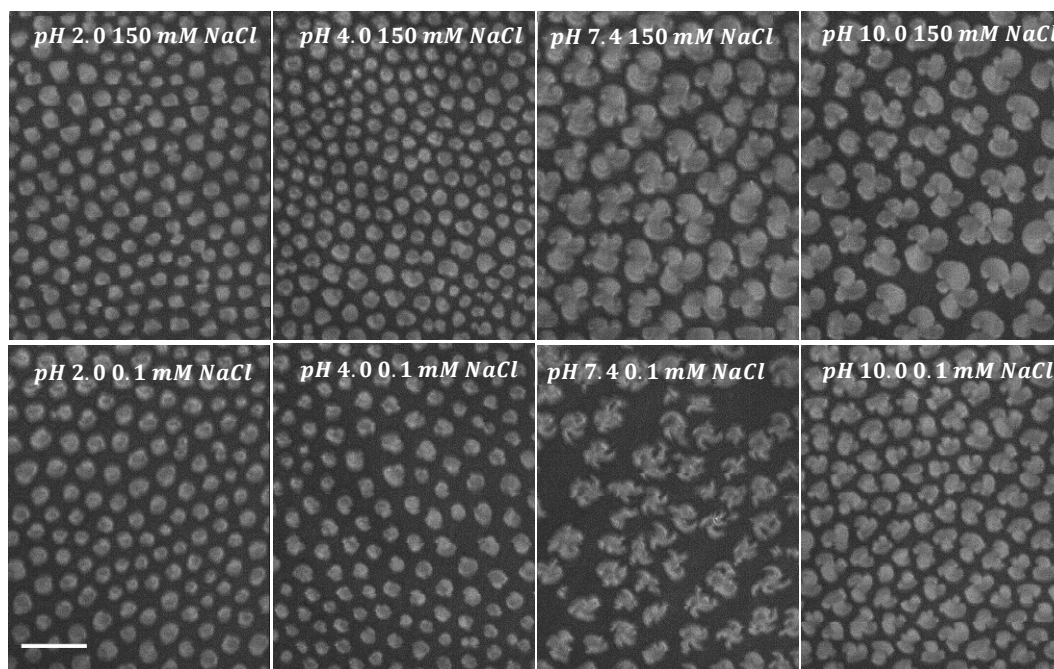


Figure 4.15: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DPPC/MP1 ($X_{MP1}=0.072$) espalhados em solução de NaCl nas concentrações e pH indicados, registradas durante a compressão a 20 °C e em 7 - 8 mN/m. A barra de escala corresponde a 50 μ m.

4.2.1.4 Inserção do peptídeo em monocamadas de DPPC

Experimentos de inserção do peptídeo MP1 em monocamadas de DPPC em diferentes pressões iniciais de superfície foram realizados monitorando a cinética de adsorção e a possível inserção do peptídeo na monocamada lipídica.

Como mostrado na Fig. 4.16, a variação da pressão de superfície, $\Delta\pi = \pi - \pi_i$, observada após a adsorção de peptídeo na monocamada diminuiu linearmente com a pressão inicial, π_i , sendo possível determinar a pressão de máxima inserção (PMI), isto é, o valor de π_i em que $\Delta\pi = 0$ mN/m. PMI é o valor limite de pressão lateral no filme lipídico que impede a inserção do peptídeo, ou seja, acima deste valor o peptídeo não é incorporado na monocamada (Maget-Dana 1999). Em água e em 150 mM NaCl (pH ajustado para 7,4), os valores de PMI obtidos foram de 34 e 28 mN/m, respectivamente.

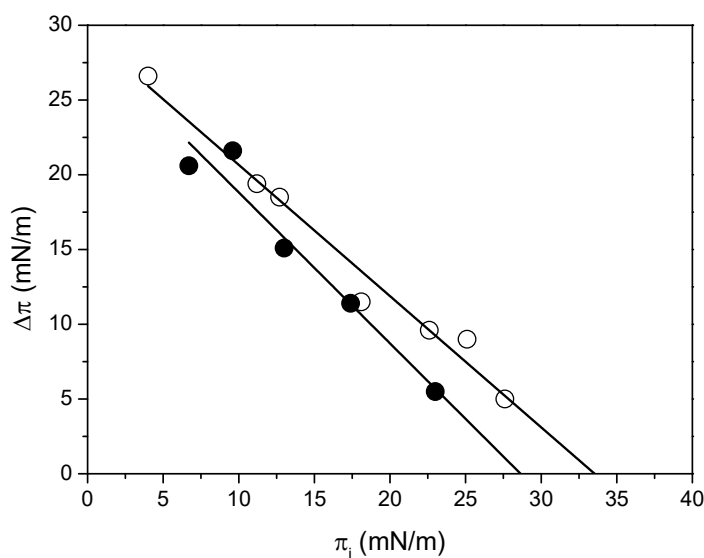


Figura 4.16: Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DPPC em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μ M de peptídeo na subfase. A concentração de peptídeo foi escolhida considerando a mínima concentração em que o peptídeo apresentou máxima atividade superficial obtidas a partir da Fig. 4.2C. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

4.2.2 Monocamadas de DMPC

4.2.2.1 Isotermas da mistura DMPC/MP1 em água pura e em 150 mM NaCl e visualizações por BAM

A Fig. 4.17 mostra as isotermas de compressão de monocamadas de DMPC na presença e ausência de MP1 e imagens registradas durante a compressão em água pura e em 150 mM NaCl (pH 7,4), e ainda, a refletividade média obtida dos filmes.

As isotermas de compressão de monocamadas de DMPC indicaram que o filme estava no estado LE durante toda a compressão em ambas as subfases estudadas (Fig. 4.17A e D). Os dados estão em bom acordo com o encontrado na literatura (Kubo et al. 2001).

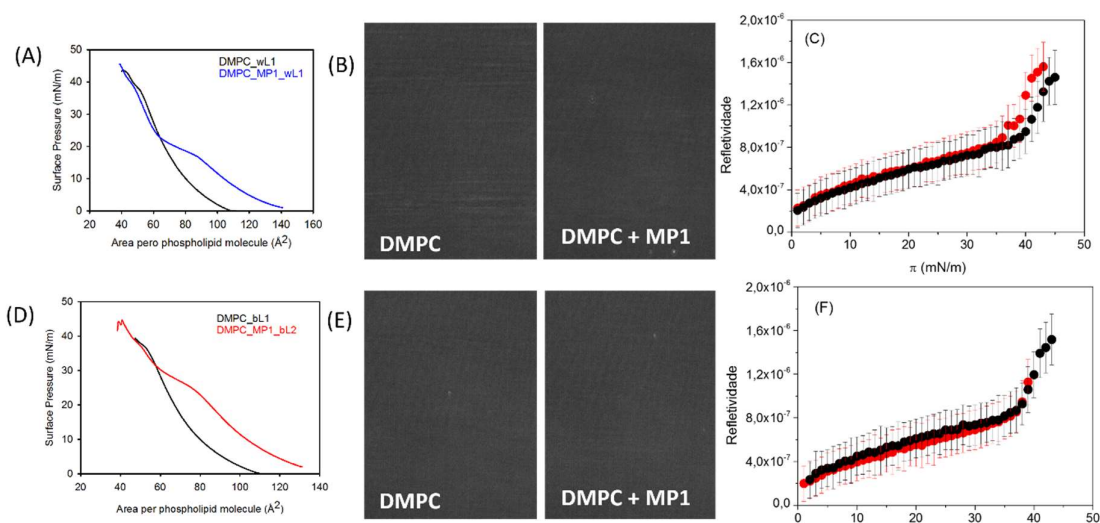


Figura 4.17: (A) e (D) Isotermas de compressão $\pi \times A$ de monocamada de DMPC puro e da mistura DMPC/MP1 ($X_{MP1}=0,06$) em água e em 150 mM NaCl (pH 7,4), respectivamente. (B) e (E) Imagens de BAM de filmes de DMPC e DMPC/MP1 em água e em 150 mM NaCl, respectivamente, na pressão de superfície indicada. (C) e (F) Refletividade média da RE (símbolo fechado) e RC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondentes aos filmes de DMPC puro (vermelho) e filme de DMPC/MP1 (preto) em água e 150 Mm NaCl, respectivamente.

Em água e na presença de 6,0 mol% de peptídeo, um platô foi observado na pressão de 18 mN/m (mesma pressão de colapso do filme peptídeo, ver Fig. 4.1) e na pressão de 20 mN/m o peptídeo é excluído do filme. Em 150 mM NaCl e na presença do peptídeo também foi observado um segundo platô na pressão de superfície de ~ 4 mN/m superior do que foi observado no filme de peptídeo puro na mesma subfase (Fig. 4.17D). A superposição das

isotermas em 30 mN/m indica que a partir desta pressão as moléculas de peptídeo foram excluídas do filme. Em ambas as subfases, a área média calculada a partir das isotermas de compressão das monocamadas mistas (DMPC/MP1) apresentaram valores maiores do que a área ideal em todas as pressões analisadas.

As imagens de BAM para monocamadas de DMPC/MP1 mostraram que a presença do peptídeo não induziu a reorganização das moléculas lipídicas na interface que resultasse na formação de domínios sólidos (Fig. 4.17B e E). As Fig. 4.17C e F mostram que a refletividade média do filme misto (peptídeo/lipídio) possui o mesmo valor do que do filme de lipídio puro, indicando que o peptídeo não induz alteração no comportamento do filme lipídico.

4.2.2.2 Inserção do peptídeo em monocamadas de DMPC

A Fig. 4.18 mostra que a inserção do peptídeo causou maior variação da pressão de superfície na presença de 150 mM NaCl na subfase, indicando maior inserção na monocamada nesta condição. Os valores de PMI obtidos em água e em 150 mM NaCl foram de 24 e 35 mN/m, respectivamente.

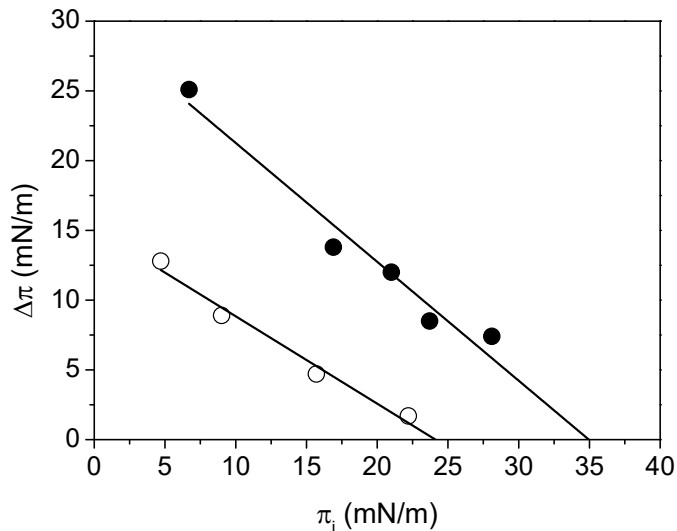


Figura 4.18: Inserção do peptídeo MP1 em monocamada lipídica de DMPC em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μ M de peptídeo em água pura. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

4.2.3 Monocamadas de PE

4.2.3.1 Isotermas da mistura DMPE/MP1 em água pura e em 150 mM NaCl

A Fig. 4.19 mostra que as isotermas de compressão do filme de DMPE em água pura e em solução salina apresentam um platô, em torno de 5 mN/m, característico de coexistência de fases LE-LC. Em água, na presença de 7,2 mol% de peptídeo um segundo platô foi observado na mesma pressão superficial que corresponde ao colapso do filme de peptídeo puro, sugerindo que a partir desta pressão o peptídeo foi lançado para a subfase.

Em 150 mM NaCl, foi observado um comportamento diferente, com o aparecimento de mais 2 platôs nas pressões de 21 e 38 mN/m e o peptídeo permaneceu no filme até a pressão de 40 mN/m, e este efeito foi observado para concentrações de peptídeo entre 2,4 e 9,6 mol% (Fig. 4.19B). Em contrapartida, nenhuma alteração na π_i foi observada em ambas as condições estudadas (Fig. 4.20A). Nesta condição, a interação (atrativa ou repulsiva) entre MP1 e DMPE foi analisada investigando se a variação da área molecular média em uma pressão fixa satisfaz a regra da aditividade. A comparação entre área experimental e a área estimada para uma mistura ideal é mostrada na Fig. 4.20B para duas pressões de superfície (2 e 10 mN/m). Para as duas pressões analisadas, os valores experimentais mostraram um bom acordo com os valores ideais, indicando miscibilidade ideal ou imiscibilidade total entre os componentes do filme.

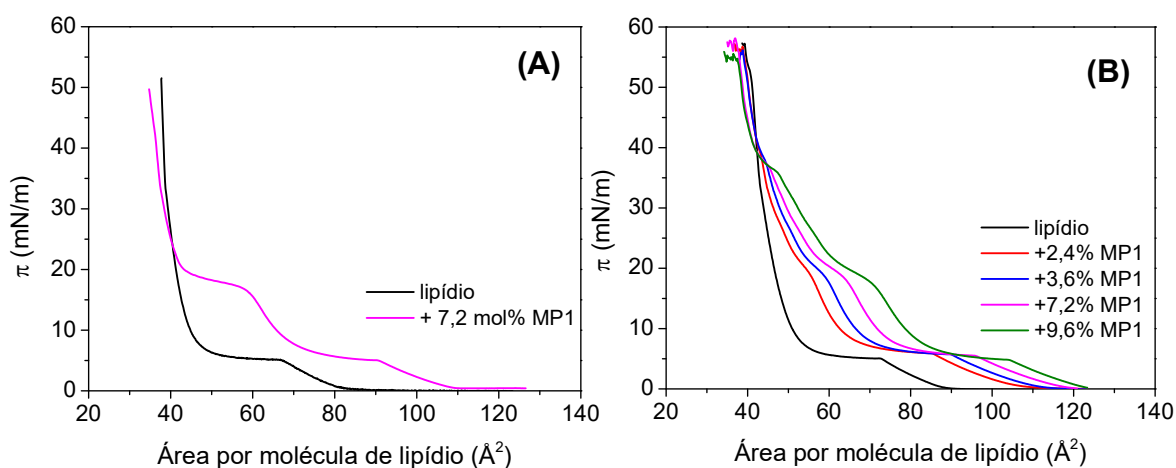


Figura 4.19: Isotermas de compressão de filme de DMPE na ausência e presença de peptídeo co-espalhados com lipídio em água pura (A) ou 150 mM NaCl, pH 7,4 (B). As áreas correspondem à área da monocamada total normalizada pela quantidade de lipídios (sem considerar o número de moléculas de peptídeos).

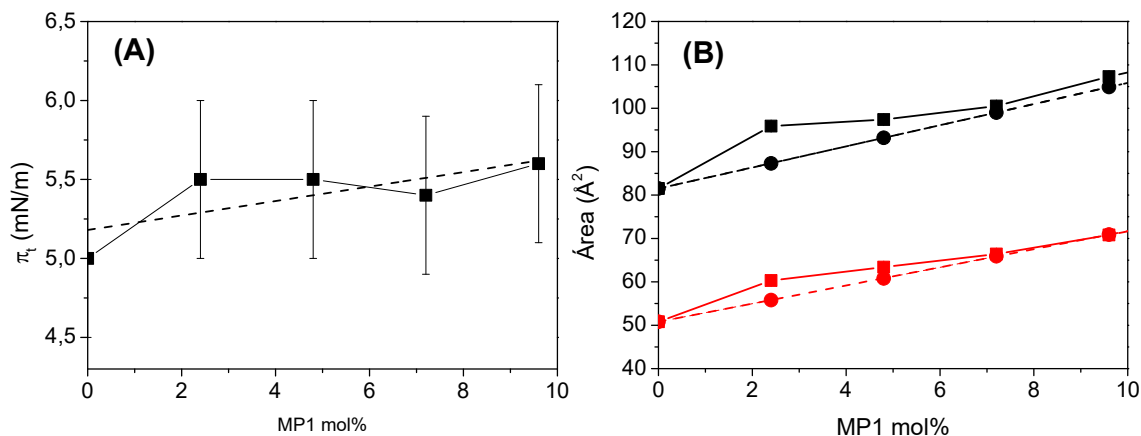


Figura 4.20: (A) Pressão de superfície correspondente a transição de fase do DMPE em função da fração molar de peptídeo. A linha pontilhada corresponde ao ajuste linear e o erro da medida corresponde a resolução da técnica ($\sim 0,5$ mN/m). (B) Área molecular média em função da fração molar de MP1 no filme lipídico em diferentes pressões de superfície: $\pi = 2$ mN/m (símbolos em vermelho) e $\pi = 15$ mN/m (símbolos em preto). O valor médio \pm o desvio padrão de no mínimo 3 medidas independentes são representados. Linhas pontilhadas correspondem a área molecular média de uma mistura ideal e as linhas contínuas, a área real. Em todos os casos foram calculados para 150 mM NaCl, pH 7,4.

Para as monocamadas de DMPE em água, a região de módulo de compressibilidade quase nula em ~ 5 mN/m, característica do platô de transição de fase LE-LC, também é observada na presença de 7,2% de MP1 (Fig. 4.21A). A incorporação do peptídeo à monocamada causa diminuição do valor do módulo de compressibilidade na região em que o peptídeo é excluído do filme lipídico indicando que nesta região a monocamada tornou-se mais compressível. Como mostrado na Fig. 4.121B, em 150 mM NaCl três valores mínimos de C_s^{-1} próximos de zero foram observados nas temperaturas de 5, 20 e 38 mN/m, que correspondem a transição LE-LC, primeiro e segundo platô do peptídeo, respectivamente. Na faixa de 12,5 a 50 mN/m a presença do peptídeo na monocamada induziu redução do módulo de compressibilidade o que sugere que as moléculas de peptídeo não são excluídas do filme de uma só vez e permanecem associadas ao filme sob maior pressão lateral do que observado em água.

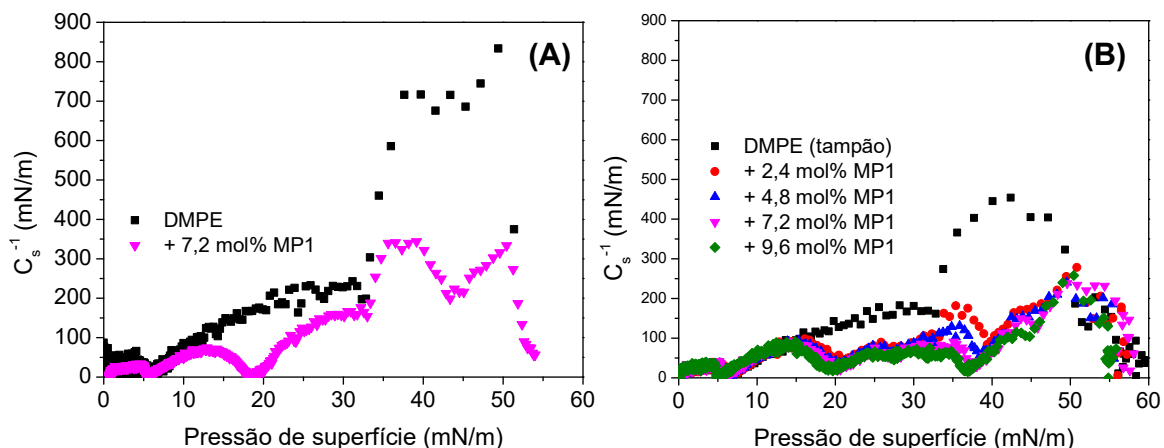


Figura 4.21: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DMPE na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

4.2.3.2 Morfologia dos domínios de monocamadas de DMPE/MP1 determinada por BAM

As imagens de BAM de filmes de DMPE, Fig. 4.22, mostraram que a formação de domínios LC ocorreu nas pressões de superfície correspondentes aos platôs de coexistência de fases LE-LC, em ambas as subfases estudadas (Fig. 4.22A e C). Os domínios sólidos em formas “dendríticas” não sofreram modificações com a presença de sal na subfase. Na presença de peptídeo, as imagens de BAM mostraram que MP1 prefere estar integrado na fase mais fluida, aumentando, assim, a quantidade dessa fase, sendo que em água pura, os domínios foram mais ramificados. Para pressões acima de 20 mN/m pode ser observado o início da fusão dos domínios (percolação da fase LC) (Fig. 4.22B). Por outro lado, em NaCl os domínios foram muito similares aos observados na ausência do peptídeo, mas a fusão teve início em pressão maior do que em água (Fig. 4.22D). Nas duas condições investigadas, pequenos domínios apareceram na pressão correspondente ao colapso do peptídeo.

As morfologias dos domínios em formas de dendríticos também foram visualizadas em água por microscopia de fluorescência em que 0,5 mol% de lipídio com sonda fluorescente, lissamina rodamina-b-sulfonil PE, foi adicionado ao filme, como mostrado na Fig. 4.23. A presença do peptídeo na monocamada induziu aumento da fase fluida e a formação de domínios com mais ramificações comparado ao observado para lipídio puro. Estes resultados indicaram que a presença do lipídio marcado com a sonda fluorescente não induziu artefatos na morfologia dos domínios.

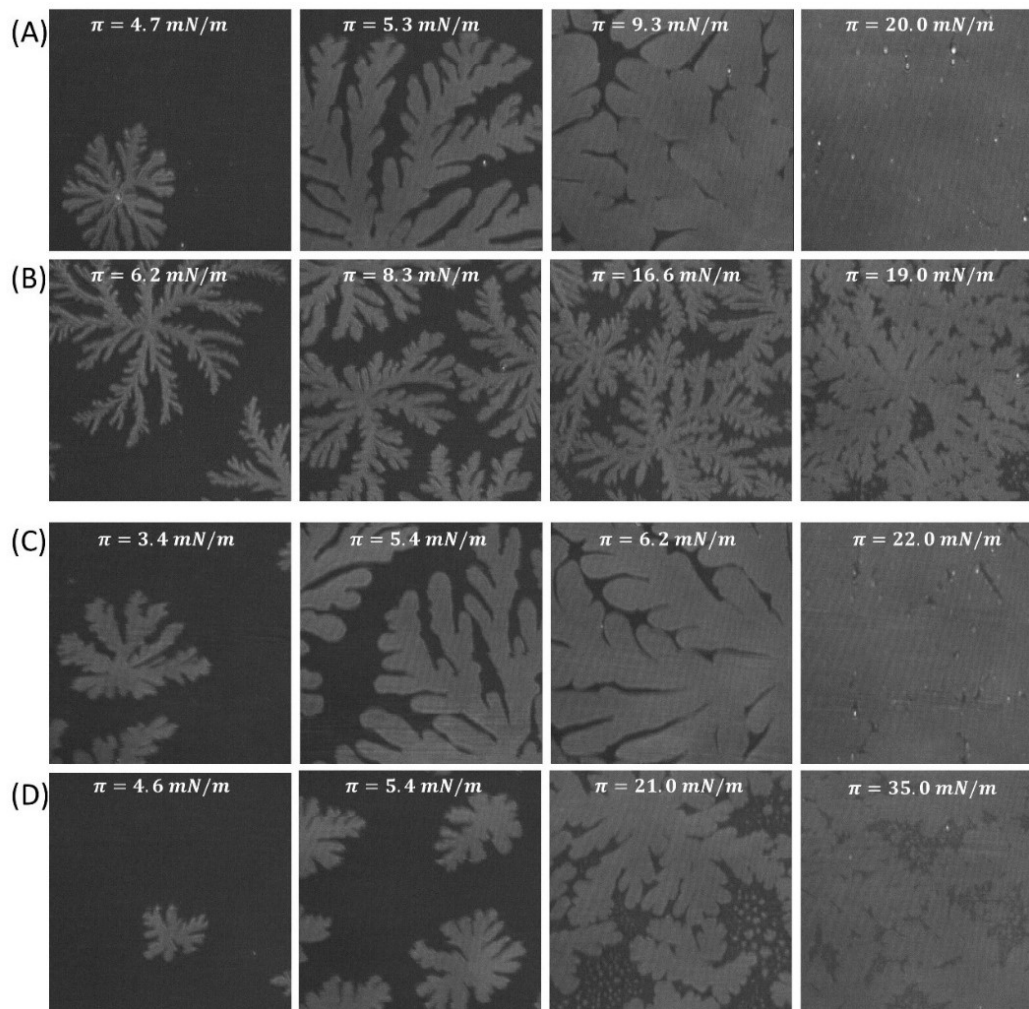


Figura 4.22: Imagens de BAM de monocamadas formadas por DMPE puro (A, C) ou DMPE/MP1 ($X_{\text{MP1}}=0.060$) (B, D) espalhada em água pura (A, B) ou em 150 mM NaCl (C, D) e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões de superfície indicadas. Tamanho da imagem é: 200 x 200 μm .

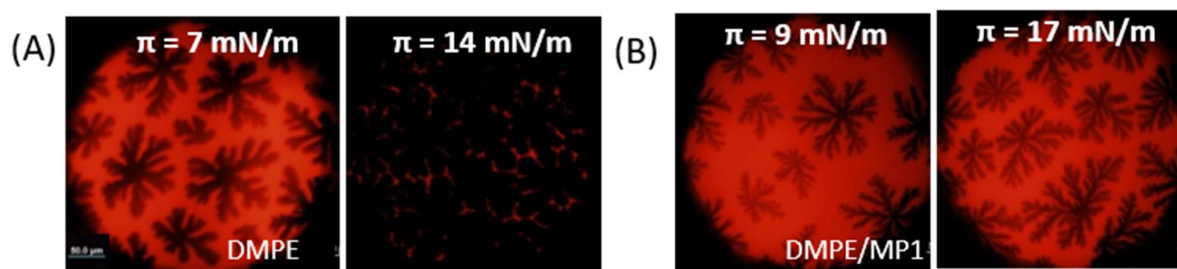


Figura 4.23: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas formadas por DMPE (A) ou DPPC/MP1 para $X_{\text{MP1}} = 0,072$ (B) espalhado em água pura e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A barra de escala corresponde a 50 μm .

A Fig. 4.24 mostra a refletividade média calculada para as fases LC e LE dos filmes de DMPE e da mistura DMPE/MP1. Na presença do peptídeo a refletividade da fase LE foi observada em pressões mais altas do que em filme de lipídio puro, indicando a presença do peptídeo nesta fase. Na presença de 150 mM NaCl na subfase, foi observado aumento da refletividade da fase LE até a pressão de 40 mN/m, maior do que a observado em água, sugerindo que a associação do peptídeo ao filme é mais forte do que em água. Em água e na presença de NaCl, nenhuma alteração foi observada na refletividade da fase LC e a partir das pressões de superfície de 25 e 39 mN/m, respectivamente, somente a fase LC é observada, indicando que o peptídeo foi excluído do filme lipídico.

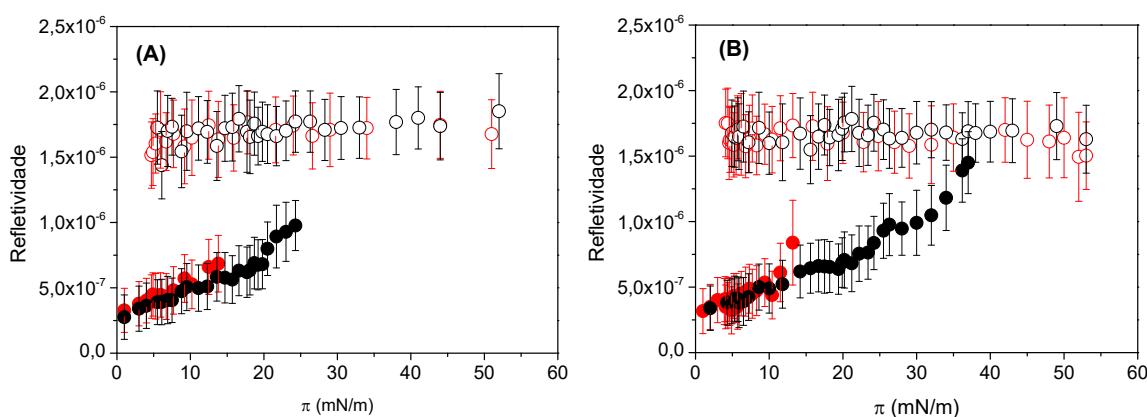


Figura 4.24: Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de DMPE puro (vermelho) e filme de DMPE/MP1 (preto) em água (A) e 150 Mm NaCl (B).

4.2.3.3 Inserção em monocamadas de DMPE, DPPE e POPE

A inserção do peptídeo MP1 em monocamadas de PE foi estudada com três diferentes fosfolípidos, DMPE, DPPE e POPE, como mostrado na Fig. 4.25. Para DMPE e DPPE, os valores de PMI obtidos em água foram iguais a 23 mN/m. Em 150 mM NaCl, para DMPE e POPE, PMI obtidos foram 32 e 51 mN/m, respectivamente.

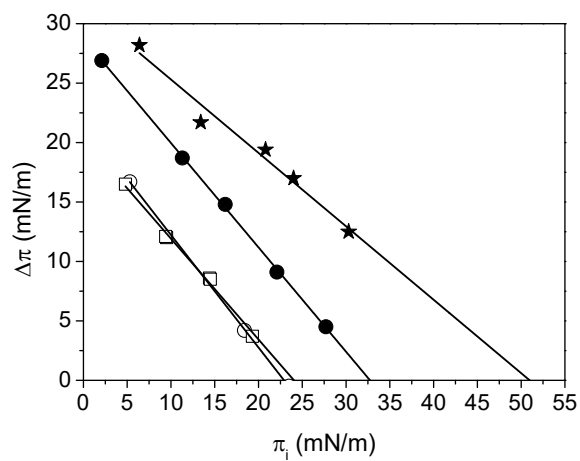


Figura 4.25: Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DMPE (círculo) ou DPPE (quadrado) ou POPE (estrela), em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μM de peptídeo na subfase. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

4.3 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em monocamadas de PS

4.3.1 Monocamadas de DPPS

4.3.1.1 Isotermas da mistura DPPS/MP1 em água pura e em 150 mM NaCl

As isotermas de monocamadas de DPPS apresentam apenas região de coexistência G – LC (gás – líquido-condensado) a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4.26), de acordo com o reportado na literatura (Bouffieux et al. 2007; Chen et al. 2010).

Na presença de quantidades crescentes de peptídeo observou-se um platô em 23 mN/m (5 mN/m maior do que a pressão de colapso do filme de peptídeo puro), em água e a partir de 30 mN/m os peptídeos são excluídos do filme, como evidenciado pela sobreposição das isotermas (Fig. 4.26A). Em 150 mM NaCl, na presença do peptídeo (Fig. 4.26B), foram observados 2 platôs, um a pressão correspondente ao peptídeo puro (ver Fig. 4.1B) e um segundo menos evidente na pressão de $\sim 30\text{ mN/m}$. Nesta condição não foi observado sobreposição das isotermas.

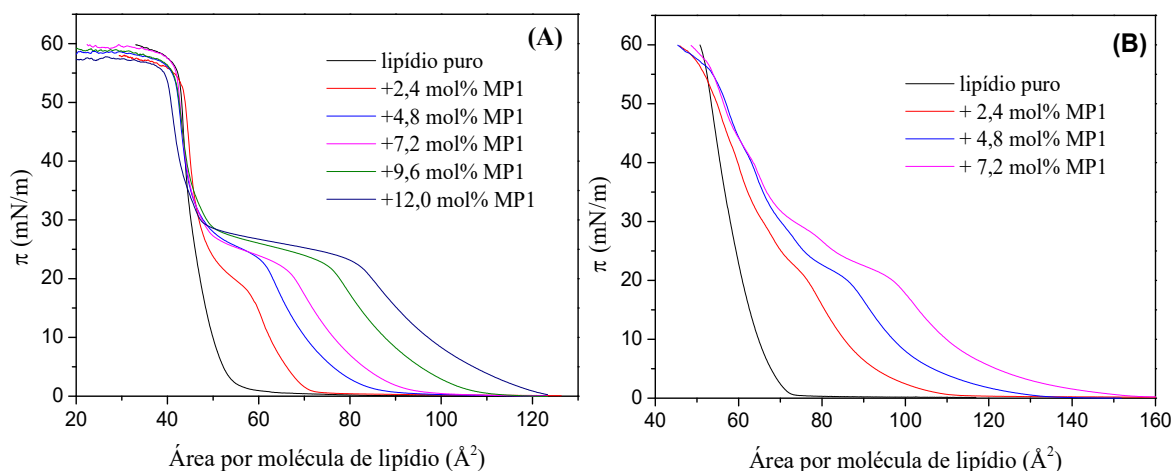


Figura 4.26: Isotermas $\pi - A$ de filmes lipídicos de DPPS na ausência e na presença de diferentes frações molares de MP1 co-espalhados com fosfolipídio em água pura (A) ou 150 mM NaCl (pH. 7,4) (B). Monocamadas comprimidas a $5\text{ cm}^2/\text{min}$ a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A Fig. 4.27 mostra as curvas do módulo de compressibilidade calculado a partir das isotermas da Fig. 4.26. Para DPPS puro não foi observado um mínimo, pois a monocamada não apresenta transição de fase LE-LC. Na presença de peptídeo em água, valores próximos de zero foram observados na pressão de 25 mN/m indicando alta compressibilidade (fluidez) da

monocamada resultando na exclusão de peptídeo do filme. Em 150 mM NaCl, nas curvas de C_s^{-1} mostradas na Fig. 4.27B duas regiões com valores próximos de zero foram observadas. Nesta condição moléculas de peptídeo são excluídas em pressões diferentes, 21 e 30 mN/m. Mesmo em pressões acima de 40 mN/m, os valores C_s^{-1} entre 50 e 100 indicam que monocamada estava no estado LE na presença do peptídeo, sugerindo que moléculas de peptídeo ainda estavam presentes no filme.

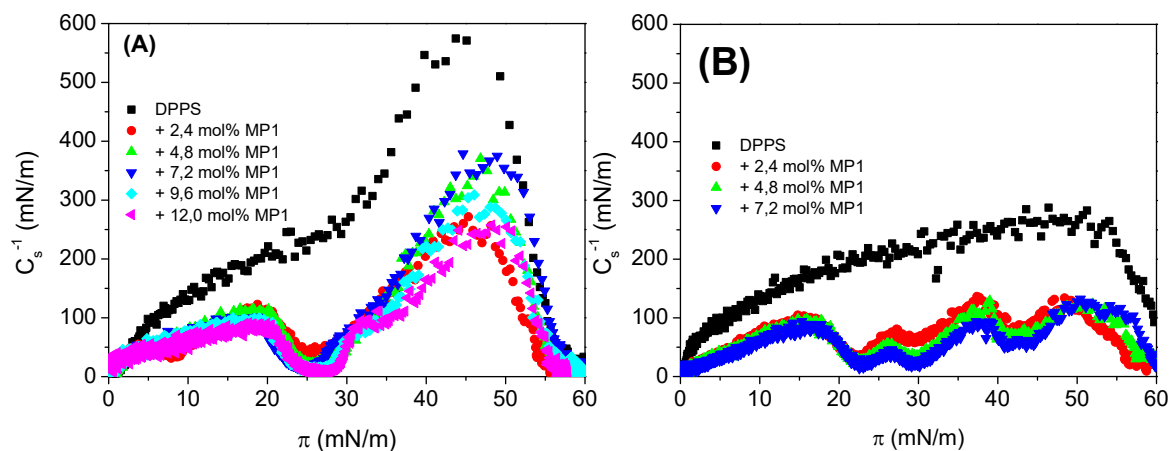


Figura 4.27: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para monocamadas de DPPS na ausência e na presença de diferentes frações de MP1, em água (A) e em 150 mM NaCl (B).

4.3.1.2 Monocamadas de DPPS/MP1 visualizadas por FM, BAM e AFM

Como mostrado na Fig. 4.28A e A', imagens de BAM e FM, respectivamente, em monocamadas de DPPS puro, na pressão de 3 mN/m são observados domínios sólidos de formas irregulares na interface que se fundem no decorrer da compressão induzindo uma estrutura compacta dividida por faixas de menor intensidade (Fig. 4.28A, $\pi = 22$ mN/m) ou imagem totalmente preta (Fig. 4.28A'). A presença de MP1 no filme lipídico induziu a formação de pequenas regiões "claras" distribuídas homogeneamente na região fluida (Fig. 4.28B). Regiões claras em BAM correspondem as regiões pretas na fluorescência que caracteriza a fase sólida (Fig. 4.28B'). Analisando a refletividade do filme por BAM, observamos que essas regiões "escuras" indicam o aparecimento de uma região expandida no filme, ocupada pelo peptídeo (Fig. 4.28C). Com o aumento da pressão, a região expandida diminui e após a pressão de colapso do peptídeo somente a região condensada é observada no filme. Estes resultados indicaram, ainda, que parte das moléculas de peptídeo foram excluídas para a subfase, entretanto, o aumento da espessura do filme sugere que parte das moléculas de peptídeo permaneceram

associadas ao lipídio, provavelmente às cabeças polares. A Fig. 4.28D mostra a imagem de AFM de filme de DPPS/MP1 transferido da interface água-ar para um substrato hidrofílico (lamínula de vidro) na pressão de 15 mN/m. Nesta condição domínios LC circulares foram observados (não sendo visualizados por BAM).

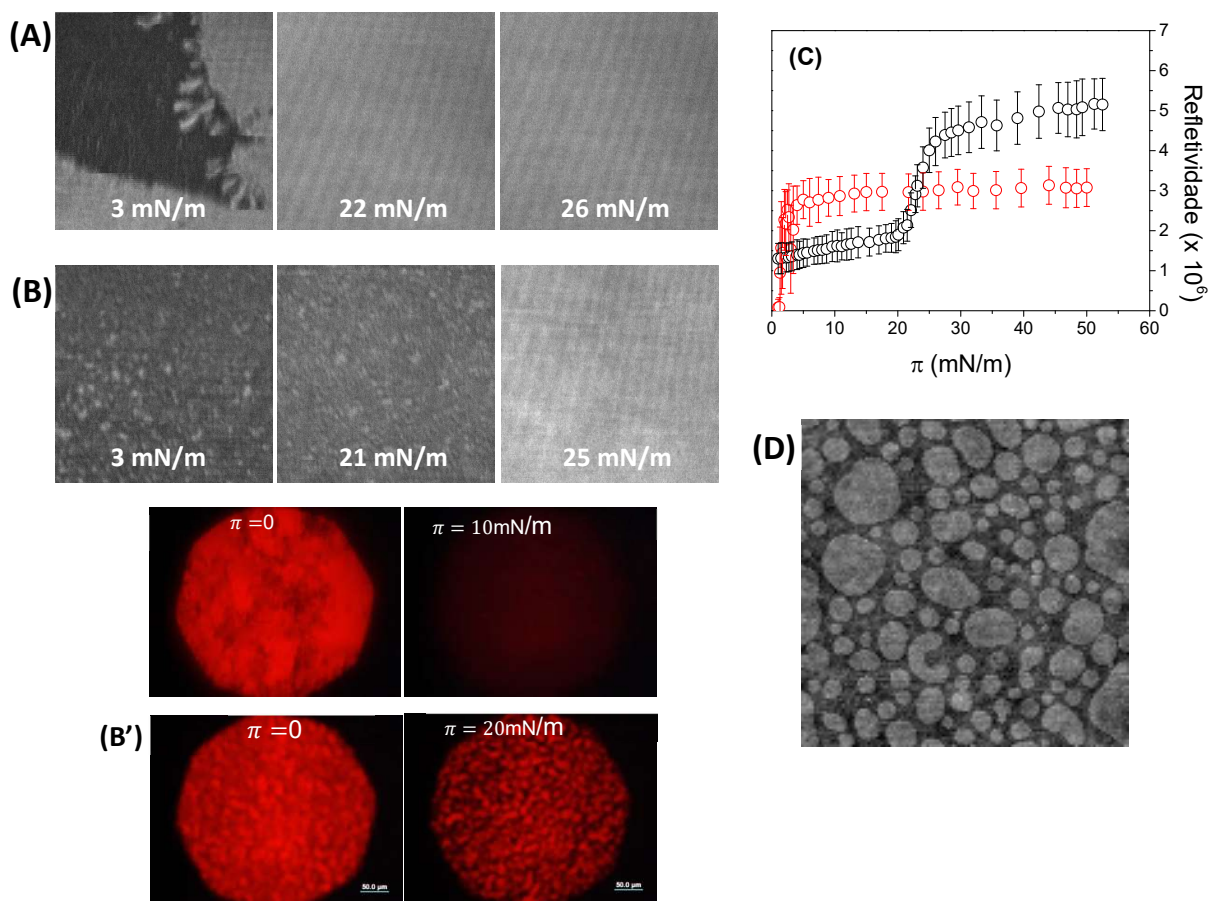


Figura 4.28: Imagens de BAM e FM de monocamadas de DPPS puro (A e A') ou DPPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,060$ (B e B') co-espalhados em água pura e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm . (C) Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em água. (D) Imagem de AFM para filme de DPPS/MP1 ($X_{MP1}=0,06$) transferidos para lamínulas de vidro da interface ar-água a 15 mN/m. Tamanho das imagens: 10 x 10 μm^2 .

Em 150 mM de NaCl, imagens de DPPS puro (Fig. 4.29A) apresentaram as mesmas características observadas nas imagens do filme de lipídio puro em água. Em filmes mistos, DPPS/MP1 (Fig. 4.29B), após a total exclusão das moléculas de peptídeo, foi observado

somente região condensada com a mesma refletividade do filme de lipídio puro (Fig. 4.29C), indicando que nesta condição o peptídeo não altera a espessura do filme.

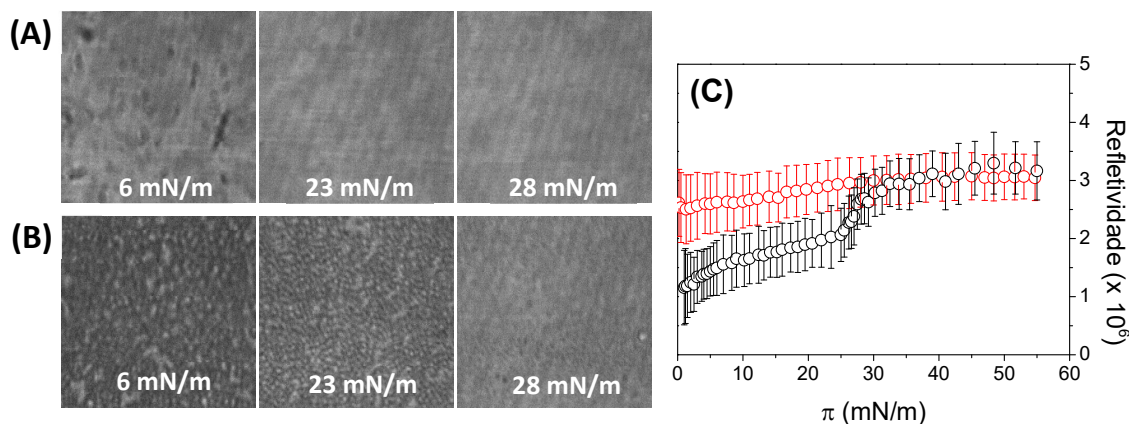


Figura 4.29: Imagens de BAM de monocamadas de DPPS puro (A) ou DPPS/MP1 ($X_{MP1} = 0,060$) (B) co-espalhados em 150 mM NaCl, (pH 7,4) e registradas durante compressão a 20 °C nas pressões indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm . (C) Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em 150 mM NaCl.

4.3.1.3 Isotermas de adsorção e inserção do peptídeo em monocamadas de DPPS

As isotermas de adsorção do peptídeo em monocamadas de DPPS foram determinadas injetando diferentes quantidades de MP1 na subfase. A monocamada lipídica foi formada tal que a pressão de superfície inicial foi de 10 mN/m (Fig. 30A). Ajustando estas isotermas por meio da equação de adsorção de Gibbs-Langmuir (curvas contínuas na Fig. 4.30A) forneceu os valores da constante de dissociação (K_d) do peptídeo e os valores da concentração de excesso de peptídeo na interface (Γ_{max}). A monocamada de DPPS, na pressão de 10 mN/m, encontra-se na fase condensada tanto em água pura quanto em 150 mM NaCl. O excesso de peptídeo na interface foi de $(2,2 \pm 0,4) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ em sal e $(1,8 \pm 0,3) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ em água. A constante de dissociação obtida em solução salina, $K_d = (34,2 \pm 16,1) \text{ nM}$, foi ~ 6 vezes maior do que em água, sugerindo maior afinidade em água. Experimentos de inserção do peptídeo em monocamadas de DPPS em diferentes pressões iniciais, mostraram (Fig. 30B) que as PMI obtidas foram 32 e 28 mN/m em água e em 150 mM NaCl, respectivamente, indicando maior penetração do peptídeo na monocamada na ausência de força iônica.

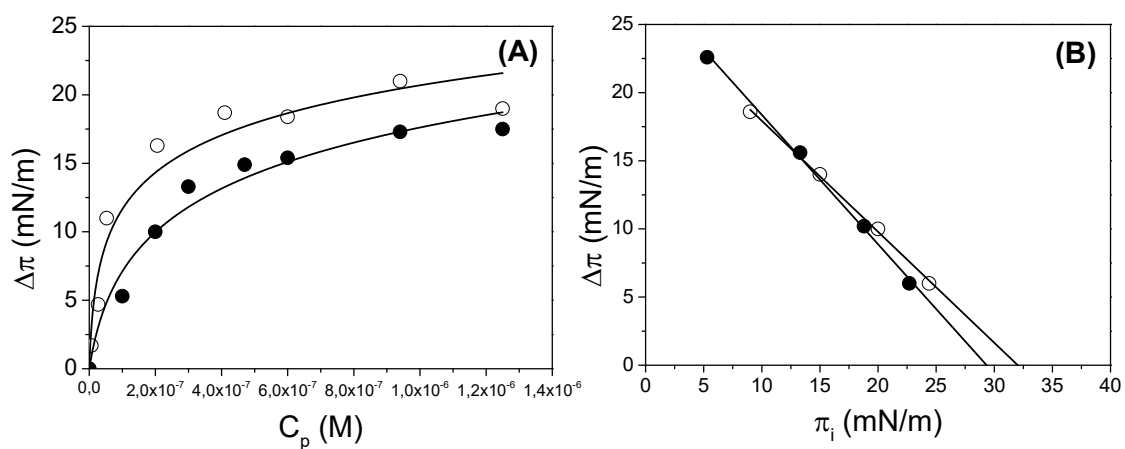


Figura 4.30: (A) Isotermas de adsorção de MP1 determinada pela diferença da pressão de superfície obtida após 1h de adsorção a monocamada de DPPS em $\pi_i = 10$ mN/m em função da concentração de peptídeo. Linhas contínuas representam o ajuste utilizando a isoterma de adsorção Gibbs-Langmuir. (B) Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DPPS. Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de $1,25 \mu\text{M}$ de peptídeo. As linhas contínuas representam o ajuste linear. Experimentos em água pura são representados pelo símbolo aberto, e em 150 mM NaCl (pH 7,4), símbolo fechado.

4.3.2 Monocamadas de DMPS

4.3.2.1 Isotermas da mistura DMPS/MP1 em água pura e em 150 mM NaCl

A Fig. 4.31A mostra que a isoterma de compressão de monocamadas de DMPS na interface água-ar apresenta um platô, em torno de 2 mN/m, característico da coexistências das fases LE-LC e área molecular de 44 \AA^2 a 20 mN/m a $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

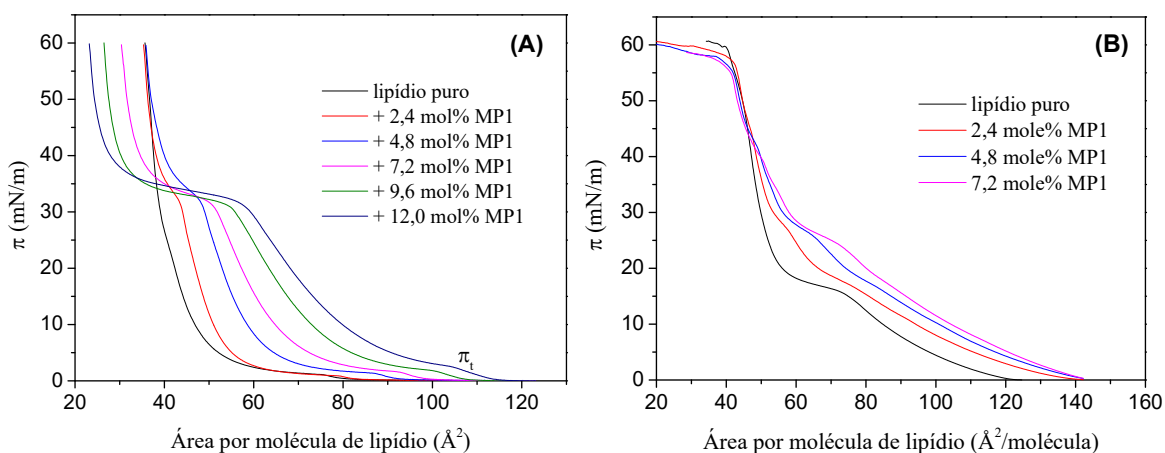


Figura 4.31: Isotermas $\pi - A$ de monocamadas lipídicas de DMPS na ausência e presença de diferentes frações molares de MP1 co-espalhado com fosfolipídio em subfase contendo água pura (A) e 150 mM NaCl (pH 7,4) (B) a $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Monocamadas foram comprimidas a $5 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Na presença de quantidades crescentes de peptídeo, inferior a 7,2 mol%, co-espalhados com lipídios na interface, valores maiores de lift-off e da pressão de transição de fase (π_t) foram observados e, ainda, a extensão do platô de transição LE-LC diminuiu com o aumento da concentração de peptídeo.

As isotermas de compressão indicaram, ainda, a existência de um segundo platô próximo de 32 mN/m , que é, provavelmente, devido ao colapso da fase rica em peptídeo (Maget-Dana et al. 1999; Birdi 2006). Este platô também pode ser caracterizado como a pressão de colapso do peptídeo, indicando imiscibilidade parcial do peptídeo na fase LC da monocamada de DMPS levando a uma separação de fases: em uma fase rica de lipídio e a outra rica de peptídeo. O grau de separação entre a região rica de peptídeo e rica em lipídio é caracterizado pelo comprimento dos platôs nas isotermas (Tabela 4.2). Esta segunda inflexão ocorreu à uma pressão que foi 15 mN/m maior do que a observada para o filme de peptídeo puro (Fig. 4.1), sugerindo forte interação molecular entre peptídeo e o lipídio aniônico (Dyck et al. 2006). Acima de 7,2 mol%

de peptídeo, o aumento de pressão lateral acima de 35 mN/m leva a valores de área que são menores que os obtidos para a monocamada de lipídio e/ou em concentrações mais baixas de peptídeo sugerindo que acima dessa concentração de peptídeo e a partir de 35 mN/m parte do filme (lipídio/peptídeo) foi expelido para a subfase (Hinz and Galla 2005). Isso pode ser uma consequência de forte interação eletrostática atrativa lipídio-peptídeo. A presença do peptídeo também deslocou a pressão de nucleação (π_t) de domínios condensados para valores maiores do que observado para lipídio puro indicando miscibilidade mais favorável de MP1 e DMPS no estado LE.

TABELA 4.2: Comprimento e pressão lateral dos platôs lipídico e peptídico de monocamadas de DMPS com diferentes frações molares de MP1 em água.

Peptídeo-MP1 (% mol)	Platô lipídico		Platô peptídico	
	Comprimento do platô (A^2)	Altura do platô (mN/m)	Comprimento do platô (A^2)	Altura do platô (π_p) (mN/m)
0	33,7	1,13	--	--
2,4	25,9	0,90	14,8	32,7
4,8	24,6	1,36	21,5	32,7
7,2	22,0	1,65	32,6	32,0
9,6	21,1	1,90	46,5	31,3
12,0	20,7	2,60	55,2	32,2

Em 150 mM de NaCl as isotermas de DMPS puro foram deslocadas para valores de área/molécula maiores e o platô de coexistência de fases foi observado em 18 mN/m (Fig. 4.31B). O aumento da área molecular para valores maiores em solução salina foi também observado por Dyck e Loschë (Dyck et al. 2006), sugerindo estar relacionado a inclusão de íons de sódio na região das cabeças polares da monocamada. A isotermas de filmes de DMPS em 150 mM NaCl, na presença do peptídeo MP1 também apresentaram também um segundo platô próximo a 35 mN/m, assim como em água pura, sugerindo interação peptídeo-lipídio. A superposição das isotermas foi observada acima de 40 mN/m sugerindo que, acima do segundo platô, o peptídeo foi expulso do filme para a subfase.

Na Fig. 4.32, são mostrados ciclos de compressão, expansão e re-compressão de monocamadas mistas de DMPS/MP1 em água. Com o aumento da concentração de MP1 nas monocamadas de DMPS/MP1 (Fig. 4.32A-C) a reinserção do peptídeo na monocamada após a

compressão, é incompleta, como pode ser visto pela histerese na re-compressão do filme após 1h de relaxação da monocamada. Na Fig. 4.32D são mostrados dois ciclos de compressão – expansão - re-compressão. No primeiro o filme foi comprimido até 15 mN/m, inferior ao platô do peptídeo, o filme foi expandido e re-comprimido, após uma hora, até 60 mN/m, mostrando ausência de histerese. O filme foi, novamente, expandido e re-comprimido mostrando histerese nesta terceira re-compressão. Estes resultados apontam a reinserção parcial do peptídeo, porém parte do lipídio que foi expelido para a subfase durante a compressão não volta para a interface.

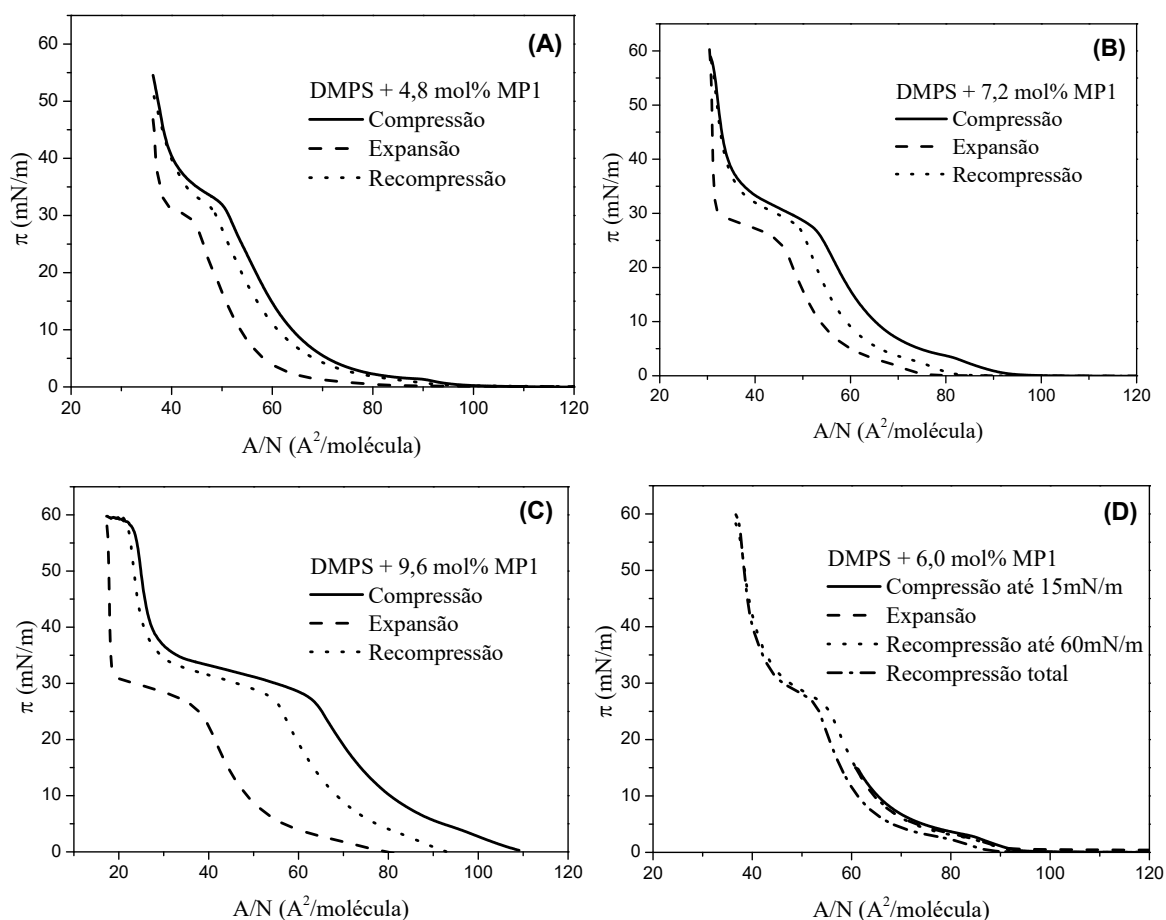


Figura 4.32: Ciclos de expansão e compressão das monocamadas de DMPS com diferentes frações molares de MP1 co-espalhado com fosfolipídio em água pura. Monocamadas foram comprimidas a 5 cm^2/min a $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.2.2 Monocamadas de DMPS/MP1 visualizadas por MF, BAM e AFM

As mudanças na morfologia dos domínios induzidas pelo peptídeo em monocamadas de DMPS foram, primeiramente, observadas por microscopia de fluorescência (Fig. 4.32). Para

visualização dos domínios, pequena fração, 0,4 mol%, de lipídio fluorescente, lissamina rodamina-b-sulfonil PE, que particiona da fase fluida, foi adicionado ao lipídio ou a mistura lipídio/peptídeo.

Imagens de fluorescência na ausência de peptídeo e na presença de 4,8 mol% de MP1 co-espalhado com lipídio em água e em 150 mM NaCl são mostradas na Fig. 4.34C. Em água, domínios de DMPS apresentaram formas de “dendritos” (Fig. 4.33A) e a presença de peptídeo induziu diminuição no tamanho dos domínios e a quantidade de ramificações, e ainda, aumentou a área fluorescente, correspondente a região LE do filme (Fig. 4.33A). Este mesmo experimento foi realizado utilizando peptídeo marcado com carboxifluoresceína no N-terminal (FITC-MP1). Na Fig. 4.33B é mostrada uma micrografia em 27 mN/m de filmes de 4,8 mol% de MP1 co-espalhado com DMPS. Estas imagens mostram que as regiões fluorescentes são as mesmas observadas para filme de lipídio puro, corroborando a interpretação de que o peptídeo particiona na fase fluida.

Em tampão contendo 150 mM NaCl uma grande quantidade de pequenos domínios escuros, aproximadamente circulares, sem ramificações, foi observado como mostrado na Fig. 4.33B. A área desses domínios aumenta ligeiramente mantendo a morfologia no decorrer da compressão. A presença do peptídeo não induziu mudanças na forma ou no tamanho dos domínios. Não se podia assumir a priori, que a mudança na forma dos domínios em 150 mM NaCl na ausência de peptídeo foi um efeito da presença de sal na subfase ou do marcador fluorescente que foi incorporado no filme. Mohwald e colaboradores (Fischer et al. 1984; Miller and Mohwald 1987) evidenciaram que marcadores fluorescentes que são incorporados aos filmes lipídicos comportam-se como impurezas e muitas vezes podem induzir mudanças na morfologia dos domínios lipídicos

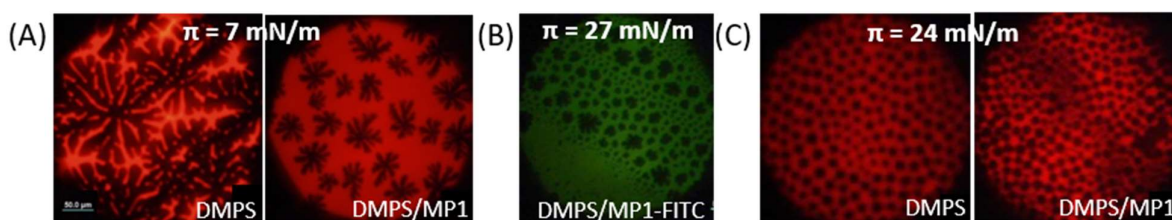


Figura 4.33: Micrografias de fluorescência de monocamada de DMPS e DMPS/MP1 ($X_{MP1} = 0,048$) co-espalhados com o lipídio marcado, lissamina rodamina-b-sulfonil PE, em água (A) e 150 mM NaCl (C) e de DMPS co-espalhado com FITC-MP1 ($X_{FITC-MP1} = 0,060$) (B) nas pressões de superfícies indicadas e a 20 °C.

Os experimentos em BAM mostraram que em água pura, filmes de DMPS apresentaram domínios LC com formas de “dendritos” na região de transição LE-LC (Fig. 4.34A) em bom acordo com os resultados de microscopia de fluorescência. No decorrer da compressão, as ramificações dos domínios cresceram até a pressão de 15 mN/m em que toda a região LE desapareceu completamente. Quando 2,4 mol% de peptídeo foi co-espalhado com DMPS na interface água-ar, a nucleação dos domínios iniciou na pressão maior do que para o filme de lipídio puro e os domínios apresentaram tamanhos menores (Fig. 4.34B). O aumento da concentração de peptídeo para 7,2 mol% induziu a formação de domínios menores e uma segunda nucleação de pequenos domínios amorfos foi observada próximo a pressão de colapso do peptídeo (Fig. 4.31A). Como mostra a imagem de BAM a 35 mN/m (Fig. 4.34C) os contornos dos domínios condensados são mais brilhantes indicando aumento da espessura da monocamada.

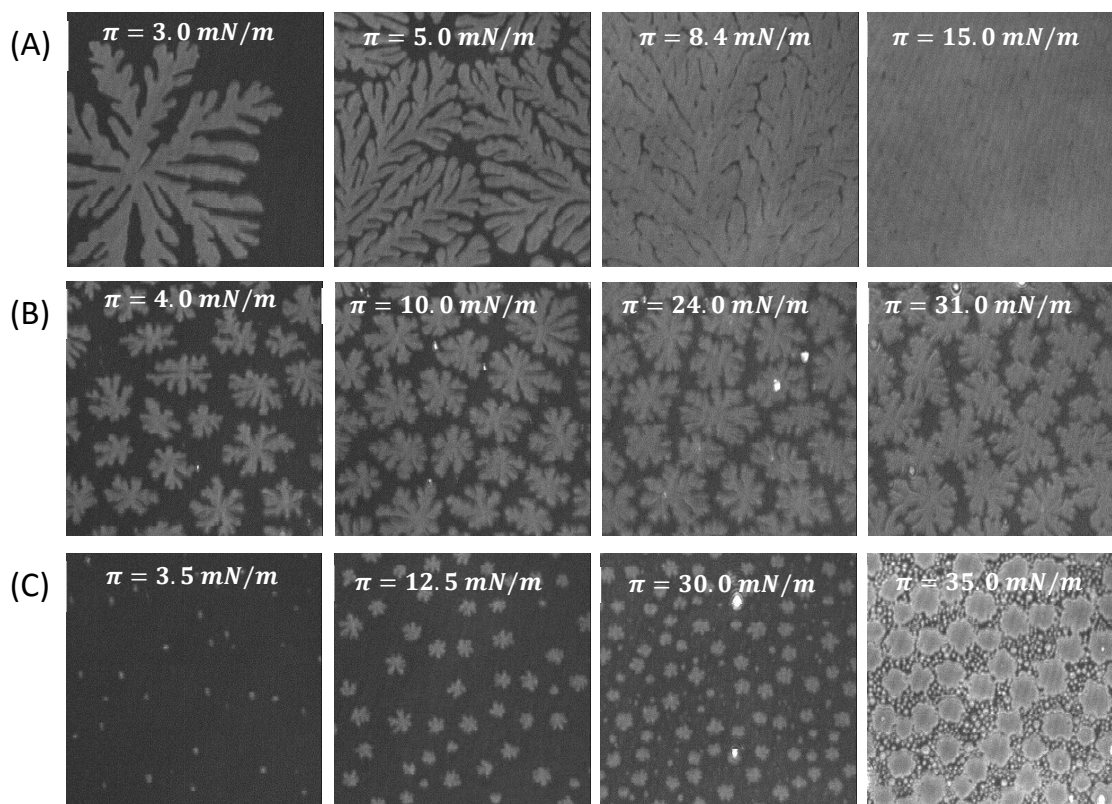


Figura 4.34: Imagens representativas de BAM de monocamadas de DMPS puro (A) ou DMPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,048$ (B) e $X_{MP1} = 0,072$ (C) co-espalhados em água pura e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm .

As imagens de AFM de filme de DMPS/MP1 transferido da interface água-ar para um substrato hidrofílico na pressão de 15 mN/m são mostradas na Fig. 4.345 Para filmes de DMPS/MP1 as imagens mostraram domínios LC semelhantes aos observados por BAM.

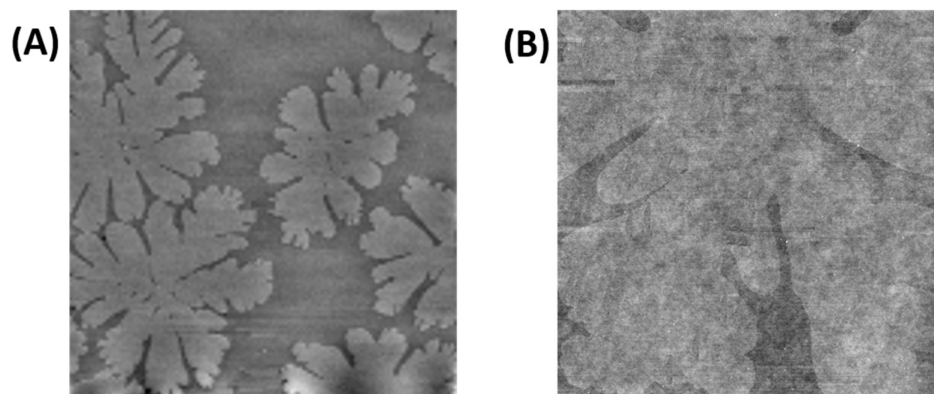


Figura 4.35: Imagens de AFM para monocamadas DMPS/MP1 ($X_{MP1}=0.060$) transferidas da interface água-ar para substrato de lamínula de vidro na pressão de 15 mN/m. Tamanho das imagens: 100 x 100 μm (A) e 20 x 20 μm (B).

Em solução salina, as imagens de BAM mostram que para filmes de DMPS puro os domínios apresentaram morfologia completamente diferente comparada com lipídio puro em água. A Fig. 4.36A, mostra o aparecimento de pequenos domínios condensados, na região LE-LC, com o contorno arredondado, sem ramificações, em ~ 17 mN/m. A área desses domínios aumenta ligeiramente mantendo a morfologia no decorrer da compressão. Para pressões acima de 33 mN/m pode ser observado que os domínios começam a fundir e a 37 mN/m todo o filme encontra-se na fase sólida. Estes resultados indicam que os íons da subfase atuam no balanço energético diminuindo a repulsão entre os dipolos e diminuindo a tensão de linha.

Imagens de BAM de filmes formados por peptídeo co-espalhado com lipídio (Fig. 4.36B) mostraram que os domínios eram menores e mais arredondados do que para filme de DMPS puro com uma distribuição de tamanho praticamente constante ao longo da compressão. Por outro lado, a fusão dos domínios foi observada em valor de pressão ($\pi = 43$ mN/m) maior do que em água (~ 37 mN/m) sugerindo que o peptídeo na interface, preferencialmente na fase fluida, dificulta a fusão de domínios; efeito semelhante ao de aumento de repulsão entre eles.

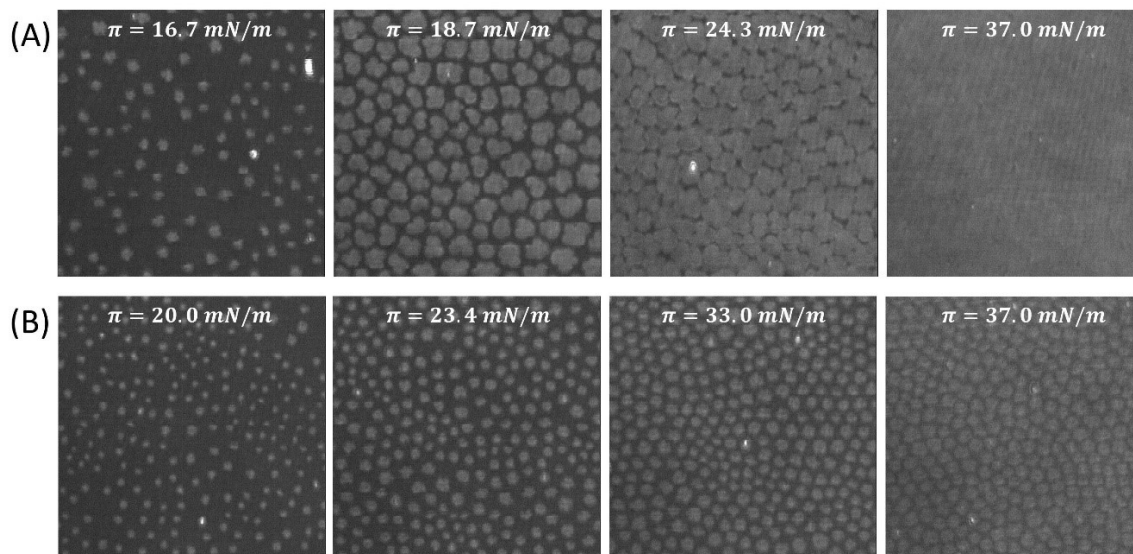


Figura 4.36: Imagens representativas de BAM de monocamadas compostas por DMPS puro (A) ou DMPS/MP1 para $X_{MP1} = 0,060$ (B) co-espalhados em 150 mM NaCl e registradas durante compressão a 20 °C e nas pressões superficiais indicadas. Tamanho da imagem: 200 x 200 μm .

Observou-se ainda que na presença do peptídeo a região expandida das monocamadas tem área maior do que na sua ausência, sugerindo assim que o peptídeo estabiliza a fase fluida (LE), o que está consistente com a expansão observada nas isotermas de compressão (Fig. 4.31B). Isto pode ser observado através da Fig. 4.37 em que a refletividade das regiões condensadas e expandida foi calculada através das imagens de BAM na presença e ausência de peptídeo.

Na pressão correspondente a 12 mN/m, a região LE não é mais observada para filme de lipídio puro, indicando que o filme está na fase condensada, ao passo que na presença do peptídeo a região LE foi observada durante toda a compressão e acima da pressão onde o peptídeo seria excluído da subfase a refletividade do filme aumenta. O aumento da refletividade indica aumento da espessura do filme, sugerindo que moléculas de peptídeo permanecem associadas a região das cabeças polares do lipídio.

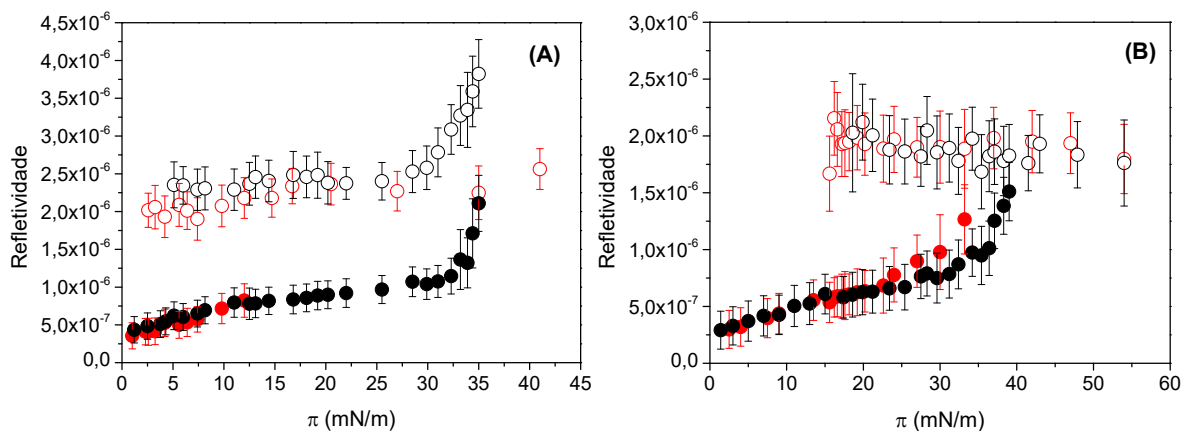


Figura 4.37: Refletividade média das regiões LE (símbolo fechado) e LC (símbolo aberto) observadas nas imagens de BAM correspondente aos filmes de lipídio puro (vermelho) e filme de lipídio/peptídeo (preto) em água (A) e 150 mM NaCl (B).

4.3.2.3 Isotermas de adsorção em monocamadas de DMPS e inserção do peptídeo em monocamadas de DMPS e POPS

A Fig. 4.38A mostra as isotermas de adsorção de MP1 em monocamadas de DMPS em água e em 150 mM NaCl em que os filmes lipídicos foram formados na pressão de superfície inicial de 10 mN/m.

Considerando $\pi_i = 10$ mN/m, encontramos os valores de $K_d = (5,4 \pm 3,7)$ pM e $\Gamma_{\max} = (1,6 \pm 0,2)$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ em água e de $K_d = (0,7 \pm 0,3)$ nM, e de $\Gamma_{\max} = (3,1 \pm 0,7)$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ em 150 mM NaCl. Como nesta pressão a monocamada de DMPS em solução salina está na fase fluida e em água a monocamada está na fase condensada. Os resultados sugerem que o maior número de peptídeo na interface quando $\pi_i = 10$ mN/m, está relacionado à preferência do peptídeo pela fase fluida, entretanto, a redução da interação eletrostática decorrente do efeito de blindagem eletrostática das cargas das cabeças polares pela presença de íons Na^+ , reduziu a afinidade do peptídeo em meio salino indicando a importância das interações eletrostáticas na adsorção do peptídeo à monocamada.

A máxima variação de pressão de superfície ($\Delta\pi$) após a injeção de peptídeo na subfase de monocamadas de DMPS e POPS em função pressão de superfície inicial (π_0) é mostrado na Fig. 4.37B. Os valores de PMI obtidos para monocamadas de DMPS em água e em 150 mM NaCl foram de 38,7 e 35 mN/m, respectivamente e para monocamadas de POPS em NaCl, 42,5 mN/m.

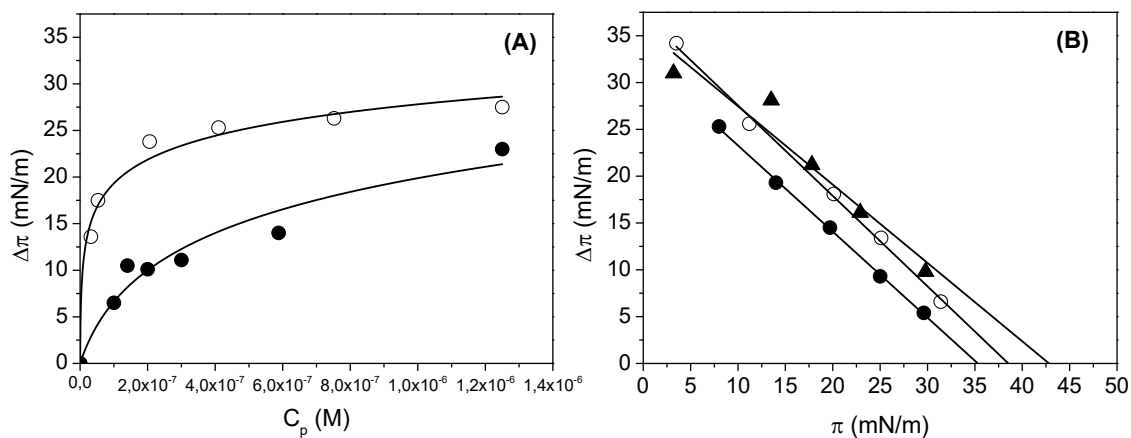


Figura 4.38: (A) Isotermas de adsorção de MP1 determinada pela diferença da pressão de superfície obtida após 1h de adsorção a monocamada de DMPS em $\pi_i = 10$ mN/m em função da concentração de peptídeo em água pura (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado). Linhas contínuas representam o ajuste utilizando a equação de adsorção Gibbs-Langmuir. (B) Inserção do peptídeo MP1 em monocamadas lipídicas formadas por DMPS em água (símbolo aberto) e em 150 mM NaCl (pH 7,4) (símbolo fechado) e formadas por POPS em 150 mM NaCl (7,4) (triângulo fechado). Máxima variação da pressão superficial ($\Delta\pi$) em função da pressão inicial (π_i) após a injeção de 1,25 μ M de peptídeo em água pura. As linhas contínuas representam o ajuste linear.

4.4 Impacto do peptídeo Polybia-MP1 em membranas lipídicas contendo PS

4.4.1 Visualizações de GUVs por microscopia de fluorescência e confocal

A Fig. 4.39 mostra, por meio de imagens de contraste de fase, o efeito de MP1 em GUVs de POPC/POPS marcadas com 0,5 mol% de NBD-PE. A primeira sequência são imagens de fluorescência e a segunda de contraste de fase. A primeira imagem à esquerda mostra a vesícula na ausência de peptídeo e as imagens seguintes foram obtidas após a adição do peptídeo. As imagens de fluorescência indicam que o peptídeo induz a formação de regiões densas e pontos fluorescentes sugerindo a formação de domínios ou agregados peptídeo/lipídio.

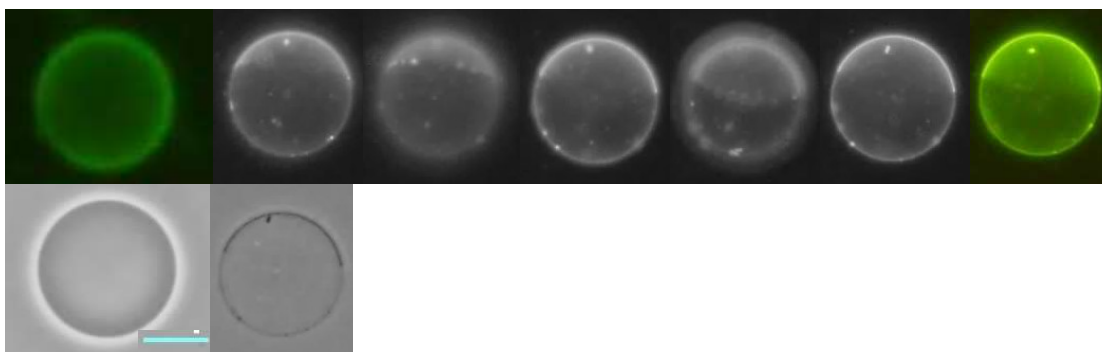


Figura 4.39: Imagens de fluorescência (primeira sequência) e contraste de fase (segunda sequência) de GUVs compostas por POPC/POPS (3/1) após a adição de 10 μ M de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado.

A Fig. 4.40 mostra imagens capturadas, no decorrer do tempo, após a adição do peptídeo, na câmara de observação, em GUVs formadas por DOPC (A) e DOPC/BSM/Chol (3:3:1) (B) visualizados por microscopia confocal. Como pode ser observado, as imagens de GUVs formadas por DOPC/DSM/Chol mostraram inicialmente coexistência de fases líquido-líquido, com uma fase rica em DOPC (Ld) e uma rica de Chol (Lo). Na presença do peptídeo (Fig. 4.40B), nenhuma mudança na forma dos domínios ordenados ou na membrana foi observada.

Por outro lado, quando lipídio aniônico, POPS, foi incluído na membrana (DOPC/POPS (3:1 molar ratio)), foi observado influxo constante do marcador CF (Fig. 4.41A). A permeação do marcador nas GUVs após a adição do peptídeo é mostrada na Fig. 4.41B. Na ausência de MP1 nenhuma mudança significativa foi observada no interior das GUVs durante 60s (dados

não mostrados). O influxo também foi verificado pela perda do contraste de fase devido à mistura de sacarose (interior das GUVs) e tampão (fora das GUVs) sem romper a membrana.

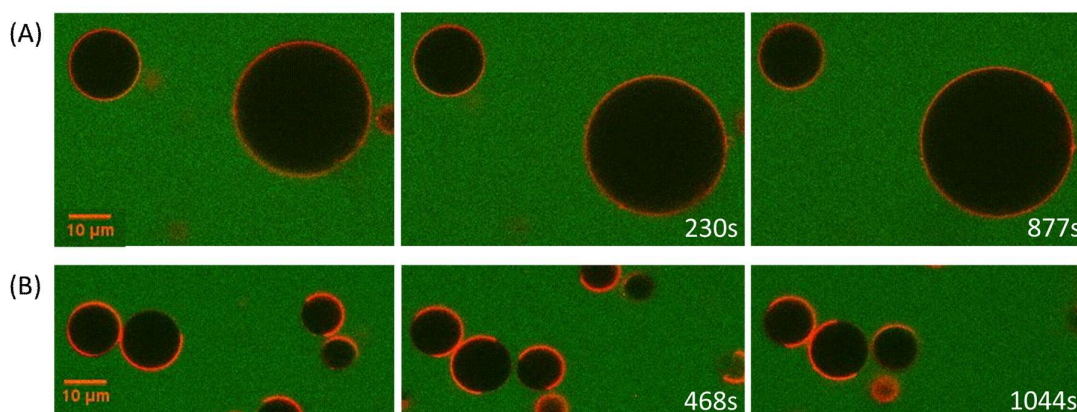


Figura 4.40: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC (A) ou DOPC/SM/Chol (3:3:1 molar ratio) após a adição de 2 μM of MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha).

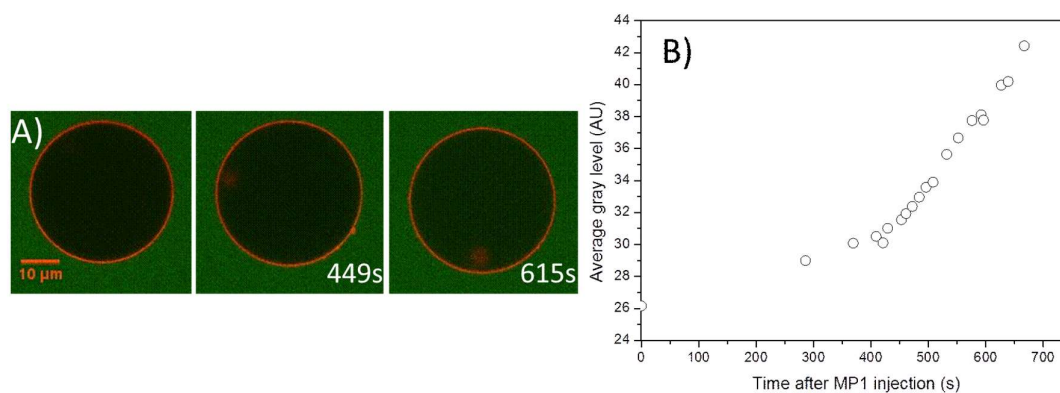


Figura 4.41: A) Imagens de microscopia de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC/POPS (3:1) após a adição de 2 μM de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha). B) Cinética de influxo do marcador de dentro das GUVs após a adição do peptídeo MP1.

Para averiguar a estabilidade do poro ou defeito na membrana, o seguinte experimento foi realizado: como o marcador fluorescente, CF, sofre significativo “photobleaching”, as imagens foram capturadas a cada 1 min para evitar a foto-degradação do marcador. Após o influxo completo para formação do poro ou defeito, ou seja, as vesículas estavam

completamente preenchidas, as imagens foram capturas a cada 2,34 s. Nesta taxa e com a potência do laser de argônio 488, o marcador CF, intacto dentro das GUVs, foi totalmente “apagado” (Fig.4.42A mostra esse controle). Após o marcador ser totalmente apagado, as imagens foram capturadas a cada 1mim, e o influxo total do marcador foi novamente observado (Fig. 4.42B).

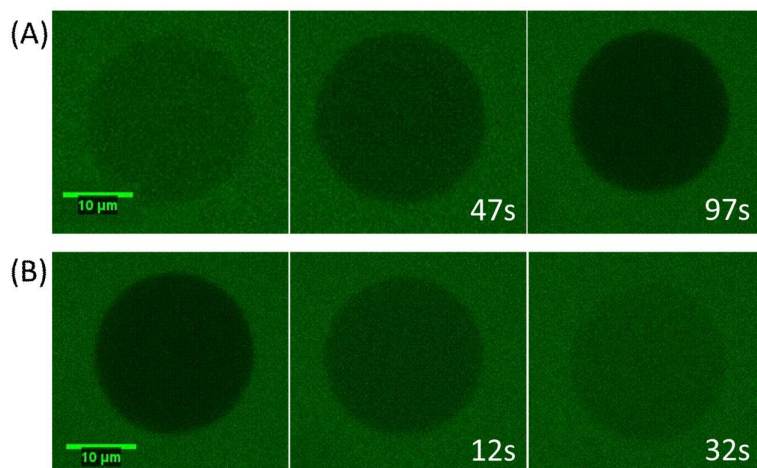


Figura 4.42: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC:POPS (3:1) e MP1 durante “bleaching” (A) e recuperação da fluorescência após “bleach” (B).

Em GUVs compostas por DOPC:POPS:BSM:Chol (2.1:0.9:3:1) foram expostas ao MP1 (Fig. 4.43) o peptídeo provocou entrada limitada de CF e induziu a formação de regiões densas na membrana e induziu a formação de regiões densas de lipídios e/ou lipídio/peptídeo.

A fim de investigar em que fase o peptídeo particiona, foram realizados experimentos com peptídeo marcado. A Fig. 4.44A mostra que quando FITC-MP1 foi adicionado a GUVs de DOPC ou DOPC:BSM:Chol (dados não mostrados) o peptídeo ligou-se a membrana sem afetar sua integridade. Em GUVs compostas por DOPC/POPS (Fig. 4.44B), FITC-MP1 também ligou-se a membrana. Por outro lado, em GUVs de DOPC:POPS:BSM:Chol (Fig. 4.44C) FITC-MP1, foi observado exclusivamente na região líquido-desordenada da membrana destas vesículas. Esses resultados estão de acordo com trabalho prévio no qual foi mostrado que este peptídeo é capaz de adsorver em vesícula unilamelares grandes compostas por POPC adotando conformação helicoidal (Leite et al. 2014).

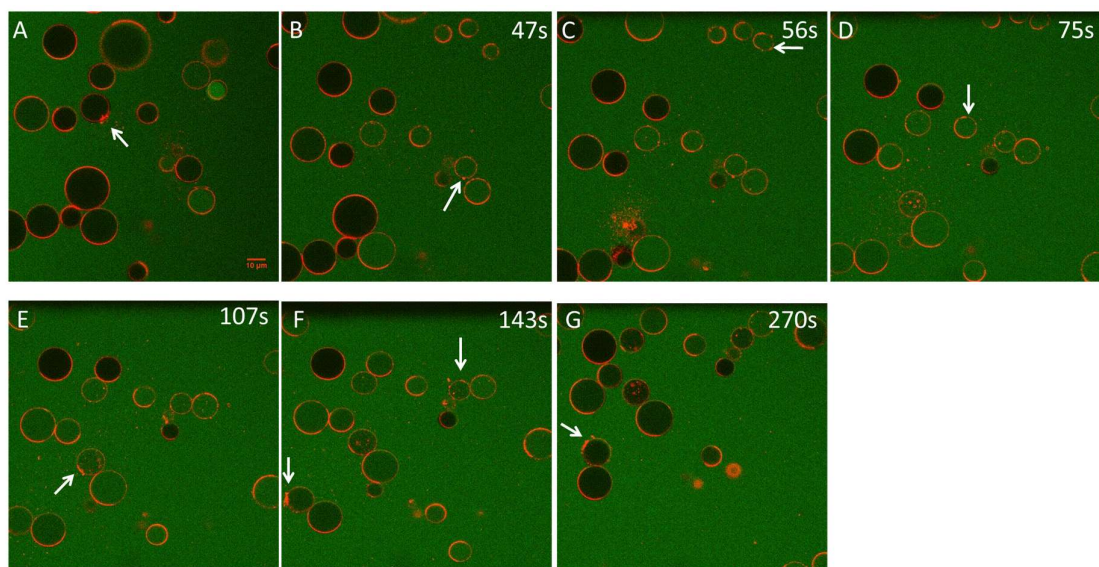


Figura 4.43: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC:POPS:BSM:Chol (2.1:0.9:3:1) após a adição de MP1. A primeira imagem de cada sequência representa o tempo 0, quando o peptídeo foi injetado. Cada imagem é uma superposição de dois sinais de fluorescência adquiridos simultaneamente da carboxifluoresceína (cor verde) e ceramida Bodipy-TR (cor vermelha). (A-G) Sequência de influx de CF induzido por 2 μM de MP1. Setas indicam os domínios/defeitos induzidos pelo MP1.

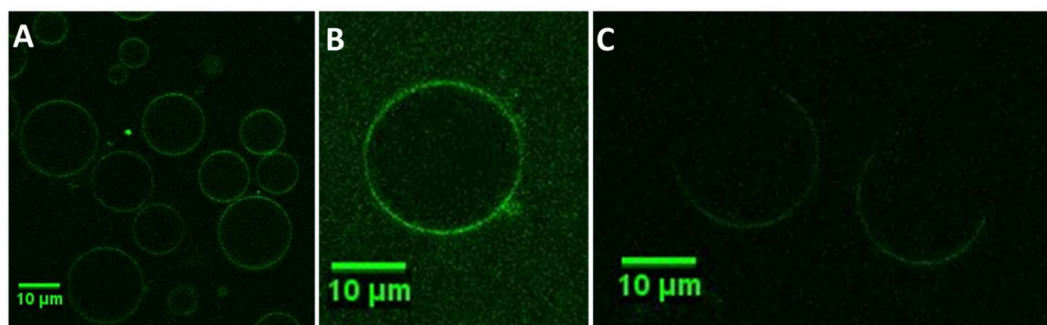


Figura 4.44: Imagens de fluorescência confocal de GUVs compostas por DOPC (A), DOPC:POPS (3:1) (B) e DOPC:POPS:BSM:Chol (2.1:0.9:3:1) (C) após a adição de 2 μM de peptídeo marcado com MP1 FITC.

4.4.2 Análise do efeito do peptídeo no comportamento termotrópico de membranas lipídicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

4.4.2.1 Mistura POPC/DPPS

O sistema binário investigado contendo fosfatidilserina foi POPC/DPPS. Estes dois fosfolipídios são caracterizados por temperaturas de transição de fase gel-líquido-cristalina bastante diferentes POPC $\rightarrow T_m = -10^\circ\text{C}$ e DPPS $\rightarrow T_m = 52,5^\circ\text{C}$. A diferença de cadeias acíclicas pode resultar em não idealidade da mistura, ou seja, imiscibilidade em algumas composições. Desta forma, inicialmente foi investigada a transição de fase para diferentes composições lipídicas para determinar em qual composição a mistura é miscível para posteriormente investigar o efeito do peptídeo. O comportamento termotrópico foi investigado utilizando vesículas multilamelares (MLVs) que foram obtidas hidratando o filme lipídico com tampão (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, pH=7,4). O termograma para MLVs de DPPS puro mostra um pico endotérmico fino centrado em $52,5^\circ\text{C}$, Fig. 4.45. O acréscimo de POPC em frações de 10 %molar induz redução da T_m . Nas composições de POPC de 20 a 60 mol% além do pico da transição principal apareceu um ombro em temperatura mais alta, com conseqüente alargamento do pico, sugerindo imiscibilidade entre os lipídios. O termograma da composição POPC/DPPS (70:30) apresentou um único pico largo, e para 80:20 existem dois picos em $22,5$ e 40°C .

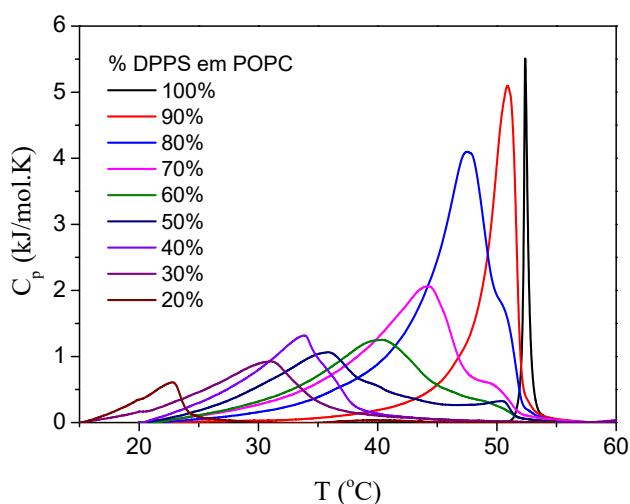


Figura 4.45: Termogramas da mistura POPC/DPPS obtidos para vesículas multilamelares (MLVs) em diferentes frações molares de DPPS, concentração total de lipídio = 2,5 mg/ml, a $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$.

A mistura na composição 70:30 foi utilizada para investigar o efeito do peptídeo MP1 por ter quantidade de fosfatidilserina mais realista, do ponto de vista biológico, que as composições 10:90. A adição de MP1 na razão L/P=30 na hidratação do filme lipídico para formação de MLVs induz o aparecimento de uma transição principal centrada em 20 °C e dois ombros centrados em 12 e 25 °C, Fig. 4.46A. O comportamento termotrópico também foi investigado utilizando vesículas unilamelares grandes (LUVs) na proporção 70:30 (Fig. 4.46B). Esse sistema apresentou temperatura de transição de fase em 28 °C. Neste caso, para melhor mimetizar o evento biológico, o peptídeo foi adicionado nas vesículas já formadas na razão [L]/[P] = 40. A adição de MP1 nas LUVs induziu o aparecimento de duas transições centradas em 24 e 19,7 °C (Fig. 4.46B).

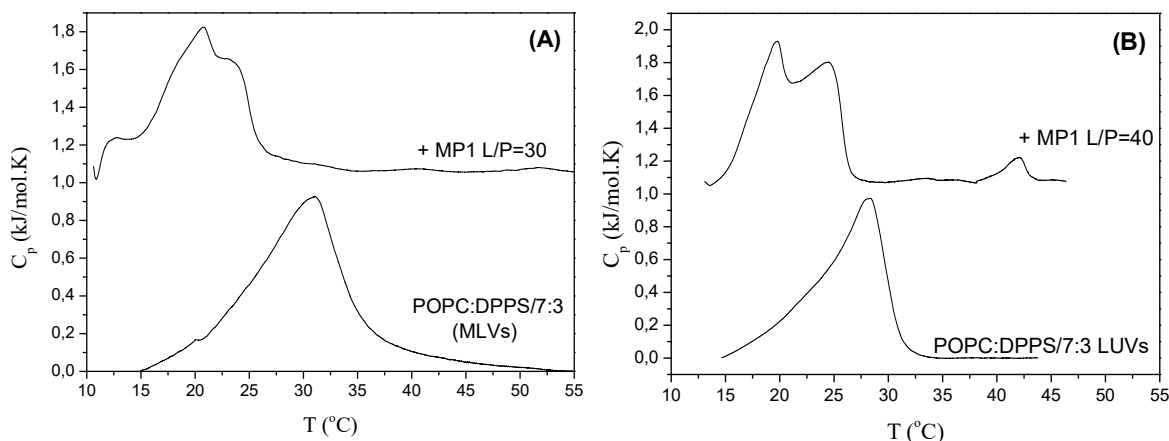


Figura 4.46: Termogramas da mistura POPC/DPPS (70:30) para: (A) MLVs na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão [L]/[P] = 30 adicionada na hidratação do filme lipídico de MLVs. (B) LUVs na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão [L]/[P] = 40 adicionado nas vesículas formadas.

4.4.2.2 Vesículas de DPPS

O impacto do peptídeo também foi investigado em vesículas de DPPS (Fig. 4.47). A adição de MP1 na razão L/P = 14 na hidratação do filme lipídico para a formação de MLVs induziu o aumento da temperatura de transição de fase de 51 para 55 °C quando as vesículas foram formadas apenas pela adição de MP1 em água. Em 150 mM NaCl, termogramas mostraram diminuição da T_m para 35 °C. Estes resultados indicam que o peptídeo estabiliza as vesículas em água e na presença de sal, estabiliza a fase fluida.

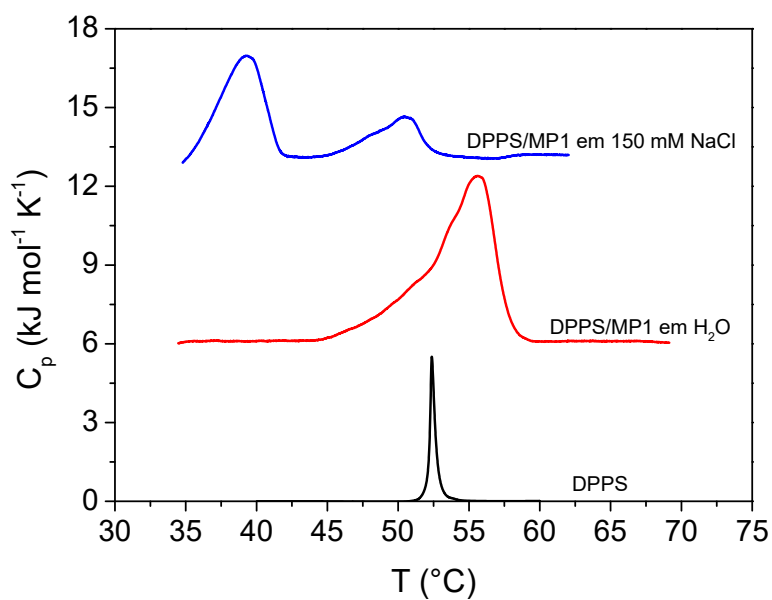


Figura 4.47: Termogramas de MLVs de DPPS na ausência e na presença do peptídeo MP1 na razão $[L]/[P] = 14$ adicionado na hidratação do filme lipídico de MLVs. As vesículas foram hidratadas com solução de peptídeo diluído em água e em 150 mM NaCl.

CAPÍTULO 5

Discussão

A caracterização de filmes do peptídeo mostrou significativa atividade interfacial em ambas as subfases estudadas, água e solução aquosa de 150 mM NaCl. Valores de pressão de colapso e potencial de superfície similares aos encontrados para MP1 foram atribuídos para peptídeos helicoidais (Maget-Dana 1999) como bombolitina (Signor et al. 1994) e LL-37 (Neville et al. 2006) que também formam monocamadas estáveis na interface água-ar. Neste sentido, uma estrutura helicoidal é esperada para MP1 acomodar-se na monocamada, uma vez que, esta é estrutura deste peptídeo quando adsorvido em vesículas zwitteriônica (PC) e aniônicas (PC/PG 7:3) com frações de hélice de 83% e 85%, respectivamente, determinadas por dicroísmo circular (Leite et al. 2014). O peptídeo é hidrofílico com hidrofobicidade média $\langle H \rangle = 0,11$ e momento hidrofóbico por resíduo $\mu = 0,29$, que caracteriza um peptídeo helicoidal de superfície (Eisenberg et al. 1984). O valor de μ para MP1 bem como sua anfipaticidade são responsáveis mais prováveis para a atividade superficial do peptídeo na interface água-ar. Assumindo uma estrutura helicoidal, a organização mais esperada do peptídeo adotando esta estrutura é mostrada na Fig. 4.1B (imagem inserida).

As áreas moleculares médias para MP1 em baixa e alta pressão de superfície foram 200 Å² (em 5 mN/m) e 160 Å² (em 15 mN/m), enquanto que em 150 mM NaCl, esses valores deslocaram para 280 Å² (em 5 mN/m) e 250 Å² (em 15 mN/m). A fim de obter informações sobre a possível orientação do peptídeo na interface, uma estimativa da área ocupada por um segmento helicoidal com o eixo da hélice orientado paralelo e perpendicular à interface foi realizada como segue: a área teórica ocupada por um segmento helicoidal com o eixo paralelo a superfície pode ser estimada como o produto do diâmetro da hélice de 15 Å, considerando as cadeias laterais (Ambroggio et al. 2004)) pelo comprimento por aminoácido 1,5 Å = 22,5 Å². Assim, para um peptídeo com 14 resíduos, a área seria de 22,5 Å² x 14 ≈ 315 Å². Por outro lado, a área teórica de uma α -hélice orientada perpendicularmente à interface assumindo o mesmo diâmetro helicoidal médio, mencionado acima, seria de aproximadamente 177 Å² ($\pi \times 7,5^2$ Å²). A comparação destes valores com a área molecular média obtida experimentalmente, sugeriram que o eixo da hélice estava orientado perpendicularmente às duas interfaces, como

previamente observado para outros peptídeos como Aurein 2,3 (Mura et al. 2013), Maculatin e Citropin (Ambroggio et al. 2004). O maior valor de área molecular média para os peptídeos em solução contendo NaCl, juntamente com o menor valor do potencial de superfície sugerem que a inclinação das moléculas foi diferente na subfase de 150 mM NaCl.

O potencial de superfície é um parâmetro complexo em que o valor resulta da contribuição do dipolo/multipolo molecular, da hidratação e dos íons na interface. A diminuição do potencial de superfície em subfase iônica comparado com água pode ser devido às distintas orientações dos dipolos moleculares (dos resíduos e das ligações amídicas do “backbone” do peptídeo) e/ou à reorientação das moléculas de água somada ao potencial gerado pela dupla camada iônica, uma vez que neste pH o peptídeo possui cargas locais e também uma carga líquida (Gaines 1966). Todos estes fatores contribuem de uma maneira muito complexa para o valor do potencial de superfície, e assim, não é possível avaliar por meio destes valores a orientação precisa do peptídeo em cada condição, tampouco qual grupo terminal do peptídeo, carboxílico ou amino, estava em contato com a água, ou se havia metade da população em cada orientação.

A presença de dois resíduos de ácido aspártico concomitantemente com três lisinas e o C-terminal amidado no peptídeo MP1 confere uma carga líquida +4e em pH 2 e +2 em pH 4, 7,4 e 10. Nas isotermas obtidas em 150 mM NaCl com pH ajustado para 2, 4, 7,4 e 10 o peptídeo ocupou maior área molecular média em pressões de superfície comparáveis em todas as condições e a pressão de colapso do filme de peptídeo em pH 2 foi observada em 11 mN/ (Fig. 4.3), sugerindo que as interações peptídeo-peptídeo foram mais atrativas na ausência de sal e em pH neutro e em pH 2 interações repulsivas peptídeo-peptídeo foram maiores que nos demais pH.

5.1 Interação do peptídeo com monocamadas lipídicas na interface água-ar: influência do comprimento da cadeia acíclica e da estrutura química do grupo polar.

5.1.1 Efeito do comprimento das cadeias acíclica

Filmes de DPPC apresentam transição de fase LE-LC em 4 mN/m, nas condições estudadas. Para monocamadas mistas de DPPC/MP1 em água desvios positivos da idealidade foram observados em todas as pressões de superfície analisadas, indicando que as interações

peptídeo-lipídio são menos atrativas do que as interações peptídeo-peptídeo e lipídio-lipídio; e indica ainda, que existe pelo menos mistura parcial dos componentes. Este resultado está de bom acordo com o aumento observado em π_t (Fig. 4.6A) na presença de MP1 que indica uma mistura parcial de peptídeo com fosfolipídio em água. O aumento em π_t também indica uma mistura preferencial de peptídeo e lipídio na fase LE, estabilizando desta maneira, esta fase em relação a fase LC (Lösche and Möhwald 1984; Miller and Mohwald 1987).

Para monocamadas de DPPC em 150 mM NaCl, nenhum desvio foi observado da regra da aditividade, sugerindo miscibilidade ideal ou imiscibilidade total entre os componentes do filme. Miscibilidade ideal é, no entanto, pouco provável considerando as diferenças de tamanho e propriedades do peptídeo comparado com as moléculas de lipídio. Além disso, como já indicado, a presença de MP1 não altera a pressão de transição de DPPC em 150 mM NaCl (Fig. 4.6A), indicando que o peptídeo não mistura com DPPC nas fases LE ou LC. Estes resultados podem indicar, também, que a energia de mistura é similar em ambas as fases, não induzindo, assim, mudança no valor de π_t . Esta última hipótese é ainda pouco provável, considerando as diferentes características entre as moléculas de MP1 e DPPC, sugerindo imiscibilidade completa entre estas moléculas em 150 mM NaCl, não favorecendo a interação hidrofóbica peptídeo-lipídio.

A cabeça polar e o comprimento das cadeias acíclicas dos fosfolipídios têm efeito pronunciado na temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina, na área molecular e na pressão de transição LE-LC (Kaganer et al. 1999). Neste sentido, DMPC possui o mesmo grupo polar que DPPC, porém 2 átomos de carbono a menos em cada cadeia acíclica. Na temperatura em que os experimentos foram realizados, 20 °C, as cadeias acíclicas do DMPC por estarem na fase fluida possuem maior grau de liberdade e ocupam maior área comparada com DPPC nesta temperatura. Desta maneira, moléculas de DMPC são menos compactas e menos ordenadas do que moléculas de DPPC exibindo apenas a fase LE durante toda a compressão.

As isotermas da mistura DMPC/MP1, em água e em 150 mM NaCl, mostraram expansão da área molecular média e aparecimento de um platô de exclusão do peptídeo do filme nas pressões de superfície de 18 e 24 mN/m, respectivamente, próximas às observadas para a mistura DPPC/MP1. A principal diferença da presença do peptídeo nas duas monocamadas, DMPC e DPPC, é o fato de que a exclusão total do peptídeo das monocamadas de DMPC é mais lenta do que em DPPC. Ou seja, como as isotermas de compressão foram comprimidas com a mesma taxa de $0,04 \text{ \AA}^2 \text{ molécula}^{-1} \text{ s}^{-1}$ apesar da exclusão iniciar praticamente nas mesmas pressões de superfícies, a acomodação do peptídeo é mais favorável em monocamadas de

DMPC, em que a exclusão total foi observada nas pressões de 25 e 32 mN/m em água e em 150 mN NaCl, respectivamente ao passo que em DPPC as pressões foram 23 mN/m em água e 25 mN/m em 150 mN NaCl. A maior pressão de exclusão total do peptídeo também pode indicar que o peptídeo induz maior perturbação na organização molecular do filme. Como as monocamadas de DMPC e MP1 puros encontram-se no mesmo estado fluido durante toda a compressão, a miscibilidade, pelo menos parcial, entre MP1 e DMPC é favorável em ambas as subfases. Como em água a interação peptídeo-peptídeo é mais favorável do que a interação DMPC-MP1 quando a pressão de colapso do filme peptídico é alcançada o peptídeo é excluído da monocamada lipídica. Em contrapartida, em 150 mM NaCl as interações MP1-MP1 são enfraquecidas e MP1 interage com as cadeias acíclicas impactando no empacotamento lipídico, e assim, maior pressão lateral é necessária para excluir o peptídeo do filme lipídico. Para monocamadas de DPPC em água e em 150 mM NaCl a presença do peptídeo aumentou a compressibilidade do filme somente quando estavam sendo expulsos para a subfase (Fig. 4.5). Em 150 mM NaCl, as interações peptídeo-peptídeo são enfraquecidas e além da fase LC em que se encontra o lipídio, DPPC possui 2 átomos de carbono a mais em cada cadeia acíclica o que favorece as interações hidrofóbica DPPC-DPPC em relação as interações DPPC-MP1 dificultando a perturbação das cadeias acíclicas e favorecendo a exclusão do peptídeo da interface.

As imagens de BAM para monocamadas de DMPC/MP1 mostraram que a presença do peptídeo não induziu a reorganização das moléculas lipídicas na interface que resultasse na formação de domínios sólidos. Indica também que as moléculas do filme (peptídeo e lipídio) são, pelos menos, parcialmente miscíveis. Em toda a compressão a refletividade do filme misto ficou igual à do filme de lipídio puro, o que indica que ambas as monocamadas, lipídio puro e lipídio/peptídeo encontram-se no mesmo estado líquido expandido, em água e em 150 mM NaCl (Fig. 4.16C e E).

Para DPPC em água, imagens de BAM e FM mostraram que na presença de peptídeo a nucleação dos domínios ocorreu em pressões de superfície maiores e os domínios apresentaram estruturas mais ramificadas e formas alongados comparados aos domínios formados em filmes de lipídio puro. A área formada pela fase mais fina (regiões escuras e fluorescentes nas imagens de BAM e FM, respectivamente), em pressões de superfícies comparáveis, foram maiores na presença de peptídeo somente no início da nucleação, indicando que o peptídeo tem preferência pela fase LE e com o aumento da pressão peptídeo devem estar nos domínios sólidos. Neste

sistema o uso das técnicas de FM e BAM permitiu obter as mesmas informações indicando que o lipídio fluorescente utilizado para FM não se comportou como uma impureza.

Em 150 mM NaCl, os resultados mostrados na Fig. 4.12, indicam que o peptídeo estava localizado na região escura junto com os lipídios na fase LE, aumentando, desse modo, a quantidade dessa região, mas sem misturar com o lipídio. Caso contrário, os valores de π_t não permaneceriam constantes (ver Fig. 4.6A) e a área molecular média, provavelmente, deveria desviar da idealidade, porém incompatível com o comportamento ideal observado na Fig. 4.6B.

A comparação dos dados obtidos das imagens (Fig. 4.9) com aqueles calculados, como explicado na tabela 1, sugere que os domínios LC foram formados por DPPC somente, enquanto que nas regiões escuras havia, praticamente, só MP1 em 15 mN/m. A área calculada ocupada por lipídios foi ligeiramente maior do que a área ocupada pela região clara, e assim, algumas moléculas de lipídio permaneceram com o peptídeo na região escura até estes serem expelidos para a subfase. Em contrapartida, em água pura, os resultados indicaram que domínios incorporaram peptídeo, uma vez que o lipídio sozinho ocuparia áreas menores do que a área correspondente à região clara.

No caso de domínios condensados formados em equilíbrio com a fase fluida, muitos estudos indicaram (Fischer et al. 1984; Weis and McConnell 1984; Miller et al. 1986; Keller et al. 1986; Vanderlick and Mohwald 1990) que a forma dos domínios é determinada por uma competição entre a tensão de linha e a diferença de momento de dipolo entre a fase LE e os domínios, e que formas como “flores” são assumidas para domínios maiores do que um raio crítico (Weis and McConnell 1984). Domínios de DPPC formados após a adição de 7,2 mol% de MP1 eram rígidos, sem relaxação de forma visível durante o experimento em escala de minutos. As imagens de AFM mostraram que os domínios assumiram uma forma ramificada desde o primeiro estágio de crescimento dos domínios, e não apenas quando o raio crítico foi atingido (Fig. 4.10 B e C). Para domínios rígidos, Krüger e Losche introduziram um terceiro termo no balanço energético além das energias interfacial e eletrostática. Este termo é relacionado às interações intermoleculares orientadas (quirais) que predizem uma forma de domínio curvada (Krüger and Lösche 2000). Este modelo indica que a repulsão eletrostática entre as moléculas no interior dos domínios não é suficiente para o desenvolvimento da formação de domínios alongados. Domínios curvados, com uma orientação preferencial de crescimento, somente aparecem se as moléculas adotarem orientações preferenciais dentro dos mesmos quando eles crescem. Considerando esta afirmativa, pode-se sugerir que quando os domínios crescem em água, eles incorporam ambos, DPPC e MP1, cada um deles com uma

orientação preferencial, levando a estruturas (“braços”) finas com direções preferenciais de crescimento.

As interações eletrostáticas atrativas entre as moléculas de peptídeo são aquelas entre os resíduos aniônicos (ácido aspártico, D2 e D8) e os resíduos catiônicos (lisinas, K4, K5 e K11). Em áreas moleculares médias elevadas (maiores do que “lift-off”) estes resíduos podem ser blindados pela presença de NaCl ou NaBr. O aumento da concentração de sal resulta na ligação de contra-íons aos resíduos carregados, e conseqüentemente, levando ao aumento gradual da quantidade de peptídeo neutralizado pelo contra-íon diminuindo, deste modo, as interações atrativas peptídeo-peptídeo. Uma vez que o filme tornou-se compacto, a acessibilidade dos íons da subfase aos resíduos carregados provavelmente diminuem. Para averiguar se há interação entre íons e peptídeos durante todo o processo de compressão ou somente quando os peptídeos estão distantes um dos outros o seguinte experimento foi realizado: filmes de peptídeos foram preparados em água pura e comprimidos até 3 ou 15 mN/m. Assim que uma destas pressões laterais foi atingida, o valor foi mantido constante e 5 mL da solução de NaCl 6 M foram adicionados a subfase (volume de 180 mL) com uma microseringa resultando em uma concentração de NaCl de 160 mM na subfase. Medidas de área, a pressão de superfície constante, mostraram variação desprezíveis (similar ao controle quando 5 mL de água pura foi adicionada na subfase), indicando que os íons da subfase não foram capazes de penetrar na interface e blindar os resíduos carregados quando o filme estava compacto, e então, nenhum aumento na área molecular foi observado após a adição de solução salina nas duas pressões de superfície, 3 e 15 mN/m.

Visto que a presença de ânions na subfase desempenha papel importante na topografia de filmes lipídicos (Aroti et al. 2004) experimentos realizados na presença de NaBr mostraram resultados similares aos obtidos em NaCl, indicando que o efeito de ânions foi decorrente de blindagem não-específica das cargas do peptídeo.

Estes resultados sugeriram que interações atrativas observadas entre as moléculas de peptídeo em água são relacionadas a pontes salinas entre os pares D2-K4/K5 e D8-K11 se todos os peptídeos possuírem a mesma orientação na interface, ou entre os pares D2-K11 e D8-K4/K5 se os peptídeos adotarem orientações antiparalelas. Somente quando estas pontes salinas são formadas entre os peptídeos, MP1 se mistura com DPPC sugerindo, desse modo, que um rearranjo peptídeo-peptídeo específico é necessário para que ocorra interações favoráveis lipídio-peptídeo. Quando os peptídeos estão próximos, estes resíduos com cargas opostas induzem orientações preferenciais das moléculas no cristal durante o crescimento dos domínios.

Cada novo peptídeo incorporado ao domínio em crescimento se unirá preferencialmente com seus resíduos negativos a outro peptídeo que expõe os resíduos positivos, resultando em domínios com formas ramificadas. Com esse rearranjo peptídeo-peptídeo, a região hidrofóbica do peptídeo fica disponível para fazer contatos hidrofóbicos com as cadeias acíclicas do DPPC e favorece a interação hidrofóbica DPPC/MP1 (ver a posição dos resíduos amarelos na imagem inserida na Fig. 4.1B). Na presença do peptídeo, os domínios mantêm orientações preferenciais das ramificações curvadas, indicando que mesmo quando os domínios são uma mistura de DPPC e MP1, as interações quirais DPPC-DPPC permanecem, como previamente observado para mistura de DPPC/copolímero (Scholtysek et al. 2015).

Considerando que o comportamento do peptídeo em monocamadas de peptídeo puro é o mesmo que em monocamadas mistas DPPC/MP1, em 150 mM NaCl, pH 7,4 os resíduos carregados ligaram-se aos contra-íons quando o peptídeo estava em áreas moleculares maiores que “lift-off”, e os contra-íons permaneceram ligados ao peptídeo quando o filme se tornou compacto. Como consequência da ligação iônica, a interação entre os ácidos aspárticos e as lisinas não foi suficientemente forte, levando a uma energia livre total da interação peptídeo-peptídeo menos atrativa e então, o peptídeo permaneceu na fase menos densa quando misturado com DPPC, e foram capazes de ocupar áreas moleculares maiores. Um aumento da concentração de sal de 0,1 mM para 150 mM causa uma diminuição na proporção de resíduos carregados livres, não ligados aos contra-íons, conduzindo a uma diminuição gradual das interações atrativas entre peptídeos com diminuição simultânea da sua habilidade de se misturar com os lipídios.

Em contrapartida, em subfase ácida os domínios eram menores e mais arredondados do que em pH neutro e básico em 150 mM NaCl (ver Fig. 4.15). Isto correlaciona com o maior número de domínios em pH ácido, logo com o maior número de núcleo do que quando ocorreu a nucleação. Vega Mercado e colaboradores reportaram que quando a densidade de núcleos aumenta, a área para cada domínio diminui, levando a domínios menores e mais arredondados (Vega Mercado et al. 2012). Em um sistema com processo de nucleação clássico, a quantidade de núcleos aumenta quando a taxa de perturbação em relação a difusão do sistema aumenta. Isso implica, como era esperado, que a quantidade de domínios é maior quando a taxa de compressão aumenta ou quando a difusão dos lipídios diminui (isto é, quando a viscosidade do filme aumenta). Seguindo esta hipótese, sugerimos que no sistema analisado filmes de DPPC e MP1 em pH baixo com total ou parcial desprotonação dos resíduos de ácido aspártico, pode ser mais viscoso do que em pH neutro, no qual o peptídeo tem carga líquida +2, e básico, com

parcial desprotonação das lisinas. Porém, isso é apenas uma hipótese e a viscosidade da superfície deve ser determinada afim de completar esta explicação da topografia na solução ácida.

As Fig. 5.1 e 5.2 mostram uma ilustração do comportamento do peptídeo nas monocamadas lipídicas de DMPC e DPPC, respectivamente, em água e em 150 mM NaCl.

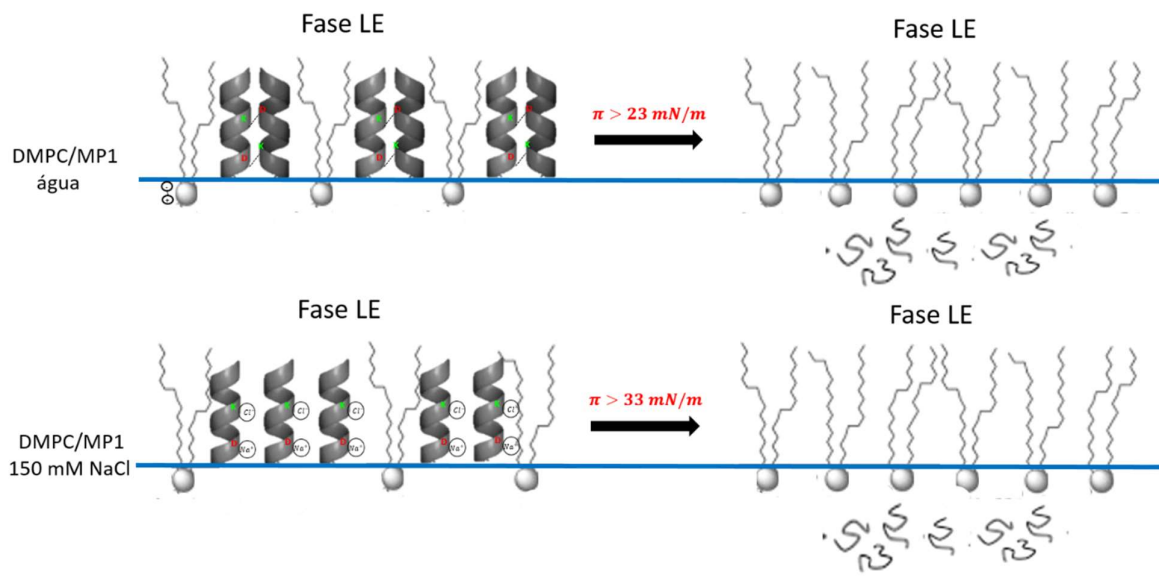


Figura 5.1: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPC em água e em 150 mM NaCl.

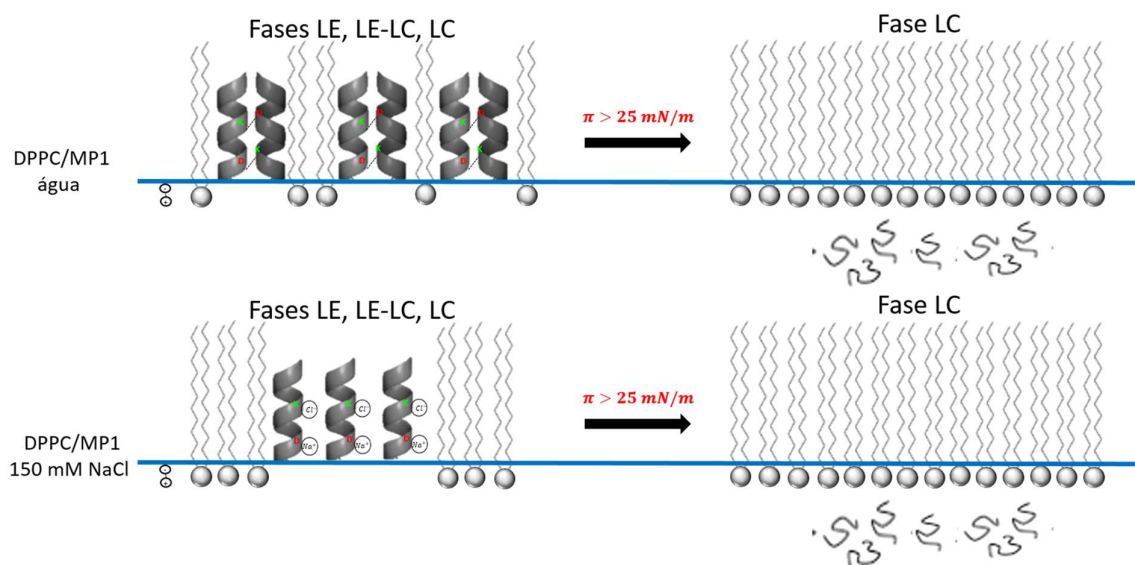


Figura 5.2: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DPPC em água e em 150 mM NaCl.

5.1.2 Efeito da cabeça polar

Fosfolipídios com a mesmo comprimento das cadeias acíclicas, mas com diferentes cabeças polares possuem diferentes características como temperatura de transição de fase, área molecular média e pressão de transição de fase LE-LC. Neste sentido, a temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina de PE é maior que de PC. Com base nesta evidência Nagle (Nagle 1976) investigou se a grande diferença nas temperaturas de transição de fase entre DPPC (41 °C) e DPPE (63 °C) pode ser explicada por interações entre as cabeças polares. Neste estudo, Nagle evidenciou que no caso do DPPC os grupos colina impedem os grupos fosfatos de ficarem próximos o suficiente para formar pontes de hidrogênio. Em contrapartida, no DPPE ligações de hidrogênio podem formar entre o nitrogênio e os oxigênios do fosfato fornecendo outra ligação que favorece o aumento da T_m . Além das diferentes temperaturas de transição de fase de PC e PE, Phillips e colaboradores (Phillips et al. 1972) constataram através de medidas de raio-X que os dipolos zwitteriônicos na lecitina (PC) são orientados perpendicularmente a bicamada resultando em interação repulsiva, ao passo que, os dipolos do PE são orientados no plano da bicamada. E ainda, através de medidas de RMN, Michaelson e colaboradores (Michaelson et al. 1974) evidenciaram que as diferentes orientações entre estes grupos polares são devido à forte interação entre os grupos amina e fosfato mediada, possivelmente, por ligações de hidrogênio, em comparação entre os grupos colina e fosfato. Com base nestes resultados, a presença da transição LE-LC observada em DMPE e ausente em DMPC, deve estar relacionada com as diferenças nas orientações e interações dos grupos polares.

Isotermas da mistura DMPE/MP1 em água apresentam, em comum com misturas DPPC/MP1 e DMPC/MP1 nas mesmas condições, o aparecimento de um platô na pressão correspondente à pressão de colapso do filme de peptídeo puro, porém sem desvio da idealidade. Em 150 mM de NaCl, o comportamento foi diferente dos observados para DMPC e DPPC, com o aparecimento de 3 platôs, um correspondente à transição LE-LC e os demais a exclusão do peptídeo do filme.

Assim como DPPC, DMPE apresenta região de coexistência de fase LE-LC, mas com domínios sólidos em forma de “dentritos” em ambas as subfases estudadas (Fig. 4.22) A forma dos domínios depende do tipo de lipídio, da composição da subfase, temperatura, e cinética de crescimento (Heckl et al. 1986; Miller et al. 1986; Vanderlick and Möhwald 1990). Na presença de MP1, em água, foram observados domínios com estruturas mais ramificadas e aumento da fase fluida, indicando a preferência do peptídeo por esta fase. A forma dos domínios é

determinada pela competição entre tensão de linha e diferença de momento de dipolo entre as fases LE e LC. De acordo com o modelo teórico proposto por McConnell (McConnell 1990), domínios alongados ou ramificados ocorrem devido ao efeito de interações eletrostáticas repulsivas que agem para maximizar a repulsão do centro de nucleação induzindo formas alongadas, enquanto que a tensão de linha favorece a formação de domínios com o contorno arredondado. A hipótese é que, em água as interações atrativas peptídeo-peptídeo são mais favoráveis que peptídeo-lipídio e então, ocorre uma separação de fase, uma fase rica de peptídeo e outra rica de lipídio. Os domínios lipídicos crescem até um raio crítico, e a presença de domínios peptídicos na região LE altera a escala de tempo da cristalização, e o crescimento do cristal ocorre em vários estágios (mais fractais) (Miller and Mohwald 1987; Vanderlick and Mohwald 1990).

Por outro lado, na presença de 150 mM NaCl, foi observado maior número de núcleos que pode ser explicado pela redução da tensão de linha diminuindo a energia livre necessária para a formação de um núcleo. Como em 150mM NaCl as interações peptídeo-peptídeo são enfraquecidas, nossa hipótese é que o aumento da quantidade de peptídeo difundido na fase fluida durante a compressão aumenta a viscosidade do meio mudando as propriedades reológicas da fase fluida. Desta maneira, novos lipídios que iram mudar de fase não irão se mover facilmente e, então, um novo domínio será gerado.

Em água a compressibilidade do filme aumentou somente durante a exclusão do peptídeo. Em contrapartida, em 150 mM NaCl na faixa de pressão entre 15 a 40 mN/m foram observados valores de módulo de compressibilidade próximos a 100 mN/m indicando alta compressibilidade do filme sugerindo alteração do empacotamento lipídico induzido pelo peptídeo.

Estudar o impacto do peptídeo em monocamadas zwitteriônicas de DMPC, que apresenta apenas fase LE durante toda a compressão, e DMPE, com coexistência de fases LE-LC, mostrou que a exclusão do peptídeo do filme não está relacionada apenas à presença da fase fluida que favorece a acomodação do peptídeo, mas as características da cabeça polar também são importantes para acomodação do peptídeo no filme misto.

A Fig. 5.3 mostra o modelo do comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPE em água e em 150 mM NaCl.

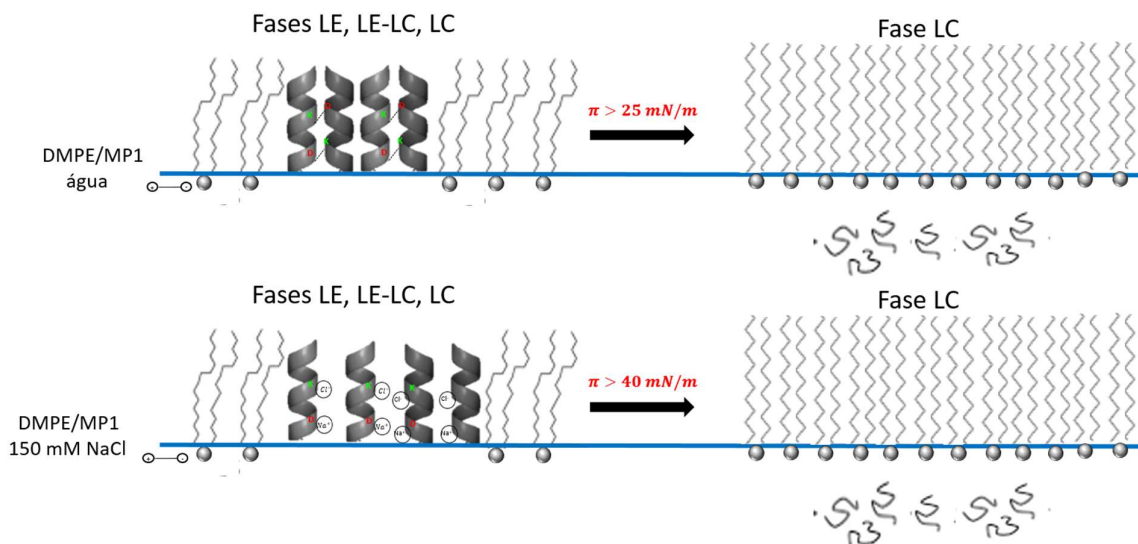


Figura 5.3: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPE em água e em 150 mM NaCl.

5.1.3 Efeitos da cabeça polar negativa

A adição de MP1 impacta de três maneiras o comportamento de fase de monocamadas de DMPS: 1) aumenta a área expandida da monocamada, verificado pelo aumento da área por molécula e maior área da região escura nas imagens de BAM, 2) induz o aparecimento de um platô de colapso irreversível de peptídeo na pressão de 15 mN/m maior do que observado para monocamadas de peptídeo puro e 3) aumenta a pressão de transição LE-LC, e portanto a pressão de nucleação dos domínios influenciando o crescimento dos mesmos. Monocamadas de DMPS apresentam domínios com estruturas em formas dendríticas assim como observado para monocamadas de DMPE. A presença de MP1 inibe a formação da fase condensada, diminuindo o tamanho médio dos domínios e aumentando a densidade de domínios. O peptídeo prefere a fase fluida, que persiste até altas pressões. O menor tamanho dos domínios condensados é resultado do aumento da quantidade de peptídeo na interface entre a fase rica de peptídeo e o domínio condensado. Aumentando a quantidade de peptídeo de 4,8 mol% para 7,2 mol% pequenos domínios amorfos foram observados na região de colapso do peptídeo (Fig. 4.34). Este resultado indica a ocorrência de novas nucleações e aumento da espessura da monocamada, como evidenciado pela maior refletividade em comparação a monocamada de lipídio puro. As interações atrativas entre MP1/DMPS são mais fortes que as interações atrativas entre MP1/MP1 e repulsivas entre DMPS/DMPS em oposição ao que foi observado

para os lipídios zwitteriônicos. Acima de 35 mN/m foi observada diminuição da área molecular média em relação a área do filme de lipídio puro (Fig. 4.31A), indicando que moléculas de lipídio e peptídeo foram excluídas do filme em um processo irreversível (Fig. 4.32B) por um possível processo de micelização.

Em 150 mM NaCl, domínios menores de forma mais arredondados foram observados nas monocamadas de DMPS indicando que os íons da subfase atuam no balanço energético diminuindo a repulsão entre os dipolos e diminuindo a tensão de linha. Além de aumentar a fase fluida a presença do peptídeo induziu maior número de núcleos e limitou o crescimento dos domínios. Visualização das monocamadas por microscopia de fluorescência mostraram domínios menores e mais arredondados do que os observados em BAM. Neste sentido, a presença do lipídio marcado, rodamina-PE, comportou-se como impureza induzindo mudanças na morfologia dos domínios.

Monocamadas de DPPS não apresentam a transição LE-LC, mas apenas G-LC, não sendo evidenciados domínios sólidos nas monocamadas durante a compressão. Em água, a presença do peptídeo nesta monocamada causa também expansão da fase LE como para DMPS. O platô de colapso de peptídeo ocorreu em pressões maiores que para monocamadas de peptídeo puro, mas menores do que para DMPS. Estes dados indicam que além de interações eletrostáticas atrativas entre PS e MP1 o comprimento maior das cadeias acíclicas diminui a interação peptídeo/lipídio. Em água, imagens de AFM mostraram a presença de domínios circulares sugerindo que MP1 é capaz de estabilizar as interações com relação às moléculas de DPPS (Fig. 4.28D). Este efeito de estabilização pode ser decorrente da blindagem das interações repulsivas entre os grupos carregados negativamente das cabeças polares das moléculas de DPPS devido à interação favorável PS/MP1. As moléculas do peptídeo acomodam-se geometricamente no filme lipídico, diminuindo a repulsão eletrostática entre as moléculas de DPPS deixando-as mais próximas umas das outras, de tal maneira que, após a sua exclusão para a subfase o peptídeo ainda permanece associado à interface aumentando a espessura do filme (ver Fig. 4.28). Analisando o módulo de compressibilidade (Fig. 4.27A) o processo de exclusão do peptídeo do filme aumenta a compressibilidade do filme e em pressões acima de 25 mN/m o filme encontra-se na fase LC.

Em 150 mM NaCl, dois platôs foram observados nas isotermas indicando que as moléculas de peptídeo foram excluídas do filme em pressões diferentes. Durante toda a compressão o módulo de compressibilidade observado não foi maior que 100 mN/m, indicando que o peptídeo perturbou o empacotamento lipídico e o filme permaneceu no estado fluido

durante toda a compressão. Nesta condição, não foi observada sobreposição das isotermas indicando que nem todas as moléculas de peptídeo foram excluídas para a subfase, ou seja, parte das moléculas de peptídeo permaneceram no filme.

A cabeça polar do fosfolipídio está localizada na interface entre o meio aquoso e a região das cadeias acíclicas. Nesta região, a ionização dos fosfolipídios e, em certos casos, os grupos carregados dos fosfolipídios geram potencial eletrostático responsável pela adsorção de íons. Em adição, as moléculas de água próximas são polarizadas, contribuindo com este potencial eletrostático. Tocanne e colaboradores (Tocanne and Teissié 1990) evidenciaram que o pKa aparente de moléculas anfífilicas sofre um deslocamento quando estas estão organizadas na interface. A mudança da micropolaridade do meio do grupo ionizável quando organizado na interface induz um deslocamento no pKa de 0,2-0,4 unidades (Tocanne and Teissié 1990). Assim, o potencial da monocamada reduziu o pKa dos grupos ácidos da cabeça polar, e consequentemente, o pH da superfície. Desta maneira, a variação do pKa resulta na diminuição do pH da superfície (Mercado et al. 2011). A organização de uma molécula ácida na monocamada na interface água-ar produz uma superfície carregada negativamente e uma dupla camada de íons próximas a superfície (Gaines 1966). Assim, prótons são atraídos e o pH próximo da interface torna-se menor do que o pH da subfase. Usando o modelo de Gouy-Chapman para monocamadas de DMPS e DPPS foram obtidos pH de superfície de aproximadamente 2,2 e 4,8 em água e em 150 mM NaCl, respectivamente sendo que a porcentagem de moléculas ionizadas é 1,6% e 86%. Para monocamadas de DMPS, assumindo que a tensão de linha permanece inalterada, o aumento da densidade eletrostática resulta em núcleos com raios críticos menores o que explicaria o aumento da densidade de nucleação observado na presença de sal na subfase (Fig. 4.34C).

Considerando os valores de pKa da lisina e do ácido aspártico sendo 10,53 e 3,86, respectivamente, com relação aos pH da subfase tanto para água quanto para 150 mM NaCl com pH ajustado para 7,4 os ácidos aspárticos encontram-se desprotonados e o peptídeo possui carga líquida +2. Em pH 2,2 e 4,8 o peptídeo está totalmente e parcialmente protonado, respectivamente. Isotermas de compressão de monocamadas de peptídeo puro em 150 mM NaCl e pH 2 indicaram uma interação peptídeo/peptídeo repulsiva evidenciado pelas maiores áreas moleculares e menor pressão de colapso comparado a água. Para DMPS em água, os peptídeos estarão neutros se estiverem associados ao DMPS ou terão carga líquida +4 o que levará ao aumento da densidade de carga na fase LE induzindo aumento da densidade de

nucleação e a diminuição do raio crítico. Esta é uma hipótese e um estudo mais aprofundado está sendo realizado.

As Fig. 5.4 e 5.5 mostram o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPS e DPPS, respectivamente, em água e em 150 mM NaCl.

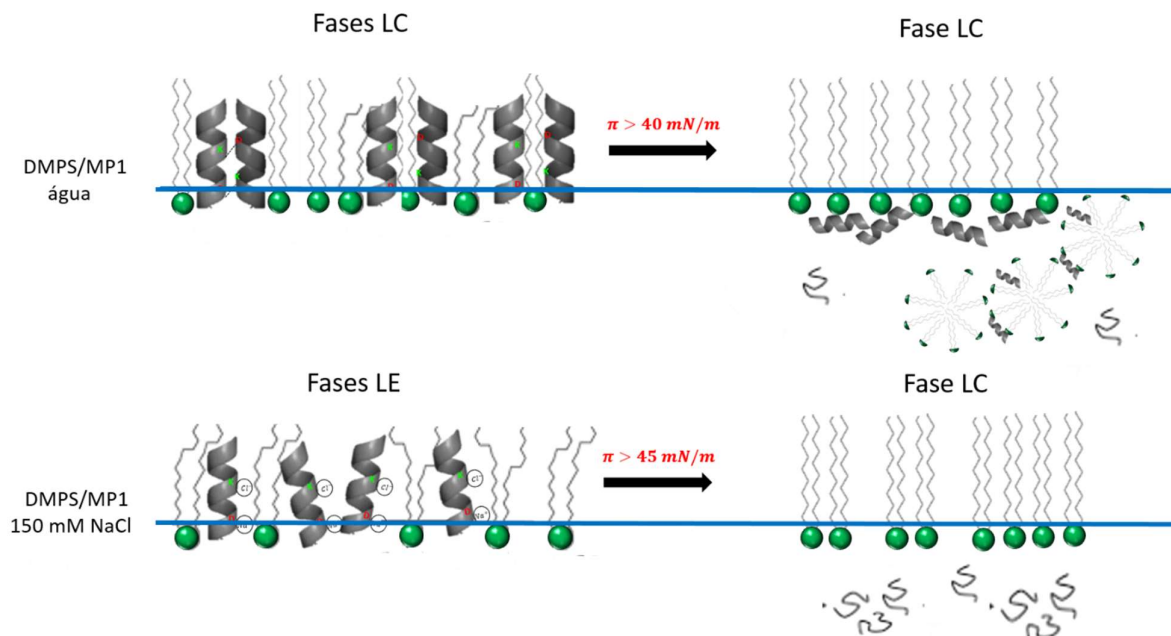


Figura 5.4: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DMPS em água e em 150 mM NaCl.

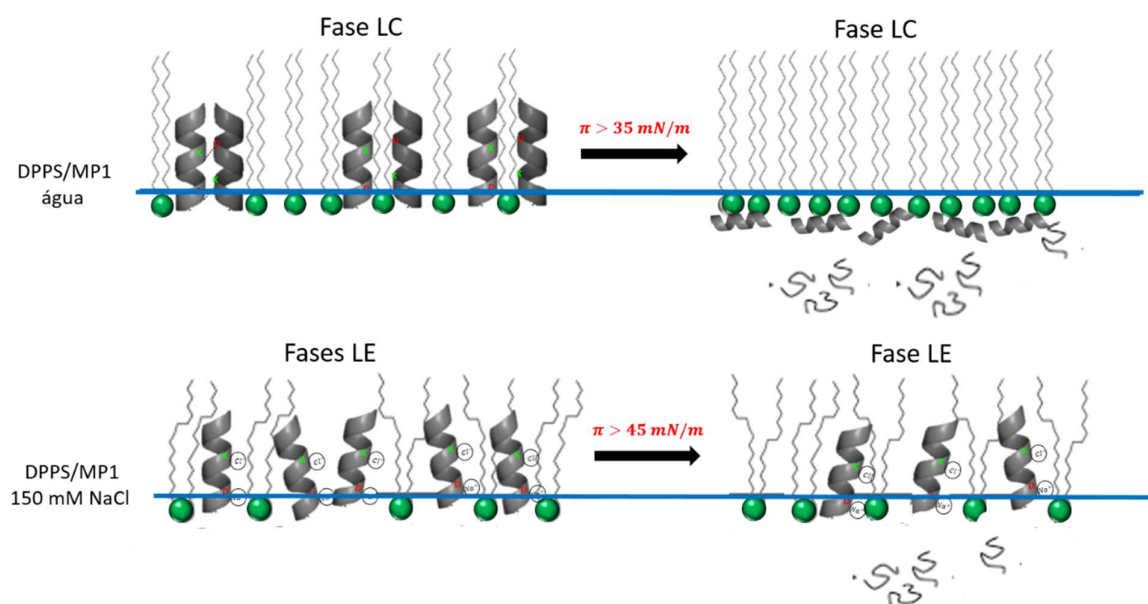


Figura 5.5: Modelo para o comportamento do peptídeo em monocamadas de DPPS em água e em 150 mM NaCl.

5.2 Afinidade do peptídeo a DMPS e DPPS

Em monocamadas de DMPS, o maior número de peptídeos associados à interface quando $\pi_i = 10$ mN/m, está relacionado à preferência do peptídeo pela fase fluida. Entretanto, o efeito de blindagem eletrostática das cargas das cabeças polares pelos íons Na^+ reduz a afinidade do peptídeo em meio salino indicando a importância das interações eletrostáticas na adsorção do peptídeo à monocamada. A monocamada de DPPS na pressão de 10 mN/m encontra-se na fase condensada tanto em água quanto em 150 mM NaCl. A maior quantidade de peptídeos associados à interface foi observada em 150 mM NaCl o que está de acordo com os dados obtidos das isotermas de compressão nas quais as moléculas de peptídeo permanecem no filme durante toda a compressão. A constante de dissociação em solução salina, $K_d = (34,2 \pm 16,1)$ nM, foi ~6 vezes maior do que em água, e em DMPS foi mais de 11 vezes maior do que a de DPPS indicando que a maior rigidez da cadeia de palmitoil comparada com miristoil impede a inserção do peptídeo à monocamada. No entanto, o número de moléculas de MP1 associadas a monocamadas de DPPS, $(1,77 \pm 0,25)$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, e de DMPS, $(1,63 \pm 0,25)$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, está dentro do erro experimental sugerindo a mesma orientação nas duas interfaces.

5.3 Inserção do peptídeo

Experimentos de inserção medem a habilidade do peptídeo de ser incorporado na interface lipídica. O valor de PMI, que está relacionado com o empacotamento lipídico, é uma medida quantitativa da qual pode-se obter informações da capacidade de inserção do peptídeo na membrana, bem como, a afinidade do peptídeo com os constituintes da monocamada. Os valores de PMI determinados em todas as monocamadas investigadas estão mostrados na tabela 5.1

Tabela 5.1 Valores de PMI (mN/m) obtidas em todas as monocamadas investigadas em água e em 150 mM NaCl.

	DPPC	DMPC	DPPE	DMPE	POPE	DPPS	DMPS	POPS
água	34	24	23	23	-	32	38,7	-
150 mM NaCl	28	35	-	32	51	28	35	42,5

O grupo polar da membrana lipídica é a primeira região da membrana em contato com o peptídeo. Consequentemente, suas propriedades químicas, especificamente as propriedades eletrostáticas e o tamanho da cabeça polar, desempenham um importante papel na seletividade do peptídeo.

5.3.1 Subfase: água

Em água, o grupo da cabeça polar do PS tem duas cargas negativas e uma positiva, enquanto PC e PE possuem uma carga positiva e uma negativa. PMI obtido para penetração do MP1 em DMPS foi de ~10 e 13 mN/m maior do que para monocamadas zwitteriônicas, DMPC ou DMPE, respectivamente, indicando que a presença das interações eletrostáticas entre o peptídeo carregado positivamente e o lipídio aniônico são dominantes. Como mostrado nas isotermas de compressão de misturas de peptídeo-lipídio em água pura indicaram que MP1 permanece na interface até a pressão de 40 mN/m na mistura DMPS/MP1 (Fig. 4.31A) e até, 23 mN/m nas misturas DMPE/MP1 e DMPC/MP1 (Fig. 4.19A e 17A, respectivamente). Assim, a maior variação de pressão superficial observada para filmes de DMPS sugere maior quantidade de peptídeo capaz de ser incorporado neste filme em comparação com DMPC e DMPE.

Em contrapartida, MP1 induz maior variação de pressão superficial em monocamadas de DPPC, PMI = 34 mN/m, do que de DPPE, 23 mN/m (Tabela 5.1). A organização lateral da monocamada de DPPC favoreceu a inserção do peptídeo. Após a incorporação na monocamada o peptídeo assume uma orientação na qual interações atrativas peptídeo-peptídeo, decorrentes desta organização específica do peptídeo na monocamada, regulando a interação peptídeo-lipídio (Alvares et al. 2015). Na faixa de pressão superficial de 5 a 25 mN/m, a configuração adotada pelas moléculas de DMPC (fase líquido-expandida - desorganizado) e DMPE (fase líquido-condensado) na interface é uma barreira para penetração do MP1, indicando que além da natureza da cabeça polar do lipídio, o estado físico da monocamada lipídica também está envolvido no processo de inserção do peptídeo.

Para monocamadas de PE, o comprimento da cadeia acíclica não alterou a penetração do peptídeo e, acima de 30 mN/m o peptídeo não é capaz de penetrar na monocamada. O mesmo comportamento, em ambas as monocamadas DMPE e DPPE, indica que não há interações específicas entre MP1 e PE ou que as interações com ambas as regiões, hidrofílica e hidrofóbica, dos PEs se compensam de tal maneira que o comprimento da cadeia não altera o processo de

inserção do peptídeo. Considerando o lipídio DPPS, espera-se que a penetração seja maior do que o observado em DPPC e DPPE, como observado para as monocamadas de DMs. Porém, foram encontrados valores próximos de PMI em DPPS e DPPC de 32 e 34 mN/m, respectivamente.

5.3.2 Subfase: 150 mM NaCl

Em solução aquosa de 150 mM NaCl e pH = 7,4, os grupos polares de PC, PE e PS apresentam as mesmas cargas que em água. A presença do sal causou aumento da inserção do peptídeo nas monocamadas zwitteriônicas, DMPC e DMPE, e diminuição na monocamada DMPS (Tabela 5.1) com PMI de 35, 32,5 e 35 mN/m, respectivamente. As mesmas PMIs obtidas para DMPC e DMPS, bem como para DPPC e DPPS, indicam que, a presença de íons Na⁺ reduzem a repulsão eletrostática das cabeças polares (PS) e ainda contribuem para que as interações hidrofóbicas estejam presentes no processo de inserção, que é consistente com peptídeos que são capazes de perturbar a região das cadeias acíclicas. A penetração em monocamadas de palmitoil, além da blindagem das cargas negativas pelos íons Na⁺, sofre efeito da interação cadeia-cadeia do lipídio, diminuindo a inserção do peptídeo.

Tendo como referência a pressão lateral de 30 mN/m, que é considerada ser característica da membrana biológica, maior variação foi observado na inserção do peptídeo na monocamada de POPE (51 mN/m) e POPS (47 mN/m). Notadamente, a inserção do peptídeo é influenciada por diferentes condições de empacotamento lipídico.

Na presença de sal na subfase, as interações peptídeo-peptídeo são enfraquecidas, e as interações hidrofóbicas entre peptídeo/lipídio ou lipídio/lipídio dirigem essa interação e maior inserção é observada para DMPC e DMPE, em comparação com DPPC.

5.4 Domínios lipídicos em GUVs e correlação com a atividade lítica do peptídeo

A indução de segregação lipídica ou de separação de fase lateral induzida por peptídeo foi proposto ser um mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos (Epanand et al. 2007; Epanand and Epanand 2009a). Investigando a atividade lítica do MP1 em GUVs de POPC/POPG por meio de microscopia de fluorescência foi observada a formação de regiões fluorescentes densas que foram relacionadas a agregação peptídeo/lipídio ou então à segregação lipídica (Dos Santos

Cabrera et al. 2011). A formação destas regiões densas foi observada em outras circunstâncias envolvendo o peptídeo MP1 (Leite et al. 2015). A pergunta é se a formação de domínios ou destes agregados está relacionada à atividade lítica.

Como estratégia utilizamos uma composição lipídica que vem sendo investigada intensivamente (Veatch and Keller 2003; Goñi et al. 2008) no estudo de transições de fase líquido-líquido.

Este sistema modelo formado pela mistura DOPC/SM/Chol, domínios Lo (líquido-ordenado) são formados quando colesterol associa-se a esfingomielina (SM), dando origem a um complexo ordenado Chol-SM; e em mistura com DOPC exhibe coexistência de fase Lo/Ld (Líquido-ordenado/líquido-desordenado) (Veatch and Keller 2005). A presença de MP1 em GUVs formadas por DOPC/SM/Chol ou simplesmente por DOPC, não induziu nenhum efeito na permeabilidade e na integridade das GUVs (Fig.4.39). Em GUVs formadas por DOPC/POPS, o peptídeo induziu a entrada de CF no lúmen das vesículas mantendo influxo constante indicando que o poro/defeito induzido pelo peptídeo MP1 na membrana permanece aberto (Fig. 4.42). É possível que este efeito esteja correlacionado com vazamento tudo-ou-nada observado anteriormente (Leite et al. 2015). Os experimentos de monocamadas de PS indicaram que MP1 prefere este fosfolípido e acima da pressão de colapso do peptídeo os experimentos indicaram que peptídeo/lípido são expelidos para a subfase como se fosse um processo de micelização. Este processo poderia estar ocorrendo nas vesículas, embora não tenha sido possível observar mudanças na integridade das mesmas. Estes pequenos defeitos, que permitem a permeação de uma molécula pequena como a carboxifluoresceína, poderiam permanecer abertos.

Efeito similar foi observado quando GUVs compostas por DOPC/POPS/SM/Chol (2.1:0.9:3:1) foram expostas ao MP1 (Fig. 4.43). Nestas GUVs o peptídeo provocou entrada limitada de CF e induziu a formação de regiões densas na membrana. Neste sentido, presença de coexistência de fases Ld-Lo favoreceu a formação de agregados lipídicos e/ou de lípido/peptídeo.

Estes resultados indicam que MP1 induz a formação de poros/defeitos na membrana interagindo preferencialmente com bicamadas contendo PS, em acordo com a sua seletividade às vesículas aniônicas. E ainda, a separação lateral de fase poderia desempenhar um importante papel na sua atividade e pode ser favorecida pela presença de coexistência de fase Ld-Lo. A presença de POPS não alterou a forma dos domínios líquido ordenados SM/Chol. O peptídeo não induziu qualquer alteração nos domínios Lo. Quando POPS está presente na mistura o

peptídeo induziu a formação de regiões densas na fase fluida e o influxo e/ou a formação de domínios da membrana por estar envolvidos na atividade lítica do MP1.

5.5 Impacto do peptídeo no comportamento termotrópico de sistemas lipídicos contendo PS

Termogramas obtidos para mistura POPC/DPPS/MP1 indicaram que o peptídeo induziu segregação lipídica, ligando preferencialmente ao DPPS, induzindo assim uma fase rica de DPPS/MP1 e uma fase rica de POPC e conseqüentemente o abaixamento da temperatura da transição principal. A diminuição da temperatura de transição de fase também indica desestabilização da membrana lipídica decorrente da inserção do peptídeo na região hidrofóbica da membrana causando perturbação do empacotamento lipídico.

O impacto do peptídeo também foi investigado em vesículas de DPPS formadas em água e em 150 mM NaCl. Nos termogramas obtidos em água foram observados aumento da temperatura de transição de fase de 51 para 55 °C, indicando estabilização da fase gel coerente com o observado para a monocamada de DPPS que mostrou que o módulo de compressibilidade, para pressões acima de 30 mN/m é superior a 200 mN/m mesmo após a adição de 13 mol% de MP1. Em 150 mM NaCl, efeito oposto foi observado, ou seja, diminuição da temperatura de transição de fase para 35 °C, indicando estabilização da fase líquido-cristalina, fluida. Este resultado, também está de acordo com o observado nas isotermas de compressão nas mesmas condições nas quais foi observado que o módulo de compressibilidade da monocamada foi menor que 100 mN/m para pressões de 30 mN/m.

CAPÍTULO 6

Conclusões

Nesta tese as propriedades superficiais do peptídeo Polybia-MP1 e sua interação com os lipídios DPPC, DMPC, DMPE, DPPS e DMPS foram investigadas por monocamada de Langmuir. O peptídeo Polybia-MP1 apresentou significativa atividade interfacial em água e em subface iônica formando monocamadas estáveis.

Os valores de áreas moleculares e de potencial de superfície obtidos das isotermas de compressão sugeriram que o peptídeo adotou principalmente uma estrutura helicoidal compatível com os resultados de dicroísmo circular em vesículas lipídicas. Os valores de área molecular evidenciaram que esta estrutura helicoidal está orientada quase perpendicularmente à interface água-ar.

Para valores comparáveis de pressão de superfície, os peptídeos ocuparam áreas maiores em todas as subfases investigadas diferentes de água pura sugerindo que as interações peptídeo-peptídeo foram mais atrativas na ausência de sal e em pH neutro.

Em água pura MP1 e DPPC co-cristalizam formando domínios ramificados enquanto em subfases com concentrações e sal maiores que 1,0 mM e pH neutro, ou solução ácida (pH 2,0) ou básica (pH 10,0) independente da força iônica, os peptídeos foram expulsos das regiões mais densas e os domínios apresentaram a forma de “triskelion” como em DPPC puro. Nestas condições a atração entre peptídeos é fraca. Pontes salinas podem ser formadas entre as faces hidrofílicas envolvendo os resíduos de ácido aspártico e lisinas em água, deixando peptídeos mais próximos, com as faces hidrofóbicas livres para fazer contatos hidrofóbicos com as cadeias acíclicas dos lipídios favorecendo a co-cristalização. Em meio ácido os resíduos de ácido aspártico estão total (pH 2) ou parcialmente (pH 4) protonados enquanto em meio básico as lisinas estão parcialmente desprotonadas desfavorecendo estas pontes salinas. Em pH neutro e alta concentração de sal (> 1,0 mM) os contraíons parcialmente blindam as cargas dos resíduos carregados dificultando a formação de pontes salinas.

Os filmes de DMPC só apresentam a fase G e LE durante toda a compressão caracterizada por maior movimentação das cadeias acíclicas, portanto mesmo em água, onde a formação de pontes entre peptídeos é mais favorável, o movimento das cadeias desfavorece

contatos hidrofóbicos com os peptídeos, que são expulsos para as subfases. Na presença de sal na subfase a interação MP1-MP1 são enfraquecidas e MP1 interage com as cadeias acíclicas impactando no empacotamento lipídico, e assim, maior pressão lateral é necessária para excluir o peptídeo do filme lipídico.

Filmes de DMPE apresentaram transição entre as fases LE e LC formando domínios em forma de dendritas ou folhas. O efeito do peptídeo foi de torna-las mais dendríticas ou mais subdivididas ou fractais, indicando que em água ocorre uma separação de fase, uma região rica de peptídeo e outra rica de lipídio. A presença da fase rica em peptídeo altera o tempo de cristalização induzindo a formação de ramificações. Em subfase iônica a forma dos domínios é mantida e o efeito do peptídeo é de reduzir as dimensões dos domínios atuando como impurezas na interface com a fase fluida.

Interações eletrostáticas foram evidenciadas em monocamadas de DMPS/MP1 e DPPS/MP1. Em água, monocamadas de DMPS apresentam a transição LE-LC formando domínios em forma de dendritas. A presença de MP1 nesta monocamada diminuiu a formação da fase condensada e em pressões acima de 35 mN/m uma fase com alta refletividade foi observada indicando aumento da espessura da monocamada que pode ser decorrente de um processo de micelização. Em alta concentração salina (150 mM NaCl) os íons atuaram no balanço energético entre a tensão de linha e repulsão de dipolo induzindo diminuição no tamanho e nas ramificações dos domínios de lipídio puro e o aumento do número de núcleos que pode estar relacionado ao aumento da densidade eletrostática.

Monocamadas de DPPS apresentam transição G-LC. Em água o peptídeo induziu estabilização da monocamada com a formação de regiões densas e após a sua exclusão permaneceu associado ao filme possivelmente decorrente da interação MP1/PS. Em subfase iônica efeito contrário foi evidenciado, peptídeo perturbou o empacotamento lipídico e a fase fluida foi estabilizada no filme. Este efeito também foi observado em bicamadas através de medidas de DSC em que estabilização da fase gel foi evidenciado em água e da fase líquido-cristalina em meio salino.

Nestes sistemas estudados maior impacto no empacotamento lipídico foi evidenciado em monocamadas de DMPE e DPPS.

Os resultados obtidos por medidas de monocamadas de Langmuir mostraram a importância dos resíduos de ácido aspártico na regulação das interações peptídeo/peptídeo e peptídeo-lipídio como já evidenciado a importância do resíduo D2 na modulação das interações MP1/membrana (Leite et al. 2011; Leite et al. 2014).

Este rearranjo peptídico, com possíveis interações laterais, na superfície pode explicar a alta afinidade a vesículas aniônicas comparado com outros peptídeos mais positivamente carregados (Dos Santos Cabrera et al. 2008). À atração eletrostática peptídeo/membrana de longo alcance, soma-se uma interação de curto alcance (pontes salinas peptídeo/peptídeo) estabilizando o peptídeo na membrana lipídica. Estes resultados podem ser provavelmente extrapolados para outros peptídeos formadores de poros/defeitos como sequências similares.

Interações eletrostáticas atrativas PS/MP1 explicam a preferência do peptídeo catiônico pelo lipídico aniônico. Separação de fases, uma rica de peptídeo e outro de lipídio, e interações laterais peptídeo/peptídeo e interações hidrofóbicas entre PE/MP1 parecem ser a origem da sinergia entre estes lipídios no aumento da permeabilidade em GUVs de PC/PE/PS.

Visualizações de vesículas gigantes e medidas de DSC indicaram que MP1 induz a formação de poros/defeitos na membrana interagindo preferencialmente com bicamadas contendo PS em acordo com a sua seletividade às vesículas aniônicas. E ainda, que a presença de PS em membranas que apresentam separação de fase Ld-Lo pode desempenhar um importante papel na atividade lítica do peptídeo favorecendo a separação lateral de fase. A formação de regiões densas na fase fluida e o influxo e/ou a formação de domínios da membrana por estar envolvidos na atividade lítica do MP1.

APÊNDICE A

Estratégias para explorar contribuições eletrostática e não-eletrostática da interação de peptídeos antimicrobianos helicoidais com membranas modelos

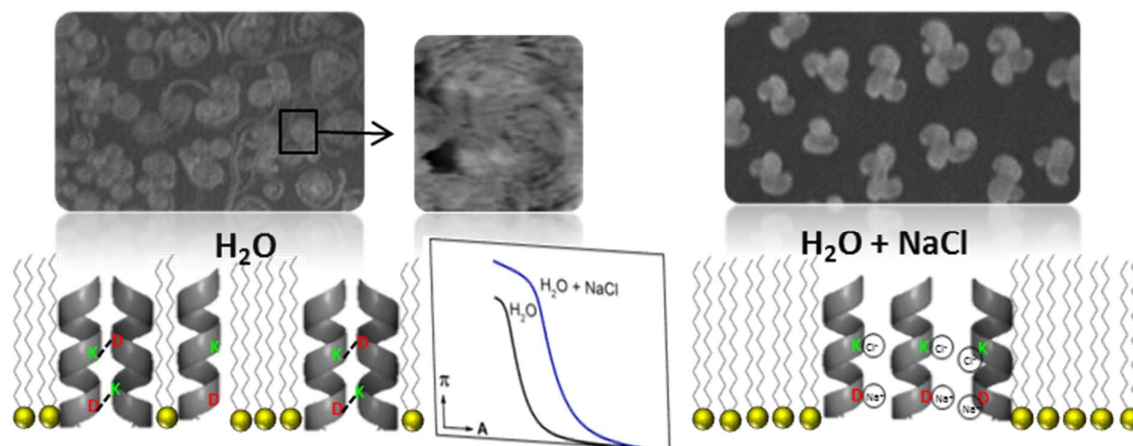
C.1 Resumo

A seletividade e especificidade peptídeos antimicrobianos helicoidais são relacionados à sua adsorção à bicamada e a perturbação do empacotamento lipídico. A seletividade está relacionada à sequência do peptídeo e a perturbação à composição lipídica da bicamada. Nesses processos envolvem um delicado balanço entre contribuições energéticas eletrostática e não-eletrostática. Neste trabalho de revisão nós revisamos técnicas experimentais que permitem acessar essas contribuições energéticas e destacar importantes aspectos dessas contribuições que modulam a afinidade e seletividade de peptídeos antimicrobianos à bicamada lipídica. A estratégia foi determinar o coeficiente de partição do peptídeo na membrana modelo por meio de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular e medidas de potencial zeta, e utilizar monocamadas de Langmuir para investigar a perturbação do empacotamento lipídico. Nós focamos em alguns peptídeos (MP1 e L1A) que apresentam, concomitantemente, resíduos ácidos e básicos. Embora resíduos ácidos não sejam encontrados com frequência, eles desempenham um importante papel na atividade biológica desses peptídeos. Este manuscrito foi enviado ao “*Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly da Elsevier*” e será o cap.8 do volume 24 (*Strategies for exploring electrostatic and non-electrostatic contributions to the interactions of helical antimicrobial peptides with model membranes - Alvares DS, dos Santos Cabrera MP, Ruggiero Neto J.*)

APÊNDICE B

Regulação Eletrostática das Propriedades Interfaciais do Peptídeo Polybia-MP1 e sua Interação com DPPC.

B1 - Resumo



Neste trabalho estudamos como se regula a organização que adquire o peptídeo Polybia-MP1 na interface, tanto na presença quanto na ausência de lipídios neutros utilizando monocamadas de Langmuir como sistema modelo. A estratégia foi obter informações termodinâmicas a partir das isotermas de compressão e mudanças na morfologia superficial dos domínios lipídicos induzidas pelo peptídeo usando microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e microscopia de força atômica (AFM).

DPPC foi escolhido por ser um dos principais componentes da membrana celular e apresentar transição de fase LE-LC, em 5 mN/m a 20 °C, que nos permitiu investigar o impacto do peptídeo nas diferentes fases da monocamada lipídica. No intuito de explorar as propriedades eletrostáticas na interação peptídeo/lipídio, o efeito da força iônica foi analisado por diferentes condições iônicas (0, 0,1, 1,0 e 150 mM) e diferentes sais (NaCl e NaBr). Experimentos em pH ácido e básico também foram realizados no intuito de estudar o efeito da mudança da carga líquida do peptídeo em diferentes condições: pH 2 (peptídeo está totalmente protonado), pH 4 e pH 10 (MP1 está parcialmente desprotonado).

Os resultados obtidos mostraram que MP1 forma monocamada estável, com valores de área lateral e potencial de superfície indicando, principalmente, estrutura helicoidal orientada, preferencialmente, perpendicular à interface. Em monocamadas compostas pela mistura DPPC-MP1, peptídeo e lipídio co-cristalizam formando domínios ramificados somente em água pura. Em subfases com concentração salina acima de 1 mM de NaCl ou em condições ácida (pH 2 ou 4) ou básica (pH 10), MP1 formou um filme menos compacto e foi excluído dos domínios lipídicos. Estes resultados indicaram que a presença de interações eletrostáticas atrativas entre as moléculas de peptídeos permite que eles permaneçam mais próximos um dos outros interagindo com DPPC, provavelmente como uma consequência de um rearranjo particular do peptídeo no filme. Nós sugerimos que os resíduos aniônico e catiônico, D e K respectivamente, que ocupam posições “chaves” na sequência do peptídeo seriam os responsáveis pela atração peptídeo-peptídeo, formando pontes salinas, conduzindo interações orientadas em um cristal e, da mesma forma, para os domínios ramificados.

Os resultados obtidos ajudaram a entender o comportamento global da interação MP1-DPPC e que a presença de sais no meio afeta a interação entre peptídeos e, indiretamente, sua capacidade de interagir com DPPC. Entender o comportamento do peptídeo em um sistema neutro é de grande importância para a compreensão em sistemas mais complexos, que contenham lipídio aniônico, uma vez que a presença de sal afeta ambos, lipídio e peptídeo carregados (publicado em “*BBA – Biomembrane*”- ***The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions.*** *Alvares, DS, Fanani, ML, Ruggiero Neto, J, Wilke, N.*) (Alvares et al. 2015).



The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions



Dayane S. Alvares^a, Maria Laura Fanani^b, João Ruggiero Neto^{a,*}, Natalia Wilke^{b,*}

^a UNESP – São Paulo State University, IBILCE, Department of Physics, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultades de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2015

Received in revised form 16 November 2015

Accepted 4 December 2015

Available online 7 December 2015

Keywords:

Peptide–peptide lateral interactions

Langmuir-monolayer

Lipid–peptide co-crystals

Domain shape

Membrane electrostatic interactions

ABSTRACT

Polybia-MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), extracted from the Brazilian wasp *Polybia paulista*, exhibits a broad-spectrum bactericidal activity without being hemolytic and cytotoxic. In the present study, we analyzed the surface properties of the peptide and its interaction with DPPC in Langmuir monolayers. Polybia-MP1 formed stable monolayers, with lateral areas and surface potential values suggesting a mostly α -helical structure oriented near perpendicular to the membrane plane. In DPPC–peptide mixed monolayers, MP1 co-crystallized with the lipid forming branched domains only when the subphase was pure water. On subphases with high salt concentrations or at acidic or basic conditions, the peptide formed less densely packed films and was excluded from the domains, indicating the presence of attractive electrostatic interactions between peptides, which allow them to get closer to each other and to interact with DPPC probably as a consequence of a particular peptide arrangement. The residues responsible of the peptide–peptide attraction are suggested to be the anionic aspartic acids and the cationic lysines, which form a salt bridge, leading to oriented interactions in the crystal and thereby to branched domains. For this peptide, the balance between total attractive and repulsive interactions may be finely tuned by the aqueous ionic strength and pH, and since this effect is related with lysines and aspartic acids, similar effects may also occur in other peptides containing these residues in their sequences.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Helical antimicrobial peptides are short sequences, up to 50 amino acids, rich in cationic, non-polar and hydrophobic residues, whose distribution along the chain allows the formation of an amphipathic helix when in membrane. Thanks to their cationicity, these peptides have selective preference for anionic lipid membranes, which is the main characteristic of the outer leaflet of prokaryotic plasmatic membranes [1]. Diverse studies have demonstrated that their efficiency of action against anionic membrane is strongly dependent on the membrane properties and the peptide structural features as net charge, charge distribution and hydrophobicity [1–3]. These peptides display, in general the ability to disturb lipid bilayers inducing leakage of the cell content. Several models have been proposed for the mechanism of action of these peptides and they have been extensive and comprehensively described in a recent review [4]. These mechanisms are not exclusive and some peptides can display more than one depending on the peptide-to-lipid ratio. These models suggest that their disturbance on the lipid packing induces leakage without requiring specific membrane receptor [5]. By

this ability in acting only on the lipid phase of the membrane, these peptides have a great potential to substitute conventional antibiotics [1] or as a model to the design of new drugs based on the membrane as their main target. The search for new compounds with antimicrobial activity has been very active in the last two decades due to the increase in the number of bacterial strains resistant to the conventional antibiotics [1] that is considered as one of the greatest health public problem of this century. Studies have also shown that, besides their antimicrobial activities these peptides also can act against cancer cells [6].

Polybia-MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), or simply MP1, is an example of these peptides. It is extracted from the venom of the Brazilian wasp *Polybia paulista* and exhibits a broad-spectrum bactericidal activity without being hemolytic and cytotoxic [7]. MP1 also showed a selective inhibitory effect on proliferating prostate and bladder cancer cells [8], and against multidrug-resistant leukemic cells [9]. In addition, this peptide is cytotoxic against leukemic T lymphocytes and highly selective in recognizing these cells compared with healthy lymphocytes [10].

An important feature of this peptide is the presence of two aspartic acids concomitantly with three lysines and the amidated C-terminus, conferring a low positive net charge (+2e) at physiological pH values. This low net charge, however, does not hamper its selectivity to anionic bilayers in comparison to zwitterionic ones. Studies of the peptide interaction with model membranes were used to investigate the physico-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jruiggiero@sjrp.unesp.br (J. Ruggiero Neto), wilke@fcq.unc.edu.ar (N. Wilke).

APÊNDICE C

Interação de peptídeos helicoidais com membranas modelo acessada por técnicas espectroscópicas

C.1 Efeito do ácido aspártico D2 na afinidade do peptídeo Polybia-MP1 a vesículas lipídicas aniônicas

Uma importante característica do peptídeo Polybia-MP1 é a presença de dois ácidos aspárticos concomitantemente com três lisinas e o C-terminal amidado conferindo uma carga líquida baixa (+2e), comparada com outros peptídeos antimicrobianos altamente seletivos, em pH fisiológico. Neste trabalho investigamos a influência do resíduo de ácido aspártico nas energias de ligação dos peptídeos Polybia-MP1, do seu análogo sintético, que possui a substituição D2N, e do mastoparano-X (MPX), que não possui ácido aspártico em sua sequência, com bicamadas lipídicas aniônica e zwitteriônica. As energias de adsorção, eletrostática e conformacional foram investigadas por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência usando vesículas unilamelares grandes (LUVs) e por medidas de potencial zeta e a energia livre para transferir o peptídeo desenovelado da solução para a interface da bicamada foi calculada usando MPex. A comparação das afinidades destes peptídeos a vesículas de POPC:POPG (70:30) mostrou que MP1 é 50% maior do que seu análogo, apesar de sua baixa carga líquida (+2e) e ainda maior quando comparado com o peptídeo MPX que possui carga +4e. A energia eletrostática aumentou com a carga líquida do peptídeo e comparando-a com o termo conformacional, foi praticamente igual para o MPX e duas vezes menor para o MP1. Para MP1 a energia de adsorção foi 2,0 kcal/mol mais favorável do que a soma das energias interfacial, eletrostática e conformacional (ΔG_{total}), enquanto para N2D análogo estes termos foram praticamente iguais. Em contrapartida, para MPX, ΔG_{total} é mais favorável do que a energia de adsorção, indicando que alguma energia poderia ter sido superestimada ou que um processo não favorável interfere na adsorção do peptídeo MPX não sendo levado em consideração nos cálculos. Para MP1 em vesículas aniônicas, a componente extra de energia foi 1,2 e 1,5 mais favoráveis do que seu análogo N2D e MPX, respectivamente. (publicado em *“European Biophysics Journal”*- **Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles**. Leite, NB, Alvares, DS, de Souza, BM, Palma, MS, Ruggiero Neto, J) (Leite et al. 2014).

Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles

Natália Bueno Leite · Dayane dos Santos Alvares ·
Bibiana Monson de Souza · Mário Sérgio Palma ·
João Ruggiero Neto

Received: 4 November 2013 / Revised: 5 January 2014 / Accepted: 5 February 2014
© European Biophysical Societies' Association 2014

Abstract Polybia-MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), a helical peptide extracted from the venom of a Brazilian wasp, has broad-spectrum antimicrobial activities without being hemolytic or cytotoxic. This peptide has also displayed anticancer activity against cancer cell cultures. Despite its high selectivity, MP1 has an unusual low net charge ($Q = +2$). The aspartic residue (D2) in the N-terminal region plays an important role in its affinity and selectivity; its substitution by asparagine (D2N mutant) led to a less selective peptide. Aiming to explore the importance of this residue for the peptides' affinity, we compared the zwitterionic and anionic vesicle adsorption activity of Polybia-MP1 versus its D2N mutant and also mastoparan X (MPX). The adsorption, electrostatic, and conformational free energies were assessed by circular dichroism (CD) and fluorescence titrations using large unilamellar vesicles (LUVs) at the same conditions in association with measurement of the zeta potential of LUVs in the presence of the peptides. The adsorption free energies of the peptides, determined from the partition coefficients, indicated higher affinity of MP1 to anionic vesicles compared with the D2N mutant and MPX. The electrostatic and conformational free energies of MP1 in anionic vesicles are less favorable than those found for

the D2N mutant and MPX. Therefore, the highest affinity of MP1 to anionic vesicles is likely due to other energetic contributions. The presence of D2 in MP1 makes these energetic components 1.2 and 1.5 kcal/mol more favorable compared with the D2N mutant and MPX, respectively.

Keywords Antimicrobial peptide · Peptide–membrane interaction · Electrostatic and nonelectrostatic free energy

Introduction

Mastoparans belong to a family of peptides extracted from the venom sac of wasps. They are in general tetradecapeptides containing 1–4 basic residues, and they are rich in hydrophobic and nonpolar residues (Nakajima et al. 1986). Isoleucine and asparagine are frequently found at positions 1 and 2 of the N-terminus. The third residue is generally hydrophobic, such as tryptophan in some of these peptides. Amidation of the C-terminus is frequently found as well. This terminal protection prevents proteolytic digestion (Andreu and Rivas 1999) and provides an extra hydrogen bond, increasing the stability of the helical structure (Sforça et al. 2004). By adsorbing to a lipid bilayer or bilayer mimetic, such as surfactant micelles, these peptides form an amphipathic helical structure.

Some mastoparans display broad-spectrum antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria. They are fungicidal, and in some cases, they are also hemolytic and mast cell degranulators (Palma 2006). Their biological activities are strongly related to both the amino acid content and the lipid membrane composition. These peptides are cationic, and the outer leaflet in prokaryotic cells is anionic while in mammalian cells it is rich in zwitterionic lipids (Yeaman and Yount 2003).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00249-014-0945-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. B. Leite · D. dos Santos Alvares · J. Ruggiero Neto (✉)
Department of Physics, IBILCE, São Paulo State University,
UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: jruggiero@sjrp.unesp.br

B. M. de Souza · M. S. Palma
Department of Biology, IB, Center of Studies of Social Insects,
São Paulo State University, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

C.2 Interação do peptídeo antimicrobiano sintético L1A e seus análogos, com membranas modelo por espectroscopia de fluorescência

Neste trabalho a interação do peptídeo sintético L1A e mais dois análogos com modificações no N-terminal com membranas de zwitteriônica (POPC) e aniônica (POPC:POPG) foi investigada através de técnicas espectroscópicas. Estudos mostraram que modificações no N e C-terminais são favoráveis para estabilização da conformação anfipática helicoidal (Fairman et al. 1989; Dos Santos Cabrera et al. 2004; Sforça et al. 2004) protegendo o peptídeo contra digestão proteolítica (Andreu and Rivas 1998) sendo considerado um mecanismo de resistência alternativo (Stromstedt et al. 2009; Guilhelmelli et al. 2013). Assim, as modificações, acetilação e fluoróforo ácido orto amino benzóico (Abz) ligado covalentemente no N-terminal com a substituição V8W, foram realizadas no peptídeo L1A, resultando em dois peptídeo, ac-L1A e Abz-L1A-V8W, respectivamente, ambos com carga líquida +2e. Peptídeos modificados mostraram maior conteúdo helicoidal (acessado por dicroísmo circular), mas, a acetilação diminuiu a afinidade para vesículas de POPC, enquanto que o fluoróforo Abz aumentou a afinidade para vesículas aniônicas. Medidas de supressão de acrilamida mostraram que os fluoróforos (Triptofano em Ac-L1A e Abz em Abz-L1A-V8W) foram mais blindados pelo supressor, indicando que as modificações favoreceram ao aumento da perturbação do empacotamento lipídico (publicado em *“European Biophysics Journal”* - ***Interaction of synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy.*** Zanin, LMP, Alvares, DS, Juliano, MA, Pazin, WM, Ito, AS, Ruggiero Neto, J) (Zanin et al. 2013).

Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy

Luciana Moro Puia Zanin · Dayane dos Santos Alvares ·
Maria Aparecida Juliano · Wallance Moreira Pazin ·
Amando Siuti Ito · João Ruggiero Neto

Received: 3 June 2013 / Revised: 14 August 2013 / Accepted: 17 September 2013
© European Biophysical Societies' Association 2013

Abstract Static and time-resolved fluorescence of tryptophan and *ortho*-aminobenzoic acid was used to investigate the interaction of the synthetic antimicrobial peptide L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂) with POPC and POPC:POPG. *N*-acetylated (Ac-L1A) and N-terminus covalently bonded *ortho*-aminobenzoic acid (Abz-L1A-W8V) were also used. Static fluorescence and quenching by acrylamide showed that the peptides adsorption to the lipid bilayers was accompanied by spectral blue shift and by a decrease in fluorescence quenching, indicating that the peptides moved to a less polar environment probably buried in the lipidic phase of the vesicles. These results also suggest that the loss of the N-terminus charge allowed deeper fluorophore insertion in the bilayer. Despite the local character of spectroscopic information, conclusions can be drawn about the peptides as a whole. The dynamic behaviors of the peptides are such that the mean intensity lifetimes, the long correlation time and the residual anisotropy at long times increased when the peptides adsorb in lipid vesicles, being larger in anionic vesicles. From the steady-state increase in fluorescence intensity and anisotropy, we observed that the partition coefficient of peptides L1A and its Abz analog in both types of vesicles

are higher than the acetylated analog; moreover, the affinity to the anionic vesicle is higher than to the zwitterionic.

Keywords Antimicrobial peptides · Extrinsically labeled peptide · Model membranes · Static fluorescence · Time-resolved fluorescence

Introduction

The search for new antibiotic compounds has deserved attention in the last decades because of the increase in microorganism strains resistant to conventional antibiotics (Hancock and Sahl 2006). Host defense peptides belong to the innate immune system of many living organisms from plants to mammals (Zaslhoff 2002). Among these peptides, the short linear cationic peptides have been shown to constitute an important class. Besides cationic residues, these peptides are rich in non-polar and hydrophobic residues forming an amphipathic helical structure capable of disturbing lipid bilayer and cell membrane (Matsuzaki 2009). Due to their cationicity, they have affinity to the anionic bilayer, which is a characteristic of the bacterial membrane, while the outer leaflet of eukaryotic cells is zwitterionic. This electrostatic contribution, however, does not determine the selectivity of cationic peptides per se. Some of them are also able to disturb neutral membranes resulting in an undesirable cytotoxic activity (Jiang et al. 2008). The selectivity to antimicrobial activity has been shown to involve a complex and delicate balance between peptide net charge and hydrophobicity (Dathe et al. 2001; Chen et al. 2005). Some structural parameters, such as the helix propensity, mean residue hydrophobicity, hydrophobic moment and angle of the peptide polar face, have been

L. M. P. Zanin · D. dos Santos Alvares · J. Ruggiero Neto (✉)
Department of Physics, IBILCE, UNESP, São Paulo State
University, Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto,
SP 15054-000, Brazil
e-mail: jruggiero@sjrp.unesp.br

M. A. Juliano
Department of Biophysics, UNIFESP, São Paulo, Brazil

W. M. Pazin · A. S. Ito
Department of Physics, FFCLRP, University of São Paulo,
Ribeirão Preto, SP, Brazil

REFERÊNCIAS

- Ali S, Brockman HL, Brown RE (1991) Structural determinants of miscibility in surface films of galactosylceramide and phosphatidylcholine: effect of unsaturation in the galactosylceramide acyl chain. *Biochemistry* 30:11198–205.
- Ali S, Smaby JM, Brockman HL, Brown RE (1994) Cholesterol's interfacial interactions with galactosylceramides. *Biochemistry* 33:2900–2906.
- Almeida PF, Pokorny A (2009) Mechanisms of Antimicrobial, Cytolytic, and Cell-Penetrating Peptides: From Kinetics to Thermodynamics. *Biochemistry* 48:8083–8093.
- Alvares DDS (2011) Estudo da formação de domínios em bicamadas lipídicas induzidos por peptídeos antimicrobianos. UNESP
- Alvares DS, Fanani ML, Ruggiero Neto J, Wilke N (2015) The interfacial properties of the peptide polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1858:393–402.
- Ambroggio EE, Separovic F, Bowie J, Fidelio GD (2004) Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1664:31–37.
- Andreu D, Rivas L (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415–33.
- Angelova MI, Dimitrov DS (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* 81:303.
- Arnold A, Cloutier I, Ritcey AM, Auger M (2005) Temperature and pressure dependent growth and morphology of DMPC/DSPC domains studied by Brewster angle microscopy. *Chem Phys Lipids* 133:165–79.
- Aroti A, Leontidis E, Maltseva E, Brezesinski G (2004) Effects of Hofmeister anions on DPPC Langmuir monolayers at the air-water interface. *J Phys Chem B* 108:15238–15245.
- Azagarsamy MA, Gomez-Escudero A, Yesilyurt V, et al (2009) Amphiphilic nanoassemblies for the detection of peptides and proteins using fluorescence and mass spectrometry. *Analyst* 134:635–49.
- Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:1529–1539.
- Birdi KS (1989) *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*. Springer US, Boston, MA
- Birdi KS (2006) *Self-Assembly Monolayer Structures of Lipids and Macromolecules at Interfaces*. Springer Science & Business Media
- Blondelle SE, Lohner K, Aguilar M (1999) Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim Biophys Acta* 1462:89–108.
- Bouffieux O, Berquand A, Eeman M, et al (2007) Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: Effect of phospholipid chain length and polar head. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1768:1758–1768.
- Brochard F, De Gennes PG, Pfeuty P (1976) Surface tension and deformations of membrane structures: relation to two-dimensional phase transitions. *J Phys* 37:1099–1104.
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238–250.
- Caruso B, Mangiarotti A, Wilke N (2013) Stiffness of lipid monolayers with phase coexistence.

- Langmuir 29:10807–16.
- Cevc G (1991) Isothermal lipid phase transitions. *Chem Phys Lipids* 57:293–307.
- Chattoraj DK, Birdi KS (1984) Adsorption and the Gibbs Surface Excess. Springer US, Boston, MA
- Chen X, Huang Z, Hua W, et al (2010) Reorganization and caging of DPPC, DPPE, DPPG, and DPPS monolayers caused by dimethylsulfoxide observed using Brewster angle microscopy. *Langmuir* 26:18902–18908.
- Davies JT (1951) The Distribution of Ions under a Charged Monolayer, and a Surface Equation of State for Charged Films. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci* 208:224–247.
- Davies JT, Rideal EK (1963) Interfacial phenomena.
- de Paulo J, Atkins P (2006) Physical Chemistry.
- Dennison SR, Harris F, Phoenix DA (2014) Chapter Three – Langmuir–Blodgett Approach to Investigate Antimicrobial Peptide–Membrane Interactions, 1st edn. Elsevier Ltd.
- Dennison SR, Morton LHG, Shorrocks AJ, et al (2009) A study on the interactions of Aurein 2.5 with bacterial membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 68:225–230.
- Dennison SR, Phoenix D a. (2014) Susceptibility of sheep, human, and pig erythrocytes to haemolysis by the antimicrobial peptide Modelin 5. *Eur Biophys J* 43:423–432. doi: 10.1007/s00249-014-0974-9
- Dos Santos Cabrera MP, Alvares DS, Leite NB, et al (2011) New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: Lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir* 27:10805–10813.
- Dos Santos Cabrera MP, Arcisio-Miranda M, Gorjão R, et al (2012) Influence of the bilayer composition on the binding and membrane disrupting effect of polybia-MP1, an antimicrobial mastoparan peptide with leukemic T-lymphocyte cell selectivity. *Biochemistry* 51:4898–4908.
- Dos Santos Cabrera MP, Costa STB, De Souza BM, et al (2008) Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J* 37:879–891.
- Dos Santos Cabrera MP, De Souza BM, Fontana R, et al (2004) Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: A new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Pept Res* 64:95–103.
- Drude P (1963) The theory of optics.
- Dyck M, Kerth A, Blume A, Lo M (2006) Interaction of the Neurotransmitter , Neuropeptide Y , with Phospholipid Membranes : Infrared Spectroscopic Characterization at the Air / Water Interface. 22152–22159.
- Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 179:125–142.
- Epand RF, Maloy L, Ramamoorthy A, Epand RM (2010) Amphipathic helical cationic antimicrobial peptides promote rapid formation of crystalline states in the presence of phosphatidylglycerol: Lipid clustering in anionic membranes. *Biophys J* 98:2564–2573.
- Epand RF, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U, et al (2007) Cardiolipin Clusters and Membrane Domain Formation Induced by Mitochondrial Proteins. *J Mol Biol* 365:968–980.
- Epand RF, Wang G, Berno B, Epand RM (2009) Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3705–3714.
- Epand RFRM, Epand RFRM (2009a) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1788:289–294.
- Epand RM (2007) Detecting the presence of membrane domains using DSC. *Biophys Chem* 126:197–200.
- Epand RM, Epand RF (2009b) Lipid domains in bacterial membranes and the action of

- antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1788:289–294.
- Epand RM, Rotem S, Mor A, et al (2008) Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. *J Am Chem Soc* 130:14346–14352.
- Fairman R, Shoemaker KR, York EJ, et al (1989) Further studies of the helix dipole model: effects of a free α -NH₃⁺ or α -COO⁻ group on helix stability. *Proteins* 5:1–7.
- Ferreira M, Caetano W, Itri R, et al (2005) Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Quim Nova* 28:502–510.
- Fischer A, Lösche M, Möhwald H, Sackmann E (1984) On the nature of the lipid monolayer phase transition. *J Phys Lettres* 45:785–791.
- Gaines GL (1966) *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers
- Gennis RB (1989) *Biomembranes*. Springer New York, New York, NY
- Gevod VS, Birdi KS (1984) Melittin and the 8-26 fragment. Differences in ionophoric properties as measured by monolayer method. *Biophys J* 45:1079–1083.
- Goñi FM, Alonso A, Bagatolli L a., et al (2008) Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1781:665–684.
- Gracià RS, Bezlyepkina N, Knorr RL, et al (2010) Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* 6:1472.
- Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al (2013) Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 4:353.
- Haney EF, Nathoo S, Vogel HJ, Prenner EJ (2010) Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem Phys Lipids* 163:82–93.
- He K, Ludtke SJ, Huang HW, Worcester DL (1995) Antimicrobial Peptide Pores in Membranes Detected by Neutron In-Plane Scattering. *Biochemistry* 34:15614–15618.
- Heckl WM, Losche M, Cadenhead DA, Mohwald H (1986) Electrostatically Induced Growth of Spiral Lipid Domains in the Presence of Cholesterol. *Eur Biophys J with Biophys Lett* 14:11–17.
- Heckl WM, Zaba BN, Möhwald H (1987) Interactions of cytochromes b₅ and c with phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 903:166–176.
- Hiemenz PC, Rajagopalan R (1997) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*.
- Hinz A, Galla H-J (2005) Viral membrane penetration: lytic activity of a nodaviral fusion peptide. *Eur Biophys J* 34:285–93.
- Honig D, Overbeck GA, Mobius D (1992) Morphology of pentadecanoic acid monolayers at the air/water interface studied by BAM. *Adv Mater* 4:419–424.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1778:357–375.
- Huang HW, Chen FY, Lee MT (2004) Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys Rev Lett* 92:198304–1.
- Israelachvili J (1992) *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London
- Janmey P a., Kinnunen PKJ (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* 16:538–546.
- Jing W, Hunter HN, Hagel J, Vogel HJ (2003) The structure of the antimicrobial peptide Ac-RRWWRF-NH₂ bound to micelles and its interactions with phospholipid bilayers. *J Pept Res* 61:219–229.
- Johann R, Vollhardt D, Möhwald H (2001) Shifting of Fatty Acid Monolayer Phases Due to Ionization of the Headgroups. *Langmuir* 17:4569–4580.
- Jordo MD (2007) The temperature dependence of the elasticity of giant lipid vesicle: An Optical Tweezers, Calorimetry and Confocal Microscopy study.

- Kaganer V, Möhwald H, Dutta P (1999) Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev Mod Phys* 71:779–819.
- Keller DJ, Korb JP, McConnell HM (1987) Theory of Shape Transitions in Two-Dimensional Phospholipid Domains. *J Phys Chem J Phys Chem J Electroanal Chem I J Colloid Interface Sci* 91:6417–6422.
- Keller DJ, McConnell HM, Moy VT (1986) Theory of superstructures in lipid monolayer phase transitions. *J Phys Chem* 90:2311–2315.
- Koenig BW, Ferretti JA, Gawrisch K (1999) Site-specific deuterium order parameters and membrane-bound behavior of a peptide fragment from the intracellular domain of HIV-1 gp41. *Biochemistry* 38:6327–34.
- Krüger P, Lösche M (2000) Molecular chirality and domain shapes in lipid monolayers on aqueous surfaces. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62:7031–7043.
- Kubo I, Adachi S, Maeda H, Seki A (2001) Phosphatidylcholine monolayers observed with Brewster angle microscopy and π -A isotherms. *Thin Solid Films* 393:80–85.
- Ladokhin AS, Wimley WC, White SH (1995) Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence quenching. *Biophys J* 69:1964–71.
- Lakhdar-Ghazal F, Tichadou JL, Tocanne JF (1983) Effect of pH and monovalent cations on the ionization state of phosphatidylglycerol in monolayers. An experimental (surface potential) and theoretical (Gouy-Chapman) approach. *Eur J Biochem* 134:531–7.
- Le Calvez E, Blaudez D, Buffeteau T, Desbat B (2001) Effect of Cations on the Dissociation of Arachidic Acid Monolayers on Water Studied by Polarization-Modulated Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy. *Langmuir* 17:670–674.
- Leite B, Aufderhorst-roberts A, Palma MS, et al (2015) Article PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. 109:936–947.
- Leite NB, Da Costa LC, Dos Santos Alvares D, et al (2011) The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy.
- Leite NB, dos Santos Alvares D, de Souza BM, et al (2014) Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles.
- Lheveder C, Hénon S, Meunier J (2000) *Brewster Angle Microscopy*. CRC Press
- Lösche M, Möhwald H (1984) Impurity controlled phase transitions of phospholipid monolayers. *Eur Biophys J* 11:35–42.
- Lösche M, Sackmann E, Möhwald H (1983) A Fluorescence Microscopic Study Concerning the Phase Diagram of Phospholipids. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys Chemie* 87:848–852.
- Maget-Dana R (1999) The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. pp 109–140
- Maget-Dana R, Lelièvre D, Brack A (1999) Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between α -helical and β -sheet conformations. *Biopolymers* 49:415–423.
- Maget-Dana R, Ptak M (1997) Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys J* 73:2527–2533.
- Makovitzki A, Fink A, Shai Y (2009) Suppression of human solid tumor growth in mice by intratumor and systemic inoculation of histidine-rich and pH-dependent host defense-like lytic peptides. *Cancer Res* 69:3458–63.
- Malcolm BR (1973) The Structure and Properties of Monolayers of Synthetic Polypeptides at the Air-Water Interface. In: *Progress in Surface and Membrane Science*. pp 183–229

- Mangiarotti A, Wilke N (2015) Energetics of the Phase Transition in Free-Standing versus Supported Lipid Membranes. *J Phys Chem B* 119:8718–24.
- Matsuzaki K, Harada M, Handa T, et al (1989) Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 981:130–134.
- Matsuzaki K, Yoneyama S, Miyajima K (1997) Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J* 73:831–838.
- McConlogue CW, Vanderlick TK (1999) Molecular Determinants of Lipid Domain Shape. *Langmuir* 15:234–237.
- McConnell HM (1990) Harmonic shape transitions in lipid monolayer domains. *J Phys Chem* 94:4728–4731.
- McElhaney RN (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem Phys Lipids* 30:229–259.
- Mercado FV, Maggio B, Wilke N (2011) Phase diagram of mixed monolayers of stearic acid and dimyristoylphosphatidylcholine. Effect of the acid ionization. *Chem Phys Lipids* 164:386–92.
- Michaelson DM, Horwitz AF, Klein MP (1974) Head group modulation of membrane fluidity in sonicated phospholipid dispersions. *Biochemistry* 13:2605–2612.
- Miller a, Mohwald H (1987) Diffusion limited growth of crystalline domains in phospholipid monolayers. *J Chem Phys* 86:4258–4265.
- Miller A, Knoll W, Möhwald H (1986) Fractal growth of crystalline phospholipid domains in monomolecular layers.
- Miranda PB, Du Q, Shen YR (1998) Interaction of water with a fatty acid Langmuir film. *Chem Phys Lett* 286:1–8.
- Mura M, Dennison SR, Zvelindovsky A V., Phoenix D a. (2013) Aurein 2.3 functionality is supported by oblique orientated α -helical formation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1828:586–594.
- Nagle JF (1976) Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions. *J Membr Biol* 27:233–250.
- Neville F, Cahuzac M, Konovalov O, et al (2006) Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys J* 90:1275–1287.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29:464–472.
- Parente RA, Nir S, Szoka FC (1990) Mechanism of Leakage of Phospholipid Vesicle Contents Induced by the Peptide GALA ? *Biochemistry* 31506:8720–8728.
- Petty MC (1996) *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*.
- Phillips MC, Finer EG, Hauser H (1972) Differences between conformations of lecithin and phosphatidylethanolamine polar groups and their effects on interactions of phospholipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 290:397–402.
- Pokorny A, Almeida PFF (2004) Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by δ -lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. *Biochemistry* 43:8846–8857.
- Pokorny A, Birkbeck TH, Almeida PFF (2002) Mechanism and kinetics of delta-lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 41:11041 – 11056.
- Puech P-H, Borghi N, Karatekin E, Brochard-Wyart F (2003) Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge. *Phys Rev Lett* 90:128304.
- Sato H, Feix JB (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758:1245–56.
- Scholtysek P, Shah SWH, Müller SS, et al (2015) Unusual triskelion patterns and dye-labelled

- GUVs: consequences of the interaction of cholesterol-containing linear-hyperbranched block copolymers with phospholipids. *Soft Matter* 11:6106–6117.
- Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ (2008) Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1778:2308–2317.
- Sforça ML, Oyama S, Canduri F, et al (2004) How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. *Biochemistry* 43:5608–17.
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1462:55–70.
- Shchukin, E.D. et al. (2011) *Stable Nanoemulsions: Self-Assembly in Nature and Nanomedicine*. Elsevier
- Siegel S, Hoenig D, Vollhardt D, Moebius D (1992) Direct observation of three-dimensional transformation of insoluble monolayers. *J Phys Chem* 96:8157–8160.
- Signor G, Mammi S, Peggion E, et al (1994) Interaction of bombolitin III with phospholipid monolayers and liposomes and effect on the activity of phospholipase A2. *Biochemistry* 33:6659–70.
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–31.
- Souza BM, Mendes M a., Santos LD, et al (2005) Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 26:2157–2164.
- Stafford JH, Hao G, Best AM, et al (2013) Highly specific PET imaging of prostate tumors in mice with an iodine-124-labeled antibody fragment that targets phosphatidylserine.
- Stafford JH, Thorpe PE (2011) Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium. *Neoplasia* 13:299–308.
- Stefaniu C, Brezesinski G, Möhwald H (2014) Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 208:197–213.
- Stromstedt AA, Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M (2009) Evaluation of Strategies for Improving Proteolytic Resistance of Antimicrobial Peptides by Using Variants of EFK17, an Internal Segment of LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 53:593–602.
- Telesford DM (2012) Langmuir Trough and Brewster Angle Microscopy Study of Model Lung Surfactant Monolayers at the Air/Aqueous Interface.
- Tocanne J-F, Teissié J (1990) Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* 1031:111–142.
- Vanderlick TK, Möhwald H (1990) Mode Selection and Shape Transitions of Phospholipid Monolayer Domains. *J Phys Chem* 94:886–890.
- Vanderlick TK, Möhwald H (1990) Mode selection and shape transition of phospholipid monolayer domains. *J Phys Chem B Condens matter, Mater surfaces, interfaces Biophys* 94:886–890.
- Veatch SL, Keller SL (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J* 85:3074–3083.
- Veatch SL, Keller SL (2005) Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett* 94:3–6.
- Vega Mercado F, Maggio B, Wilke N (2012) Modulation of the domain topography of biphasic monolayers of stearic acid and dimyristoyl phosphatidylcholine. *Chem Phys Lipids* 165:232–7.
- Volinsky R, Kolusheva S, Berman A, Jelinek R (2006) Investigations of antimicrobial peptides

- in planar film systems. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:1393–1407.
- Vollhardt D, Fainerman VB (2006) Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility. *Adv Colloid Interface Sci* 127:83–97.
- Wang K, Yan J, Zhang B, et al (2009) Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Lett* 278:65–72.
- Wang K, Zhang B, Zhang W, et al (2008) Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides* 29:963–968.
- Weis RM, McConnell HM (1984) Two-dimensional chiral crystals of phospholipid. *Nature* 310:47–49.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, et al (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13003–8.
- Wilke N (2014) *Lipid Monolayers at the Air–Water Interface*, 1st edn. Elsevier Ltd.
- Wimley WC (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol* 5:905–917.
- Yeagle PL (2016) *The Membranes of Cells*. Elsevier Science
- Yeaman MR (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 55:27–55.
- Zanin LMP, Alvares DDS, Juliano MA, et al (2013) Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy. *Eur Biophys J* 42:819–831.
- Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62:971–988.