



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

Danúbia Batista Martins

**Interações de Peptídeos de Cadeias Curtas e Bicamadas
Lipídicas: Estudo Biofísico e Reflexos sobre a Atividade
Biológica**

São José do Rio Preto
2018

Danúbia Batista Martins

**Interações de Peptídeos de Cadeias Curtas e Bicamadas
Lipídicas: Estudo Biofísico e Reflexos sobre a Atividade
Biológica**

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^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera

Coorientador: Prof. Dr. Valmir Fadel

São José do Rio Preto
2018

Danúbia Batista Martins

**Interações de Peptídeos de Cadeias Curtas e Bicamadas
Lipídicas: Estudo Biofísico e Reflexos sobre a Atividade
Biológica**

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.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr^a. Iolanda Midea Cuccovia
USP – São Paulo

Prof. Dr^a. Marisa Rangel
Instituto Butantan – São Paulo

Prof. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
FAMERP – São José do Rio Preto

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

São José do Rio Preto
26 de novembro de 2018

RESUMO

O uso de peptídeos bioativos em antibioticoterapia tem dentre suas vantagens principais a reduzida possibilidade de desenvolvimento de resistência, uma vez que o alvo são os fosfolipídios constituintes da membrana celular. Muitos desses peptídeos são de cadeia curta, com amplo espectro de atividade contra bactérias e contra fungos, e com baixa citotoxicidade. Mecanismos de seletividade na ação de peptídeos bioativos vêm sendo investigados como forma de dirigir modificações estruturais que aperfeiçoem suas ações terapêuticas, minimizando efeitos tóxicos ou indesejáveis. Por serem predominantemente catiônicos, apresentam interação preferencial com bicamadas lipídicas aniônicas. Os peptídeos estudados neste trabalho são a Jelleine-I e dois análogos (JIF2W e JIF2WR) sintetizados com algumas modificações de resíduos na sequência primária, e a Protonectin isolada e em mistura com Protonectin (1-6). Estudos preliminares por dinâmica molecular sugeriram a formação de agregados na Jelleine-I em meio aquoso e em ambientes que modelam as características físico-químicas de membranas celulares, como as micelas do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). Informações semelhantes foram também obtidas por meios computacionais para a Protonectin. Entretanto, este peptídeo quando em mistura com Protonectin (1-6), apresenta menor tendência à agregação em meio aquoso e em SDS. Outros estudos mostraram ainda que esta mistura apresenta atividades biológicas aumentadas. Neste trabalho realizou-se uma análise biofísica desses peptídeos em relação à formação de agregados, eficiência e seletividade, avaliados na presença de ambientes de caráter zwitteriônico e aniônicos, utilizando medidas de espectroscopia de FTIR, dicroísmo circular (CD) e fluorescência além de Potencial Zeta e determinação de atividades biológicas. Mudanças estruturais em diferentes ambientes foram verificadas tanto para a família das Jelleinas como para as Protonectinas na interação com bicamadas lipídicas, assim como também variações na formação da agregação. Nestas interações os peptídeos mostraram-se seletivos e com maior afinidade por bicamadas lipídicas de caráter aniônico. Biologicamente, ambas as famílias apresentaram baixa atividade

hemolítica, sendo a Jelleíne-I e o análogo JIF2WR ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas, enquanto a Protonectin mostrando-se mais ativa contra células tumorais, com uma tendência de melhor eficiência na combinação terapêutica em mistura com a Protonectin (1-6) na proporção 1:1.

Palavras chaves: Jelleine-I; Protonectin; Agregação; Peptídeos antimicrobianos; Peptídeos anticâncer; Interações Peptídeos-Bicamadas Lipídicas; Modelos de Membrana; Técnicas Espectroscópicas.

ABSTRACT

The use of bioactive peptides in antibiotic therapy has among its main advantages the reduced possibility of resistance development, since the target are the phospholipids constituting the cell membrane. Many of these peptides are short chain, with broad spectrum of activity against bacteria and against fungi, and with low cytotoxicity. Mechanisms of selectivity in the action of bioactive peptides have been investigated as a way of directing structural modifications that improve their therapeutic actions, minimizing toxic or undesirable effects. Because they are predominantly cationic, they present preferential interaction with anionic lipid bilayers. The peptides studied in this work are Jelleine-I and two analogues (JIF2W and JIF2WR) synthesized with some modifications of residues in the primary sequence, and Protonectin isolated and in admixture with Protonectin (1-6). Preliminary molecular dynamics studies have suggested the formation of aggregates in Jelleine-I in aqueous media and in environments that model the physico-chemical characteristics of cell membranes, such as sodium dodecyl sulfate (SDS) surfactant micelles. Similar information was also obtained by computational means for Protonectin. However, this peptide when mixed with Protonectin (1-6), presents a lower tendency to aggregation in aqueous medium and in SDS. Other studies have also shown that this mixture has increased biological activities. In this work a biophysical analysis of these peptides was performed in relation to the formation of aggregates, efficiency and selectivity, evaluated in the presence of zwitterionic and anionic environments, using measurements of FTIR spectroscopy, circular dichroism (CD) and fluorescence in addition to Zeta Potential and determination of biological activities. Structural changes in different environments were verified for both the Jelleinas family and Protonectins in the interaction with lipid bilayers, as well as variations in aggregation formation. In these interactions the peptides were selective and with greater affinity for lipid bilayers of an anionic character. Biologically, both families had low hemolytic activity, with Jelleine-I and JIF2WR analogue being active mainly against Gram-positive bacteria, whereas Protonectin was more active against tumor cells, with a trend of better efficiency in the

combination therapy with Protonectin (1-6) in the ratio 1: 1.

Keywords: Jelleine-I; Protonectin; Aggregation; Antimicrobial peptides; Anticancer peptides; Peptide-Lipid bilayer interactions; Membrane Models; Spectroscopic Techniques.

Agradecimentos

Agradeço imensamente a Professora Doutora Marcia Perez dos Santos Cabrera por todo este período de aprendizagem, pelas oportunidades proporcionadas com a finalidade de contribuir para o meu crescimento profissional, pela paciência dedicada nos períodos de dificuldade e, especialmente, por ser uma inesgotável fonte de inspiração para o meu trabalho. Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Valmir Fadel.

Agradeço à UNESP-IBILCE; pela excelente formação que me proporcionou e ao Programa de Pós Graduação em Biofísica Molecular, que através dos professores e funcionários possibilitou a execução deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço a FAPESP por todo o apoio financeiro ao longo do doutorado.

Agradeço aos colaboradores que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho: Prof. Dr. Maurício Boscolo, pelo uso do FTIR; Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pelo uso do CD; a Dra. Bibiana Monson de Souza e ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pelos testes de atividade antibacteriana; a Dra. Carolina Colombelli Pacca, pelos testes de atividade antifúngica; ao aluno Vinícius Eleotério Fazani por ser voluntário para doação de sangue para os testes de atividade hemolítica; ao Prof. Dr. Miguel A. R. B. Castanho pelos testes de viabilidade celular das Protonectinas; ao Prof. Dr. Manoel Arcisio-Miranda, pelos testes de viabilidade celular das Jelleinas.

Agradeço a União das Faculdades dos Grandes Lagos – UNILAGO, e em especial ao Prof. Dr. Eduardo Meireles por acreditar em mim como docente e sempre incentivar meu aperfeiçoamento científico, para crescimento profissional e intelectual.

Agradeço em especial aos meus companheiros de laboratório Vinícius, Maira, Luana, Mirian, Viviane e Thais, pelos momentos de companheirismo, descontração e trocas de experiência, e também fora dele como Maicon, Grazi, Amanda, Tabata, Davi, Gabriela, Taisa e Dayane e queridos alunos/orientandos como Henrique, Carla, Luciano, Robson e tantos outros que estavam presentes sempre que precisei.

Agradeço a minha toda a minha família e especialmente a minha mãe por toda dedicação em me apoiar e me ajudar em todos os momentos, e por todos os Reikis, homeopantias, energias positivas e paciência que foram fundamentais para esse fechamento. Agradeço ao Juliano por me apoiar em todos os momentos dessa caminhada e pelo infinito carinho, amor e PACIÊNCIA!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	2
1.1 - INTRODUÇÃO	2
1.2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
1.3 - OBJETIVOS	20
CAPÍTULO 2	22
2.1 – MATERIAIS	22
2.2 - MÉTODOS	23
2.2.1 - Preparação de vesículas grandes (LUVs).....	23
2.2.2 - Determinação de CAC via fluorescência	23
2.2.3 - Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	25
2.2.4 - Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	28
2.2.5 - Extravasamento de corante	29
2.2.6 - Anisotropia de fluorescência da sonda DPH.....	31
2.2.7 - Potencial Zeta e tamanho de vesículas (DLS)	31
2.2.8 - Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.....	34
2.2.9 - Atividade antibacteriana e antifúngica	37
2.2.10 – Atividade hemolítica.....	39
2.2.11 - Ensaio de Viabilidade Celular para Protonectinas	40
2.2.12 - Ensaio de Viabilidade Celular para Jelleínas	41
CAPÍTULO 3 - JELLEINE-I E ANÁLOGOS	43
CAPÍTULO 4 - PROTONECTIN E PROTONECTIN (1-6)	75
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	115
CAPÍTULO 6	117
6.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CAPÍTULO 7	136
7.1 – APÊNDICE.....	136

Capítulo 1

1.1 - Introdução

Nas últimas décadas, a análise e caracterização biofísica de peptídeos antimicrobianos (AMPs) como conformação estrutural, estabilidade, citotoxicidade e avaliação da sua atividade *in vitro* e *in vivo*, e estudos em sistemas modelo permitem evoluir o conhecimento fundamental para que o desenho de novas sequências que conduzam a formas mais eficientes e seletivas. Os AMPs vêm sendo estudados para a compreensão dos mecanismos moleculares que caracterizam principalmente sua ação na presença de bactérias, fungos e células tumorais com o intuito de serem utilizados em alternativa para os tratamentos convencionais (Matanic et al., 2004; Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Melo e Castanho, 2012).

O interesse na utilização dos AMPs no meio clínico vem crescendo nos últimos anos pela sua alta seletividade, eficiência e baixa citotoxicidade (Mathur, et al., 2016). O desenvolvimento e pesquisa desses peptídeos os tornam candidatos para testes clínicos e aplicabilidade na medicina, o que já vem sendo realizado em mais de 140 peptídeos denominados de terapêuticos (Fosgerau e Hoffmann, 2015). Investimentos da indústria farmacêutica na obtenção, inovação e caracterização desses peptídeos, conduzem a testes clínicos como, por exemplo, o peptídeo ZP2929 da companhia dinamarquesa Zealand Pharma, indicado para testes em diabetes tipo 2 e obesidade, que se encontra em fase I (Kaspar e Reichert, 2013). Já outros estão em fases mais avançadas de testes, como o MAR709 (Roche - Suíça) em fase II e o Oritavancin, da americana *The Medicines Company*, que possui um mecanismo de ação de ruptura da membrana celular de bactérias Gram-positivas e que está em fase III de testes para infecções bacterianas (Fosgerau e Hoffmann, 2015; Karaoui et al., 2013). A aprovação de peptídeos terapêuticos em testes clínicos já é realidade, como, por exemplo, o Koolistin®, da companhia indiana Biocon Ltd., nome comercial dado ao peptídeo *colistin sulfate*, que é usado para o tratamento de infecções geradas por bactérias resistentes, e mais recentemente aprovado, o Surfaxin®, da companhia americana *Discovery Laboratories*, para Síndrome de Desconforto Respiratório (RDS) em bebês prematuros (Agirre, et al., 2016; Kaspar e Reichert, 2013).

Uma das estratégias para obter melhoramento na atividade desses peptídeos tem início no desenho de peptídeos análogos, através de modificações na sequência de aminoácidos dos peptídeos de origem. Essas modificações frequentemente se relacionam a características de tamanho, carga elétrica líquida, conformação estrutural, hidrofobicidade e anfipaticidade. As novas sequências devem ser caracterizadas quando as suas atividades biológicas para que finalmente demonstrem que as alterações favorecem ou prejudicam a atividade e a seletividade da molécula desenvolvida (Brodgen, 2005 e Pasupuleti, et al., 2012). A literatura mostra que essa estratégia é capaz de dar origem a novos peptídeos com potencial para tratamento clínico nas áreas de oncologia, doenças metabólicas, infecções, problemas cardiovasculares, entre outros (Fosgerau, et al., 2015). Para a indústria farmacêutica, um peptídeo pequeno (<30 resíduos) e com ação medicamentosa, seria mais vantajoso para a aplicação médica, uma vez que os custos das sínteses são proporcionais ao tamanho das cadeias. No entanto, os gastos na fabricação ainda são bem elevados quando comparados aos medicamentos convencionais (Lax, 2010). Além disso, o uso traz algumas limitações como a administração dos mesmos no organismo, sendo realizados preferencialmente na forma injetável, inalatória ou cutânea e não ingeridos, pois podem mais facilmente estar sujeitos a serem degradados no processo de digestão (Lax, 2010).

1.2 - Fundamentação Teórica

Peptídeos bioativos

Peptídeos são moléculas compostas de uma sequência de resíduos de aminoácidos (menores de 30 resíduos) e com baixo peso molecular (1400 a 7000 Da). São caracterizados como bioativos, por possuírem atividade biológica, e mais especificamente, peptídeos antimicrobianos (AMPs), por sua ação contra micro organismos como atividade bactericida, antifúngica e antiviral, atividade antiparasitária, além da atividade anti células tumorais, entre outros (Melo, et al., 2009; Pasupuleti, et al., 2012; Wang, et al., 2018). Algumas características são de fundamental importância para as diferentes atividades dos peptídeos como AMPs, como tamanho da cadeia, carga líquida, anfipaticidade e hidrofobicidade (Wang, et al., 2018).

Caracterização físico-química

Tamanho da sequência

O tamanho de um peptídeo bioativo pode variar conforme a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na sua sequência primária. Peptídeos curtos são preferidos para utilização como peptídeos terapêuticos por possuírem um reduzido custo de síntese além de tornar dificultada a degradação por proteases presentes nos sistemas biológicos, aumentando sua estabilidade (Lax, 2010; Ramesh, et al., 2016; Samantha Ng, et al., 2018). Os AMPs de cadeias curtas vêm sendo alvo de muitos estudos como para atividade fungicida contra *Candida albicans* que foi verificada para um octapeptídeo, denominado de peptide 1 (IKIKIKIK-NH₂), que mostrou-se mais ativo que a fluoconazol e o miconazol, fármacos mais utilizados (Samantha Ng, et al., 2018). Outro exemplo de peptídeos ativos contra bactérias e *Candida* são os RK31 (RKSKEKIG-OH) e KS30 (KSKEKIGK-OH), que possuem 8 resíduos de aminoácidos e são sequências derivadas do peptídeo LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-OH), de 37 resíduos. Os peptídeos de cadeia curta apresentaram maior atividade antimicrobiana e fungicida demonstrando elevada eficiência e seletividade (Gallo e Murakami, 2005; Kosikowska e Lesner, 2016).

Carga líquida

Os AMPs possuem, em sua grande maioria, uma carga líquida positiva, ou seja, caráter catiônico o que favorece a sua interação preferencialmente com membranas aniônicas, como a de fungos, bactérias e células tumorais, podendo causar a lise celular (Lee, et al., 2015; Gaspar e Castanho, 2013). A atração entre o peptídeo, de carga positiva, e membrana celular, com carga negativa, é o primeiro passo para a interação eletrostática. Após essa aproximação e contato com a membrana, o peptídeo se orienta, adquire uma conformação secundária característica e pode, conseqüentemente levar a formação de poros ou defeitos na membrana, podendo ainda penetrar no citoplasma, atingir outros alvos ou causar a morte celular diretamente por efeito de lise (Jenssen, et al., 2016). A redução da carga líquida presente na cadeia do peptídeo, pode ocasionar

uma redução na atividade antimicrobiana dos AMPs (Wang, et al., 2018), ou pode aumentá-la por interferir com outros parâmetros como a hidrofobicidade (Dathe, et al., 2001).

Hidrofobicidade

Outro parâmetro importante é o grau de hidrofobicidade do peptídeo, que se relaciona a preferencia do mesmo em se manter na solução ou migrar para regiões hidrofóbicas (Dathe e Wieprecht, 1999). Essa característica afeta a interação e pode reduzir a seletividade por membranas negativamente carregadas, tornando mais hemolíticos peptídeos altamente hidrofóbicos (Schmidtchen, et al., 2014; Wood, et al., 2014; Wang, et al., 2018). Dentre as características desejáveis de AMPs está a baixa atividade hemolítica, e a sua seletividade em relação às células alvo. A hidrofobicidade pode definir a seletividade de um peptídeo que está relacionada a preferencia por determinada membrana. Para um AMP é de fundamental importância que as membranas negativamente carregadas, como de bactérias, fungos e tumorais, sejam as preferidas em relação às células sanguíneas, por exemplo. (Brodgen, 2005; Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Melo, et al., 2009; Li, et al., 2012).

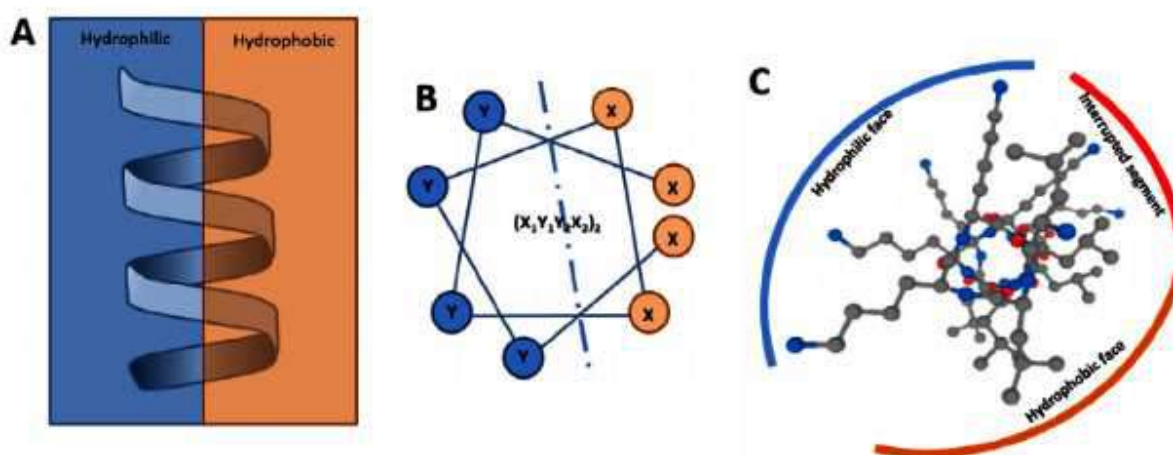
A hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$) pode ser obtida pela média aritmética da hidrofobicidade intrínseca dos resíduos, de acordo com deferentes escalas. Uma delas, é a escala de consenso de Eisenberg e colaboradores (1984). Nesta escala a $\langle H \rangle$ é relacionada a cada resíduo, com suas respectivas características, como polaridade e carga, sendo o resíduo mais hidrofóbico a isoleucina (Ile) $\langle H \rangle = 0,73$ e o resíduo menos hidrofóbico é a arginina (Arg) $\langle H \rangle = - 1,76$. Em estudo desenvolvido por Liu e Deber (1998) outro método foi apresentado para determinação da hidrofobicidade relativa de cada resíduo de aminoácido, obtido a partir do tempo de retenção HPLC. Há ainda as escalas de Kyte e Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) e Wimley e White (Wimley & White 1996) que são bastante usadas em estudos envolvendo peptídeos.

Anfipaticidade

A anfipaticidade está diretamente relacionada ao ordenamento da sequencia primária e à composição de aminoácidos que o peptídeo possui, surgindo da oposição de face entre os

resíduos hidrofóbicos e os resíduos polares, como mostrado na figura 1. Esse parâmetro é verificado especialmente em peptídeos com formação de hélice- α , sendo esse arranjo considerado importante para a atividade antimicrobiana de amplo espectro (Khara, et al., 2017). Outras estruturas secundárias como folhas- β e conformações em voltas ou estendidas também podem apresentar anfipaticidade (Mohanram e Bhattacharjya, 2014)

Figura 1 – Esquema ilustrando a face hidrofóbica e hidrofílica de uma hélice- α (A). A projeção de uma hélice- α ideal com os resíduos opostamente distribuídos, onde Y são os resíduos com caráter catiônico e X os resíduos hidrofóbicos (B). Modelo demonstrando os resíduos na hélice- α com suas respectivas cadeias laterais e identificando as regiões de maior contato com a membrana (face hidrofóbica) e mais expostas (face hidrofílica) (C).



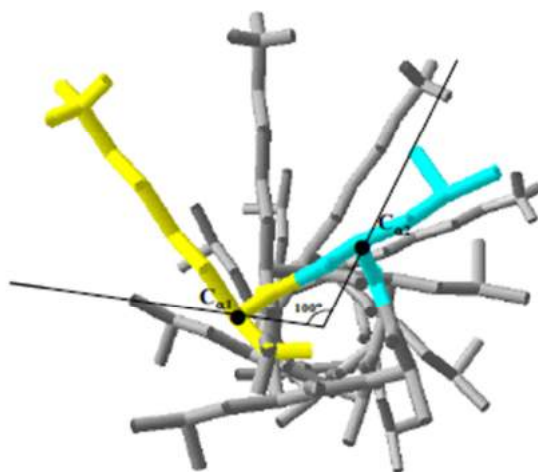
Fonte: Adaptado de Khara, et al. (2017).

Os resíduos carregados como Arg, Lys e His, proporcionam cargas positivas e os resíduos hidrofóbicos são mais suscetíveis à incorporação nas bicamadas, mediando uma possível ruptura da membrana e possível morte celular (Wang, et al., 2018). Alguns aminoácidos como, por exemplo, a Fenilalanina (Phe), pode reduzir a formação estrutural de hélice- α , enquanto que a Leucina (Leu) e Lisina (Lys) são resíduos que tem uma tendência maior à formação da conformação helicoidal e podem modular a anfipaticidade (Wiradharma, et al., 2011).

Momento Hidrofóbico

Momento hidrofóbico (μ_H) é uma característica resultante do ordenamento de uma sequência peptídica que favoreça a formação de estruturas helicoidais. Ele é resultado do cálculo do momento ponderado das respectivas hidrofobicidades de cada resíduo de aminoácido. Segundo Eisenberg e colaboradores (1984) o μ_H é uma medida indireta da anfipaticidade de peptídeos, quem indica a orientação dos resíduos da sequência primária na formação helicoidal. O conceito do momento hidrofóbico é baseado em uma hélice- α ideal, onde o ângulo entre as cadeias laterais da sequência dos aminoácidos no eixo da hélice é de 100° , como mostrado na figura 2. Isso indica que quanto maior o momento hidrofóbico, maior a orientação dos resíduos para uma segregação entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. É possível uma predição da estrutura helicoidal de um peptídeo, a partir do μ_H e sua atividade em membranas, dependendo da conformação estrutural (Dathe e Wieprecht, 1999).

Figura 2 – Projeção de uma hélice- α ideal do peptídeo KLA1 com 16 resíduos de aminoácidos (A), com ângulo de 100° entre os resíduos 1 e 2 deste peptídeo com o eixo da hélice.

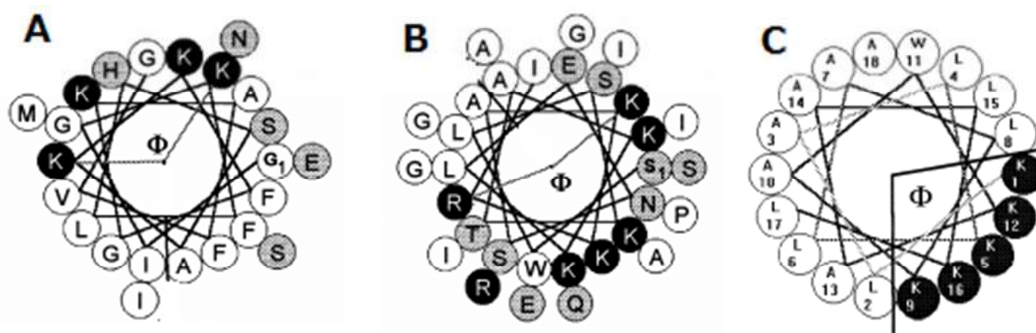


Fonte: Costa (2006)

Ângulo polar (Φ)

O ângulo polar (θ_p ou Φ) é definido como a angulação formada pelos resíduos polares, ou seja, a face polar formada quando na configuração de uma hélice- α (Dathe e Wieprecht, 1999). Esse parâmetro está diretamente relacionado à forma com que esse peptídeo interage com membranas (Dathe, et al., 1997). A figura 3 mostra diferentes projeções para peptídeos bastante estudados a Magainina, de 23 resíduos (A), o Cecropin P1, com 31 resíduos (B) e o KLA1 de 18 resíduos (C), com ângulos da região dos resíduos catiônicos, ou ângulos polares, de 120° , 200° e 80° , respectivamente. A redução do ângulo polar está diretamente relacionada à atividade antibacteriana e hemolítica, onde os peptídeos Magainina e KLA1 possuem maior eficiência que o Cecropin P1 (Dathe, et al., 1997; Dathe e Wieprecht, 1999).

Figura 3 - Projeção de hélice- α com seus respectivos ângulos polares (Φ) para os peptídeos Magainina (A), Cecropin 1 (B) e KLA1 (C)



Fonte: Adaptado Dathe, et al. (1997); Dathe e Wieprecht (1999).

Estrutura secundária

Peptídeos geralmente possuem uma estrutura aleatória em solução aquosa, mas na presença de ambientes com características semelhantes a membranas biológicas, adquirem conformações estruturais denominadas de secundárias como α -hélice, folhas- β ou uma mistura dessas conformações, além de estruturas em voltas ou estendidas (Bechinger, 2008). Muitos estudos mostram que a elevada atividade biológica pode estar associada ao alto teor de helicoidal,

como, por exemplo, a Magainina, que é predominantemente hélice- α (Matsuzaki, et al., 1995). Mas outros peptídeos, como o CDP-1, com peptídeo modificado do PG-1, demonstrou elevada atividade bactericida, mesmo adquirindo, em ambientes semelhantes a membranas biológicas, basicamente conformações β (Mohanram e Bhattacharjya, 2014). A conformação estendida é outra forma adquirida por peptídeos, onde o peptídeo se mantém praticamente linear, e foi verificado principalmente para sequências ricas em Prolina (Pro) e Glicina (Gly), como, por exemplo, o peptídeo de defensina de suínos, PR-39, rico em Prolinas, com 39 resíduos e que se mostrou tão eficiente quanto peptídeos com estruturação helicoidal ou folhas- β , para bactérias Gram-positivas e Gam-negativas (Veldhuizen, et al., 2014). A elevada atividade antimicrobiana também foi verificado para peptídeos ricos em Glicina, como o Gloverina, de 24 resíduos (Yi, et al., 2014).

Isso indica que a relação estrutura/função, onde a passagem da estrutura desordenada ou aleatória (*random coil*) para a formação de estruturas secundárias ordenadas é induzida pela interação dos peptídeos para com sistemas membranares e de fundamental importância como o caso do Anoplin, Mastoparano X (MP-X), Decoralin (DCN), entre outros (Dos Santos Cabrera, et al., 2008; Laird, et al., 2009; Martins, et al., 2017). Algumas alterações na conformação estrutural, como por exemplo, modificações na sequência primária, podem afetar a sua interação, reduzindo sua ação como AMP (Strömstedt, et al., 2009; Schmidtchen, et al., 2014).

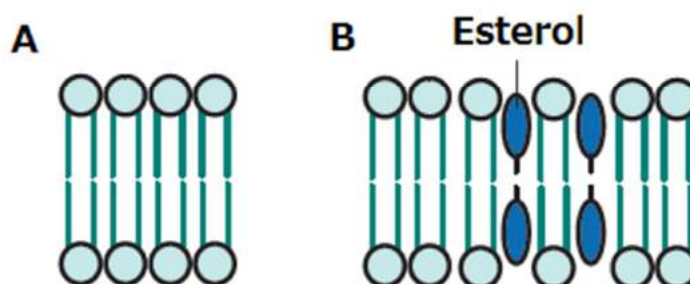
Características e Influência das Membranas Biológicas na Interação com Peptídeos

As membranas celulares são responsáveis por definir os limites externos e controlar o transporte molecular entre o meio externo e o interno e vice-versa, sendo composta por proteínas e lipídeos, principalmente fosfolipídeos, e em alguns casos esteróis (Nelson e Cox, 2014).

A atividade dos peptídeos bioativos tem como alvo a membrana celular dos organismos vulneráveis. A interação entre peptídeo e membrana depende, primeiramente, do tipo de célula (eucarioto e procarioto), uma vez que suas composições lipídicas diferem (Pasupuleti, et al., 2012). As membranas de eucariotos são, por maioria, composta de lipídios zwitteriônicos, principalmente por Fosfatidilcolina (PC), seu análogo Esfingomielina (SM) e Fosfatidiletanolamina (PE). O Colesterol (Col), um esterol, presente na membrana celular de

eucarioto e ausente na membrana de procarioto, influencia de forma decisiva na interação dos peptídeos com essas membranas, pois modifica as propriedades das membranas, como redução da permeabilidade da membrana por aumentar o empacotamento lipídico (Benachir, et al., 1997; Allende and McIntosh, 2003). O Colesterol reduz os efeitos causados por peptídeos bioativos nas bicamadas lipídicas, tornando a membrana mais rígida e afetando a cooperatividade, por exemplo, do peptídeo Polybia MP-1, quando comparado a bicamadas compostas apenas de DOPC, como observado por Dos Santos Cabrera, et al. (2008). Esse fenômeno também foi verificado para o peptídeo Melitina, onde quando adicionado colesterol à bicamada lipídica, a interação foi reduzida, como verificada pela redução da energia livre (Allende and McIntosh, 2003). A figura 4 mostra um esquema de uma bicamada lipídica na ausência (A) e na presença do colesterol, indicando onde esse esterol se localiza.

Figura 4 – Esquema demonstrativo dos fosfolipídeos em uma bicamada lipídica na ausência (A) e na presença (B) do Colesterol (Col)

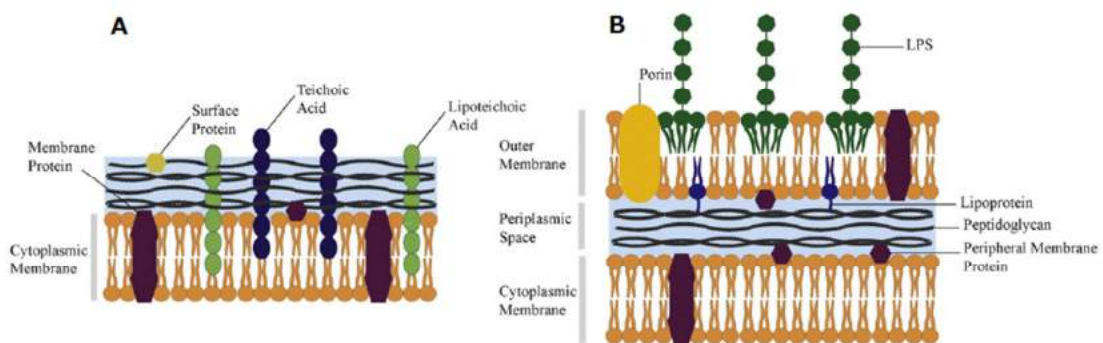


Fonte: Adaptado de Holthuis e Menon (2014).

Fosfolipídeos negativamente carregados, como, por exemplo, fosfatidilserina (PS) estão presentes na camada interna dessas membranas. O aparecimento do PS na camada externa da membrana ocorre conseqüentemente a uma anormalidade no funcionamento da célula, acarretando alterações no seu caráter zwitteriônico (Zachowski, 1993). Essas modificações tornam a membrana com caráter aniônico, que pode sinalizar o desenvolvimento de células cancerígenas (Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Sinthuvanich, et al., 2012).

As membranas celulares de microorganismos como bactérias não são diferentes, mas apresentam características específicas quando se tratando de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como mostrado na figura 5.

Figura 5 – Complexidade de membranas biológicas de bactérias Gram-positivas (A) que possui apenas uma membrana celular, e bactérias Gram-negativas (B), que possuem duas membranas celulares, o que adiciona maior proteção e resistência



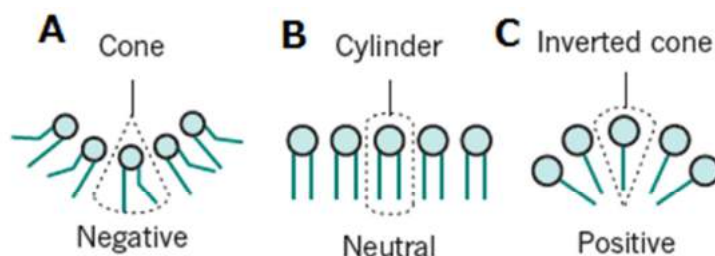
Fonte: Adaptado de Epanand, et al. (2016).

As membranas de procariotos são compostas, predominantemente, por fosfolípidios aniônicos como o fosfatidilglicerol (PG) e a cardiolipina (CL), que estão praticamente ausentes em células de eucariotos (Lohner and Prenner, 1999; Yeaman and Yount, 2003; Epanand, et al., 2006). A composição fosfolipídica de organismos como bactérias Gram-negativas são compostas principalmente por Fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG), diferentemente das Gram-positivas compostas preferencialmente por PG e cardiolipina (CL) (Shaw, 1974; Lohner, 2001; Sevcsik et al., 2008; Prossnigg, et al., 2010).

As propriedades físicas intrínsecas dos fosfolípidos, como a forma molecular adquirida por eles, são responsáveis pela curvatura que é adquirida pelas bicamadas lipídicas. Fosfolípidos como PE e CL possuem uma forma cônica e que quando na formação da bicamada induz uma

curvatura negativa, como mostrado na figura 6 (A). PC e PG possuem uma forma cilíndrica (figura 6(B)), e tendem a induzir uma curvatura positiva, pelo seu formato de cone invertido (Wang, et al., 2015), assim como lisofosfolídeos que apresentam curvatura positiva. O resultado dessa curvatura afeta diretamente a interação para com o peptídeo e pode conduzir a uma redução na sua atividade lítica, como verificado para a Polybia MP-1 nas interações com bicamadas lipídicas contendo CL (dos Santos Cabrera et al., 2008 e 2012)

Figura 6 – Esquema ilustrando a formação de uma camada lipídica com fosfolídeos de formato cônico (A), cilíndrico (B) e cônico invertido (C)



Fonte: Adaptado de Holthuis e Menon (2014).

As membranas celulares de fungos, como, por exemplo, a *C. albicans*, possuem também um caráter aniônico, podendo conter, na sua composição fosfolipídica, Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidilserina (PS) e o esteroil Ergosterol (Erg) (Löffler et al., 2000). Essa característica favorece a interação de peptídeos catiônicos como, por exemplo, a Polybia CP, que é um bom agente fungicida (Wang, et al., 2013), para as espécies de *Candida*, um dos fungos com maior resistência secundária adquiridas pelos fármacos atuais (Slaninova, et al., 2011).

Mecanismos de ação

O mecanismo de interação entre peptídeos antimicrobianos e bicamadas lipídicas tem algumas etapas relativamente bem estabelecidas. Geralmente essa interação se dá inicialmente por interações eletrostáticas, onde as regiões carregadas positivamente dos peptídeos interagem com regiões negativamente carregadas dos lipídios (cabeças polares). Nesse contato com a membrana, o peptídeo pode causar algumas alterações no empacotamento da bicamada como

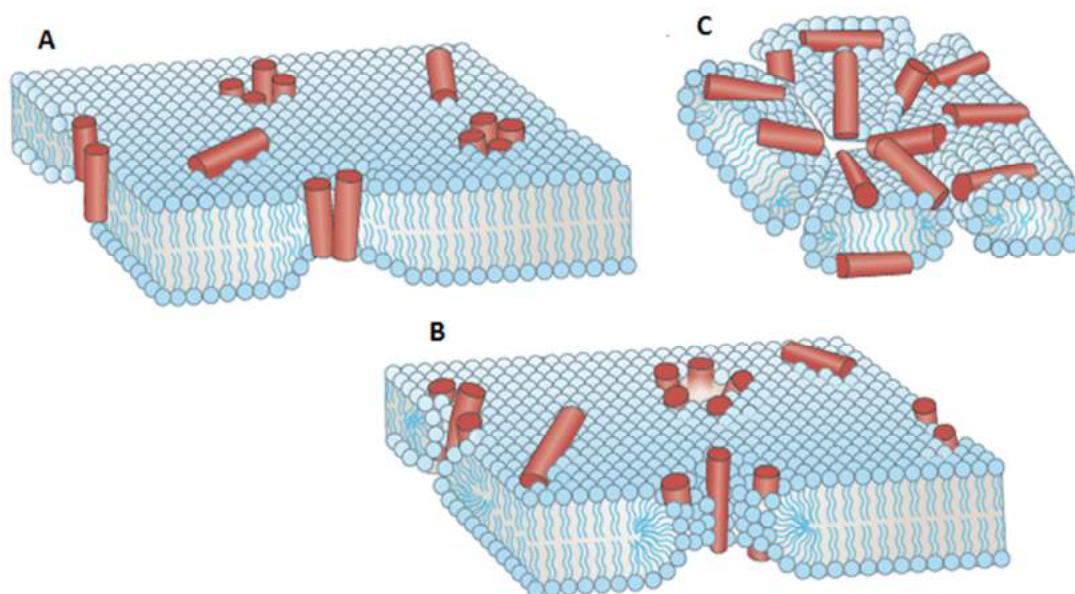
variações na curvatura, modificações eletrostáticas, perturbações locais e formação de poros ou defeitos, resultando em um rearranjo tanto do peptídeo como dos fosfolipídios (Fjell, et al., 2012).

De acordo com vários autores como Matsusaki (1996), Shai (1999) e Huang (2000), modelos para o mecanismo de interação entre os peptídeos bioativos e a membrana celular são propostos, para melhor descrição dessa associação. Esta inicia-se com a interação entre o peptídeo e a camada externa da membrana, onde o peptídeo assume uma conformação estrutural (hélice- α , folhas- β , etc), ou uma estrutura estendida, mas com características predominantemente anfipáticas, de forma paralela à membrana. A presença do peptídeo catiônico induz mudanças inicialmente nos grupos mais expostos como cabeças polares de caráter aniônico, evoluindo para a bicamada como um todo, influenciando na distribuição de cargas, tensão de curvatura, fluidez da membrana, além do empacotamento lipídico (Killian, 1992; Zhao et al., 2002; Bozelli, et al., 2012).

Segundo Huang (2000) o acúmulo dos peptídeos paralelamente a superfície externa da membrana acontece enquanto a razão $[P]/[L]$ é baixa até a mesma atingir uma concentração crítica, ou seja, um razão $[P]/[L]$ limite que causa uma tensão nessa superfície levando a uma deformação significativa e posterior formação de poros ou defeitos. A partir dessa concentração, a orientação do peptídeo muda, tornando-se perpendicular a membrana, podendo levar a formação de poros toroidais, o modelo proposto por Matsusaki (1996). Nesse modelo o peptídeo forma o poro interagindo com a região das cabeças polares, causando uma curvatura positiva na camada fosfolipídica da membrana de maneira que as cadeias acílicas não entrem em contato com o peptídeo, mantendo-se interiorizados na bicamada, onde o poro possui peptídeos e lipídios, como mostrado na figura 7 (B). Segundo Matsuzaki, o poro toroidal pode acarretar em uma translocação do peptídeo para a região do citoplasma celular. Esse modelo é mais compatível com peptídeo de cadeia curta e de comportamento cooperativo (Wimley, 2010).

Outro tipo de modelo de formação de poros é a estrutura barril (Baumann e Mueller, 1974). Nesse modelo o peptídeo orienta-se de tal forma que a região hidrofóbica do peptídeo interage com as caudas acílicas dos lipídios, revestindo todo o interior do poro, e os resíduos carregados ficam em contato com a solução e com a região das cabeças polares dos fosfolipídios. Essa interação causa a separação lateral da bicamada lipídica, como mostrado na figura 7 (A).

Figura 7 – Principais modelos de mecanismos de interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas na formação de poro Barril (A), poro Toroidal (B) e Carpete (C).



Fonte: Adaptado de Melo et al. (2009).

Outro modelo é o denominado carpete, proposto por Shai (1999), no qual os peptídeos vão se acumulando e cobrindo a superfície da membrana até atingirem uma concentração crítica, semelhante a um tapete e desestabilizando a bicamada, podendo agir como um detergente. Conforme a concentração de peptídeo aumenta, ultrapassando a concentração crítica, fragmenta-se a membrana, como na figura 7 (C) (Shai et al., 1999; Shai, 2013). As conformações adquiridas pelo peptídeo, as mudanças estruturais conferidas pela membrana e a forma da interação peptídeo-membrana, conferem a sua eficiência bioativa (Wadhvani, et al., 2012).

A agregação de peptídeos em solução e/ou na presença de membranas é um fenômeno que pode interferir diretamente na interação peptídeo-membrana, modificando seu comportamento. Segundo Sayegh e colaboradores (2016), o peptídeo estudado, o Longipin, apresentava estrutura aleatória em tampão e em ambientes com caráter zwitteriônico, mas em bicamadas de composição fosfolipídica semelhante à de fungos, houve a formação de agregados que podem ter favorecido a interação, ou seja, tornando-o mais eficiente. Por outro lado, estudos verificaram que a presença da agregação pode diminuir a atividade antimicrobiana, como verificado para o

peptídeo dermaseptin S4 e análogos (Feder, et al., 2000) e 6K-F17 e análogos (Yin, et al., 2012), indicando que a redução da agregação favorece a atividade antimicrobiana dos peptídeos. Em estudos anteriores (dos Santos Cabrera et al., 2014; Baldissera et al., 2015), verificou-se que os AMPs Jelleine-I, e Protonectin tendem a formação de agregados em solução e/ou na presença de sistemas miméticos de membranas. Essas condições ainda pouco exploradas constituíram o objeto de interesse do presente estudo para estabelecimento de uma relação entre a formação de agregados, seletividade e eficiência de peptídeos bioativos.

Para a caracterização estrutural, a espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) assim como de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são técnicas que possibilitam a análise de estruturas secundárias. O FTIR vem se tornando uma técnica muito utilizada para a detecção de agregação em se tratando de peptídeos e proteínas (Murayama e Tomida, 2004; Miller, et al., 2013). A sensibilidade vibracional para a região correspondente às estruturas secundárias ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) possibilita a verificação da formação de agregados, na faixa de aproximadamente 1620 a 1630 cm^{-1} , que é característico de folhas- β intermoleculares (Barth, 2007). Estudos com proteínas e peptídeos, relacionadas a doenças como o Alzheimer e Parkinson, por exemplo, utilizam do FTIR para monitoramento da conformação estrutural, como redução das estruturas secundárias, como hélice- α , aumento da formação de agregados (Perálvarez-Marín, et al., 2008; Eisenberg e Jucker, 2012; Sarroukh, et al., 2013).

O mecanismo de interação entre os peptídeos e membranas modelo, assim como a sua afinidade podem ser estudados por meio de espectroscopia de fluorescência e também por medidas de Potencial Zeta, podendo investigar a eficiência e a afinidade das interações na presença de diferentes composições lipídicas (Freire et al., 2011; dos Santos Cabrera, et al., 2008). A caracterização do comportamento de peptídeos em bicamadas lipídicas que modelam as principais características das membranas biológicas nos possibilita prever aspectos da forma e do mecanismo de ação em bactérias, fungos e em células tumorais (Sayegh, et al., 2016).

Os Peptídeos-Modelo deste Estudo

Jelleínas

O peptídeo Jelleine-I, (JI), um dos peptídeos da classe das Jelleínas, foi extraído de fonte natural, a geléia real. Essa consiste em uma secreção ácida e de coloração branca amarelada, alimento principal das abelhas rainhas (Fujiwara, et al., 1990). Produzida pelas operárias, sua composição pode variar de acordo com o ambiente, clima e ecologia da região, mas mantendo-se rica em vitaminas, minerais, proteínas, além de carboidratos, como por exemplo, a frutose (Palma, 1992). Estudos desenvolvidos por Fontana e colaboradores (2004) extraíram, purificaram e submetem a vários testes biológicos, 4 peptídeos análogos tipos da Jelleína-I, mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Sequencia primária dos peptídeos da família das Jelleínas.

Peptídeos	Sequências
Jelleine-I	P-F-K-I-S-I-H-L-NH ₂
Jelleine-II	T-P-F-K-I-S-I-H-L-NH ₂
Jelleine-III	E-P-F-K-I-S-I-H-L-NH ₂
Jelleine-IV	T-P-F-K-I-S-I-H-NH ₂

Fonte: Fontana et al. (2004).

Neste estudo as modificações dos análogos da JI (adição de resíduo no N-terminal e deleção em Jelleine-IV), causaram algumas mudanças na ação biológica. A JI, em comparação com as demais jelleínas, possui algumas características relevantes como elevada atividade antibacteriana (com MIC da ordem de 10 µg/ml) e antifúngica (MIC de 2,5 µg/ml). Para as demais Jelleínas, a eficiência foi reduzida, com MIC na ordem de 15 µg/ml, 30 µg/ml e nenhuma atividade para J-II, J-III e J-IV, respectivamente.

A interação das jelleínas com bicamadas fosfolipídicas de composições semelhantes a bactérias e fungos foi estudada, indicando alta atividade lítica para a JI em relação às demais. Adicionalmente, por dinâmica molecular, os resultados sugeriram a formação de agregados quando na presença de ambientes que mimetizam as características físico-químicas e estruturais

de membranas celulares (dos Santos Cabrera, et al., 2014). Por esses motivos, o peptídeo JI vem sendo usado como base para o *design* de análogos que são sintetizados com o intuito de se obter melhores agentes bioativos. Em trabalhos com análogos da JI algumas modificações tornaram o peptídeo mais eficiente (Hansen, 2010) mas algumas substituições, principalmente do N e C-terminais, reduziram a atividade antibacteriana (Romanelli, et al., 2011; Capparelli, et al., 2012), sugerindo uma forte influência dos aminoácidos dessas regiões para o melhoramento dos peptídeos.

No presente trabalho, dois análogos foram desenhados e sintetizados: JIF2W, que apresenta um resíduo de triptofano (Trp) na posição 2 ao invés da fenilalanina presente na sequência nativa, e o JIF2WR que além de possuir um resíduo de Trp na posição 2, como o JIF2W, apresenta argininas (Arg) nas posições 3 e 7 em que se encontram a lisina (Lys) e a histidina (His) na sequência da JI. A sequência da JI e dos análogos estão apresentadas na tabela 2, assim como sua carga líquida e suas hidrofobicidades médias calculadas.

Tabela 2 - JI e análogos sintetizados. Sequências com as respectivas substituições em vermelho, carga líquida (Q) em pH 5.5, hidrofobicidade média (<H>) e momento hidrofóbico (μ_H) segundo Eisenberg et al., 1984, além de tempo de retenção (TR em minutos).

Peptídeos	Sequências	Q	<H>	μ_H	TR (min)
Jelleine-I (JI)	Pro- Phe-Lys -Ile-Ser-Ile- His -Leu-NH ₂	+3	0.096	0,177	17.841
JIF2W	Pro- Trp -Lys-Ile-Ser-Ile- His -Leu-NH ₂	+3	0.066	0,167	18.042
JIF2WR	Pro- Trp-Arg -Ile-Ser-Ile- Arg -Leu-NH ₂	+3	-0.186	0,399	16.989

O desenho desses análogos considerou basicamente duas premissas:

1. A presença de resíduos Arg confere resistência aos efeitos de blindagem de carga pelos sais do meio o que deverá aumentar a eficiência;
2. A presença de resíduos Trp, pela sua preferência de localização em regiões de interface desestabilizando as membranas (Lim et al., 2013).

Estudos já verificaram que peptídeos ricos em Trp e Arg possuem maior atividade biológica (Chan, et al., 2006) e que algumas substituições na sequência primária por esses

resíduos podem favorecer sua bioatividade, como verificado por Pellegrini e colaboradores (1997), em um fragmento da Lisozima (98-112), onde trocas de Asn por Arg aumentaram a atividade bactericida, enquanto que a troca de Trp por Tyr reduziu a atividade. A substituição da Lys por Arg também favorece a interação com bicamadas lipídicas, como verificado por Li e colaboradores (2013) através de dinâmica molecular, onde um peptídeo contendo Arg demonstrou deformações mais dramáticas nessas bicamadas em comparação com outro peptídeo contendo Lys, possivelmente pela desprotonação na membrana, o que não acontece com a Arg. Peptídeos com substituição da Lys por Arg, investigados em outro trabalho (Liu, et al., 2016), mostrou que o peptídeo rico em Arg teve seu transporte pela membrana celular facilitado em relação ao análogo contendo Lys.

Protonectinas

Outro peptídeo, Protonectin (PTN), extraído originalmente de veneno de vespa social *Protonectarina sylveirae* (Dohtsu, et al., 1993) e posteriormente do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes* (Mendes, et al., 2004) despertou interesse principalmente pela sua ação bactericida para *P. aeruginosa* (MIC de 1,7 µg/ml), além da reduzida atividade hemolítica (Mendes, et al., 2004). Um análogo natural de PTN, Polybia-CP, com grau de semelhança de 93%, segundo APD (*The Antimicrobial Peptide Database*, 2018) com apenas uma modificação no resíduo 11, onde uma glicina (G) foi substituída por Serina (S) (tabela 3), vem se tornando fonte de estudos por sua ação antimicrobiana, principalmente em *S. aureus* com MIC de 4µM (Wang, et al., 2013), além de ação fungicida para várias espécies de *Candida*, para *C. tropicalis* (MIC de 4 µM) (Wang, et al, 2016). A ação contra células tumorais também foi avaliada tendo demonstrado um MIC de 11 µM em células de câncer de próstata (PC-3) (Wang, et al., 2011).

Estudo desenvolvido por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010), obtiveram melhores atividades bactericidas, quando um fragmento, denominado de Protonectin 1-6 (PTN₁₋₆), contendo os seis primeiros resíduos da sequência da PTN, foi introduzido na proporção molar 1:1, junto a PTN, em solução. A tabela 3 mostra as sequências primárias da PTN e da PTN₁₋₆, com suas respectivas carga líquidas e hidrofobicidade.

Tabela 3 - Sequências primárias da PTN e PTN₁₋₆. Características físico-químicas individuais e da mistura, PTN/PTN₁₋₆, como carga líquida (Q) em pH fisiológico, e hidrofobicidade média (<H>), calculada segundo Eisenberg et al., 1984.

Peptídeos	Sequências	Q	<H>
PTN	Ile-Leu-Gly-Thr-Ile-Leu-Gly-Leu-Leu-Lys-Gly-Leu-NH ₂	+2	0,276
PTN ₁₋₆	Ile-Leu-Gly-Thr-Ile-Leu-NH ₂	+1	0,417
PTN/PTN ₁₋₆		+3	0,323
Polybia-CP*	Ile-Leu-Gly-Thr-Ile-Leu-Gly-Leu-Leu-Lys-Ser-Leu-NH ₂	+2	0,278

*Wang, et al. (2013)

Ao analisar essa mistura, os autores observaram que a sua eficiência foi aumentada, principalmente em *E. coli* e *B. subtilis*. Outra característica observada para essa mistura foi o aumento do teor helicoidal determinado via CD, sugerindo que a PTN₁₋₆ favoreceu a interação e consequente maior estruturação da PTN (Baptista-Saidemberg, et al., 2010). Em outro estudo desenvolvido por Baldissera e colaboradores (2015), mudanças conformacionais na presença de micelas de SDS, foram encontradas em um estudo computacional para a PTN isolada e na mistura (PTN/PTN₁₋₆). Por simulação computacional foi possível verificar uma maior interação entre a PTN e micelas de SDS quando na presença da PTN₁₋₆, do que quando isolada. Essa observação sugeriu que ocorra uma redução da formação de agregados na mistura quando comparado a PTN isolada, favorecendo a interação (Baldissera et al., 2015).

1.3 - Objetivos

O objetivo principal desse trabalho é investigar por técnicas biofísicas dois tipos de peptídeos antimicrobianos de fontes diferentes, um proveniente da geléia real e o outro de veneno de vespa, que têm em comum o fato de seus mecanismos de interação com ambientes que mimetizam características físico-químicas de membranas celulares serem afetados por processos de agregação/desagregação segundo resultados obtidos em estudos anteriores (Baptista-Saidemberg et al., 2010; dos Santos Cabrera et al., 2014; Baldissera, et al., 2015). Entender os mecanismos ligados a esse comportamento deve contribuir para que análogos mais eficientes e seletivos possam ser desenhados.

Considerando os peptídeos Jelleíne-I (JI) e seus análogos (JIF2W e JIF2WR), e Protonectin e a mistura desta com a Protonectin (1-6), espera-se especificamente estudar as seguintes questões:

1. Comprovar experimentalmente a formação da agregação que as simulações por dinâmica molecular sugeriram em ambientes miméticos com relação a estrutura e a composição fosfolipídica de membranas de microrganismos e tumores.
2. Avaliar se a agregação está presente em todas as condições estudadas e se ela pode estar afetando a eficiência dos peptídeos.
3. Verificar a relevância de alguns aspectos estruturais, especificamente para JIF2W e JIF2WR. Se as substituições na sequência primária da JI, que levou à geração dos análogos conduziu a agentes antimicrobianos e/ou tumorocidas mais eficientes e/ou mais seletivos.
4. Investigar a atividade lítica em bicamadas lipídicas, considerando a importância desse efeito no mecanismo de ação de peptídeos bioativos. O intuito é verificar se há uma interação preferencial com bicamadas aniônicas ou zwitterionicas e em quais delas os peptídeos são mais eficientes. A realização de testes de atividade hemolítica, assim como ação antibacteriana, antifúngica, além da citotoxicidade em células normais e tumorais, complementar o estudo da atividade lítica.

5. Investigar efeitos de curvatura de membrana e de flacidez das bicamadas lipídicas e sua importância para a atividade lítica e biológica dos peptídeos.
6. Investigar como e em que extensão a constituição fosfolipídica da bicamada afeta a inserção ou ligação dos peptídeos, como a afinidade dos peptídeos por cada bicamada.
7. Avaliar biologicamente os peptídeos em estudo com relação a atividade hemolítica e ação em microrganismos como Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *Candida* e células tumorais.

Capítulo 2

2.1 – Materiais

Os peptídeos Jelleine-I (JI), JIF2W, JIF2WR, Protonectin (PTN) e Protonectin (1-6) (PTN₁₋₆) foram adquiridos da GenScrip (Piscataway, NJ, USA) e as seqüências são apresentadas nas tabela 2 e 3. Os fosfolipídios utilizados são os sintéticos palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC, abreviadamente PC), palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE, abreviadamente PE), palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (POPS, abreviadamente PS), palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG, abreviadamente PG) e cardiolipina (CL), fornecidos pela Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). O colesterol (Col) e ergosterol (Erg) foram fornecidos pela Sigma Chemical Co (S. Louis, MI, USA), além dos marcadores difenilhexatrieno (DPH), carboxifluoresceína (CF), ANTS (8-aminonaftaleno-1,3,6-trissulfonato de sódio), DPX (P-xileno-bis(N-brometo piridino), ácido 5-doxil-esterárico (DOXIL) e Metanol-d₄ (deuterado). Outros reagentes são de qualidade analítica ou superior. Para os experimentos de RMN foram utilizados água deuterada e dodecil sulfato de sódio (SDS) deuterado (D25), ambos da *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*(Andover, MA, USA). Cloreto de manganês (Mn²⁺) foi fornecido pela Reagen – produtos de laboratórios (Colombo, PR, Brasil). Para os testes de atividade bactericida foram usados as *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 25924) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923) e para a atividade fungicida as *Candidas*: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), além de duas cepas clínicas *Candida albican clínica* (HB 5984) e *Candida albican clínica* (HB 5960). Nos ensaios de viabilidade celular usou-se das células NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658™), SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™), HUVEC (ATCC® CRL-1730™) e MDA-MB-231.

Os tampões utilizados foram citrato/fosfato com 150 mM de NaCl em pH 5,5 para todos os experimentos com a JI e análogos. Para os experimentos em pH 7,5, os tampões foram HEPES com 150 mM de NaF para os experimentos de Potencial Zeta, DLS e CD, e para o FTIR, extravasamento de corante e DPH usamos o Tris/HCl, com 1mM de EDTA e 150 mM de NaCl.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Preparação de vesículas grandes (LUVs)

Filmes finos de fosfolipídeos na composição e concentração desejadas, contendo ou não marcadores fluorescentes de membrana, foram obtidos dissolvendo-os em clorofórmio em tubos de vidro de fundo arredondado seguido de evaporação do solvente sob fluxo de N₂ e totalmente seco sob vácuo. Segue-se a hidratação pela adição de tampão (contendo ou não marcador fluorescente) em temperatura acima da temperatura T_C de transição entre as fases gel e líquido cristalina. Após homogeneização a suspensão é submetida à extrusão através de membranas de policarbonato (6 vezes em membranas de 400 nm e 11 vezes em membranas de 100 nm) em mini-extrusor Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, Al, USA). Havendo a presença de marcador fluorescente no tampão, seu excesso é removido por cromatografia de permeação em gel em coluna de Sephadex (G-25M) (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK).

O intuito é investigar a interação dos peptídeos acima mencionados com bicamadas lipídicas compostas de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (PC), palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina (PE), palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (PS), palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL), além do colesterol (Col) e ergosterol (Erg). As bicamadas lipídicas mimetizam a composição fosfolipídica de membranas de bactérias Gram-negativa na composição molar de PE:PG 76:24 (Shaw, 1974), de bactérias Gram-positiva na composição molar de PG:CL 50:50 (Lohner, 2001), de fungos *C. albicans* na composição molar de PC:PS:Erg 40:40:20 (Löffler et al., 2000), de tumores na composição molar de PC:PS:Col = 60:20:20, e de eritrócitos na composição molar de PC = 100 (Mahalka e Kinnunen, 2009).

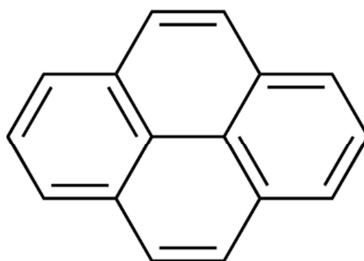
2.2.2 - Determinação de CAC via fluorescência

O estudo da agregação de peptídeos em meio aquoso é de grande importância para acompanhar seu comportamento quando em solução, indicando sua conformação para uma posterior interação com bicamadas lipídicas. Essa investigação pode ser realizada fazendo-se uso de algumas sondas fluorescentes uma vez que estas podem fornecer informações do meio em que se encontram. Essas pequenas moléculas sofrem perturbações pela presença dos agregados,

variando suas propriedades fluorescentes que resultam da sua interação não covalente com essas moléculas maiores (Brand, L. e Gohlke, J.R., 1972).

Uma das sondas bastante utilizada em estudos é o pireno, que é uma molécula muito hidrofóbica, como mostrado na figura 8, com baixa solubilidade em água e sendo assim interage preferencialmente com moléculas anfipáticas em sua porção hidrofóbica, localizando-se preferencialmente no interior de agregado que se formam com o aumento concentração do componente em estudo (Martari e Sanderson, 2008).

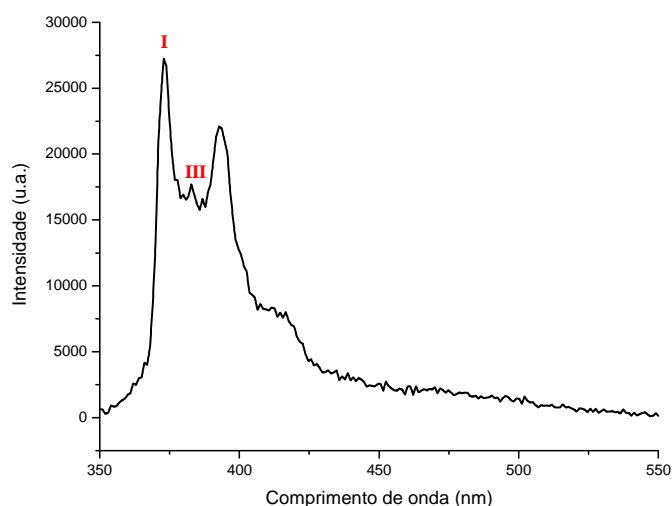
Figura 8 – Estrutura molecular do pireno



Fonte: Sigma-aldrich (2018)

O pireno possui um espectro de emissão muito característico, como mostrado na figura 9. O pico I está relacionado a polaridade do solvente e mais significativo que o pico III. Com a formação dos agregados e o pireno se interioriza na porção hidrofóbica desses agregados e a intensidade do pico I é reduzida, indicando que a polaridade do meio foi reduzida. A razão entre as intensidades dos picos I e III, ou seja, I/III é utilizado para indicar a formação de agregados da molécula em estudo (Vieira, et al., 2003).

Figura 9 – Espectro de emissão do pireno a 2 μM em tampão citrato/fosfato com 150 mM de NaCl com a indicação dos picos I e III utilizados para a determinação do CAC.



Fonte: Próprio autor (2018)

Para a determinação da concentração de agregação crítica (CAC) utiliza-se da razão entre as intensidades dos picos I (373 nm) e III (384 nm), onde a razão se torna menor com o aumento do grau de agregação, ou seja, empacotamento da sonda na formação de agregados (Vieira, et al., 2003).

2.2.3 - Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

FTIR é uma técnica sensível à estrutura secundária de proteínas e também usada para estudar estados agregacionais. A banda Amida I, região da vibração de estiramento C=O, que corresponde aos números de onda de 1600 a 1700 cm^{-1} , vem sendo muito usada na literatura para identificar estruturas secundárias de peptídeos e proteínas (Jackson e Mantsch, 1995; Barth, 2007; Sarroukh, et al., 2013). A partir da análise da região é possível detectar, por exemplo, α -hélices e folhas- β que apresentam frequências vibracionais em aproximadamente 1653 e 1635 cm^{-1} , respectivamente (Shai, 2013). A frequência vibracional de um agregado ocorre por volta de 1620-1625 cm^{-1} devido à diferença no ambiente hidrofóbico (Miller et al., 2013).

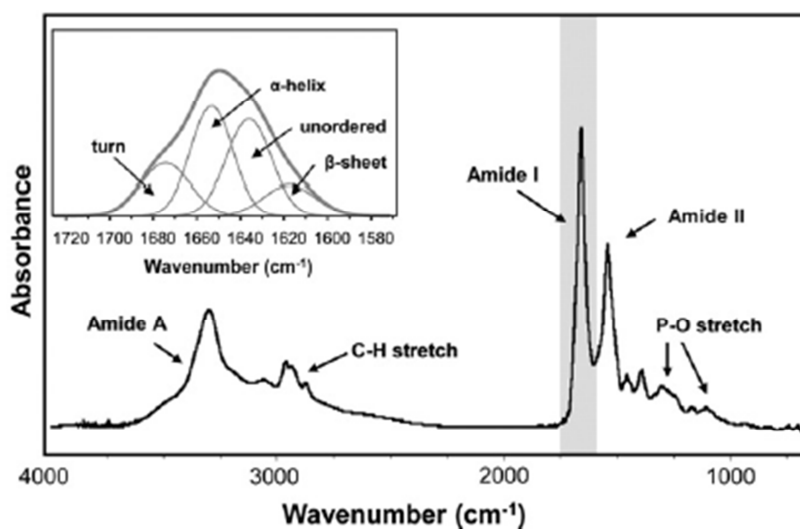
Tabela 4 – Estrutura secundária e seus respectivos limites de número de onda na região Amida I

Estrutura Secundária	Números de onda (cm⁻¹)
Agregação	1620 - 1625
Folhas- β	1630 – 1640
Aleatório	1640 – 1650
Hélice- α	1650 – 1660
Voltas	1660 – 1685

Fonte: Murayama e Tomida (2004); Barth (2007) e Miller et al. (2013).

Uma aproximação amplamente utilizada para extrair informações estruturais do espectro de IR de proteínas e peptídeos está ligada a um procedimento computacional chamado de deconvolução espectral a partir da segunda derivada do espectro. Este procedimento, algumas vezes chamado de “melhoramento de resolução” ou “realce na definição”, permite maior separação e assim melhor identificação (visualização) da sobreposição de componentes estruturais da banda Amida I. Os números de onda das respectivas estruturas e suas posições são obtidos a partir da 2ª derivada, indicando onde estão os componentes e quais são as estruturas secundárias presentes sob o contorno da banda espectral completa. O ajuste é feito através múltiplas gaussianas, permitindo determinar quais são elas. Uma vantagem do método de deconvolução é que ele introduz menos distorção ao espectro, não afetando as intensidades integradas (áreas) das componentes individuais de banda (Surewicz et. al., 1993; Murayama e Tomida, 2004). A figura 10 exemplifica a deconvolução e obtenção das múltiplas Gaussianas simplificada, correspondentes a cada estrutura secundária.

Figura 10 – Espectro de FTIR ilustrando as várias bandas estruturais e em destaque a banda Amida I, da região de 1600 a 1700 cm^{-1} . Na figura menor, uma vista expandida da banda em destaque com as deconvoluções e suas respectivas contribuições de estruturas secundárias.



Fonte: Miller, et al. (2013).

Espectros de ATR-FTIR foram coletados com um espectrofotômetro Spectrum Two (PerkinElmer, Beaconsfield, UK) em tampão deuterado (Citrato/Fosfato com 150mM de NaCl em pH 5,5 para a JI e análogos e Tris/EDTA com 150mM de NaCl em pH 7,5 para as PTN e mistura) e na presença das diferentes vesículas nas composições acima descritas. A formação das vesículas na composição fosfolipídica desejada é feita em aproximadamente 250 μL de tampão deuterado e extrusadas, e em seguida, amostras são preparadas na razão de lipídeo/peptídeo de 5:1 (Saravanan et al., 2012). Após 2 horas para equilíbrio, essas amostras são diretamente aplicadas ao detector equipado com cristal de diamante, e os espectros coletados são registrados e tratados pelo software Spectrum 10TM (E.U.A.). Cinquenta interferogramas foram coletados para cada espectro com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} , seguido de uma correção de linha de base (*baseline*). O espectro da solução com vesículas foi subtraído do espectro da vesícula+peptídeo para obter apenas a contribuição do peptídeo. A análise de estrutura secundária foi realizada segundo a técnica de deconvolução dos espectros na região da banda Amida I', de 1700 a 1600 cm^{-1} .

2.2.4 - Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

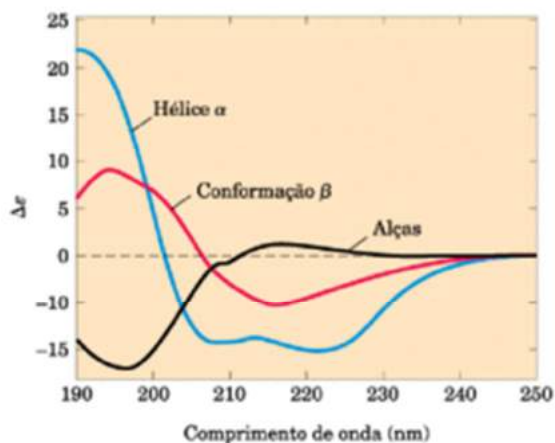
O dicroísmo circular (CD) é outra técnica espectroscópica empregada na determinação da estrutura secundária de peptídeos em interação com vesículas de diferentes composições. Espectros de CD são coletados no intervalo de comprimento de onda de aproximadamente 190 a 260 nm, usando um espectropolarímetro J-815 (JASCO International Co. Ltd., Tóquio, Japão), a 25°C, utilizando cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico e tomando-se 10 acumulações com velocidade de 50nm/mim. A elipticidade observada, θ (mdeg), após corrigida em função da diluição, quando necessário, é descontada da respectiva linha de base. Esses dados são convertidos para elipticidade molar média por resíduo, no caso de peptídeos, $[\Theta]$, usando a relação

$$[\Theta] \text{ (deg cm}^2\text{/dmol)} = \frac{100 \cdot \theta}{l \cdot c \cdot (n - 1)}$$

onde l é o caminho óptico em cm, c é a concentração de peptídeo em mM e n é o número de ligações peptídicas possíveis.

A conformação estrutural adquirida por peptídeos podem apresentar espectros bem característicos de cada estrutura, como mostrado na figura 11. Para determinação do percentual estrutural de cada conformação nos espectros de CD, foi utilizado o programa CD-Pro [CONTIN, SMP56] com os dados espectrais já na forma de elipticidade molar (CDPro software, 2004).

Figura 11 – Espectros característicos das principais estruturas secundárias: Hélice- α , conformações β e alças ou também conhecidas como voltas.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

2.2.5 - Extravasamento de corante

Extravasamento de marcador fluorescente encapsulado em LUVs, induzido pelos peptídeos em estudo, será monitorado por espectros de emissão de fluorescência usando o espectrofluorímetro ISS modelo PC1 (Urbana, Champaign, IL, USA). Nestes experimentos, alíquotas do estoque de peptídeo em estudo será adicionada sob agitação à cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, contendo a solução de fosfolipídeos (100 μ M), em tampão Citrato/Fosfato e 0,15 M de NaCl, na presença da sonda fluorescente ANTS/DPX (pH 5,5) para JI e seus análogos e carboxifluoresceína (pH 7,0) para a PTN e a mistura PTN/PTN₁₋₆. Para CF o comprimento de onda de emissão de fluorescência é 520 nm, com excitação em 490 nm; e para ANTS/DPX o comprimento de onda de emissão é 530 nm com excitação em 360 nm. A intensidade de fluorescência em função do tempo é utilizada para determinar o percentual de marcador fluorescente liberado: % vazamento = $100 \times (F - F_0) / (F_{100} - F_0)$, onde F é a intensidade de fluorescência medida (em unidades arbitrárias), F_0 corresponde à intensidade de fluorescência de LUVs intactos e F_{100} é a intensidade de fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas, obtido por adição de 20 μ L de solução de Triton X-100 a 10%. Estes dados foram analisados por meio de curvas de dose resposta, % vazamento vs concentração de

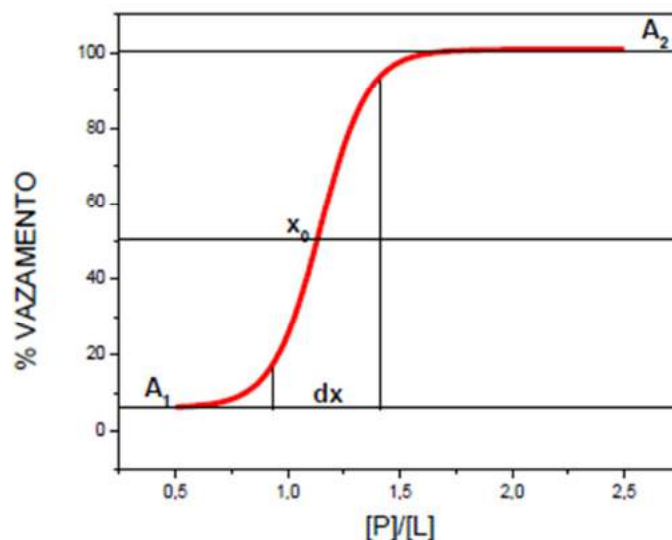
peptídeos e a variação da intensidade de emissão em função do tempo foi analisada por meio de relações para cinética exponenciais (dos Santos Cabrera et al., 2008).

As curvas dose-resposta são obtidas a partir dos valores de % extravasamento em função da razão [P]/[L]. Estas curvas possuem perfil sigmoidal e foram ajustadas pela equação sigmoidal de Boltzmann:

$$y = A_2 \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + \exp \frac{x - x_0}{dx})}$$

onde a % de extravasamento (y) depende de x , a razão [P]/[L], A_1 , a mínima % de extravasamento, A_2 a máxima % de extravasamento, x_0 a [P]/[L] em um % de extravasamento igual a 50% e dx o intervalo do eixo x correspondente a inclinação da curva sigmoidal. Uma representação da curva dose-resposta é representada na figura 12, de onde é possível determinar a $[P]/[L]_{\text{crítica}}$ a partir da intersecção entre duas retas, uma que passa por A_1 e outra que segue a inclinação da curva.

Figura 12 - Representação esquemática dos parâmetros presentes na equação sigmoidal de Boltzmann. Baseado nos dados obtidos com o peptídeo Polybia MP-3



Fonte: Slade (2010).

2.2.6 - Anisotropia de fluorescência da sonda DPH

Para monitorar alterações no empacotamento lipídico, difenilhexatrieno (DPH) deve ser incluído aos filmes lipídicos à fração molar baixa (~0,002). Várias concentrações de peptídeos foram testadas para uma concentração fixa de vesículas (Zhao, 2002). A anisotropia de fluorescência foi medida no espectrofluorímetro ISS modelo PC1 Urbana, Champaign, IL, USA), utilizando-se polarizadores de Glam-Thompson, e calculada por meio das componentes paralela e perpendicular da emissão quando DPH é excitado com feixe polarizado nestas direções. As intensidades entre as diferentes direções em relação a emissão e excitação, ou seja, paralelo e perpendicular, é corrigida pelo fator G, que é a razão da sensibilidade dos sistemas de detecção entre as intensidades da luz polarizada horizontalmente na excitação com a luz polarizada verticalmente e horizontalmente na emissão. A equação abaixo mostra o cálculo segundo Lakowicz (2006):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Onde I_{HV} e I_{HH} corresponde á luz polarizada na horizontal para excitação e vertical na emissão (I_{HV}) e horizontal na emissão e na excitação (I_{HH}).

Os feixes de excitação e emissão são fixados em 360 e 450 nm, e a largura das fendas de 2 nm (dos Santos Cabrera, et al., 2014). O cálculo da anisotropia de fluorescência, r , é feito a partir da equação,

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

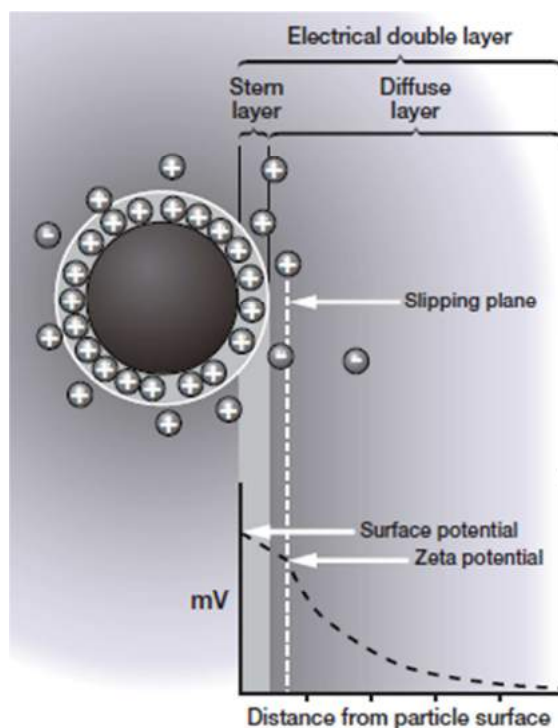
Onde I_{VV} e I_{VH} correspondem, respectivamente, à luz polarizada na vertical para excitação e emissão (I_{VV}) e horizontal na emissão e vertical na excitação (I_{VH}).

2.2.7 - Potencial Zeta e tamanho de vesículas (DLS)

Para quantificar a extensão da interação eletrostática entre diferentes bicamadas e peptídeos, medidas de potencial zeta foram utilizadas na determinação de coeficientes de partição (Freire et al., 2011). O potencial zeta é medido por meio de mobilidade eletroforética de vesículas

(LUVs) em concentrações específicas para cada peptídeo na presença de diferentes concentrações dos peptídeos em estudo, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), em uma cela de polipropileno específica, após 15 minutos de equilíbrio. A adsorção dos peptídeos a vesículas aniônicas altera sua densidade de carga e consequentemente o potencial zeta, aumentando-o progressivamente até um valor limite que pode ser negativo, neutro ou positivo.

Figura 13 – Esquema da distribuição eletrônica no entorno de uma molécula com carga negativa, indicando a região onde é determinado o potencial Zeta



Fonte: Zetasizer nano user manual (2013).

O potencial zeta é calculado através da mobilidade eletroforética, μ_E , de acordo com a equação de Helmholtz-Smoluchowski: $\zeta = \eta \mu_E / \epsilon \epsilon_0$, onde η é a viscosidade da fase aquosa, ϵ_0 é a permissividade do vácuo e $\epsilon = 78$ é a constante dielétrica da água. Os valores de viscosidade e índice de refração da água são 0,8872 cP e 1,330, respectivamente (Nelson e Cox, 2014). Os dados são analisados pelo software do equipamento fornecendo o potencial zeta médio. As equações a seguir são usadas para o cálculo de K_p :

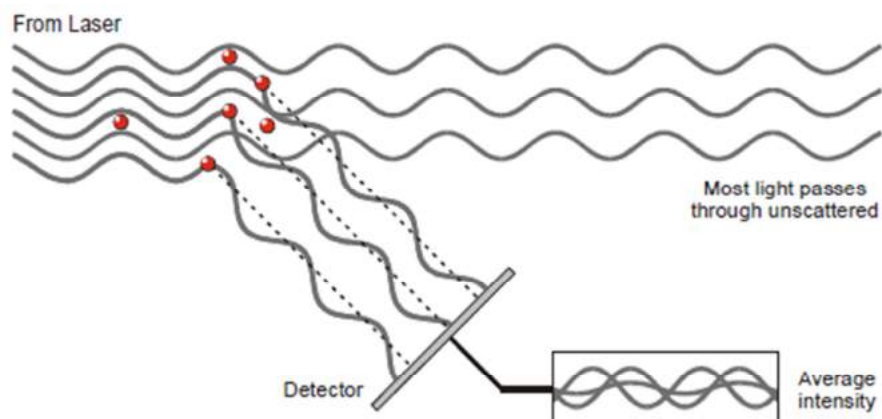
$$\frac{\zeta_{final}}{\zeta_0} = 1 + \frac{X_L Z_{peptide}}{f_{PL}[L]Z_{lipideo}} \cdot [P]$$

$$X_L = \frac{K_{PYL}[L]}{1+K_{PYL}[L]}$$

onde $Z_{peptide}$ e $Z_{lipideo}$ são, respectivamente, as cargas absolutas do peptídeo e do lipídeo, ζ_{final} e ζ_0 são respectivamente o valor do potencial zeta ao final de cada titulação e o valor inicial na ausência de peptídeo, X_L é a fração molar de peptídeo ligado na vesícula, $[L]$ e $[P]$ são as concentrações de lipídeo e peptídeo, f_{PL} a fração de fosfolipídeos aniônicos na composição das vesículas e γ_L volume molar do lipídeo (Freire et al., 2011).

O diâmetro médio das vesículas nos dá o tamanho das partículas em solução. As partículas suspensas em um líquido são iluminadas por uma luz dispersa por alguns minutos e por não serem estacionárias, ou seja, estão constantemente em movimento devido ao movimento browniano. O movimento browniano é o movimento de partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido que o envolve. Uma característica importante do movimento browniano para o *Dynamic Light Scattering* (DLS) é que pequenas partículas se movem rapidamente enquanto que as partículas grandes se movem mais devagar (manual Zetasizer Nano, 2013).

Figura 14 – Esquema do espalhamento de luz causado pelo tamanho das partículas, atingindo o detector.



Esta técnica tem sido utilizada para monitorar as mudanças do tamanho das vesículas devido à interação com peptídeos e verificar a formação de agregados. O diâmetro médio das vesículas é determinado por espalhamento de luz usando uma fonte de luz laser He-Ne (633 nm), operando a um ângulo de espalhamento de 173° , no mesmo equipamento utilizado para determinação do potencial zeta, e também para concentrações diferentes dos peptídeos em estudo.

2.2.8 - Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear

Para a determinação estrutural via RMN, o assinalamento sequencial do sistema de spins e suas conexões são obtidos dos espectros ^1H -2D COSY, ^1H -2D TOCSY e ^1H -2D NOESY. Cada resíduo é constituído de um sistema de spins, acoplados de forma única e possuem padrões espectrais que os diferenciam entre si (Fadel, 2003). A conexão entre os sistemas de spins dos resíduos, ou seja, a ligação e interação entre eles, tanto da sequência primária, com resultante da sua estruturação, é de possível identificação pelo espectro Homonuclear ^1H -2D NOESY. Nesse conjunto de sistemas de spins determina-se os aminoácidos sequencialmente vizinhos, identificados pelas conexões inter-resíduos entre o próton ligado ao carbono alfa de um resíduo e o próton ligado ao nitrogênio amídico do resíduo subsequente, ou ligado a outros prótons de demais regiões (Clare e Gronenborn, 1993). Essas correlações juntamente com o assinalamento do sistema de spins, possibilitam a determinação da estrutura secundária do peptídeo.

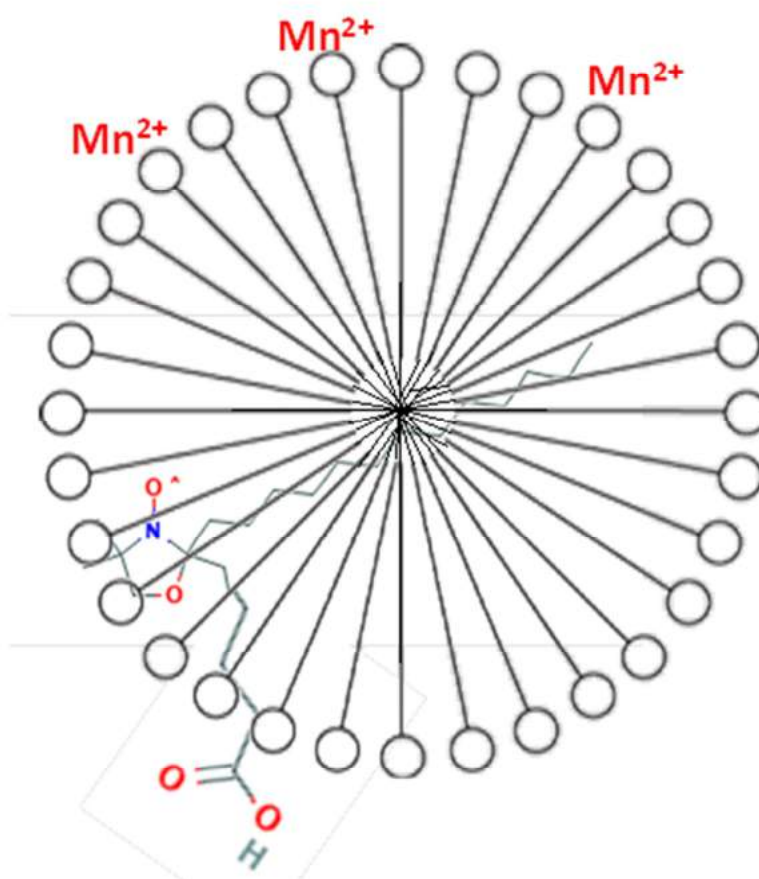
A interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas induz a estruturação do peptídeo e mudanças estruturais podem ocorrer em diferentes meios e composições fosfolipídicas (Yin, et al., 2012; Martins, et al., 2017). A determinação da estrutura tridimensional da PTN foi realizada na presença de micelas de SDS, simulando ambientes que se assemelham a membranas biológicas (Hugonin, et al., 2008).

O experimento utilizou a metodologia clássica e adaptada por Fadel (2003) para determinação estrutural por RMN em solução, sendo o Homonuclear ^1H -2D COSY, ^1H -2D TOCSY e ^1H -2D NOESY. Os espectros COSY foram coletados com 1024 scans; Os espectros TOCSY foram adquiridos usando uma sequência de *spin-lock* DIPSI com intensidade de campo de 10kHz e tempo de evolução de 80 ms. Já os espectros NOESY foram obtidos com tempo de

300 ms. Ambos, TOCSY e NOESY, foram coletados com 56 aquisições e 512 scans. Esses experimentos foram utilizados para os assinalamentos residuais, sequenciais e coletas de vínculos espaciais (Wüthrich, 1986). Os peptídeos liofilizados foram dissolvidos para a concentração de 1mM em tampão fosfato 5 mM (pH 5.0), 100 mM de SDS deuterado e 10% D₂O para os experimentos de determinação estrutural. Para a verificação da exposição dos peptídeos, foram usados as sondas paramagnéticas Mn²⁺ a concentração de 0.1mM e o DOXIL a 1mM, dissolvido em metanol deuterado. Todas as amostras continham o 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato (DSS) (0,00 ppm) utilizado para referenciar a calibração dos espectros. A supressão da água foi alcançada pelo esquema *WATERGATE*. Todos os experimentos foram realizados no espectrômetro Varian Unity de 599,887 MHz, a 25°C.

O posicionamento relativo da cadeia peptídica à superfície da micela de SDS será determinado pelo uso de sondas paramagnéticas em solução. Essas sondas possuem elétrons não pareados, encontrados em radicais orgânicos e íons metálicos (Otting, 2010). Utilizou-se como sondas para esse trabalho o íon Manganês (Mn²⁺) e o orgânico 5-doxil ácido esteárico. O efeito paramagnético de Mn²⁺ é verificado na região exposta ao solvente e para o 5-doxil ácido esteárico, na região em contato com a micela, como representado na figura esquematizada 15.

Figura 15 – Esquema da micela de SDS com a representação das respectivas sondas paramagnéticas, indicando suas respectivas localizações.



Fonte: Próprio autor (2018)

Agentes paramagnéticos provocam o alargamento das linhas de ressonância de resíduos em sua vizinhança e a consequente diminuição da intensidade em picos dos espectros 2D de RMN (Damberg, et al., 2001). Comparando-se a intensidade dos picos nos espectros sem e com a adição das sondas paramagnéticas identifica-se as regiões de contato com o meio que contém a sonda (Jarvet et al, 2007).

Os espectros bidimensionais foram processados usando o software nmrPIPE (IBBR, 2018). A análise dos espectros, assinalamento dos sistemas de spins e correlações entre os sistemas de spins, além da determinação das intensidades e áreas dos picos cruzados foram

realizados pelo software CARI (Keller, 2004). Para a modelagem molecular utilizou-se o software UNIO (Herrmann, 2002), com ferramentas usadas para o cálculo e calibração de restrições NOE, aplicando o algoritmo CANDID para análise NOE e CNS para cálculo de estrutura utilizando dinâmica de ângulo de torção e métodos de recozimento simulado (Brunger, et al., 2010). O software realiza 7 checagens dos assinalamentos e correlações, analisando possíveis violações de restrições estruturais, para um refinamento, otimização e minimização de energia da estrutura. Após a rodada final de refinamento, as conformações de mínima energia foram consideradas para análise. A qualidade estereoquímica foi verificada pelo pacote PROCHECK_NMR (EMBL-EBI, 2010). Para a verificação de alterações estruturais e agregação da PTN na presença da PTN₁₋₆, foram utilizados o desvio químico e a largura dos picos nos espectros TOCSY.

2.2.9 - Atividade antibacteriana e antifúngica

Para avaliação do potencial antimicrobiano dos peptídeos utilizou-se os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) para ambas as classes de peptídeos (Jelleínas e Protonectinas), além da *Escherichia coli* (ATCC 25924) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923), apenas para as Jelleínas. Para a realização da manutenção e cultivo dos microrganismos utilizou-se o meio de cultura Müller-Hinton (Difco). A manipulação das cepas bacterianas foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical sob condições estéreis. Os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9%) à partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração dos inóculos foi ajustada e diluída contendo uma suspensão de bactérias com aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC), verificado através da turbidez da solução contendo as bactérias. Em seguida preparou-se as microplacas adicionando-se 200 µL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido. Em cada orifício da placa foram adicionados 10 µL de solução de peptídeo incluindo também 10 µL de inóculo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações (de 0,25 µg/ml a 500 µg/ml)) e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. Para o valor de referência zero adicionou-se 80 µL de meio Müller-Hinton líquido, e 10 µL de água deionizada esterilizada e 10 µL de solução salina. Para o valor de referência 100%, foram adicionados 10 µL de água, 10 µL da suspensão de

inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34 °C, por 18 horas. Após este período, adicionou-se 10 µl do cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (Mallinckrodt) na concentração de 0,5% (m/v) em água e as leituras são realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34 °C. Em seguida determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (MIC) para todos os peptídeos testados.

Para a análise de atividade antifúngica, foi utilizada a metodologia estabelecida pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A3 (2008), utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. Para realização do ensaio, foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* (ATCC 90028) para ambas as classes de peptídeos (Jelleínas e Protonectinas) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), além de duas cepas clínicas *Candida albican clínica* (HB 5984) e *Candida albican clínica* (HB 5960), para as Jelleínas apenas. Essas cepas foram previamente inoculadas em meio RPMI líquido e incubada por 16 horas a 37°C para a realização do ensaio. Após este período, utilizou-se microplaca estéril de 96 poços com diluições seriadas dos peptídeos (100 µg/mL a 0,8 µg/mL) em meio RPMI contendo uma suspensão de levedura com aproximadamente 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC). A placa foi incubada por 24 horas a 37°C e a atividade antifúngica foi expressa em Concentração Inibitória Mínima (MIC). Como controle de inibição antifúngica foi utilizado Anfotericina B e para o controle de esterilidade, utilizou-se somente o meio de cultura (controle negativo).

Cálculo da concentração inibitória fracionária

A combinação terapêutica entre dois ou mais agentes pode favorecer ou ser indiferente na morte de um patógeno. O potencial antimicrobiano pela associação de mais de um agente pode ser medido através da determinação da concentração inibitória fracionária (*fractional inhibitory concentration* - FIC) (Walkenhorst, 2016). Essa associação segundo Schelz e colaboradores (2006) pode ser calculada pelo índice FIC que corresponde a razão entre o MIC da mistura pelo MIC apenas de um dos agentes, segundo a equação.

$$FIC = \frac{MIC_{mistura}}{MIC_{isolado}}$$

Esse índice indica se a interação é de sinergia ($FIC \leq 0,5$), onde a presença do segundo agente acelera a morte do patógeno; de aditividade ($0,5 > FIC \leq 1,0$), sugerindo apenas a adição de mais um agente ao sistema, causando mínimas diferenças na ação; indiferente ($1,0 > FIC \leq 4,0$), quando não há diferença na morte do patógeno pela presença do outro agente; e antagonista ($FIC > 4,0$) onde o segundo agente prejudica a ação biológica (Schelz, et al., 2006; Walkenhorst, 2016).

2.2.10 – Atividade hemolítica

O estudo de atividade hemolítica é um importante parâmetro para avaliar a segurança de peptídeos naturais e/ou sintéticos frente a eritrócitos humanos (Kosikowska et al., 2016), sendo assim, a atividade hemolítica dos peptídeos foi avaliada segundo modificações da metodologia descrita por Souza e colaboradores (2005).

Obtenção dos eritrócitos

Para a obtenção dos eritrócitos, utilizou-se amostras de sangue obtidas de voluntário do grupo de pesquisa, com autorização do Conselho de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) com número de registro 69088517.5.0000.5466. Uma amostra de 500 μ L de sangue em 50 μ L de solução salina (NaCl 0,85%, CaCl₂ 10 mM) foi mantida por 15 minutos sob agitação leve para evitar coagulação. A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em centrífuga clínica a 3000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspendidas em 10 mL de solução salina, para lavagem dos eritrócitos. Repetiu-se a etapa anterior por mais duas vezes.

O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias foi considerado como 100% de células. Em seguida para a realização dos ensaios de atividade hemolítica, preparou-se uma suspensão de eritrócitos diluindo-se (100% das células), com solução salina isotônica a 1,5%.

Ensaio de hemólise

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços onde cada orifício continha 10 μ L de diferentes concentrações de cada peptídeo (0,2 a 500 μ g/ml), previamente dissolvidas em 10 mL de solução salina. Em cada poço foram adicionados 90 μ L da suspensão de eritrócitos perfazendo

um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de hemólise foram adicionados 10 µL de solução salina e 90 µL da suspensão de eritrócitos e, para o controle de 100% de hemólise, foram adicionados apenas 10 µL de solução salina acrescida de 1% (v/v) do agente hemolítico Triton X-100, em 90 µL de suspensão de eritrócitos.

A placa foi incubada em temperatura de 37°C por 2 horas sob leve agitação. Após este período, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e então realizou-se as leituras de absorbância, em leitor de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE), com filtro de 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A porcentagem da atividade hemolítica foi determinada a partir a equação a seguir:

$$\%hemólise = \left(\frac{Abs_{leitura} - Abs_{0\%}}{Abs_{100\%} - Abs_{0\%}} \right) * 100$$

Onde a $Abs_{leitura}$ corresponde a absorbância determinada para o poço com o peptídeo em estudo, $Abs_{0\%}$ e $Abs_{100\%}$ correspondem as absorbâncias do controle de 0% de hemólise e 100% de hemólise, respectivamente.

2.2.11 - Ensaio de Viabilidade Celular para Protonectinas

Esses experimentos foram realizados no Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, Portugal, sob supervisão do Prof. Dr. Miguel A. R. B. Castanho como parte do projeto de colaboração SPRINT/FAPESP No. 50187-8.

A atividade citotóxica *in vitro* de PTN, PTN₁₋₆ e da mistura PTN/PTN₁₋₆ foi avaliada através de um ensaio de MTT (Figueira et al. 2017). Resumidamente, células MDA-MB-231 (câncer de mama) foram semeadas a 3.000 células por 100 µL em uma placa tratada com cultura de tecidos de 96 poços (TPP) e incubadas por 24 h. O meio de cultura de células foi substituído em cada poço por 100 µl de peptídeo diluído em meio completo isento de soro (0,01 - 200 µM) após lavagem com solução tampão fosfato salino (PBS). As células foram incubadas com o peptídeo por 24 horas e 10 µL de solução 5 mg/mL de solução de MTT foram adicionados diretamente a cada poço para uma incubação final de 2 horas. Finalmente, o sobrenadante de cada poço foi

descartado, os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 150 µL de DMSO de grau espectrofotométrico e a absorbância foi medida em 540 nm. Controles para 100% de viabilidade celular e 100% de morte celular foram realizados utilizando meio isento de soro e meio com 20% de DMSO, respectivamente. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada como: $(\text{Absorbância}_{\text{peptídeo+célula}}/\text{Absorbância}_{\text{só célula}}) \times 100$ e o percentual de morte celular (%) como: $100 - (\text{porcentagem de viabilidade celular})$. As experiências foram realizadas em dois dias diferentes com culturas de células crescidas independentemente.

2.2.12 - Ensaio de Viabilidade Celular para Jelleínas

Cultura de células

As células NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658™) (Fibroblasto normal), SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™) (Melanoma) e HUVEC (ATCC® CRL-1730™) (Endotelial normal) foram gentilmente doadas pela professora Jane Zveiter e esses experimentos foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Manoel Arcisio-Miranda, ambos do Departamento de Biofísica, Unifesp, Brasil. A NIH-3T3 e SK-MEL-28 foram cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina enquanto células HUVEC foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As três linhas celulares foram mantidas em incubação à 37°C e 5% de CO₂.

Teste de viabilidade celular

Avaliou-se a viabilidade celular por ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como previamente descrito (da Silva, 2018). Resumidamente, as células foram plaqueadas a 1×10^4 por poço em placas de 96 poços. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio foi completamente substituído por meio sem penicilina / estreptomicina e o peptídeo em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 50 µmol/L) foi adicionado ao teste. Após 24 h de incubação, 0,05 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) foram

adicionados a cada poço e as placas foram ainda incubadas a 37 ° C durante 4 h. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth®, SP, Brasil) foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A seguir, a densidade óptica foi medida em 570 nm com um leitor de microplacas (BioTek Instruments, VT, USA).

CAPÍTULO 3 - JELLEINE-I E ANÁLOGOS

Resultados e discussões

A Jelleine-I (JI) é um peptídeo de 8 resíduos já estudado por Fontana e colaboradores (2004) tendo apresentado atividades bactericida e antifúngica (Fontana, et al., 2004). Foi encontrado na geleia real juntamente com 3 outros análogos (Jelleine-II, Jelleine-III e Jelleine-IV) nos quais a introdução ou supressão de apenas um resíduo no N- ou C- terminal levou a diferentes perfis de atividade antimicrobiana (Tabela 1) sem contudo apresentarem efeitos indesejáveis como atividade hemolítica ou de degranulação de mastócitos (Fontana et al., 2004). Posteriormente as Jelleínas foram objeto de estudos sistemáticos de substituição de aminoácidos (Hansen, 2010; Romanelli et al., 2011; Capparelli et al., 2012; Lim et al., 2013) talvez provocados pelos fatos da Jelleine-I ser um peptídeo de fonte provavelmente segura e que apresenta relevante atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade (Fontana et al., 2004; Romanelli et al., 2011). Mais recentemente as Jelleínas foram investigadas em sua interação com bicamadas lipídicas com o objetivo de aprofundar o conhecimento de seus mecanismos de ação (dos Santos Cabrera et al., 2014). Esses estudos mostraram que Jelleine-I apesar do baixo grau de estruturação age sobre bicamadas lipídicas e tende a formar agregados, que se assemelham a pequenas esferas em grupos de 4 moléculas e que agem dessa forma sobre a bicamada. Esses achados conduziram ao presente estudo onde novas mudanças na sequência foram introduzidas para observar efeitos no perfil de atividade e no mecanismo de ação.

Nesse capítulo vamos apresentar um estudo da JI e os análogos, JIF2W e JIF2WR, com o intuito de melhoramento na atividade antimicrobiana, antifúngica e possível atividade antitumoral, tomando-se como vantagens a ausência de atividade hemolítica da JI já reportada (Fontana, et al., 2004) e o fato de que a JI provem de fonte natural, a geleia real, já utilizada como alimento. O estudo consiste na caracterização dos peptídeos em interações com vesículas que modelam membranas de bactérias, fungos, de tumores e eritócitos. Além disso, a atividade biológica em bactérias, fungos, células tumorais, além da atividade hemolítica para a JI e análogos também foi avaliada com intuito de verificar sua seletividade e citotoxicidade. As sequências da JI e análogos além de informações estruturais estão na página 16.

Este estudo foi conduzido em experimentos realizados em pH 5,5 pela presença da His nas sequências da JI e da JIF2W, que se mantem protonada nesse pH, adicionando mais uma carga ao peptídeo. O comportamento diferenciado em pH ácido de peptídeos que contem His foi verificado por Holdbrook e colaboradores (2018), indicando que sua protonação aumenta a atividade antibacteriana de peptídeos HVF18 e GKY25, derivados antimicrobianos de trombinas (TCPs). A His protonada em pH 5,5 influencia nas características estruturais da JI como foi verificado por dos Santos Cabrera e colaboradores (2014), onde, por Dicroísmo Circular, verificaram uma maior estruturação do peptídeo em 8mM de SDS em pH 5,5 em relação ao pH 7,0.

Assim, este estudo foi realizado em uma sequência de etapas que primeiramente buscou caracterizar o estado agregacional e estrutural da JI e análogos nas concentrações usualmente empregadas em experimentos biofísicos e nos bio-ensaios. Em seguida, avaliações *in vitro* da atividade hemolítica, antibacteriana, antifúngica, e antitumoral foram realizadas. Para ampliar nossa compreensão desses resultados um estudo comparativo da interação desses novos análogos e a JI com bicamadas lipídicas foi realizado, no qual vesículas foram preparadas cuja composição lipídica mimetiza aquela de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, *C. albicans* e de células tumorais.

Caracterização do Estado Agregacional e Estrutural Dependente do Ambiente

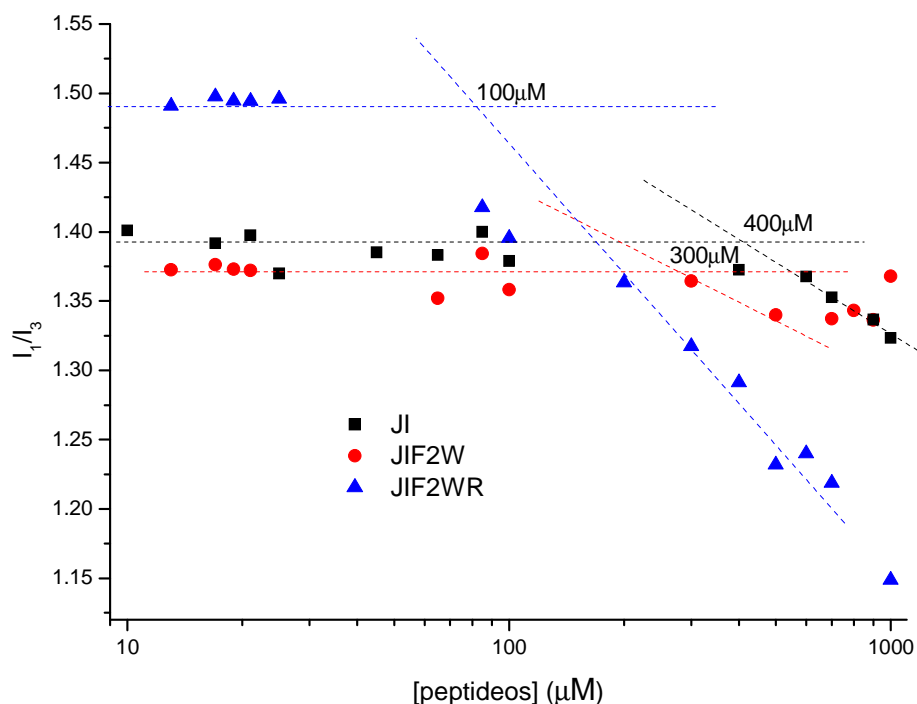
Fluorescência de Pireno

Como alguns estudos apontam para a maior eficiência de formas peptídicas que não dêem origem a agregados (Chu-Kung et al., 2010), iniciamos por verificar em quais condições esses agregados estariam ou não presentes para podermos analisar os resultados obtidos considerando esse fator.

A verificação da formação de agregados foi realizada através do método do pireno (2 μ M) em tampão citrato/fosfato com 150mM de NaCl (pH 5,5) onde, pela razão entre as intensidades dos picos em I₁ e I₃, podemos identificar a concentração de agregação crítica (CAC), ou seja, é a concentração limite para a formação dos agregados. A figura 16 mostra a curva de saturação para

o JI e os análogos JIF2W e JIF2WR, indicando a CAC graficamente para os peptídeos em estudo (Vieira, et al., 2003).

Figura 16 – Razão I_1/I_3 das bandas vibracionais do pireno ($2\mu\text{M}$) para as concentrações de JI, JIF2W e JIF2WR variando de 10 à $1000\mu\text{M}$, em tampão citrato/fosfato com 150 mM de NaCl (pH 5,5), à 25°C .



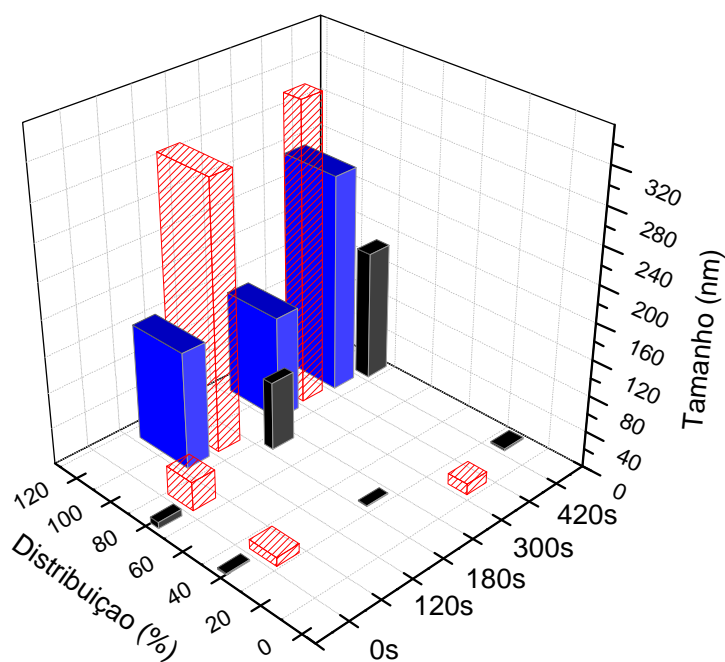
A determinação da CAC possibilita verificar a partir de qual concentração, aproximadamente, os peptídeos estão na sua forma agregada em meio aquoso, para poder acompanhar os passos da interação com bicamadas lipídicas. A análise dos dados indica CAC decrescente de JI, seguido por JIF2W e JIF2WR, de aproximadamente $400\mu\text{M}$, $300\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$, respectivamente. O comportamento agregacional pode estar relacionada ao significativo aumento do momento hidrofóbico do análogo JIF2WR. No trabalho desenvolvido por Liu e colaboradores (2016), os peptídeos chamados de 2 e 5, que possuíam maior momento hidrofóbico ($\approx 0,81$), apresentaram agregação e formação micelar na presença do fluoróforo 1,8-ANS, o que não foi verificado pelos peptídeos 3 e 6, que possuem μ_H da ordem de $0,052$. Esse pode ser o principal

motivo para que o JIF2WR se oriente com uma face hidrofóbica maior e/ou mais organizada, agregando em concentrações menores que o JI e JIF2W.

Espalhamento Dinâmico de Luz

A formação agregacional dos peptídeos também foi avaliada por medidas de DLS, onde é possível determinar o tamanho médio das partículas, como apresentado na figura 17, onde foram monitorados em função do tempo.

Figura 17 – Distribuição de tamanho médio de partículas dos peptídeos em função do tempo para o JI (em preto), JIF2W (hachurado em vermelho) e JIF2WR (em azul) na concentração de $50\mu\text{M}$ em tampão citrato/fosfato com 150 mM de NaCl, pH 5,5, à 25°C .



O comportamento do JI e seus análogos apresentaram-se bem distintos, onde é possível verificar mais de uma população na distribuição de tamanho. Para JI, duas populações foram obtidas, indicando que parte dessas moléculas estão separadas (porcentagens de 10 a 40%)

enquanto uma outra população vai se aglomerando ao longo do tempo, indicado pelo aumento de tamanho, chegando a 90% do total distribuição no tempo de 420 segundos. A JIF2W possui também duas populações, mas que atingem um tamanho maior que o JI em menor tempo (300 segundos). Mas a principal diferença foi em JIF2WR que apresentou apenas uma população onde praticamente se mantém até o tempo de 180 segundos e que aumenta de tamanho de forma mais uniforme até 300 segundos. Esse comportamento da JIF2WR está de acordo com sua rápida orientação e organização molecular, em acordo com o CAC.

A concentração escolhida para o acompanhamento do tamanho médio das moléculas (50 μM) foi determinada com base em trabalhos já publicados para o JI (Fontana, et al., 2004; Jia, et al., 2018) e que também serão discutidos mais adiante nesse trabalho, onde essa concentração se aproxima ao máximo valor de MIC encontrado para a ação fungicida neste trabalho. Portanto, considerando estes resultados e as respectivas CAC obtidas, é possível considerar que a formação de agregado dos peptídeos em solução aquosa próximo aos valores das MICs foi insignificante, sugerindo que a ação provavelmente se inicia para os peptídeos desagregados.

Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), especialmente na região de 1600 a 1700 cm^{-1} , chamada de Amida I ou I', é utilizada para a identificação das estruturas secundárias presentes em um peptídeo ou proteína através da deconvolução espectral (Murayama e Tomida, 2004). Estudos anteriores da JI (dos Santos Cabrera et al., 2014) sugeriram, computacionalmente, que sua ação sobre membranas ocorresse na forma de agregados, sendo essas formações possíveis de serem quantificadas na faixa de 1620 a 1625 cm^{-1} . Espectros dos peptídeos foram coletados em tampão Citrato/Fosfato com 150mM de NaCl diluídos em água deuterada, em pH = 5,5, TFE deuterado (40%), SDS (8mM) diluído em água deuterada, e em diferentes composições fosfolipídicas com a razão lipídeo/peptídeo de 5:1 (Saravanan et al., 2012). Para todos os espectros, foram calculadas a 2ª derivada e realizada a deconvolução espectral, que consiste da subdivisão do espectro em todos os componentes de estrutura secundária nele presentes, como exemplificado na figura 18 para tampão, TFE e SDS, onde a linha preta corresponde ao espectro original, a linha vermelha ao ajuste gaussiano e as

deconvoluções em cinza. As porcentagens determinadas pela deconvolução do espectro estão apresentadas na tabela 5.

Figura 18 – Espectros de FTIR deconvoluídos para a JI (1ª linha), JIF2W (2ª linha) e JIF2WR (3ª linha) em tampão citrato/fosfato em pH 5,5 (A, D e G), 40% de TFE (B, E e H) e 8 mM de SDS (C, F e I). A linha preta corresponde ao espectro original, a linha vermelha ao ajuste gaussiano e suas respectivas deconvoluções.

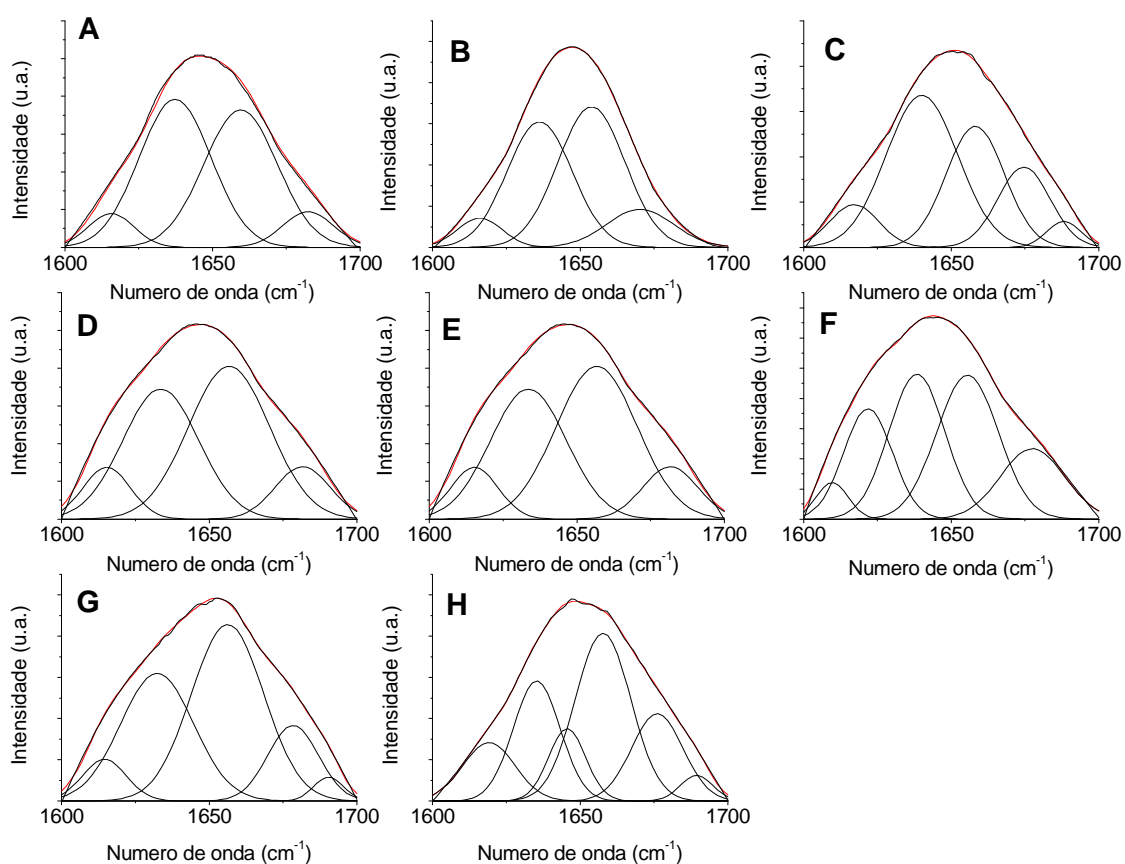


Tabela 5 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros de JI e seus dois análogos, como induzidas pela presença de tampão (Tp) Citrato/Fosfato contendo 150 mM de NaCl, na presença de solução 40% TFE e 8 mM SDS no mesmo tampão, a partir da deconvolução dos respectivos espectros através da 2ª derivada. Desvio padrão de $\pm 1\%$

%	JI			JIF2W			JIF2WR		
	Tp	TFE	SDS	Tp	TFE	SDS	Tp	TFE	SDS
Hélice- α	-	15	26	-	28	14	-	21	8
Folhas- β	-	18	28	-	-	26	-	-	8
Voltas	38	38	23	44	47	34	57	36	50
Aleatório	47	15	-	44	25	-	16	26	8
Agregação	15	14	23	12	-	26	27	17	26

Ao analisar as contribuições estruturais obtidas da deconvolução dos espectros de FTIR verificou-se a formação de agregados para os 3 peptídeos em praticamente todos os meios avaliados. A presença do resíduo de Prolina (Pro) na sequência primária do JI e análogos, pode ter favorecido essa formação, por, segundo Martari e Sanderdon (2008) influenciar a agregação em peptídeos. Uma característica observada em TFE e SDS para todos os peptídeos: os espectros revelam pequenas contribuições estruturais para hélice- α e folhas- β , sendo o menor teor dessas estruturas observado para a JIF2WR em meio anisotrópico.

As características estruturais e de agregação desses peptídeos também foram investigadas na presença de bicamadas lipídicas aniônicas miméticas de membranas de bactérias Gram positivas (PGCL 50:50), Gram negativas (PEPG 76:24), *C. albicans*, representando fungos (PCPSErg 40:20:20) e tumores (PCPSCol 60:20:20), além de vesícula zwitteriônica (PC 100). As figuras 19 apresentam os espectros de FTIR deconvoluídos da JI, JIF2W e JIF2WR, respectivamente. As tabelas 6 e 7 resumem as contribuições percentuais das estruturas secundárias obtidas a partir deconvolução dos respectivos espectros através da 2ª derivada.

Figura 19 – Espectros de FTIR deconvoluídos para a JI (primeira coluna), JIF2W (segunda coluna) e JIF2WR (terceira coluna) na presença de bicamadas lipídicas: PC (A, B e C), PCPSCol (D, E e F), PCPSErg (G, H e I), PEPG (J, L e M) e PGCL (N, O e P).

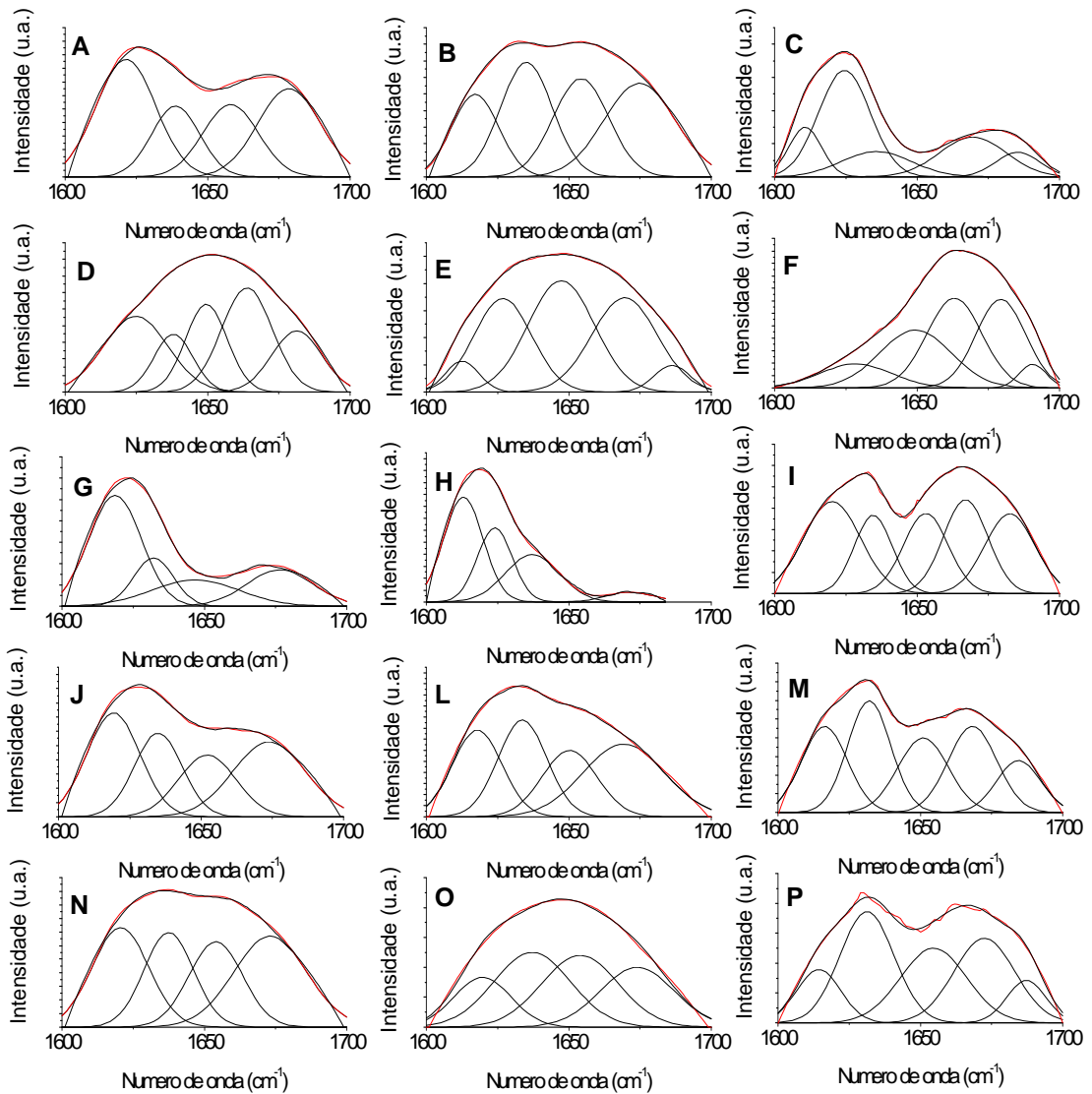


Tabela 6 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros de JI e seus dois análogos na presença das composições vesiculares PC, PCPSCol e PCPSErg.

%	JI			JIF2W			JIF2WR		
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PC	PCPSCol	PCPSErg	PC	PCPSCol	PCPSErg
Hélice- α	20	36	-	25	24	-	27	26	16
Folhas- β	17	29	16	27	26	26	24	-	7
Voltas	28	29	18	30	30	5	-	63	33
Aleatório	-	-	18	-	-	-	30	-	11
Agregação	35	6	48	18	20	69	19	11	33

Tabela 7 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros do JI e seus dois análogos na presença das composições vesiculares de PEPG e PGCL.

%	JI		JIF2W		JIF2WR	
	PEPG	PGCL	PEPG	PGCL	PEPG	PGCL
Hélice- α	21	19	30	13	18	25
Folhas- β	-	21	-	13	34	30
Voltas	31	29	24	38	34	33
Aleatório	22	-	31	-	-	-
Agregação	26	31	15	36	14	12

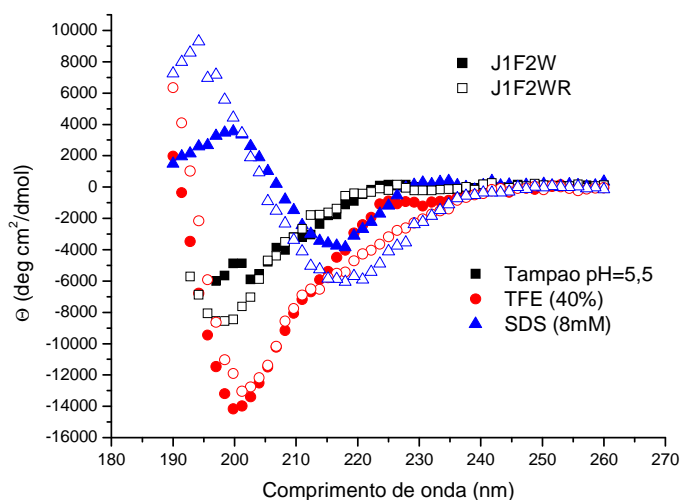
Ao avaliar as composições estruturais adquiridas pelos peptídeos JI e seus análogos (Tabelas 6 e 7), a característica mais evidente é a formação de agregados presentes em todas as vesículas testadas, com destaque para a composição de PCPSErg, onde a agregação foi mais evidente. Nessa composição não houve a formação de estrutura helicoidal para a JI e JIF2W e menor percentual de hélice- α para o JIF2WR. O menor conteúdo estruturado (maior conteúdo de

estruturas aleatórias) pode ser correlacionado ao alto teor de agregação apresentado por todos os peptídeos nessa composição. O maior grau de estruturação corresponde ao menor teor de estrutura aleatória, como verificamos ao comparar a forma aleatória dos peptídeos em tampão, em relação aos demais ambientes testados. Isso confirma que o ambiente é capaz de modificar as características estruturais dos peptídeos em meio aquoso. Em TFE e PC, o peptídeo JIF2WR mostrou um aumento na formação de estrutura aleatória, mas em contra partida aumentou a formação de hélice- α , quando comparado ao tampão, além da redução da agregação. Esse comportamento diferenciado sugere que a redução da agregação juntamente com o aumento estrutural, mesmo com o aumento da formação aleatória, pode ter sido de fundamental importância para sua eficiência de uma forma geral, como vamos verificar mais adiante nesse trabalho.

Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)

Uma investigação das estruturas secundárias foi realizada também por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para os análogos, JIF2W e JIF2WR a 20 μ M, inicialmente em tampão citrato/fosfato com 150mM de NaF em pH 5,5, solução de TFE 40% e de micelas de SDS (8mM) (figura 20) e comparados a espectros da JI obtidos por dos Santos Cabrera et al. (2014).

Figura 20 – Espectros de CD para os análogos JIF2W (símbolos cheios) e JIF2WR (símbolos vazios) em pH 5,5 a 25°C.



Ao observar os espectros é possível verificar que em tampão citrato/fosfato os espectros para ambos os análogos apresentam características de estrutura aleatória. Já em TFE e SDS, as características sugerem um misto da formação de folhas- β e aleatória. Considerando que esses peptídeos possuem apenas 8 resíduos de aminoácidos na sequência primária, a formação de folhas- β , pode resultar de ligações intermoleculares (Jackson e Mantsch, 1995).

A tabela 8 resume as estruturas secundárias determinadas a partir do programa CD-Pro, que permite a quantificação das contribuições dos diferentes componentes estruturais presentes para o JIF2W e o JIF2WR.

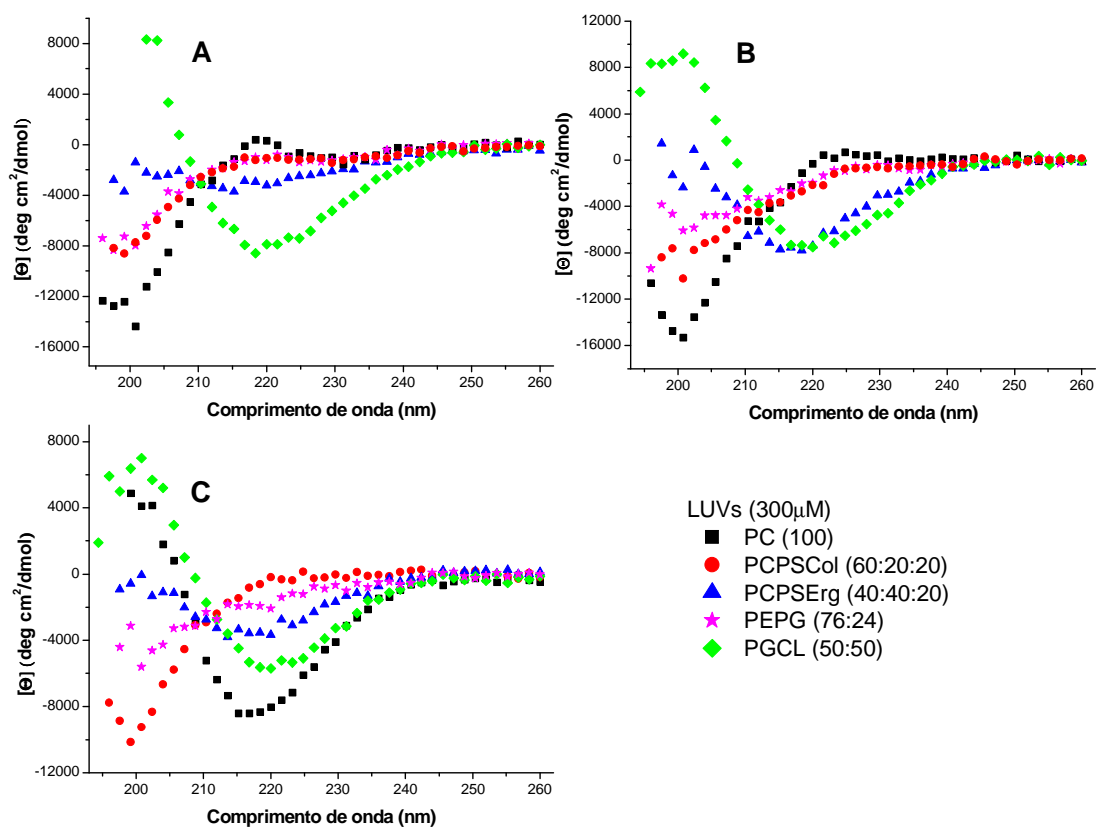
Tabela 8 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros de JIF2W e JIF2WR calculadas pela rotina CD-Pro em tampão citrato/fosfato (Tp), 40% de TFE e 8mM de SDS em pH 5,5.

%	JIF2W			JIF2WR		
	Tp	TFE	SDS	Tp	TFE	SDS
Hélice- α	4	7	3	5	9	6
Folhas- β	41	35	45	39	33	43
Voltas	22	23	21	22	24	22
Aleatório	33	35	31	34	34	29

Verificamos que os peptídeos análogos de JI possuem características estruturais muito semelhantes. Em uma comparação com os dados e espectros de JI (dos Santos Cabrera, et al., 2014), verificamos que os 3 peptídeos possuem a mesmas configurações estruturais. Isso indica que as modificações realizadas na sequência de aminoácidos, não causaram mudanças significativas na estrutura secundária nesses ambientes.

Espectros de JI e seus análogos também foram obtidos na presença das mesmas bicamadas lipídicas dos espectros de FTIR foram obtidos. A figura 21 mostra os espectros de JI, JIF2W e JIF2WR a 20 μ M, na presença de 300 μ M de vesículas.

Figura 21 – Espectros de CD dos peptídeos na concentração de 20 μM , em diferentes composições fosfolipídicas a 300 μM , 25°C. (A) JI; (B) JIF2W e (C) JIF2WR.



Ao analisar os espectros verificamos que para JI e análogos predominam características de conformações aleatórias e de folhas- β , como verificado por Ong e colaboradores (2014) para peptídeos curtos como IK8-all-L, também de 8 resíduos, e que apresentou basicamente conformação de folhas- β em SDS. As tabelas 9 e 10 resumem o conteúdo das estruturas secundárias determinadas a partir do CD-Pro.

Tabela 9 – Contribuições (%) de diferentes estruturas secundárias para os espectros de JI e dos análogos calculados pela rotina CD-Pro em tampão citrato/fosfato na presença de vesículas de PC, PCPSCol e PCPSErg, em pH 5,5.

%	JI		JIF2W			JIF2WR		
	PC	PCPSCol	PC	PCPSCol	PCPSErg	PC	PCPSCol	PCPSErg
Hélice- α	6	6	5	6	7	5	5	6
Folhas- β	36	38	36	37	36	39	40	40
Voltas	22	22	23	22	31	21	22	22
Aleatório	36	34	36	35	26	35	33	32

Tabela 10 – Contribuições (%) de diferentes estruturas secundárias dos espectros de JI e análogos calculados pela rotina CD-Pro em tampão citrato/fosfato na presença de vesículas de PEPG e PGCL, em pH 5,5.

%	JI		JIF2W		JIF2WR	
	PEPG	PGCL	PEPG	PGCL	PEPG	PGCL
Hélice- α	6	5	5	4	5	5
Folhas- β	39	89	37	58	38	44
Voltas	22	6	25	21	23	23
Aleatório	34	-	34	17	34	28

Ao analisar as contribuições estruturais calculadas pelo CD-Pro, verificamos que independentemente da composição fosfolipídica do meio, JI e análogos adquirem praticamente as mesmas conformações com baixa formação helicoidal (próximo de 5%) e alto percentual de folhas- β . Estudo de peptídeos curtos, de 8 a 4 resíduos mostraram que assim como a carga e hidrofobicidade, o comprimento da cadeia é de fundamental importância para a estruturação e eficiência de um peptídeo. Variando apenas o tamanho da sequência, verificaram que a formação

de folhas- β é otimizada com uma sequência de 8 resíduos e reduzida para cadeias menores (Ong, et al., 2014). Para a JI e análogos, a quantidade de carga assim como o tamanho das sequências se mantem, variando apenas a hidrofobicidade, o que não interferiu de forma significativa na estruturação dos peptídeos.

Embora peptídeos curtos como a JI e análogos, possuam a tendência a formas basicamente não estruturadas, as análises conformacionais consideram as estruturas estatisticamente mais frequentes em determinado ambiente que pode ou não favorecer a formação de uma delas em relação as demais. Experimentos por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) complementam as observações realizadas pelo FTIR, por considerarem outras relações peptídeo/lipídeo.

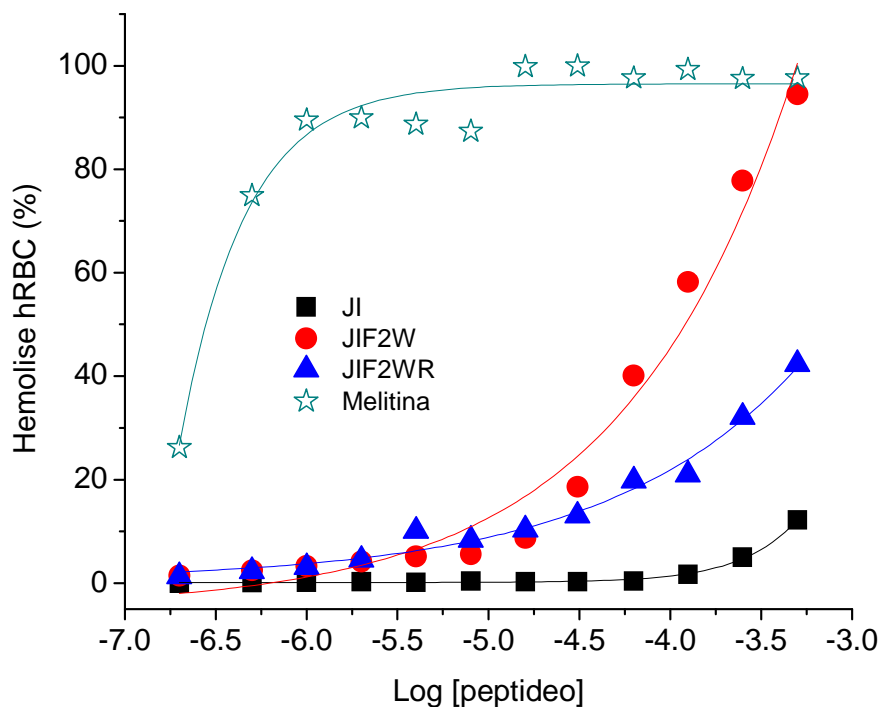
Ao comparar os dados de CD com os de FTIR, verificamos que o teor helicoidal adquirido pelos peptídeos foi maior em todos os meios avaliados. Essa aumento pode estar associado a razão [P]/[L] de 1:5 utilizada para a espectroscopia de infravermelho em contrapartida com a razão 1:15 no CD. Outra diferença está no elevado teor de folhas- β observado nos experimentos de CD. Essa divergência provavelmente é resultado da formação de agregados, que por ser uma variação nas conformações β (Jackson e Mantsch, 1995), são considerados pelo CD, como folhas- β .

Bio-ensaios

Atividade hemolítica

Uma das vantagens de se estudar análogos de JI é a possibilidade de que não apresentem atividade hemolítica assim como verificado para ele (Fontana, et al., 2004). A figura 22 mostra a isoterma de atividade hemolítica de JI e análogos em relação a referência, melitina, um peptídeo conhecido por ser hemolítico.

Figura 22 – Atividade hemolítica para JI e análogos, utilizando a melitina como controle.



A concentração em que o peptídeo induz 50% da máxima atividade hemolítica, EC_{50} , foi determinada graficamente (Tabela 11). Encontramos que JI e JIF2WR são peptídeos não hemolíticos, ambos com EC_{50} acima de 500 μ M, enquanto JIF2W apresenta EC_{50} de aproximadamente 100 μ M, podendo ser considerado pouco hemolítico. Os dados corroboram uma baixa atividade hemolítica para a JI que já havia sido verificada em outros trabalhos (Fontana et al., 2004 e Jia, et al., 2018). A baixa citotoxicidade pode estar também associada ao tamanho dos peptídeos, pois na literatura foi verificado que a baixa atividade hemolítica pode estar relacionada a cadeias curtas de aminoácidos (Wiradharma, et al., 2011). A ausência de atividade hemolítica de JI e seu análogo JIF2WR favorece sua aplicabilidade.

Atividade antibacteriana e antifúngica

Estudos com o peptídeo JI despertaram interesse inicialmente devido aos dados bastante interessantes de atividade antibacteriana e antifúngica de JI relatados por Fontana et al. 2004. Depois desse trabalho outros como Hansen (2010) e Romanelli et al. (2011), também investigaram essas atividades em comparação a novos análogos desenhados e encontraram

resultados semelhantes. A figura 23 e a tabela 11 apresentam os dados que obtivemos de atividade bactericida para JI e análogos.

Figura 23 – Atividade antibacteriana para os peptídeos JI e análogos em *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25924) e *P. aeruginosa* (ATCC 13338), utilizando o Cloranfenicol, como medicamento controle representado pela linha tracejada.

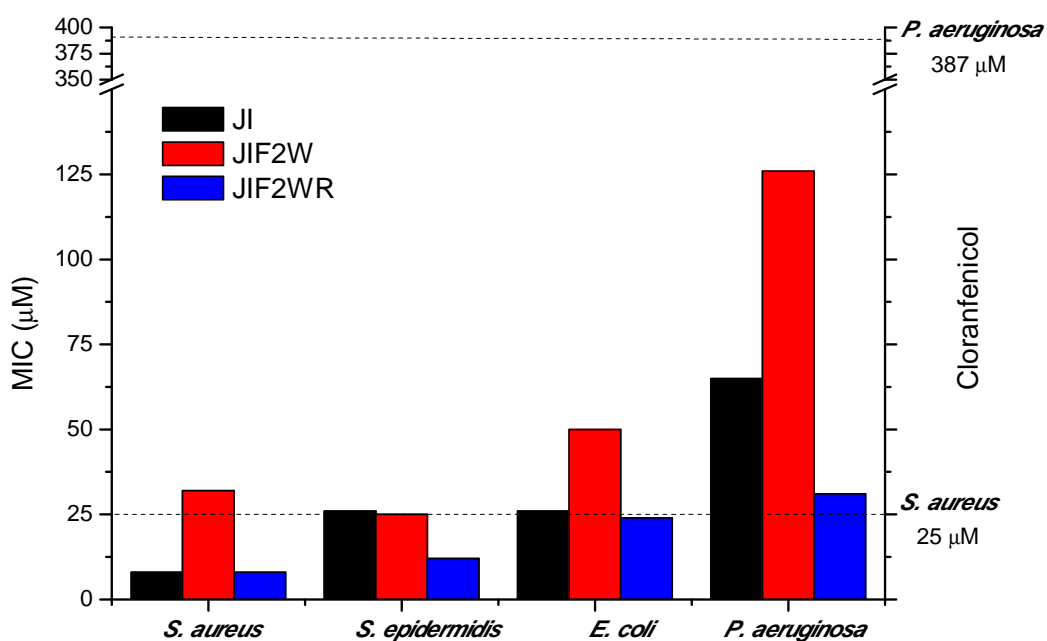


Tabela 11 – Concentração inibitória mínima (MIC) para a atividade antibacteriana (em µg/ml e µM) e hemolítica (EC₅₀) de JI e análogos. Ensaios realizados em triplicata. Determinação do índice terapêutico (I.T.), EC₅₀/média dos MICs.

	Ação antimicrobiana								EC ₅₀	I.T.
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>S. epidermidis</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25924		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13338			
	(µg/ml)	µM	(µg/ml)	µM	(µg/ml)	µM	(µg/ml)	µM	µM	
J1	8 10*	8	25	26	25	26	62 10*	65	>500	>12
J1F2W	32	32	25	25	50	50	125	126	91	1
J1F2WR	8	8	12,5	12	25	24	32	31	>500	>11
Cloranfenicol	8	25	30	93	15	46	125	387	-	-

*Fontana, et al., 2004 – para *S. aureus* ATCC 6535 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Os resultados ora obtidos para JI diferem, consideravelmente daqueles obtidos por Fontana et al. (2004) para *P. aeruginosa*, provavelmente pela diferença de linhagens das bactérias e o análogo J1F2WR apresentou maior eficiência que a JI nessa bactéria Gram-negativa. A conformação estrutural basicamente composta de folhas-β para os 3 peptídeos, mas principalmente para a J1F2WR e JI pode ter sido responsável pela melhor atividade para *S. aureus*, como já verificado para outros peptídeos por Ong e colaboradores (2014). Nesse sentido podemos considerar que este análogo possui a melhor ação antimicrobiana em praticamente todas as bactérias testadas, mostrando-se superior ao cloranfenicol, medicamento controle. Essas características que o destacam estão associadas às modificações introduzidas na sua sequência primária que resultaram em maior atividade, principalmente a presença dos resíduos de arginina (Arg). Um aumento na ação antimicrobiana foi observado por Mishra e colaboradores (2017), onde um peptídeo curto (8 resíduos) e com uma dupla Arg, mostrou-se mais ativo tanto em bactérias como em fungos e mais seletivo que outros contendo lisina (Lys), apresentando ainda menor atividade hemolítica. O análogo J1F2W, em comparação a J1F2WR e JI, apresentou a menor ação bactericida, mostrando-se menos ativo.

Os fungos, assim como as bactérias, são parte integrante do nosso organismo, mas alterações no nosso metabolismo podem favorecer a proliferação descontrolada (Slaninova, et al., 2011). A figura 24 e a tabela 12 mostram os resultados obtidos nos testes de ação fungicida para a JI e análogos, indicando um MIC praticamente constante para diferentes cepas de *Candida*, salvo algumas exceções.

Figura 24 – Atividade fungicida para a JI e análogos para diferentes cepas de *Candida*, utilizando anfotericina B como medicamento controle. A *C. albicans c. (1)* e a *C. albicans c. (2)* são espécies clínicas registradas sob identificação HB 5984 e HB 5960, respectivamente.

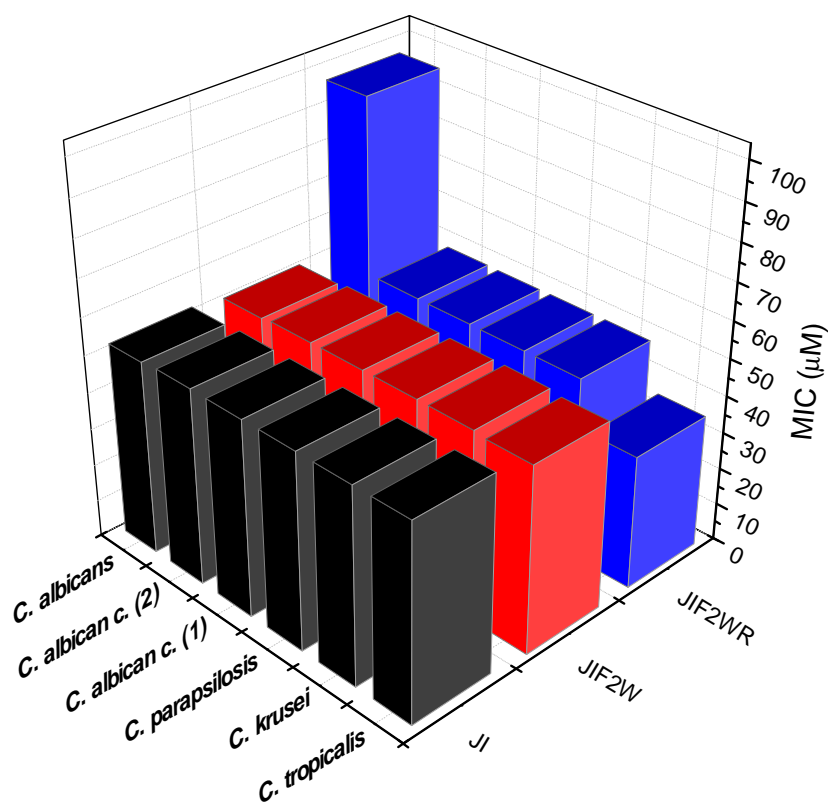


Tabela 12 – Concentração inibitória mínima (MIC) para a atividade antifúngica (em µg/ml e µM) do JI e análogos. Ensaios realizados em triplicata.

	Ação antifúngica					
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albican</i> <i>clínica</i> HB 5984	<i>C. albican</i> <i>clínica</i> HB 5960	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
	µM	µM	µM	µM	µM	µM
J1	>52,4 16**	>52,4 32**	>52,4 64**	>52,4 2,5*	>52,4	52,4 64**
J1F2W	50,3	>50,3	>50,3	>50,3	>50,3	50,3
J1F2WR	24 a 48,1	>48,1	>48,1	>48,1	>48,1	96,2
HAL 1/5***	13 ± 8	20	20	-	-	7,5 ± 2,5
HAL 1/10***	20	14 ± 3	40	-	-	9 ± 1
Anfotericina B	< 14	< 14	< 14	< 14	< 14	27

*Fontana, et al., 2004 – para *C. albicans* cepa clínica. ** Jia, et al., 2018 – para *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 14053. *** Slaninova, et al., 2011 para peptídeos pequenos (12 resíduos).

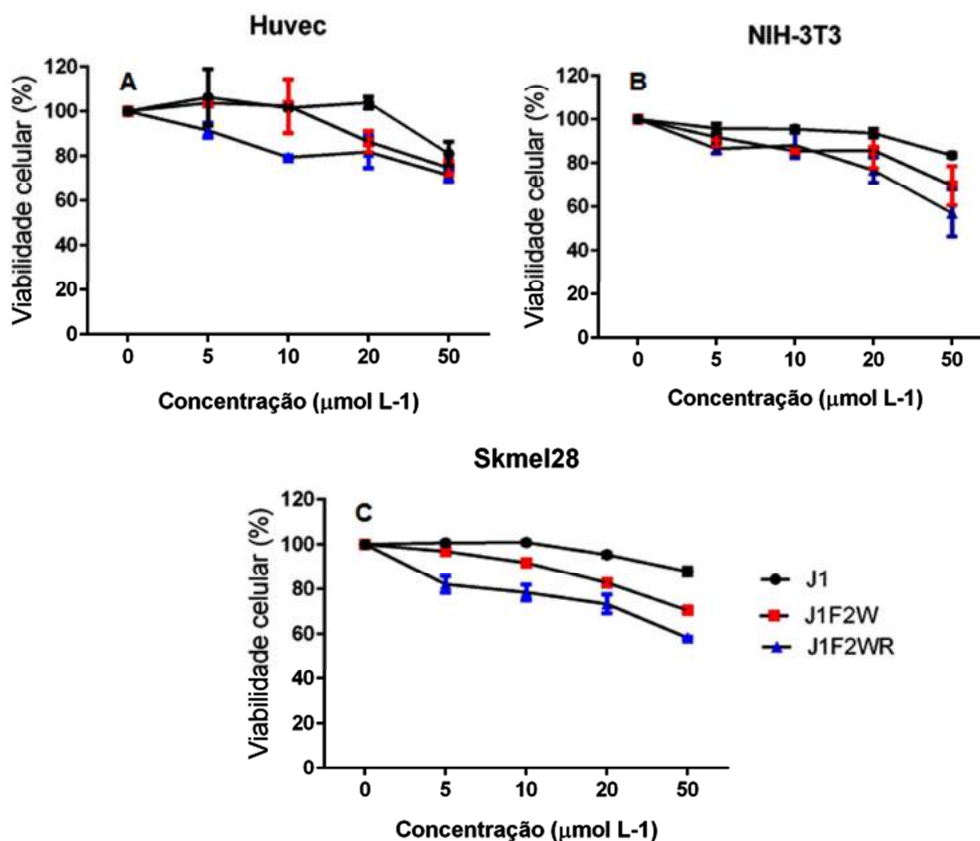
O teste de ação fungicida foi realizado para 6 tipos diferentes de *Candida*, destacando a melhor ação da J1F2WR em *Candida tropicalis* com menor concentração inibitória dentre os 3 peptídeos testados (entre 24 e 48,1 µM). Comparando dados em outros trabalhos, como em Slaninova e colaboradores (2011), a atividade antifúngica de dois peptídeos pequenos (até 12 resíduos), como mostrado na tabela 11, se mostra na mesma ordem de grandeza que os testes com as jelleínas, com unidade de formação de colônia (CFU) da ordem de 10⁵, principalmente em se tratando da J1F2WR em *Candida tropicalis*. A Jelleína I, testada para vários tipos de *Candidas* em outro trabalho, possuem semelhantes MICs, maiores que 52 µM, para *Candida albicans* e *parapsilosis* (64 µM) (Jia, et al., 2018). Diferença entre MICs determinado por Fontana (2004) e por outros trabalhos (Jia, et al., 2018; Slaninova, et al., 2011), pode estar relacionada ao tipo de cepa da *Candida albicans* clínica utilizada e pela diferença na linhagens entre os trabalhos.

O comprimento da cadeia de aminoácido vem se tornando de suma importância na síntese de novos AMPs, pois dificulta degradação por proteases presentes no organismo humano, reduzindo o custo de produção (Lax, 2010; Samantha Ng, et al., 2018). Segundo Samantha Ng e colaboradores (2018) peptídeos mais curtos (de 6 a 9 resíduos) mostraram maior atividade em *Candida albicans* (ATCC 64550) em relação a peptídeos mais longos. Isso pode ser um fator favorável da JI e análogos.

Viabilidade Celular para Jelleinas

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para as células HUVEC (Endotelial normal), NIH-3T3 (Fibroblasto normal) e SKMel-28 (Melanoma) e os resultados obtidos para a JI e análogos estão apresentados na figura 25, indicando qual dos peptídeos seria mais viável para as células testadas.

Figura 25 – Viabilidade celular testada via ensaio de MTT para os peptídeos JI e análogos, para células de HUVEC (A), NIH-3T3 (B) e SKMel-28 (C).



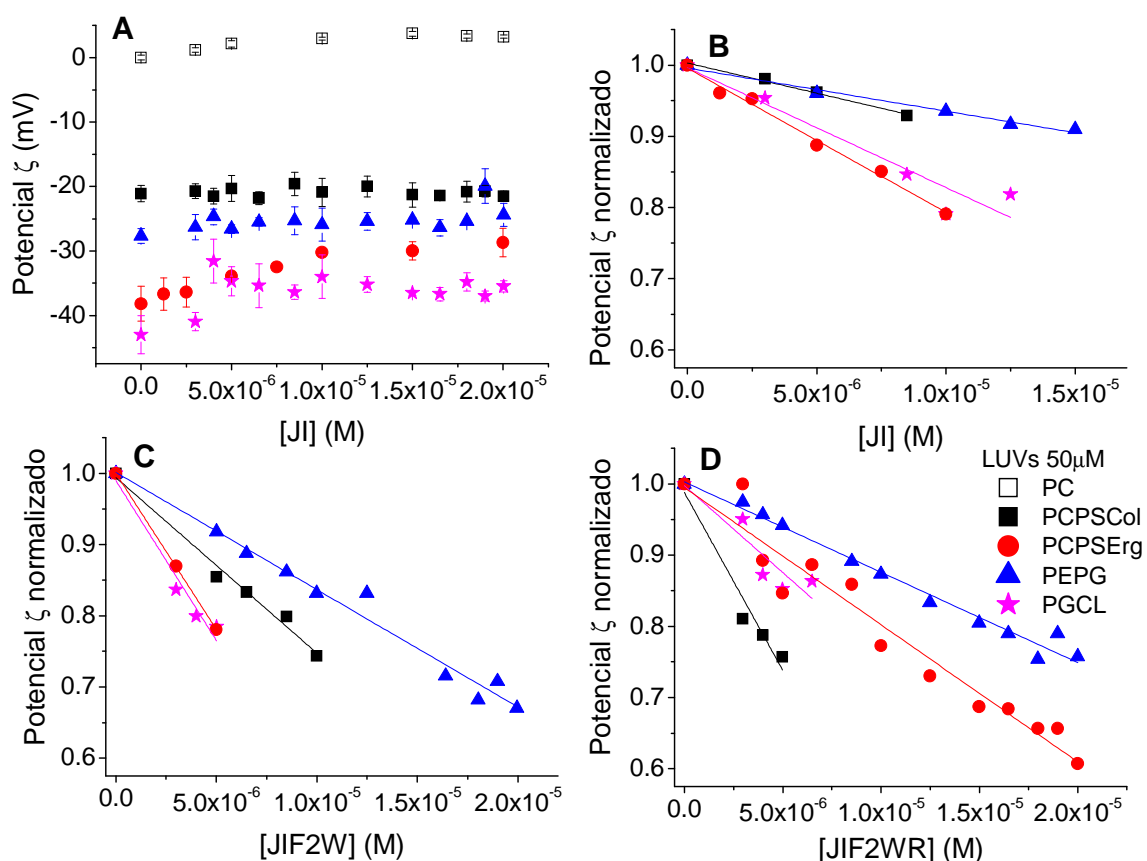
A viabilidade celular indica o quanto aquela célula sobrevive frente a ação de um agente externo, no caso, os peptídeos JI e análogos. O JI mostrou-se pouco seletivo, matando 20% de ambas as células normais a 50 μ M, e sendo até menos eficiente para o Melanoma (cerca de 10%) à mesma concentração. Um comportamento semelhante foi observado para o JIF2W, mostrando-se um pouco mais eficiente em células tumorais, atingindo por volta de 20 e 30% de morte a concentração máxima testada. Mas o peptídeo JIFW2R foi o que demonstrou maior eficiência em células SKMel-28, matando cerca de 40% em 50 μ M, porém pouco seletivo para com as células normais, chegando a 50% de morte para as células NIH-3T3. Esse comportamento indica que os peptídeos são pouco seletivos. Um comportamento semelhante foi observado para os peptídeos desenhados, TetraF2W, especialmente TetraF2W-RR, onde demonstrou eficiência contra células de adenocarcinoma epitelial (HeLa CCL-2) e menor citotoxicidade para o peptídeo com a dupla de Arg, em relação aos análogos com Lys (Mishra, et al., 2017). Além da cadeia curta, que otimiza a produção, reduzindo os custos de síntese, a presença da Arg sugere um melhoramento no JIF2WR em relação os demais.

Interações com Modelos de Membrana

Potencial zeta e determinação do coeficiente de partição (K_p)

A figura 26 mostra as isotermas de adsorção de JI (A) para diferentes composições vesiculares, determinadas através das medidas de potencial Zeta (ζ). As isotermas dos 3 peptídeos possuem comportamentos muito semelhantes, provavelmente refletindo caráter semelhante das interações eletrostáticas. Para a determinação do coeficiente de partição (K_p) foi realizado o ajuste linear pela normalização do potencial zeta (figura 25 B, C e D). O coeficiente angular fornece a fração molar de peptídeo ligado a lipídeo (X_L), para a determinação do K_p .

Figura 25 – Isotermas de potencial Zeta (ζ) da JI (A) e ajuste linear para o potencial Zeta normalizado em função da concentração dos peptídeos, para as diferentes composições lipídicas das vesículas: JI (B); JIF2W (C) e JIF2WR (D).



A tabela 13 apresenta os valores calculados do coeficiente de partição (K_p) determinado de acordo com Freire et al., (2011) e indica o teor de carga aniônica de cada composição vesicular e os diâmetros das vesículas na presença de 20 μ M de peptídeo.

Tabela 13 - Cálculo do coeficiente de partição (K_p) dos peptídeos na presença de vesículas carregadas, à 25°C, teor de carga aniônica de cada composição vesicular e diâmetros das vesículas na presença de 20 μM de peptídeo.

% carga aniônica	PCPSCol		PCPSErg		PEPG		PGCL	
	20		40		24		110	
	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)
JI	0,8±0,6	159	1,9±0,9	130*	0,6±0,3	132	11,7±0,3	173
JIF2W	2,3±0,2	152	2,1±0,2	3641	1,8±0,9	234	11,8±0,6	2592
JIF2WR	5,2±0,7	177	3,6±0,1	237	1,4±0,7	615	9,4±0,7	157

*Dos Santos Cabrera et al., 2014, para a concentração de 15 μM .

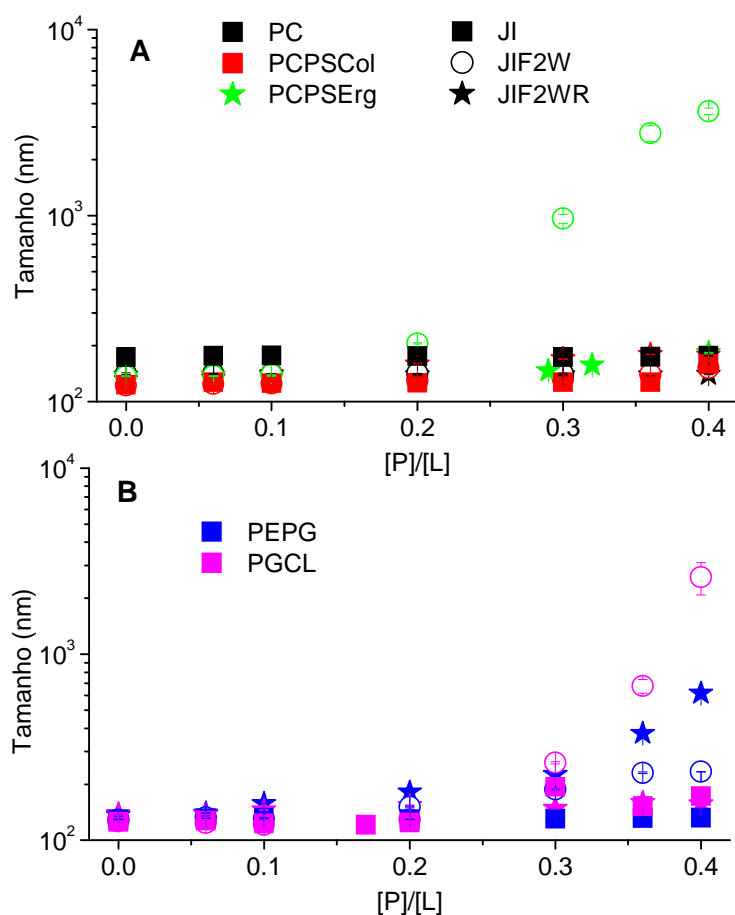
Valores de K_p da ordem de 10^3 são frequentemente encontrados para peptídeos antimicrobianos (Freire, et al., 2011). O que observamos na tabela 13, para o conjunto desses peptídeos de mesma carga líquida (+3) e hidrofobicidade decrescente (JI>JIF2W>>JIF2WR), é que existe uma tendência a maiores valores de K_p para JI e análogos em PGCL onde o teor de carga aniônica das vesículas é maior e conseqüentemente maiores afinidades decorrentes das contribuições eletrostáticas. Para as demais composições, os peptídeos demonstraram afinidades semelhantes, exceto o JIF2WR em PCPSErg, que mesmo a vesícula possuindo 40% de teor aniônico, apresentou menor afinidade (K_p de $3,6 \cdot 10^3$), quando comparada a PCPSCol, com 20% de teor aniônico (K_p de $5,4 \cdot 10^3$). Esse comportamento sugere que essa interação seja prejudicada por alguma modificação na estruturação do peptídeo, provavelmente pela presença do maior percentual de agregação verificado pelo experimento de FTIR, reduzindo a sua interação para com as bicamadas lipídicas.

Variações de tamanho médio das vesículas (DLS)

A figura 26 mostra a variação do diâmetro médio das vesículas na concentração de 50 μM pela razão [P]/[L] dos peptídeos. O diâmetro médio das vesículas em PCSPERG (40:40:20) foi

testado para JI (dos Santos Cabrera, et al., 2014) e não observou-se variação no tamanho das vesículas com o aumento da sua concentração.

Figura 26 – Variação de diâmetro médio das vesículas de diferentes composições pela razão [P]/[L] para JI e análogos, JIF2W e JIF2WR, em 50 μ M de vesículas à 25°C. Desvio padrão de aproximadamente 0,7nm.



Ao analisar os dados apresentados, o JI não causou variações significativas no diâmetro das vesículas, diferentemente dos análogos. O peptídeo JIF2W foi o que ocasionou a maior variação de tamanho, atingindo 3641 nm na composição de PCPSErg, a que mais apresentou agregação no IR, seguida pela PGCL, segunda maior formadora de agregados e a de maior K_p, chegando a 2592 nm. O JIF2WR induziu uma maior variação de diâmetro nas vesículas de PEPG, chegando em 615 nm. Observa-se que a variação do diâmetro acima de 1000 nm na JIF2W, ocorre nos miméticos de membranas de bactérias Gram positivas e fungos (as duas

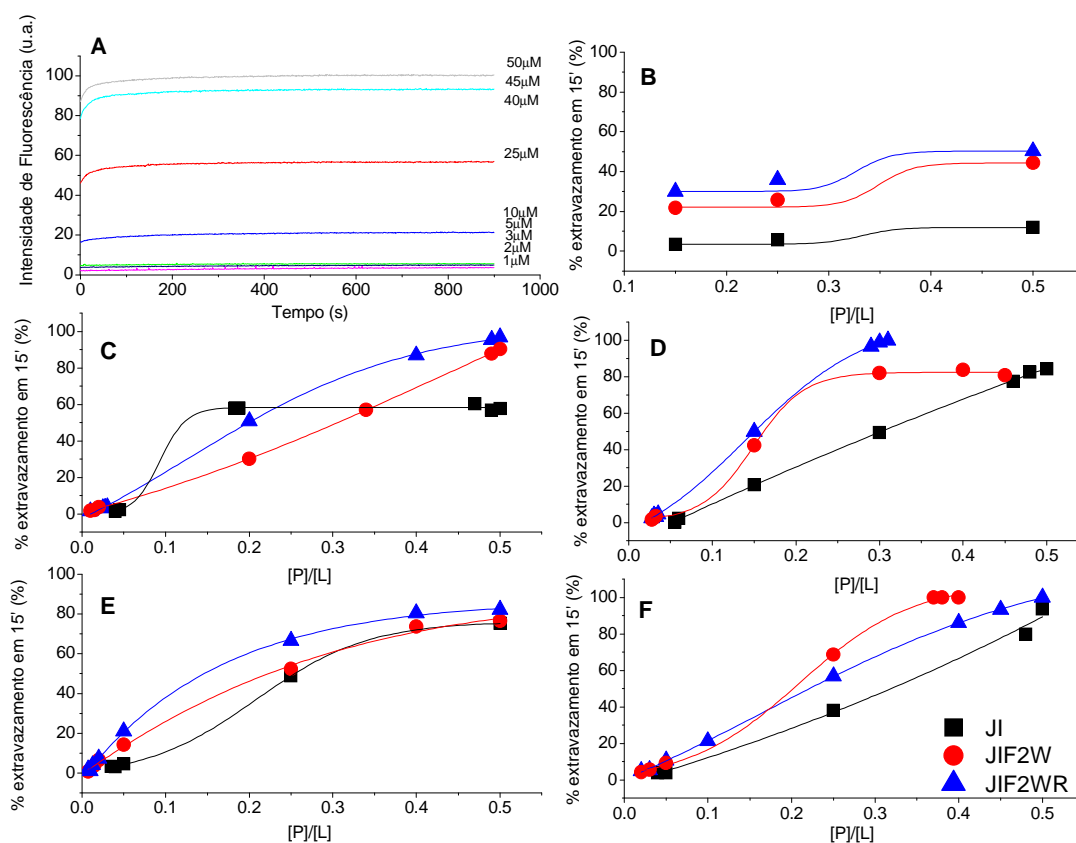
maiores em teor de carga negativa) e as composições com mais formações de agregados, segundo o IR.

Extravazamento de Corante

O mecanismo de ação de alguns peptídeos tem como característica a permeabilização tendo por alvo a camada de fosfolípidos da membrana celular de modo a induzir poros ou falhas nessas membranas (Zhao, 2002). O vazamento do conteúdo aquoso a partir de vesículas como resultado da lise, fusão ou permeabilidade fisiológica pode ser detectado fluorimetricamente através da utilização fluoróforos de peso molecular baixo. A razão da concentração limite de peptídeo e a de lipídeo, acima da qual o processo de extravazamento é iniciado, ou seja, $[P]/[L]$ crítica, caracteriza a eficiência lítica do peptídeo.

O extravazamento de vesículas induzido por JI e análogos foi analisado em experimentos de liberação dos marcadores ANTS/DPX a partir das curvas de cinética das vesículas aniônicas PCPSCol, PCPSErg, PEPG e PGCL, além da zwitteriônica PC e expressa na forma da curva dose-resposta para o tempo de 15 minutos de interação, como mostrado na figura 27.

Figura 27 – Exemplo de curva de cinética de extravasamento para JIF2WR em PGCL. (A) Curvas de dose-resposta da atividade lítica pela razão [P]/[L] de JI e análogos em pH 5,5 na presença de 100 μ M de vesículas nas diferentes composições à 25°C, em PC (B), PCPSCol (C), PCPSErg (D), PEPG (E) e PGCL (F).



O perfil de atividade lítica de JI e análogos indica de forma geral que JIF2WR é o análogo mais eficiente em praticamente todas as vesículas testadas, mas principalmente em vesículas PGCL. Os 3 peptídeos apresentam limitada interação com a vesícula zwitteriônica (PC) atingindo o máximo de 50% de vazamento em 50 μ M (maior concentração avaliada), em concordância com o caráter não hemolítico que observamos. Em PEPG, os peptídeos não atingiram o vazamento total (100%), sendo o mesmo comportamento verificado pelo JI em todas as vesículas testadas. Através das curvas dose-resposta observamos que nem todos os peptídeos possuem extravasamento com dependência sigmoïdal, de onde obtivemos o valor da $[P]/[L]_{CR}$, mostrada na tabela 14. Para melhor avaliação dos resultados identificamos o EC_{50} de todos os peptídeos nas diferentes vesículas testadas, como mostrado na tabela 15.

Tabela 14 – Razão [P]/[L] crítica calculada graficamente para a JI e análogos.

	[P]/[L]				
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL
JI	-	-	-	-	-
JIF2W	-	-	-	-	0,064
JIF2WR	-	0,0312	0,0325	-	0,028

“-“: dependência não sigmoidal

Tabela 15 – Extravazamento de 50% do corante presente nas vesículas (EC_{50}), obtidos graficamente para a JI e análogos.

	EC_{50} (μ M)				
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL
JI	-	12	30	25	32
JIF2W	-	30	16	22	22
JIF2WR	39	20	15	15	20

Para as vesículas PGCL ambos os análogos demonstraram atividade lítica de comportamento sigmoidal, sendo JIF2WR mais eficiente ($[P]/[L]= 0,028$) que JIF2W ($[P]/[L]= 0,064$). Para a maioria das composições testadas, é possível verificar na tabela 15, que o JIF2WR é o peptídeo que atinge 50% de extravasamento mais rapidamente que os demais, indicativo de maior eficiência. Os resultados mostram que o análogo JIF2WR mostrou-se mais eficiente principalmente nas bicamadas lipídicas miméticas de membranas de bactérias Gram-positivas (PGCL) em concordância com os resultados de atividade bactericida, seguida pela (PCPSCol) e (PCPSErg). De forma geral JIF2WR apresentou atividade lítica superior a apresentada por JI e pelo análogo JIF2W. Essa observação sugere que a presença do resíduo de Arginina (R) na sua sequência primária, pode estar associada ao aumento de sua eficiência, como verificado em outros trabalhos (Chan, et al., 2006 e Lim et al.,2013).

Anisotropia de fluorescência da sonda DPH

A interação de peptídeos com bicamadas lipídicas pode induzir perturbação no empacotamento lipídico, afetando sua elasticidade (Lakowicz, 2006). O uso da sonda fluorescente DPH permite monitorar alterações da elasticidade de bicamadas lipídicas provocada por um peptídeo. Porém, o uso dessa sonda requer que a fluorescência do peptídeo não afete a intensidade de fluorescência do DPH, o que verificamos previamente. Além disso, foi verificado se a detecção da fluorescência na emissão é ou não igualmente sensível para a luz polarizada na vertical quanto na horizontal (Lakowicz, 2006), pela determinação do fator G, em todas as composições fosfolipídicas testadas.

A medida de fluorescência da sonda DPH com excitação em 360 nm e emissão em 450 nm foi realizada e a variação de intensidade em 450 nm, está apresentada na figura 28, para diferentes concentrações dos peptídeos (0,5 μM , 10 μM e 15 μM). Observou-se que a presença da JI e análogos não influenciaram de forma significativa a emissão de fluorescência da sonda. O fator G foi de aproximadamente 1,0, indicativo de que a luz polarizada é igualmente sensível em ambas às direções, como indicado na tabela 16.

Figura 28 – Variação percentual de fluorescência da sonda DPH em 450 nm na presença de diferentes concentrações do JI (símbolos pretos), JIF2W (símbolos azuis vazios) e JIF2WR (símbolos azuis cheios) tampão citrato/fosfato com 150 mM NaCl em pH 5,5, à 25°C.

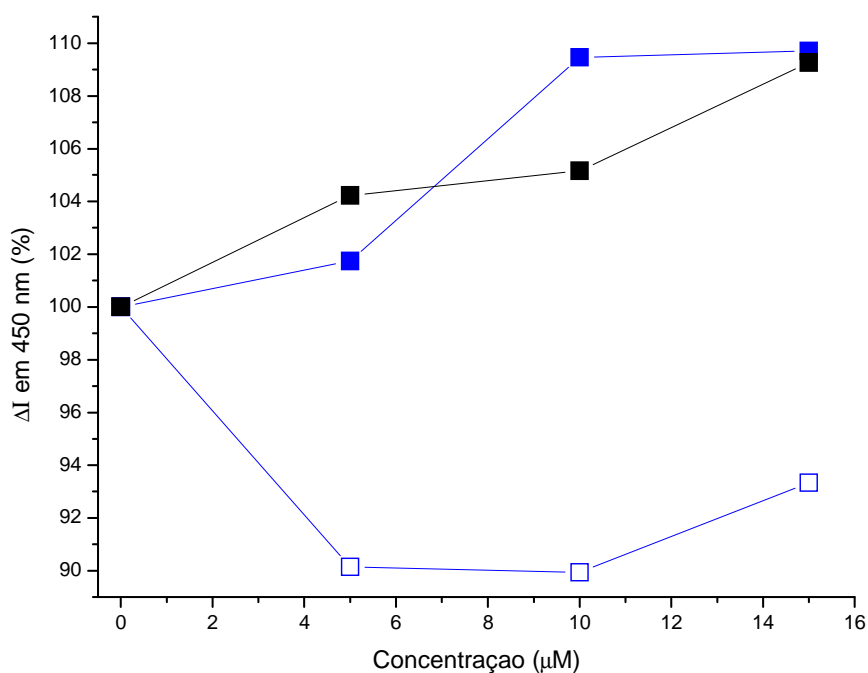
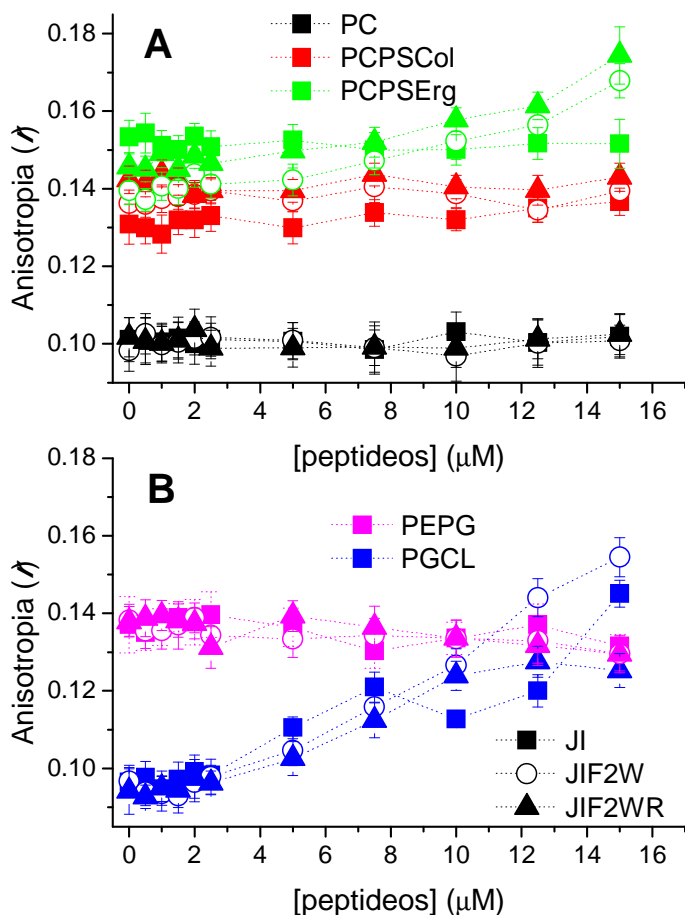


Tabela 16 – Cálculo do fator G na presença das bicamadas lipídicas em diferentes composições.

Cálculo do fator G	
PC	0.90706 ± 0.00899
PCPSCol	0.90573 ± 0.00625
PCPSErg	0.90631 ± 0.00699
PEPG	0.9343 ± 0.02979
PGCL	0.93079 ± 0.00568

A elasticidade (ou flacidez) das bicamadas lipídicas contendo DPH foi monitorada na presença de concentrações crescentes de JI e análogos. Verificamos que os peptídeos apresentam influência limitada na anisotropia, como mostrado na figura 29. Esse resultado sugere que esses peptídeos interajam preferencialmente com a região das cabeças dos fosfolípidos, pouco afetando o ordenamento na região das caudas.

Figura 29 – Anisotropia de fluorescência da sonda DPH (r) contida em LUVs (50 μM) nas diferentes composições lipídicas em função da concentração dos peptídeos em tampão citrato/fosfato com 150 mM NaCl, 25°C. (A) PC, PCPSCol e PCPSErg; (B) PEPG e PGCL. A concentração de fluoróforo DPH é de 2:1000 em relação à concentração de lipídeos. Desvio padrão de aproximadamente 0,002.



Os resultados indicaram pequenas variações da anisotropia em PCPSErg, para maiores concentrações dos análogos, e em PGCL, mais pronunciadamente para JI e JIF2W. Nesses casos,

essas pequenas variações de anisotropia podem ser influenciada da curvatura negativa da membrana causada por fosfolípidos como, por exemplo, a cardiolipina (CL), resultado que ainda não indicaria uma interação dos peptídeos com a região das caudas dos fosfolípidos (Wang, et al., 2015). Na presença de vesículas zwitterionica (PC), e de aniônicas PCPSCol e PEPG, as de menor conteúdo de cargas aniônicas, praticamente não ocorre perturbação do empacotamento lipídico, ou seja, a interação dos peptídeos provavelmente ocorre apenas na região das cabeças, não afetando a elasticidade original dessas bicamadas.

Mecanismo de ação

Quando comparamos o comportamento apresentado pela JI e pelos análogos nas interações com bicamadas lipídicas verificamos mudanças conformacionais e seletividade por ambientes de composição fosfolipídica aniônica que se assemelham membranas de bactérias, fungos, bem como células tumorais. Na espectroscopia de infravermelho (IR) foi utilizada uma concentração de 1mM de peptídeo em comparação com 20 μ M no CD, totalizando uma diferença de 50 vezes a mais de peptídeo disponível para cada vesícula no IR em relação ao CD. A razão [P]/[L] para as técnicas de IR e CD, foi de 1:5 e 1:15, respectivamente, sendo que a elevada razão entre peptídeo e lipídeo é verificada para peptídeos antimicrobianos (AMPs), onde as relações entre P:L estão entre 1:20 a 1:10 (Melo, et al., 2012). A maior afinidade dos peptídeos pelas bicamadas lipídicas está exatamente na composição de maior K_p sugerindo que, a disponibilidade dos peptídeos é maior para interação com a bicamada de composição PGCL.

Os peptídeos JI e seu análogo JIF2WR mostraram-se semelhantemente eficientes em relação a atividade biológica, principalmente em bactérias. JI possui a maior afinidade pela bicamada PGCL, sistema que mimetiza as membranas de bactérias Gram-positivas, onde se mostrou mais ativo, o mesmo comportamento foi observado para a JIF2WR. Mas segundo a literatura (Leite, et al., 2014), a maior interação e maior eficiência deveriam induzir uma maior estruturação, o que não acontece com a JI em PGCL. Embora esses peptídeos estejam estruturados (sem contribuições aleatórias, conforme tabela 7), em PGCL, JIF2WR apresenta considerável redução do teor de estruturas agregadas. Segundo a literatura, isso favorece a interação entre o peptídeo e a bicamada lipídica (Feder, et al., 2000) e que não é verificado para a JI, que ao contrário, sofre um aumento do teor de estruturas agregadas nesse ambiente.

O análogo JIF2W demonstrou baixa atividade biológica, quando comparado aos outros dois peptídeos, com maior afinidade para a vesícula de PGCL. Entretanto esse peptídeo foi o que apresentou as maiores contribuições de da formação de agregados em todos os sistemas que mimetizam membranas, demonstrando que a substituição da fenilalanina por triptofano na posição 2 não contribuiu para o melhoramento desse análogo.

Este estudo revela as seguintes características relativas ao mecanismo de ação dos peptídeos:

- 1) A maior interação com bicamadas lipídicas pode ser relacionada à maior estruturação e consequente redução da agregação, para alguns peptídeos, como o análogo JIF2WR.
- 2) A redução da agregação pode estar associada a maior eficiência e atividade biológica, como para JIF2WR.
- 3) Algumas composições fosfolipídicas das bicamadas podem ter favorecido a formação de agregados, como para o análogo JIF2W.
- 4) Substituições específicas no *design* da sequência primária dos peptídeos refletem em maior eficiência, como a substituição pela Arg no análogo JIF2WR.
- 5) Interação preferencialmente superficial entre os peptídeos e as bicamadas lipídicas.
- 6) Menor hidrofobicidade pode ter sido o parâmetro que favorece sua maior seletividade, como para JIF2WR.
- 7) Maior momento hidrofóbico sugere uma orientação da face hidrofóbica, motivo tal que pode ter induzido uma CAC a concentrações menores, como para JIF2WR.

CAPÍTULO 4 - Protonectin e Protonectin (1-6)

Resultados e discussões

Nesse capítulo vamos apresentar uma caracterização biofísica da Protonectin (PTN) e a mistura com a Protonectin 1-6 (PTN₁₋₆) em interações com vesículas que modelam ambientes de membranas zwitteriônicas, de tumores, fungos e bactérias, que foi complementada pela avaliação da atividade hemolítica, citotóxica para células normais e tumoral, antifúngica e antibacteriana. O intuito é avaliar a seletividade da PTN isolada e na mistura (PTN/PTN₁₋₆). As sequências da PTN e PTN₁₋₆, além de informações físico-químicas estão na página 18.

Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A análise de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em meio aquoso por espectroscopia de infravermelho foi empregada graças a um aspecto particular que torna a técnica importante neste caso: a possibilidade de distinção entre estruturas nativas e a formação de agregados, a partir de regiões específicas de suas respectivas vibrações moleculares (Barth e Zscherp, 2002). A região Amida I' (1600 a 1700 cm⁻¹) foi investigada nos espectros de FTIR e, a partir da deconvolução espectral, identificamos os componentes de estruturas secundárias adquiridas por PTN (figura 30) e pela mistura 1:1 (mol/mol) PTN/PTN₁₋₆ (figura 31) em tampão Tris/HCl com EDTA e 150 mM de NaCl em pH 7,5, em solução 40% TFE, em solução 8 mM de SDS e na presença das bicamadas lipídicas testadas. As contribuições percentuais de cada estrutura secundária, calculadas pela deconvolução dos espectros estão resumidos nas tabelas 17 e 18. O fragmento (PTN₁₋₆) não foi apresentado por não possui estruturação, apenas formação aleatória em todas as condições testadas.

Figura 30 – Espectros de FTIR deconvoluídos da PTN isolada em (A) tampão Tris/HCl com EDTA e 150 mM de NaCl (pH 7,5), (B) 40% de TFE, (C) 8 mM de SDS e na presença de bicamadas lipídicas de (D) PC, (E) PCPSCol, (F) PCPSErg, (G) PEPG e (H) PGCL. O espectro é representado em linha preta, o ajuste em vermelho e as deconvoluções abaixo do ajuste.

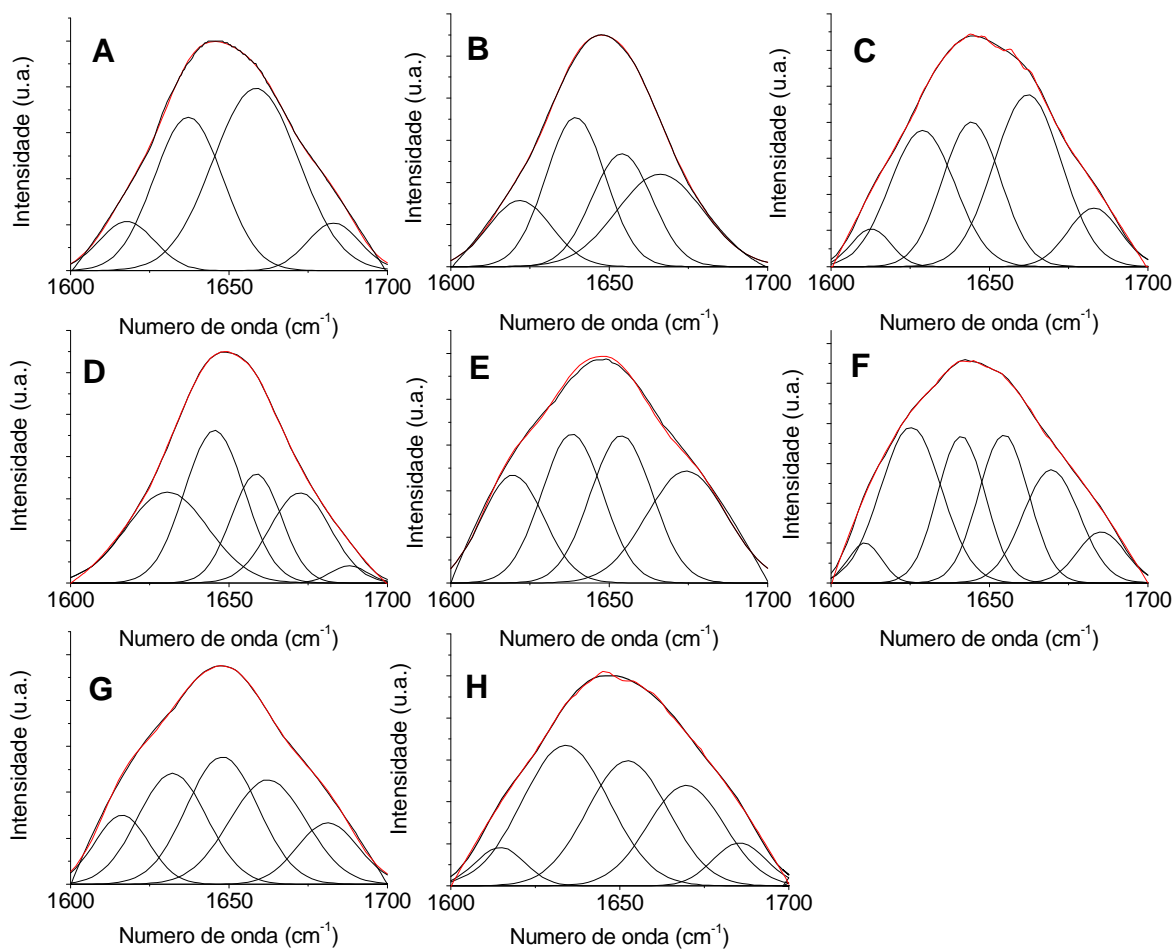


Figura 31 – Espectros de FTIR deconvoluídos da mistura PTN/PTN₁₋₆ em (A) tampão Tris/HCl com EDTA e 150 mM de NaCl (pH 7,5), (B) 40% de TFE, (C) 8 mM de SDS e na presença de bicamadas lipídicas de (D) PC, (E) PCPSCol, (F) PCPSErg, (G) PEPG e (H) PGCL. O espectro é representado em linha preta, o ajuste em vermelho e as deconvoluções abaixo do ajuste.

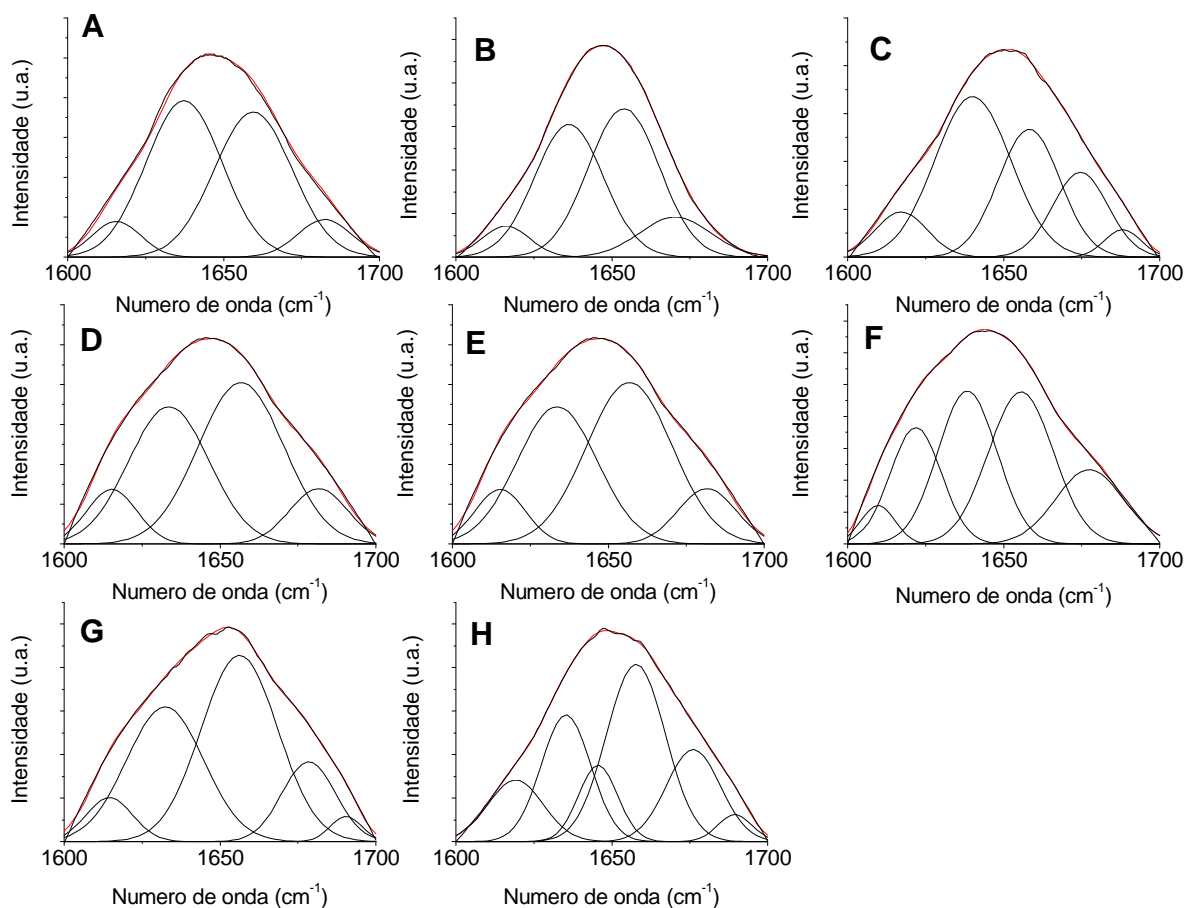


Tabela 17 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias calculadas a partir da deconvolução dos espectros para PTN e PTN/PTN₁₋₆ em tampão deuterado Tris/HCl com EDTA e 150 mM de NaCl (pH 7,5), TFE (40%) e SDS (8mM).

%	PTN			PTN/PTN ₁₋₆		
	TP	TFE	SDS	TP	TFE	SDS
Hélice- α	-	27	20	-	33	25
Folhas- β	-	-	-	-	-	-
Voltas	49	27	24	48	21	25
Aleatória	39	26	26	45	35	38
Agregação	12	20	30	7	11	12

A investigação estrutural a partir dos espectros de FTIR confirmou achados obtidos anteriormente por dicroísmo circular na presença de TFE (40%) e SDS (8mM), nos quais a estrutura helicoidal é aumentada na mistura, ou seja, PTN na presença da PTN₁₋₆ (Baptista-Saidemberg et al., 2010). Outra confirmação aparece na formação de agregados. Embora esteja presente para PTN isoladamente nos 3 meios estudados, é significativamente diminuída na mistura (PTN/PTN₁₋₆). Esse comportamento está de acordo com Baldissera e colaboradores (2015), que verificaram a diminuição dos agregados da PTN na presença da PTN₁₋₆ por simulação computacional em micelas de SDS.

A conformação estrutural dos peptídeos também foi avaliada na presença de bicamadas lipídicas aniônicas (LUVs) miméticas de membranas de bactérias Gram-positivas (PGCL 50:50) e Gram-negativas (PEPG 76:24), fungos (PCPSErg 40:20:20) e tumores (PCPSCol 60:20:20), além de zwitteriônica (PC 100), mimética de membrana de eritrócitos. A tabela 18 resume as contribuições percentuais das diferentes estruturas secundárias apresentadas por PTN e PTN/PTN₁₋₆.

Tabela 18 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias calculadas a partir da deconvolução dos espectros para a PTN e PTN/PTN₁₋₆ na presença de LUVs nas diferentes composições.

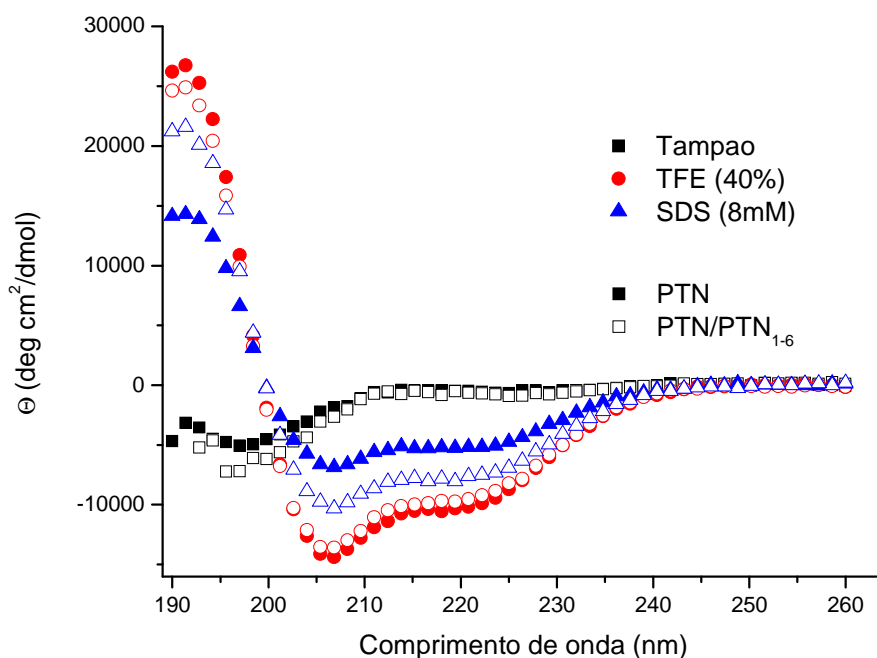
%	PTN					PTN/PTN ₁₋₆				
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL
Hélice- α	20	27	21	28	15	22	45	32	45	36
Folhas- β	-	27	-	24	5	-	36	-	32	22
Voltas	22	26	27	37	34	27	10	16	17	20
Aleatória	32	-	20	-	12	32	-	29	-	10
Agregação	26	20	32	11	34	19	9	23	6	12

Observamos igualmente na presença de bicamadas lipídicas que o teor helicoidal aumenta na presença da mistura dos peptídeos. Com exceção das bicamadas compostas por PC e PCPSErg, em todas as demais ocorre a formação de estruturas em folhas- β cujo teor também é aumentado para a mistura PTN/PTN₁₋₆. A maior estruturação, ou seja, a somatória de hélice- α e folhas- β , da PTN isolada e na mistura foi mais significativa em PCPSCol e PEPG. A redução da formação de agregados e aumento da estruturação foram comportamentos importantes, observado para a mistura (PTN/PTN₁₋₆) em todas as bicamadas lipídicas testadas, sugerindo uma maior interação de PTN para com essas LUVs. A maior estruturação é resultado da maior interação de peptídeos com bicamadas lipídicas, como observado por Leite e colaboradores (2014) para Polybia-MP1 e MPX, peptídeos derivados de veneno da vespa *Polybia paulista*, e que adquiriram maior conformação helicoidal na composição PCPG (70:30), onde obtiveram maior interação, indicado pelo maior coeficiente de partição (K_p).

Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)

A verificação da conformação estrutural da PTN e da PTN/PTN₁₋₆, também foi realizada a partir da técnica de CD na presença de tampão HEPES com 150 mM de NaF em pH 7,5, de solução de TFE 40% e de micelas de SDS (8mM), como indicado na figura 32.

Figura 32 – Espectros de CD da PTN e PTN/PTN₁₋₆ a 20 μ M, em tampão, TFE (40%) e SDS (8mM), todos a 25°C.



Os espectros em tampão são característicos de estruturas aleatórias tanto para a PTN como para a mistura. Já em TFE e SDS, os peptídeos adquiriram uma conformação helicoidal, que foi aumentada para PTN/PTN₁₋₆, em comparação com PTN isolada, tendência observada por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010) e confirmada pelos experimentos de FITR.

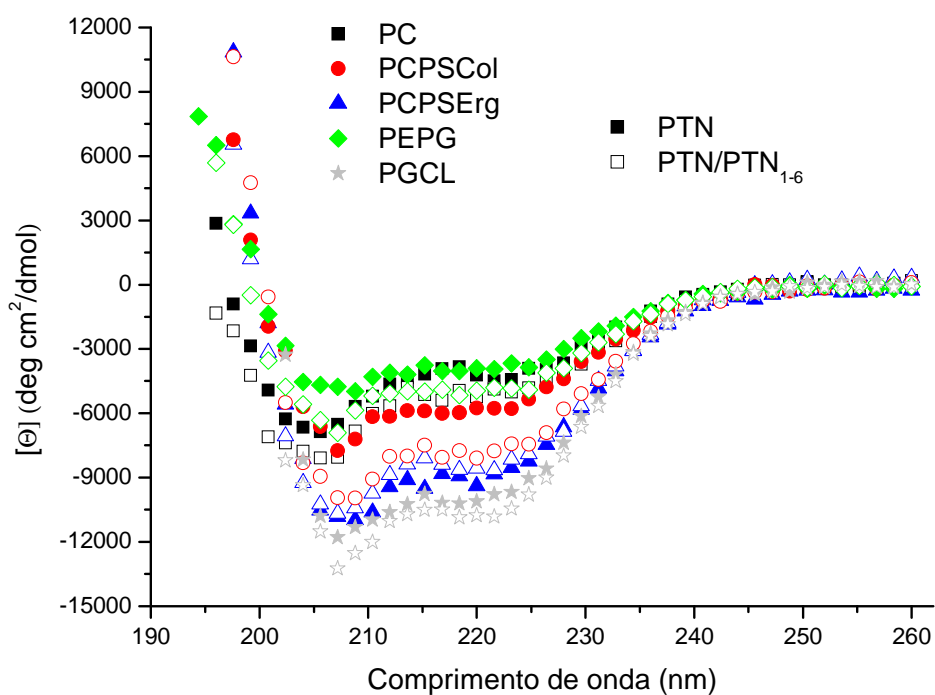
A partir do programa CD-Pro, que possui um banco de dados de estruturas proteicas baseado em NMR e raio-X, foi possível estimar as contribuições percentuais das diferentes estruturas secundárias da PTN e da PTN/PTN₁₋₆, como mostrado na tabela 19.

Tabela 19 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros de PTN e PTN/PTN₁₋₆ calculadas pelo programa CD-Pro em tampão HEPES (pH 7,5), TFE (40%) e SDS (8mM).

%	PTN			PTN/PTN ₁₋₆		
	Tampão	TFE	SDS	Tampão	TFE	SDS
Hélice- α	5	41	22	5	43	34
Folhas- β	39	15	29	37	8	17
Voltas	21	19	18	22	26	21
Aleatória	35	25	31	36	23	28

Esses dados revelam um comportamento estrutural semelhante em tampão, para a PTN isolada e na mistura (PTN/PTN₁₋₆). Já em TFE (40%) e em SDS (8mM) o teor helicoidal foi aumentado para a PTN/PTN₁₋₆ e o teor de folhas- β reduzido. Essa diminuição pode estar associada ao decréscimo da formação de agregados verificado pelo FTIR para PTN/PTN₁₋₆. Isso porque a agregação é uma variação das conformações β e que o CD pode considerar como folhas- β (Jackson e Mantsch, 1999). A figura 33 mostra os espectros de CD adquiridos para PTN e PTN/PTN₁₋₆ na presença de 300 μ M das mesmas LUVs utilizadas no FTIR.

Figura 33 – Espectros de CD da PTN (símbolos cheios) e PTN/PTN₁₋₆ (símbolos vazios) na presença de 300µM de LUVs em pH 7,5 e à 25°C. Concentração de PTN e PTN₁₋₆ de 20 µM.



Ao avaliar os espectros, notamos padrões espectrais característicos de estrutura helicoidal, identificado pelos picos negativos em 222 nm e 209 nm, em praticamente todas as bicamadas lipídicas testadas. A formação de hélices já foi descrita na literatura e confirmada por Carlier e colaboradores (2015) para o arranjo GXXXG presente na sequência de aminoácidos da PTN, quando na presença de membranas biológicas. As contribuições percentuais das diferentes estruturas secundárias, calculadas pelo programa CD-Pro, foram resumidas na tabela 20.

Tabela 20 – Conteúdo (%) de estruturas secundárias dos espectros da PTN e da mistura (PTN/PTN₁₋₆) calculadas pelo programa CD-Pro nas diferentes LUVs, em pH 7,5.

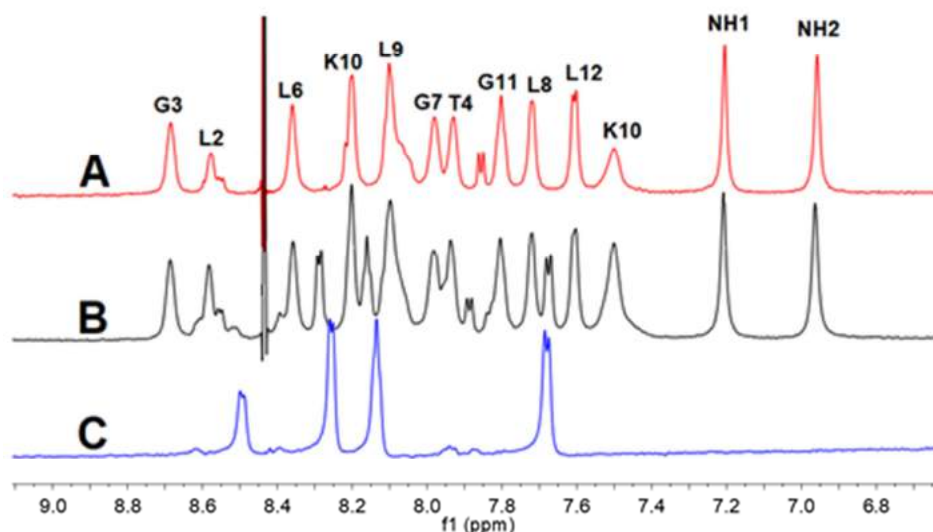
%	PTN					PTN/PTN ₁₋₆				
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL
Hélice- α	16	22	33	17	32	17	31	29	18	37
Folhas- β	32	26	17	37	15	29	21	20	29	16
Voltas	21	22	20	21	20	22	20	23	22	18
Aleatória	31	30	30	29	33	32	28	28	31	29

O comportamento dos peptídeos na presença das LUVs foi muito semelhante ao encontrado no experimento de FTIR. O A principal observação a ser feita é que existe uma tendência, em praticamente todos os casos, de PTN/PTN₁₋₆ adquirir um maior teor helicoidal quando comparado a PTN isolada e, paralelamente a isso, ocorre a redução da formação de folhas- β .

Determinação estrutural via Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros ¹H-2D COSY, ¹H-2D TOCSY e ¹H-2D NOESY foram coletados para a PTN e para a mistura (PTN/PTN₁₋₆) na presença de micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS). A figura 34 mostra o espectro ¹H-RMN da região HN-H α para os peptídeos. Os picos referentes a PTN (A) e a PTN na mistura com a PTN₁₋₆ (B) foram determinados nos mesmos locais e com mesma largura de linha, indicando que mudanças estruturais não foram induzidas pela presença da PTN₁₋₆ (Figura 34). O espectro apenas da PTN₁₋₆ (C) indica onde se encontram os picos referentes a seus resíduos, com pequenas alterações no deslocamento químico da PTN₁₋₆ isolada quando comparadas com a mesma em mistura com PTN, devido a interação com a PTN. Isso está de acordo com as pequenas mudanças conformacionais verificadas pelo IR e pelo CD na mistura, que se mostraram poucas e não significativas, assim não interferindo na interação com as micelas de SDS.

Figura 34 – Espectro $^1\text{H-NMR}$ para a estrutura da PTN (A), PTN/PTN₁₋₆ (B) e PTN₁₋₆ (C) em solução de micelas de SDS (100 mM) em 25°C, pH 5.0.



A largura de linha é medida a partir da largura na altura média do pico, ou seja, na meia largura, estimando o tempo de relaxação. Esse tempo está relacionado ao tempo de correlação, que, por sua vez, está relacionado ao tamanho da partícula em solução, ou seja, quanto menor a largura de linha, menor é o tamanho da molécula (Cavanagh, et al., 2006). Larguras de linha da ordem de 10 Hz são compatíveis com estruturas de alto peso molecular, o que sugere que os peptídeos (puros ou na mistura), estão ligados às micelas de SDS. A estimativa de peso molecular é de forma qualitativa, considerando que as estruturas em solução são globulares. O alto peso molecular é principalmente devido à micela, esta com cerca de 40 vezes maior que os peptídeos e determina o tempo de relaxamento do sistema e, conseqüentemente, a largura de linha. Como a largura de linha não sofreu mudanças, podemos sugerir que alterações no peso molecular dos agregados do PTN com a adição de PTN₁₋₆ não foi significativo frente ao peso molecular do conjunto PTN/micela.

Alterações na largura de linha podem estar relacionadas a um desvio químico referente a uma mudança no ambiente devido à presença de PTN. Pela análise do $^1\text{H-2D TOCSY}$ foi possível determinar as posições dos picos que determinam o padrão espectral de cada resíduo de aminoácido presente na sequência da PTN.

A tabela 21 mostra os deslocamentos químicos encontrados no espectro ^1H -RMN para o peptídeo PTN na presença das micelas de SDS.

Tabela 21 - Posição dos picos ^1H -RMN (ppm) para a PTN, (1 mM) em 100 mM SDS, pH 5.0 e 25°C.

Resíduo	H	HA	HB	Outros
I1		3.976	2.083	HD1 0.976; HG2 1.029; HG12 1.508; HG13 1.215.
L2	8.563	4.198	1.714/1.900	HD10.934; HD2 0.971; HG 1.209.
G3	8.670	3.800/4.072		
T4	7.915	4.270	4.039	HG2 1.221.
I5	8.057	3.724	2.057	HG1 1.656; HG2 0.900.
L6	8.344	4.010	1.607/1.743	HD1 0.964; HD2 0.909
G7	7.966	3.786/3.894		
L8	7.706	4.196	1.569/1.994	HD 0.909; HG 1.821.
L9	8.081	4.055	1.911	HD 0.847; HG 1.528.
K10	8.185	3.997	1.856	HD2 1.683; HE 2.943; HG 1.474; HZ 7.488.
G11	7.787	3.907/4.004		
L12	7.590	4.199	1.945	HD1 0.955; HD2 0,899; HG 1.552.
NH ₂				H1 7.189; H2 6.945.

A ressonância sequencial e suas respectivas atribuições foram realizadas combinando o espectro ^1H -2D TOCSY e ^1H -2D NOESY. A partir da análise dos espectros ^1H -2D NOESY, identificamos as correlações dos sistemas de spins, gerando um conjunto de dados com todas as posições dos picos e átomos correspondentes a esses picos, além de suas respectivas intensidades e áreas, que foi usado para a geração da estrutura tridimensional da PTN, pelo programa UNIO (Herrmann, 2002). Para a modelagem molecular, 143 restrições de distância contendo 42 restrições de alcance médio foram coletadas, e consideradas para cálculo de estrutura usando

UNIO. Todos os parâmetros utilizados para a otimização da estrutura e dos resultados obtidos estão resumidos na tabela 22.

Tabela 22 – Dados estatísticos de RMN para determinação da estrutura da PTN.

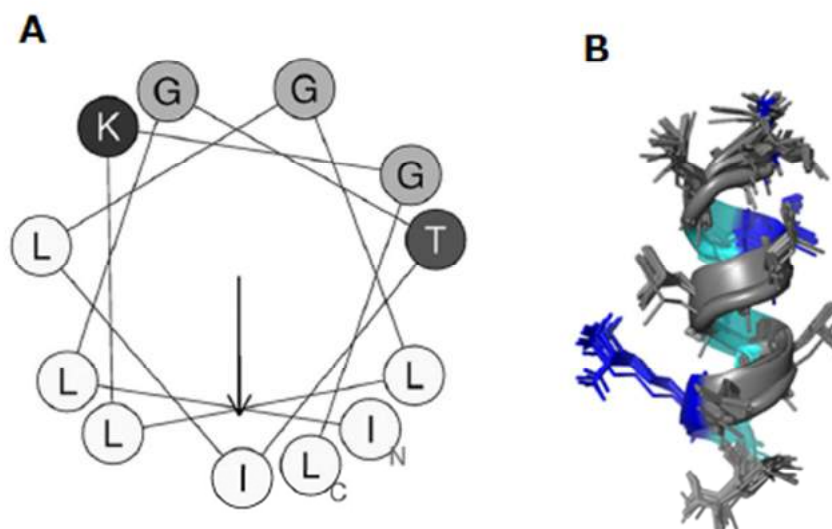
Número de resíduos	12 (1-12)
Número de modelos	20
Função alvo [Å^2]	0.11 ± 0.03 (0.04 .. 0.16)
Faixa de RMSD	1-12
<i>Backbone</i> RMSD ^a [Å]	0.45 ± 0.11 (0.24 .. 0.63)
Átomo pesado RMSD ^a [Å]	0.70 ± 0.18 (0.44 .. 0.99)
Restrições NOE	143
Intraresidual ($i-j = 0$)	55 (38.5%)
Sequencial ($i-j = 1$)	46 (32.2%)
Médio alcance ($1 < i-j < 5$)	42 (29.4%)
Restrições NOE por resíduo	11.92
Violação RMS NOE [Å]	0.0615
Região mais favorável	81.4%
Região adicional permitida	18.6%
Região generosamente permitida	0%
Região não permitida	0%

^aDesvio quadrático médio das coordenadas (Å) com intervalo ao longo de todas as 20 estruturas (em parênteses).

Ao final, as 20 melhores e mais otimizadas estruturas foram minimizadas usando o programa Gromacs para atingir 10,0 kJ/mol. Após a minimização, este conjunto de estruturas foi utilizado para representar a estrutura tridimensional em solução de PTN em SDS (100 mM), em pH 5,0 e 25°C, como mostrado na figura 35. A figura 35 apresenta uma representação da hélice- α da PTN determinada por Wang e colaboradores (2013) (A) e uma estrutura helicoidal com um teor médio de α -hélice de 56% e o conjunto de estruturas mais frequentes (13/20) exibe uma

configuração de α -hélice do resíduo 3° ao 10° (66%), conforme atribuído via DSSP (Kabsch e Sander, 1983).

Figura 35 – Representação de hélice- α proposta por Wang, et al. (2013) (A), indicando a região hidrofóbica (resíduos em cinza claro) e região hidrofílica (resíduos em escalas de cinza escuro). Superposição das 20 melhores estruturas finais calculadas e otimizadas da PTN exibindo uma conformação predominantemente helicoidal (B). Os resíduos hidrofóbicos estão representados em cinza e os polares em azul, evidenciando a anfipaticidade estrutural do peptídeo. O C-terminal é mostrado na parte inferior.



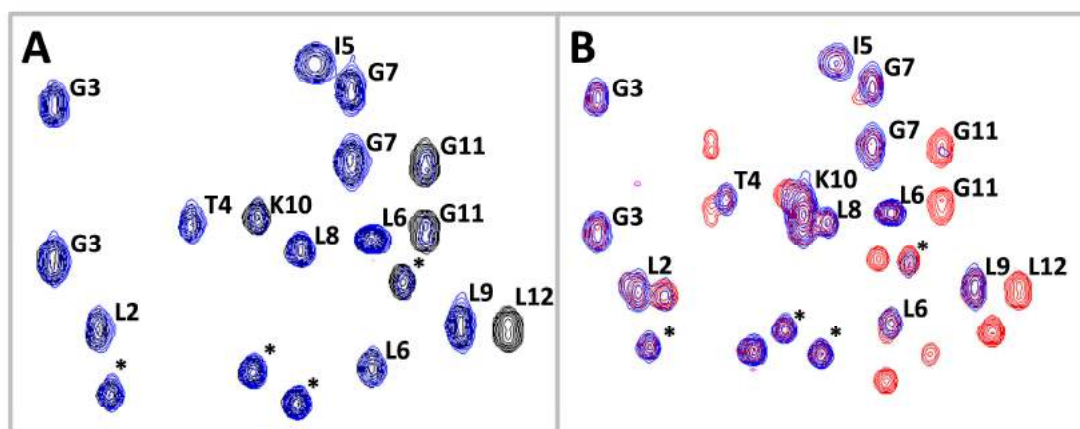
A anfipaticidade da PTN já havia sido verificada por Wang e colaboradores (2013), onde também é possível observar uma separação de uma região rica em resíduos hidrofóbicos e outra hidrofílica (figura 35 (A)). A propriedade anfipática da estrutura PTN é evidenciada pela representação, na figura 35 (B), colorida com G, T e K em azul claro e azul, em um lado do peptídeo, e I e L, em cinza, no outro lado, como mostrado na superposição dos 20 modelos finais do PTN.

Posicionamento relativo da PTN em SDS

A interação entre o peptídeo e ambientes que se assemelham a membranas, como micelas de SDS, possibilita uma estruturação do mesmo que adquire uma conformação estrutural

mantendo alguns resíduos mais expostos ao solvente, enquanto outros se mantem mais interiorizados na micela. O posicionamento dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos relativo à superfície da micela de SDS foi verificado pela adição das sondas paramagnéticas como o íon manganês (Mn^{2+}), que possibilita a identificação de resíduos mais expostos e pelo 5-doxil acido esteárico (DOXIL) que indica os resíduos mais interiorizados nas micelas. Na figura 36 é possível comparar os espectros 1H -2D TOCSY da PTN (A) e da mistura (PTN/PTN₁₋₆) (B) em SDS na ausência e na presença da sonda Mn^{2+} , verificando que os picos se mantem nas mesmas regiões mas que alguns sinais são reduzidos, indicativo de que os sinais desses resíduos foram suprimidos pela sonda Mn^{2+} , por estarem mais expostos ao solvente e onde a sonda tem mais acesso.

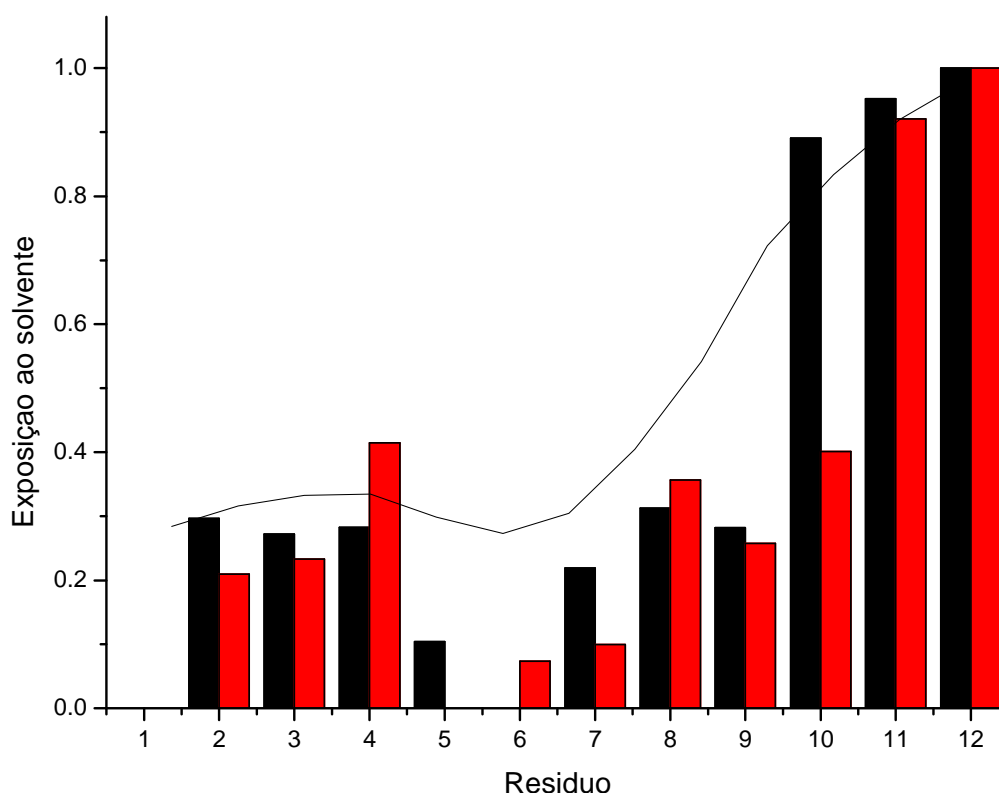
Figura 36 – Região HN-H α do espectro 2D TOCSY dos peptídeos a 1mM, pH 5,0 à 25°C em SDS a 100 mM. Na parte (A) os picos em preto são da PTN em SDS e os picos em azul são aqueles que aparecem na presença do Mn^{2+} . Na parte (B) os picos em vermelho referem-se a PTN/PTN₁₋₆ e em azul são aqueles picos que aparecem na presença do Mn^{2+} . Os picos assinalados com asteriscos são referentes a contaminantes e os picos não assinalados em (B) são referentes a PTN₁₋₆.



Para verificação das respectivas supressões residuais pela sonda, calculamos as intensidades dos picos HN-H α na ausência e na presença do Mn^{2+} e partir disso foi determinado a variação de supressão normalizada causada na acessibilidade dos resíduos pela sonda, e

representado na figura 37. Esta relaciona a exposição dos resíduos ao solvente, onde zero indica o menos exposto e 1,0 corresponde ao mais exposto ao solvente.

Figura 37 – Exposição dos resíduos ao solvente para PTN (barras pretas) e para a mistura (barras vermelhas) na presença da sonda paramagnética, Mn^{2+} . Comportamento das variações em relação a exposição ao solvente é representado pela linha preta.



A região da PTN de maior exposição ao solvente corresponde aos resíduos de 10 a 12, e a região central (resíduos de 5 a 9) corresponde à de menor exposição. Isso indica que a região do C-terminal está mais livre em solução, enquanto que a porção central está mais interiorizada nas micelas de SDS. A internalização dos resíduos do peptídeo na micela é verificado também pela sonda doxil, que indica a exposição dos resíduos no interior da micela. A figura 38 mostra os espectros 1H -2D TOCSY da PTN em SDS na ausência e na presença da sonda DOXIL, mostrando que houve um deslocamento químico causado pela sonda. O mesmo comportamento

acontece para a mistura PTN/PTN₁₋₆. A figura 39 mostra a exposição dos resíduos de aminoácidos da PTN ao interior da micela.

Figura 38 – Região HN-H α do espectro 2D TOCSY da PTN a 1mM, pH 5,0 à 25°C em SDS a 100 mM na ausência (picos em pretos) e na presença de DOXIL (picos em azul), indicando o deslocamento químico causado pela sonda. Os picos assinalados com asteriscos são referentes a contaminantes. Os picos em azul correspondem aos mesmos assinalados, mas com um deslocamento.

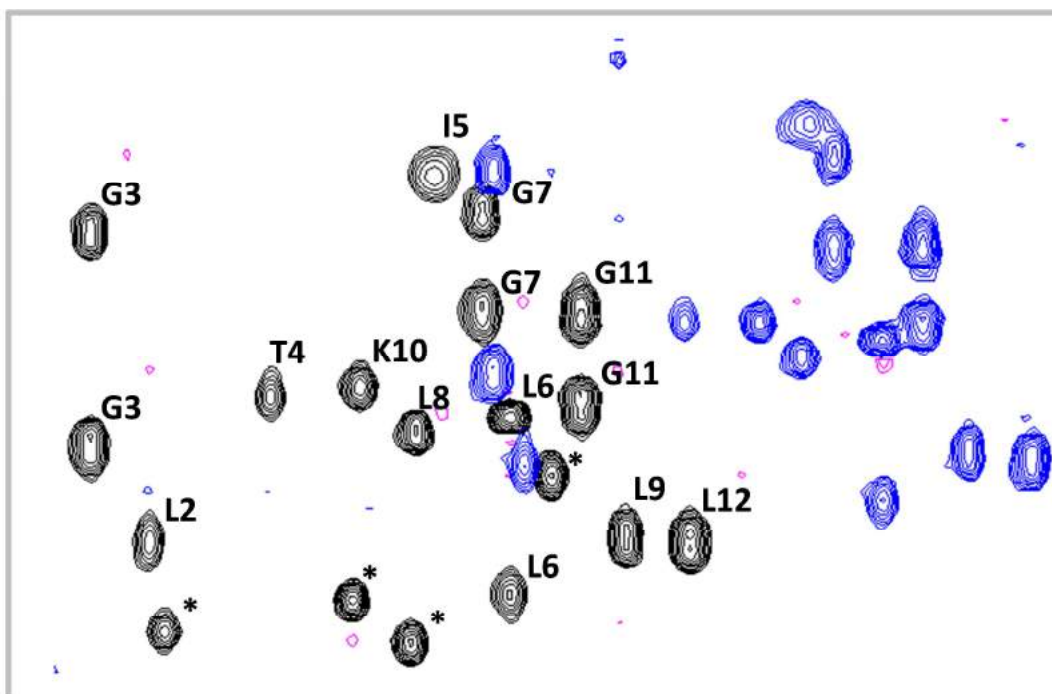
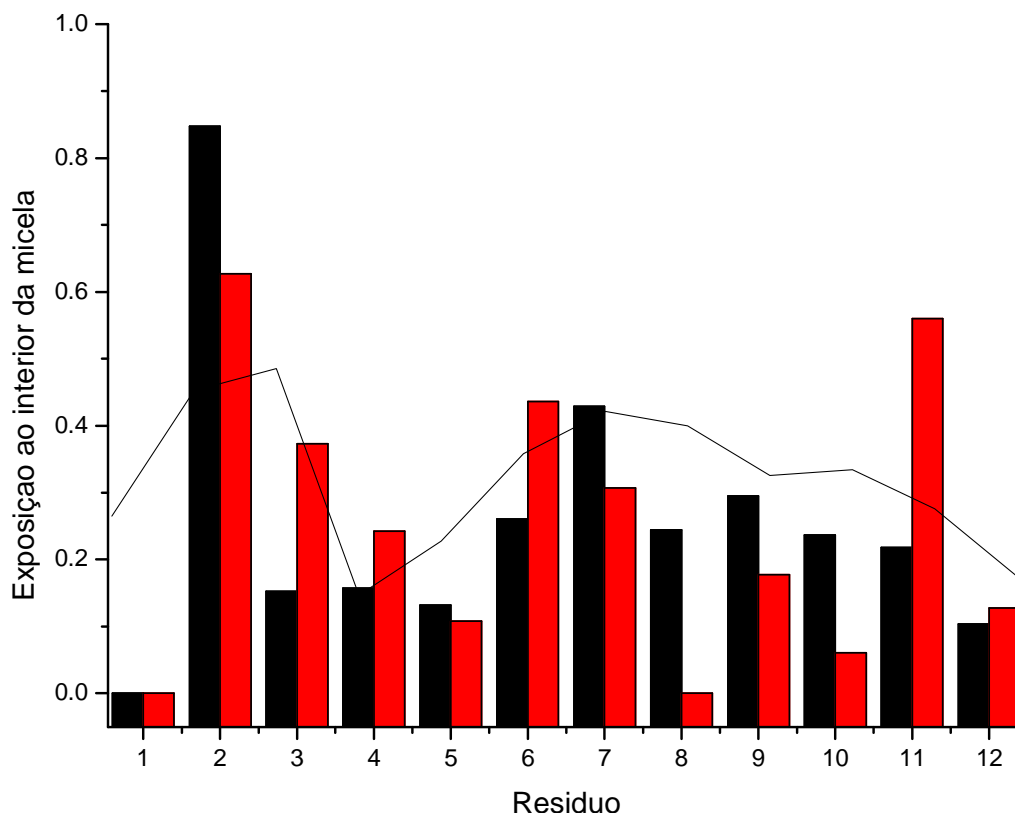


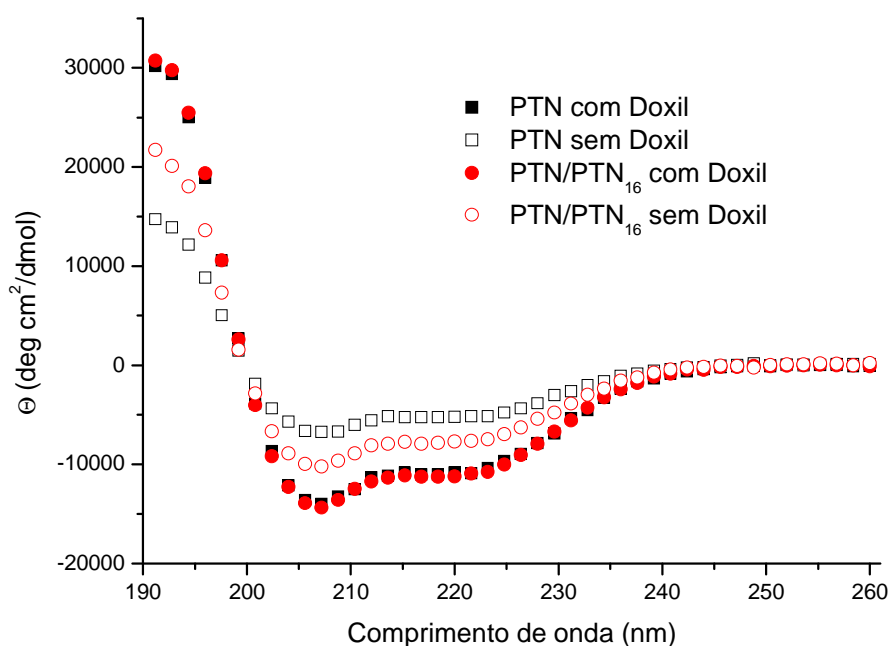
Figura 39 – Exposição dos resíduos ao interior da micela para PTN (barras pretas) e a mistura (barras vermelhas) na presença da sonda paramagnética, DOXIL. Comportamento das variações na exposição ao interior da micela é representado pela linha preta.



Ao observar a figura 39 é possível verificar certa correlação com a figura 37, ou seja, a exposição ao interior da micela está concentrada na região central do peptídeo (resíduos 6 a 9), região menos exposta ao solvente (figura 39) e a região do C-terminal, que se mostrou mais exposta ao solvente no experimento com a sonda Mn^{2+} , encontra-se menos exposta ao interior da micela. O comportamento das variações observado na figura 39 (linha preta) possui uma certa complementaridade com a figura 37, mas que deveria ser completamente oposto ao observado na figura 37. Essas diferenças no comportamento dos resíduos podem estar relacionadas ao deslocamento espectral do espectro 1H -2D TOCSY na presença do DOXIL indicativo de mudanças estruturais do peptídeo.

Devido a essas observações, foi investigada a conformação estrutural pela técnica de dicroísmo circular (CD) tanto para PTN como para a mistura na presença de SDS contendo doxil. Comparamos à estruturação helicoidal da PTN e da PTN/PTN₁₋₆ em SDS apenas, que apresentava 22% e 34% de teor helicoidal. A figura 40 mostra os espectros de CD dos peptídeos em SDS na ausência e na presença do DOXIL, sendo o cálculo das contribuições estruturais realizado pelo CD-Pro.

Figura 40 – Espectros de CD da PTN e PTN/PTN₁₋₆ em 8mM de SDS na presença (símbolos cheios) e ausência (símbolos vazios) da sonda paramagnética DOXIL à 25°C. Concentração de PTN e PTN₁₋₆ de 20 µM.



A presença do doxil aumentou a estruturação do peptídeo para 42% (PTN) e 44% (mistura). A indução estrutural causada pelo DOXIL se assemelha à mesma causada pelo TFE na PTN (41%) e na PTN/PTN₁₋₆ (43%). Esse comportamento da sonda DOXIL, favorecendo um aumento conformacional, sugere que ela não seria a sonda mais adequada para o estudo, pois alterou o enovelamento do peptídeo, o que está diretamente ligado a exposição ou não dos resíduos ao solvente. Nesse sentido, as observações feitas nesse experimentos ficam limitadas.

Interações com Modelos de Membranas

Extravasamento de corante

A atividade lítica da PTN e PTN/PTN₁₋₆ foi avaliada a partir do monitoramento do extravasamento de carboxifluoresceína (CF) contida em LUVs e em tampão Tris (10mM)/EDTA(1mM) contendo 150mM NaCl, em pH 7.5. As curvas de cinética de extravasamento de corante (CF) mostram o comportamento da PTN (figura 41) e da mistura (PTN/PTN₁₋₆) (figura 42) para diferentes concentrações (curvas coloridas) em função do tempo. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de curvas dose-resposta como mostrado na figura 43 e demonstram que a atividade dos peptídeos em função de concentrações crescentes tem um perfil cooperativo. A cooperatividade foi verificada através do ajuste de Hill, obtendo um coeficiente de Hill > 1, indicativo de um mecanismo cooperativo.

Figura 41 – Cinética de extravasamento para concentrações crescentes de PTN na presença das bicamadas fosfolipídicas nas composições de PC (A), PCPSCol (B), PCPSErg (C), PEPG (D) e PGCL (E).

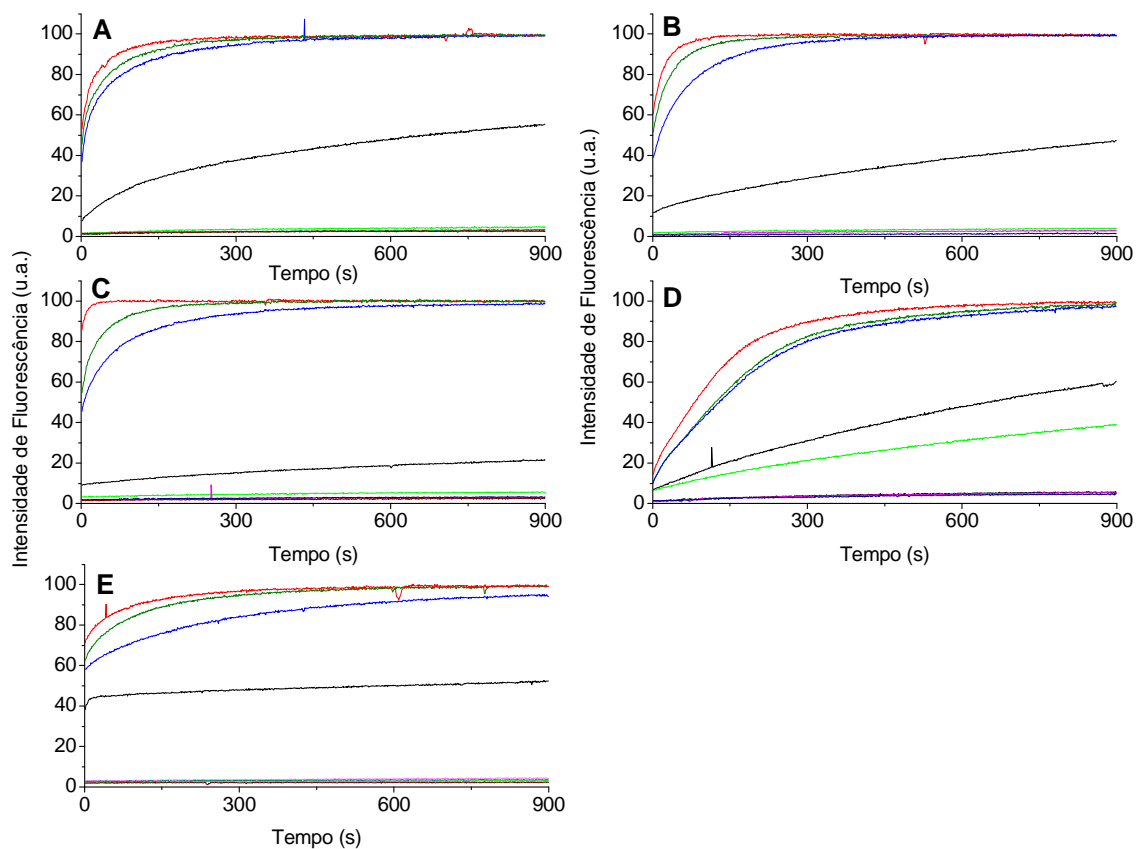


Figura 42 – Cinética de extravasamento para concentrações crescentes de PTN/PTN₁₋₆ na presença das bicamadas fosfolipídicas nas composições de PC (A), PCPSCol (B), PCPSErg (C), PEPG (D) e PGCL (E).

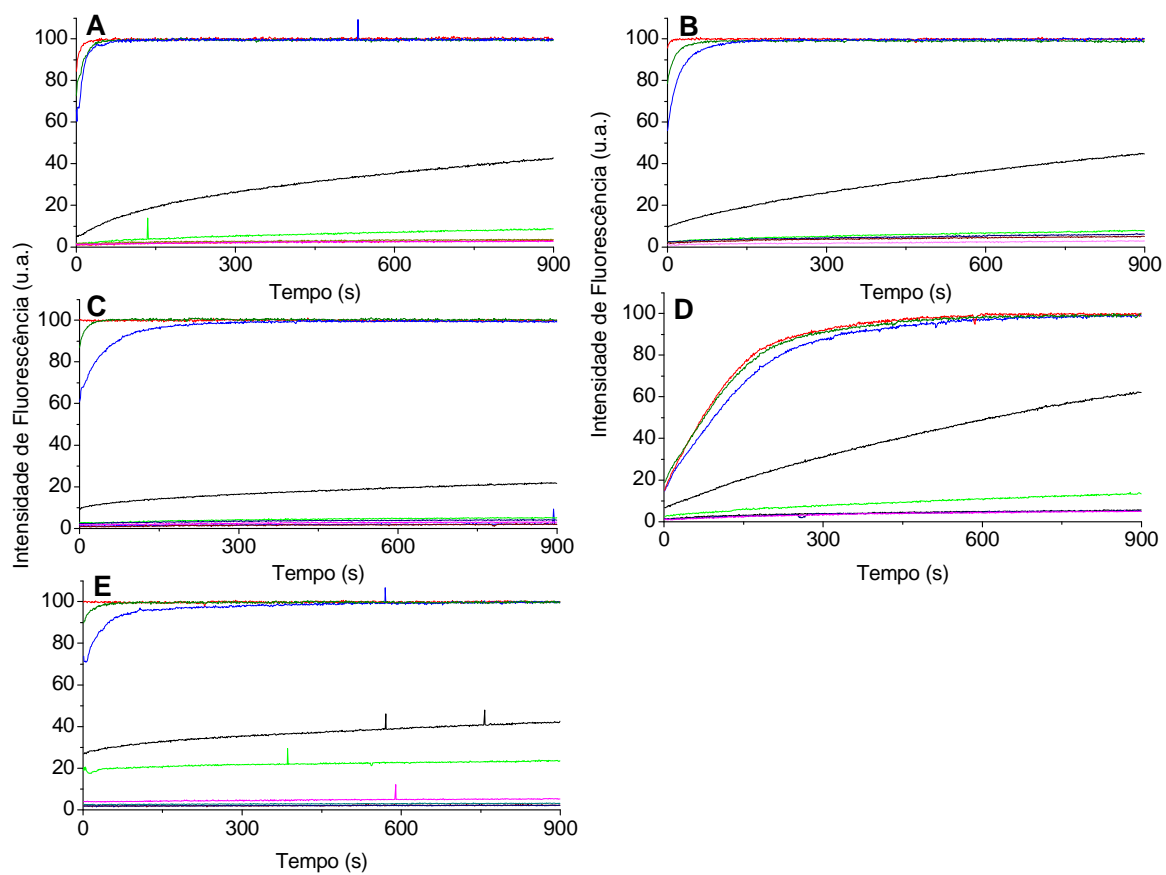
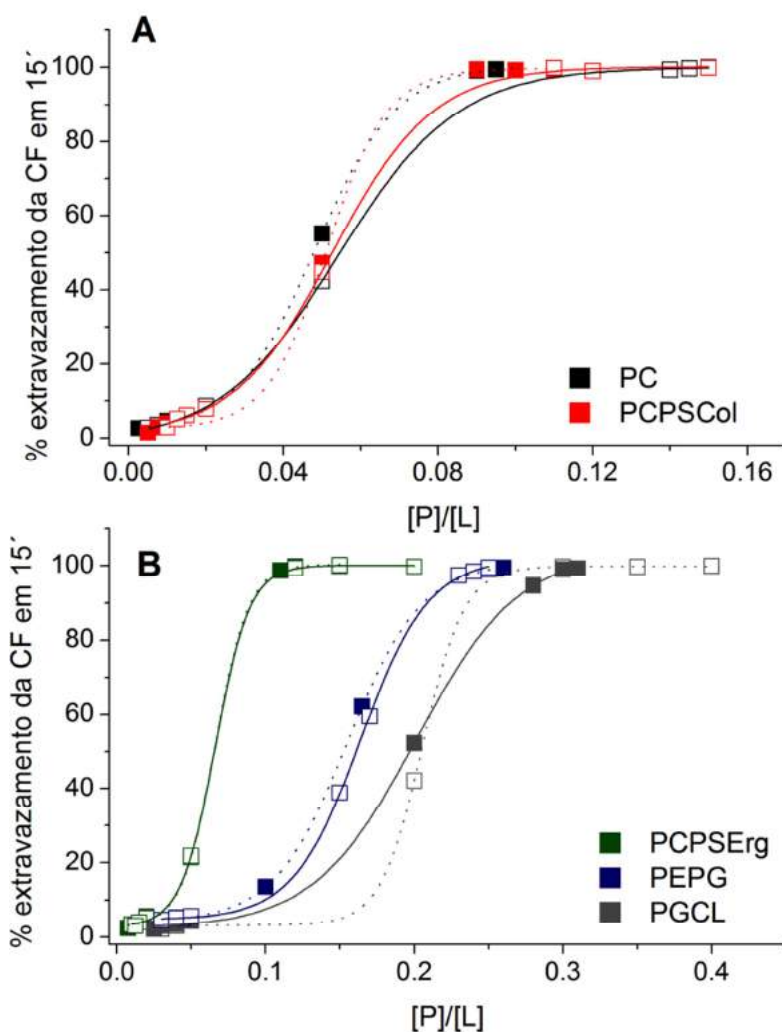


Figura 43 – Curvas de dose-resposta da atividade lítica em função da razão $[P]/[L]$ da PTN (símbolo cheio/linha pontilhada) e da mistura (PTN/PTN₁₋₆) (símbolo vazio/linha cheia), em pH 7,5, na presença de 100 μ M de LUVs nas diferentes composições, à 25°C. (A) PC, PCPSCol e (B) PCPSErg, PEPG e PGCL. O ajuste empregado (linhas cheias/pontilhadas) foi feito segundo Boltzmann.



As curvas dose-resposta tanto da PTN isolada quanto da mistura indicam a dependência sigmoideal, indicativo de um perfil cooperativo, onde a interação de uma molécula favorece a ligação das demais. Esse perfil está presente em todas as bicamadas lipídicas estudadas, tanto para a PTN isolada quanto na mistura. Isso possibilita a determinação da razão $[P]/[L]$ crítica para PTN e PTN/PTN₁₋₆, determinadas graficamente e resumidas na tabela 23.

Tabela 23 – Razão [P]/[L] crítica calculada graficamente para a PTN e PTN/PTN₁₋₆.

	[P]/[L]				
	PC	PCPSCol	PCPSErg	PEPG	PGCL
PTN	0,025	0,034	0,0414	0,115	0,132
PTN/PTN ₁₋₆	0,023	0,027	0,0394	0,102	0,120

Ao avaliar os dados obtidos, a primeira observação diz respeito à redução da razão [P]/[L] crítica para a mistura em comparação com a PTN isolada, sugerindo que a atividade lítica da PTN é intensificada na presença da PTN₁₋₆. Esse aumento da atividade lítica indica que a PTN é mais eficiente na mistura com a PTN₁₋₆, do que isolada. A maior eficiência da mistura na atividade antibacteriana foi verificada por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010). Esse comportamento foi correlacionado à pela maior estruturação da PTN na presença da PTN₁₋₆, favorecendo uma maior interação. Para as bicamadas lipídicas de PEPG e PGCL foram observadas as maiores razões [P]/[L], indicando uma baixa eficiência na atividade lítica nessas composições. Esse fenômeno pode ser decorrente do fato de que alguns fosfolípidos como PE e a CL possuem uma curvatura intrínseca negativa, que induzem uma curvatura negativa na bicamada lipídica (Wang, et al., 2015; Epan, et al., 2015). Essa curvatura pode ter sido a responsável pela reduzida atividade lítica apesar do maior valor de K_P na interação da PTN com as bicamadas lipídicas com essas composições.

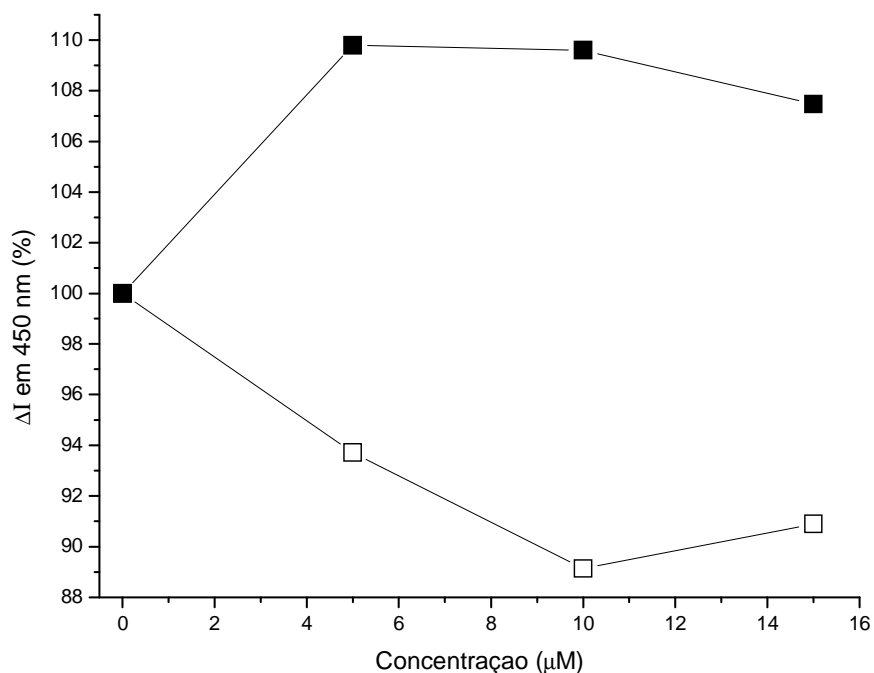
A maior atividade lítica foi observada para as LUVs zwitteriônicas (PC), indicada pela menor razão [P]/[L] que entretanto não condiz com o fato de PTN e PTN/PTN₁₋₆ não apresentarem atividade hemolítica (vide abaixo), sugerindo que outros componentes da membrana de eritrócitos, como por exemplo o colesterol, possam influenciar nessa ação, como já encontrado para outros peptídeos (dos Santos Cabrera et al., 2008; Allende, et al., 2003). Por outro lado, esse resultado sugere que, a atividade hemolítica de PTN/PTN₁₋₆ seria maior que de PTN, como de fato se observou (Figura 43). Esse sinergismo também foi verificado em estudo anterior (Baptista-Saidemberg, et al., 2010) onde a concentração para atividade hemolítica foi

reduzida pela metade em PTN/PTN₁₋₆. Segundo eles a interação direta entre a PTN e a membrana celular é potencialmente favorecida pela mistura, PTN/PTN₁₋₆.

Anisotropia de fluorescência da sonda DPH

A associação de peptídeos a bicamadas lipídicas pode causar o desordenamento do empacotamento dos fosfolipídios constituintes. Essa perturbação induzida pode causar um aumento ou redução na flacidez ou elasticidade da membrana que pode ser monitorada pela sonda DPH (Zhao, 2002), desde que a fluorescência dos peptídeos não interfiram com a intensidade da fluorescência da sonda. Para isso foi realizado um experimento de fluorescência com excitação em 360 nm e emissão em 450 nm, para a sonda DPH em tampão na presença do PTN e de PTN/PTN₁₋₆, com o intuito de investigar essa possibilidade de interferência. A figura 44 mostra a variação percentual de intensidade (ΔI) causada pela PTN e pela mistura na emissão de fluorescência da sonda DPH em 450 nm. Verificamos que em média as limitadas variações indicam uma não interferência da fluorescência dos peptídeos na fluorescência do DPH.

Figura 44 – Variação percentual da intensidade de fluorescência em 450 nm (comprimento de onda de emissão do DPH) na presença de diferentes concentrações do PTN (símbolos cheios) e PTN/PTN₁₋₆ (Símbolos vazios) em tampão Tris (10 mM)/EDTA(1mM) com 150 mM NaCl, em pH 7,5, à 25°C.



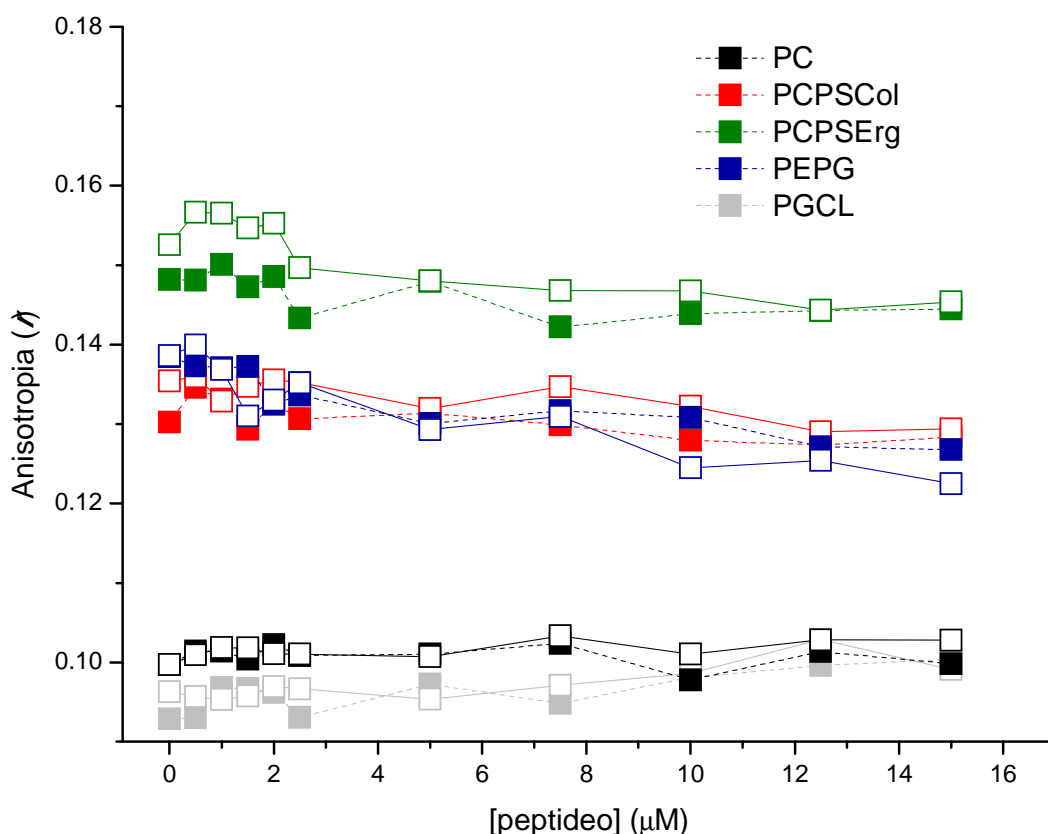
A tabela 24 resume a média dos valores do fator G calculado para as diferentes composições fosfolipídicas testadas nesse trabalho. Os valores obtidos se aproximam de 1,0, que segundo Lakowicz (2006), correspondem à igualdade de detecção da fluorescência na emissão da luz polarizada verticalmente e horizontalmente.

Tabela 24 – Cálculo do fator G na presença das bicamadas lipídicas em diferentes composições.

Cálculo do fator G	
PC	0.90307 ± 0.00599
PCPSCol	0.90607 ± 0.00755
PCPSErg	0.90521 ± 0.00709
PEPG	0.91420 ± 0.00982
PGCL	0.91058 ± 0.00679

A flacidez das bicamadas lipídicas contendo DPH foi testada na presença de diferentes composições fosfolipídicas (LUVs) para a PTN e a mistura (PTN/PTN₁₋₆). A figura 45 mostra a anisotropia causada por eles nas concentrações de 0 a 15 μM , em 50 μM de vesículas (LUVs).

Figura 45 – Anisotropia de fluorescência da sonda DPH (r) contida em LUVs de 50 μM (pH 7,5) para concentrações crescentes de PTN (símbolos cheios/linhas pontilhadas) e da mistura PTN/PTN₁₋₆ (símbolos vazios/linhas cheias). A concentração de fluoróforo DPH é de 2:1000 em relação à concentração de lipídeos. Desvio padrão de 0,002.



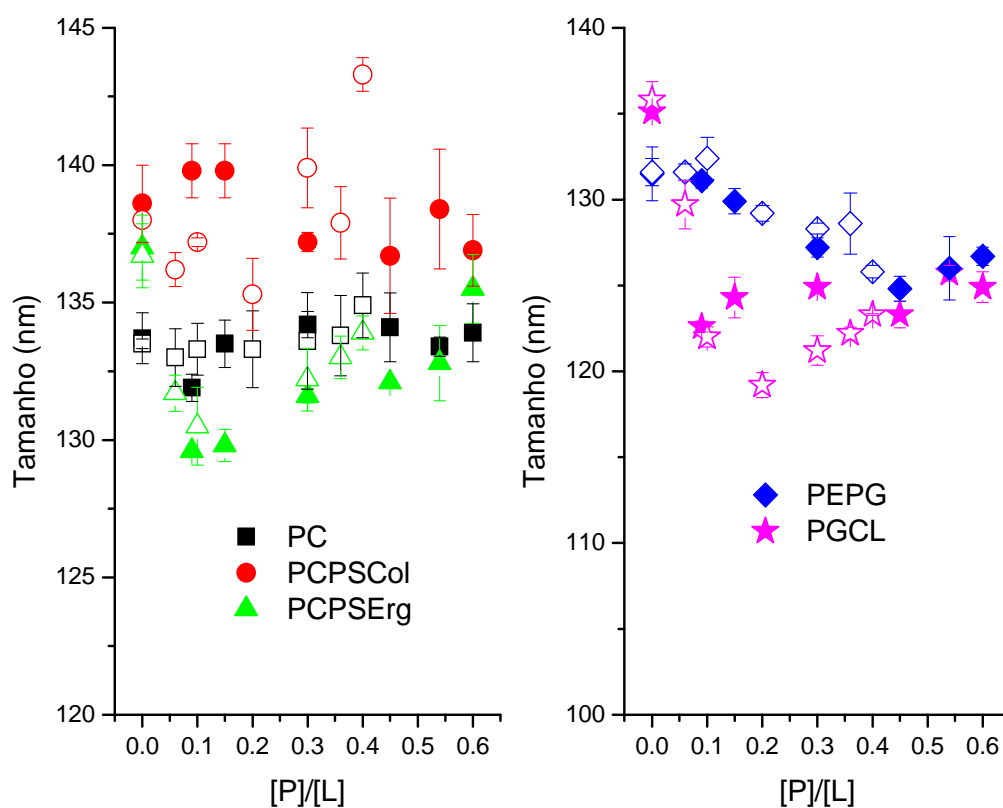
Verificamos que PTN isolada e na mistura, de forma semelhante, praticamente não afetam o empacotamento lipídico, não acarretando variações na flacidez da bicamada lipídica. O mesmo foi observado por dos Santos Cabrera e colaboradores (2014) para o peptídeo Jelleíne-I, mostrando que para diferentes composições das bicamadas, praticamente não houve variação de anisotropia.

Variações de tamanho das vesículas (DLS)

O diâmetro médio das vesículas pode ser determinado por espalhamento dinâmico de luz, DLS (*Dynamic Light Scattering*), e possibilita verificar se há variações nos diâmetros das vesículas (LUVs) mediante as interações com os peptídeos. A figura 46 mostra essa variação do

diâmetro médio das vesículas para as diferentes composições fosfolipídicas em diferentes concentrações de peptídeos.

Figura 46 – Diâmetro das vesículas em função [P]/[L] de diferentes composições de bicamadas para PTN (símbolos cheios) e PTN/PTN₁₋₆ (símbolos vazios) em 33,3 μ M e 50 μ M de vesículas, respectivamente, à 25°C.

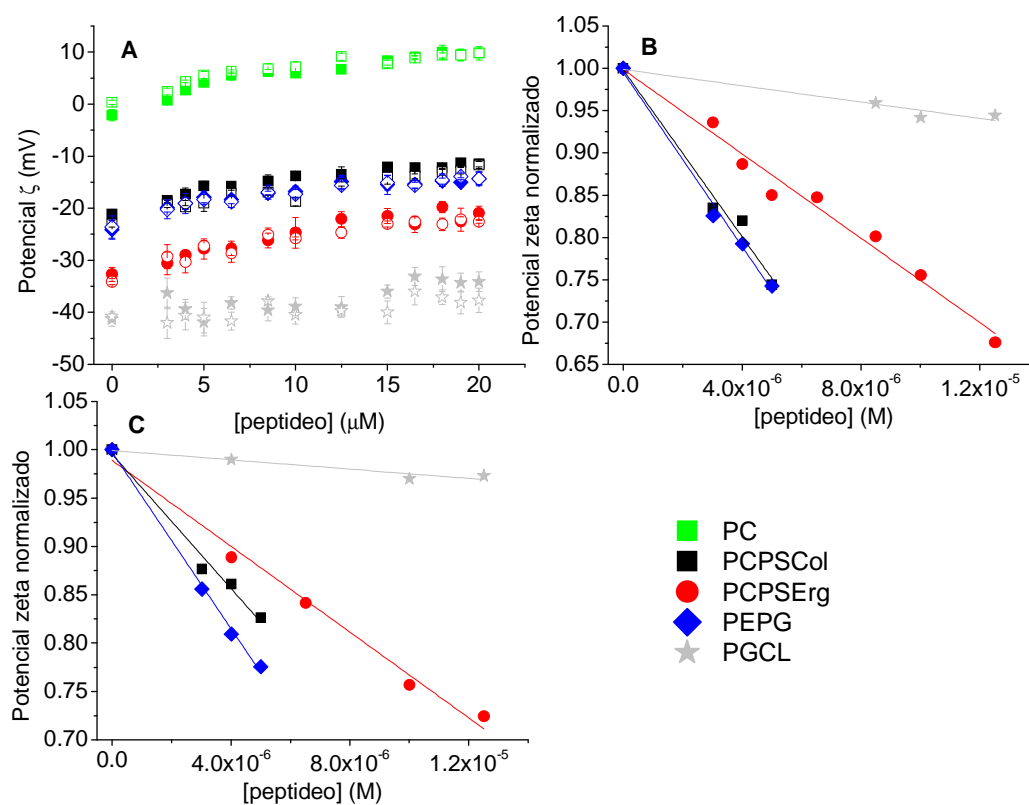


Os resultados obtidos mostram que o comportamento da PTN isolada é semelhante ao da PTN/PTN₁₋₆ e que ambas praticamente não afetam o tamanho das vesículas. A indução de agregação e conseqüentemente o aumento das vesículas não foi observado para ambos os peptídeos, como também observado para a Jelleíne-I e análogos desse trabalho (dos Santos Cabrera, et al., 2014) e análogos nesse trabalho. Pequenas reduções do tamanho inicial foram observadas para as composições de maior caráter aniônico, indicando que a neutralização das cargas negativas reduz a repulsão entre as cargas das vesículas.

Potencial Zeta e determinação de K_p

A figura 47 mostra as isotermas de adsorção da PTN isolada e da mistura (A), determinadas através das medidas de potencial Zeta (ζ), para LUVs de diferentes composições e o potencial Zeta normalizado com seus respectivos ajustes para o PTN (B) e para o PTN/PTN₁₋₆ (C).

Figura 47 – Isotermas de potencial Zeta (ζ) da PTN (símbolos cheios) e PTN/PTN₁₋₆ (símbolos vazios) (A), na presença 33,33 μM e 50 μM de LUVs respectivamente, à 25°C. Ajuste linear para o potencial Zeta normalizado em função da concentração dos peptídeos PTN (B) e PTN/PTN₁₋₆ (C)



Verificamos que tanto PTN isolada quanto a mistura interagem semelhantemente com as diferentes LUVs. A partir dessas isotermas a normalização do potencial Zeta foi realizada, e

ajustada linearmente (Figura 47 (B) e (C)) para determinação do coeficiente de partição (K_p), segundo Freire et al., 2011, como mostrado na tabela 25.

Tabela 25 - Cálculo do coeficiente de partição (K_p) dos peptídeos na presença de vesículas carregadas, à 25°C, com seus respectivos teores de carga aniônica, os diâmetros das vesículas em 20 μ M de peptídeo e potencial Zeta apenas das vesículas (ζ_0), sem a presença de peptídeo.

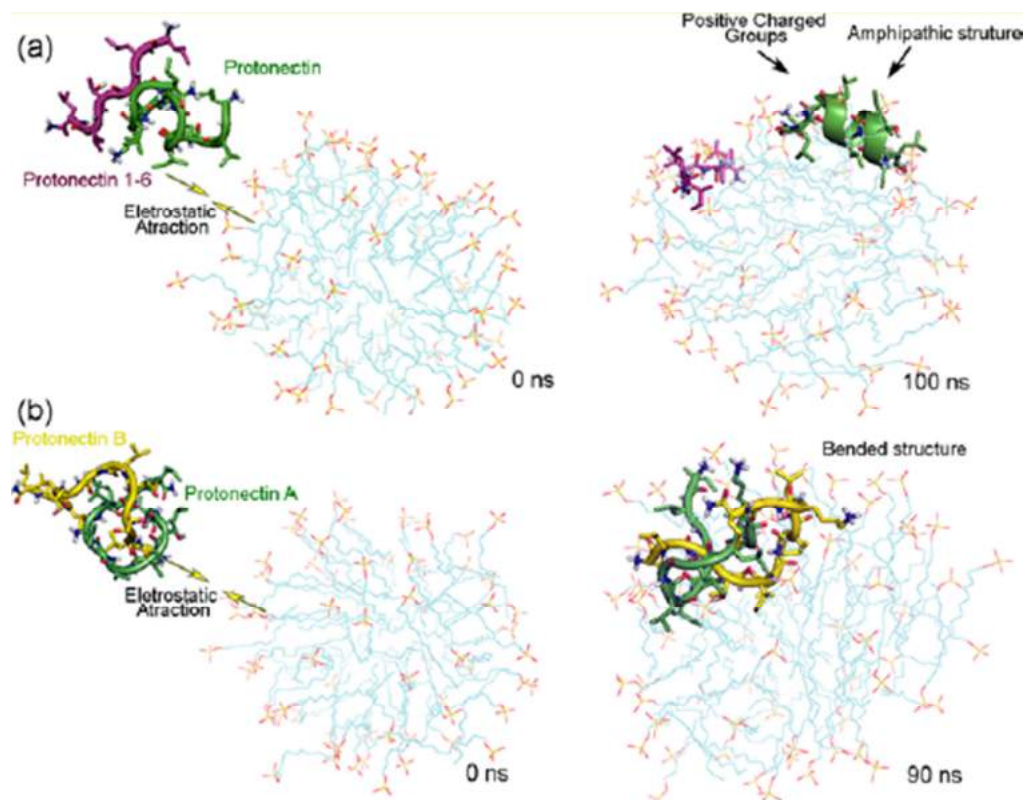
% carga aniônica	PTN			PTN/PTN ₁₋₆		
	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)	ζ_0	K_p (.10 ³)	Tamanho (nm)	ζ_0
PCPSCol (20)	4,9 \pm 0,4	137 \pm 1,3	-21,1 \pm 0,2	5,5 \pm 0,3	143 \pm 0,6	-23 \pm 0,6
PCPSErg (40)	3,5 \pm 0,1	135 \pm 1,2	-32,7 \pm 1,3	7,4 \pm 0,1	134 \pm 0,3	-34,1 \pm 0,6
PEPG (24)	10,0 \pm 0,3	127 \pm 0,5	-24,1 \pm 1,8	9,8 \pm 0,2	126 \pm 0,3	-23,6 \pm 2,2
PGCL (110)	9,1 \pm 0,1	123 \pm 0,9	-41,3 \pm 1,4	9,2 \pm 0,1	124 \pm 0,5	-40,8 \pm 0,6

Ao analisar os coeficientes de partição obtidos em diferentes meios verificamos que PTN isoladamente, com carga líquida +2, apresenta menores ou semelhantes valores de K_p em todas as LUVs quando comparada a PTN/PTN₁₋₆ que tem carga líquida +3. As composições em que os peptídeos possuem maior afinidade são aqueles que modelam membranas de bactérias Gram-negativa (PEPG) e Gram-positiva (PGCL), nos quais verificou-se uma afinidade semelhante da PTN isolada e na presença da PTN₁₋₆. Entretanto, quando comparamos com a atividade lítica, os peptídeos mostraram-se mais eficiente em PC e PCPSCol (Tabela 23), sugerindo que outros fatores, como a curvatura negativa das membranas contendo PE e CL, esteja reduzindo a atividade lítica. Efeito semelhante foi observado para o peptídeo Polybia-MP1 que apresenta reduzida atividade com bicamadas contendo CL em comparação com aquelas contendo PS (dos Santos Cabrera et al., 2008 e 2012).

Além disso, segundo estudo computacional de Baldissera e colaboradores (2015), a presença da PTN₁₋₆ na mistura PTN/PTN₁₋₆ reduz a formação de agregados que são formados de

maneiras diferentes do que na PTN isolada, como mostrado na figura 48. Segundo eles, essa diferenciação na formação de agregados é devido à soma mais favorável de contribuições de Coulomb e Lennard-Jones. Com isso podemos sugerir que outras interações, como interações hidrofóbicas, e não só a eletrostática, estariam favorecendo que a mistura PTN/PTN₁₋₆, induzisse uma maior estruturação seguida de um aumento na atividade lítica, mesmo com uma afinidade aparentemente menor, quando comparada a PTN isolada.

Figura 48 – Simulação computacional contendo a uma molécula de Protonectin (PTN) e a Protonectin 1-6 (PTN₁₋₆) (A) e duas moléculas de PTN (B). Ao longo do tempo de simulação (90ns) é possível verificar que a PTN se separa da PTN₁₋₆ favorecendo a estruturação da PTN, enquanto que as moléculas de PTN permanecem juntas, adquirindo pouca estruturação, e interagindo dessa forma com a micela de SDS



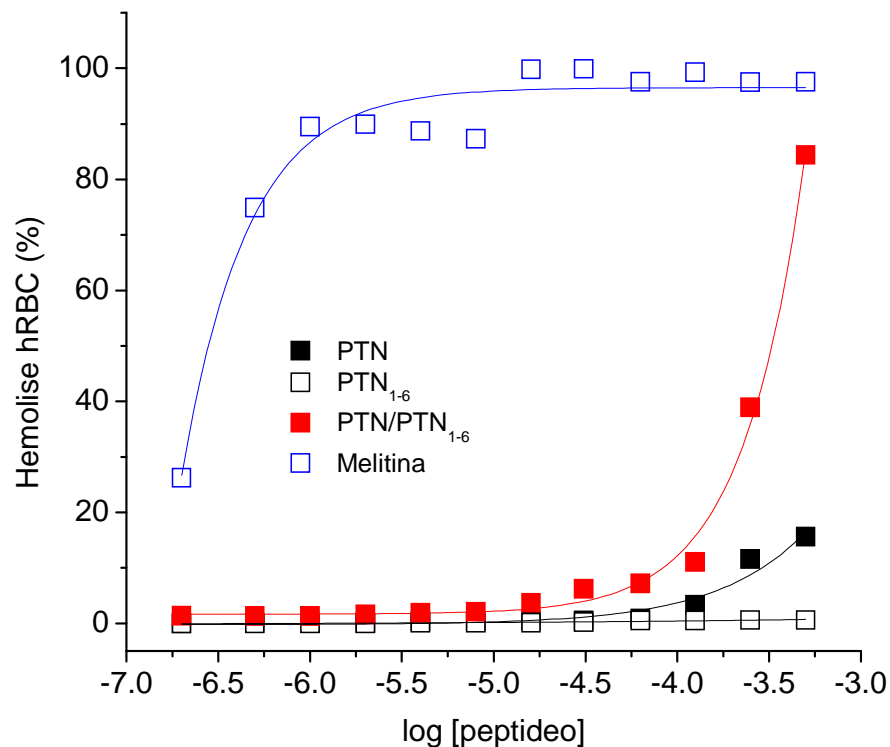
Fonte: Baldissera, et al. (2015).

Bio-ensaios

Atividade hemolítica

Segundo Baptista-Saidemberg et al., 2010 a PTN apresentara atividade hemolítica com EC_{50} de ordem de $80 \mu\text{M}$ enquanto que a mistura com PTN_{1-6} , de $40 \mu\text{M}$ em eritrócitos WRRBC. A figura 49 mostra a porcentagem de hemólise encontrada em diferentes concentrações dos peptídeos.

Figura 49 – Atividade hemolítica para a PTN e PTN/PTN_{1-6} , utilizando a melitina como referência.



Os resultados obtidos neste trabalho com eritrócitos humanos indicam que PTN e a mistura não são hemolíticos por apresentarem um valor de $HC_{50} > 500 \mu\text{M}$ e $300 \mu\text{M}$, respectivamente, indicando que a atividade hemolítica de PTN é menor que de PTN/PTN_{1-6} . Dentre os análogos da PTN, tanto a Polybia-CP em células de sangue de ratos (WRRBC) (Souza, et al., 2005), atingindo 78% de hemólise em $100 \mu\text{M}$, como o Orancis-Protonectin, para célula

sanguínea de ovelha (Morata et al., 2009) com hemólise acima de 80% a 50 μM , possuem maior atividade hemolítica que a PTN e a mistura com a PTN₁₋₆.

Essas observações sugerem que a presença de PTN₁₋₆ na mistura PTN/PTN₁₋₆ aumenta a atividade hemolítica como observado para atividade lítica em LUVs de PC, porém em baixas concentrações (< 100 μM) ainda pode ser considerado não hemolítico. A alta atividade lítica em bicamadas zwitteriônicas (PC) foi observada pelo experimento de extravazamento de corante (tabela 23), mas a presença do Colesterol, nas células sanguíneas humanas, possivelmente reduziu sua ação, como verificado em outros estudos (dos Santos Cabrera, et al., 2008; Schweizer, 2009). O mesmo comportamento já havia sido observado por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010), indicando que a mistura é um pouco mais hemolítica que a PTN isolada, mas podendo ser considerada não hemolítica a baixas concentrações.

Atividade antimicrobiana e antifúngica

Nos últimos anos vem aumentando o número de cepas fúngicas e bacterianas que adquirem resistência devido ao uso inadequado de agentes antimicrobianos (Furuya e Lowy, 2006; Slaninova, et al., 2011). Testes de atividade antimicrobiana e antifúngica foram realizados conforme as metodologias descritas anteriormente através das colaborações com a Dra. Bibiana Monson de Souza e do Prof. Dr. Mario Palma do CEIS, IB, UNESP, campus de Rio Claro (atividade antimicrobiana) e da Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca da FACERES (atividade antifúngica). Os resultados resumidos estão na figura 50 e na tabela 26.

Figura 50 – Atividade antibacteriana e antifúngica para a PTN e PTN/PTN₁₋₆ para a bactéria Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 6538), Gram-negativa (*P. aeruginosa* ATCC 13338) e fungo (*C. albicans* ATCC 90028).

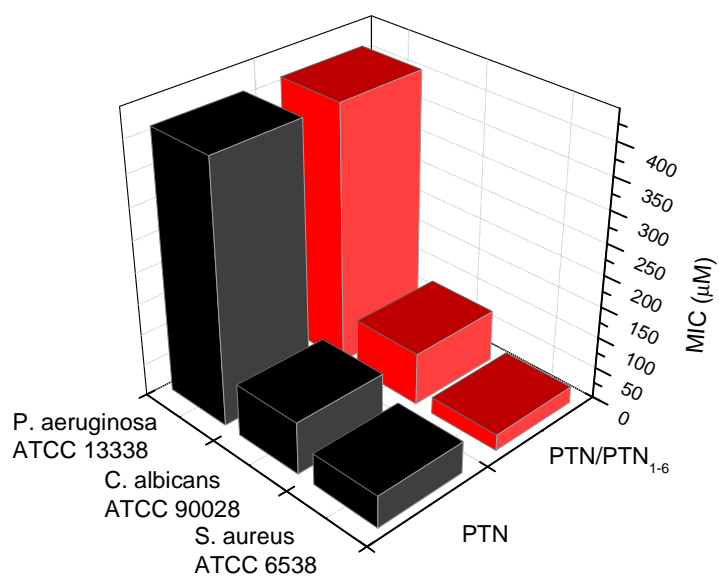


Tabela 26 – Concentração inibitória mínima (MIC) para a atividade antimicrobiana e antifúngica (em µg/ml e µM), e hemolítica (HC₅₀ em µM) de PTN e PTN/PTN₁₋₆. Ensaios realizados em triplicata. Determinação do índice terapêutico (I.T.), HC₅₀/média dos MICs.

	Ação antimicrobiana				Ação antifúngica		HC ₅₀	I.T.
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13338		<i>C. albicans</i> ATCC 90028			
	(µg/ml)	µM	(µg/ml)	µM	(µg/ml)	µM	µM	
PTN	62 12,5*	51 8**	500 1,7*	413 128**	>100	>83 16**	>>500	>4,5
PTN ₁₋₆	>500	>797	>500	>797	>100	>159	>>500	>0,9
PTN/PTN ₁₋₆	32 12,5*	26	>500 1,7*	>413	>100	>83	>300	>1,6
Cloranfenicol	8 14,5*	-	125 15,6*	-	-	-	-	-
Anfotericina B	-	-	-	-	25	27	-	-

*Baptista-Saidemberg, et al., 2010 – para *S. aureus* (ATCC 6538) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442). ** Qiu, et al., 2017 – para *S. aureus* (ATCC 29213), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 14053).

Os testes da ação antimicrobiana indicaram que para a bactéria *S. aureus*, Gram-positiva, PTN apresentou atividade em concentrações maiores (62µg/ml ou 51 µM) que a mistura PTN/PTN₁₋₆ (32µg/ml ou 26 µM), confirmando a tendência observada anteriormente (Baptista-Saidemberg et al., 2010) de uma melhor ação quando juntas, do que quando separadas, mas ainda pouco eficazes quando comparado ao Cloranfenicol (8µg/ml) usado como controle. Já para bactéria Gram-negativa, *P. aeruginosa*, ambos praticamente não apresentaram atividade, diferentemente do apresentado por outros trabalhos (Mendes, et al., 2004; Baptista-Saidemberg, et al., 2010; Qiu, et al., 2017) provavelmente pela diferença das linhagens das bactérias utilizadas. Em outro trabalho de Wang e colaboradores (2013), a PTN mostrou-se mais ativa com MIC de 8µM mas com linhagens de *S. aureus* ATCC 29213, deferentes da linhagem utilizada neste trabalho.

A tabela 27 apresenta a sequência da PTN e de alguns análogos já publicados na literatura, e onde é possível verificar que mudanças na sequência primária são de suma importância para sua atividade biológica diferenciada em cada um dos peptídeos.

Tabela 27 – Sequência da PTN e análogos obtidos de outros meios

Peptídeos	Sequências	Espécie
PTN	I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH ₂	<i>Agelaia pallipes pallipes</i> ^a <i>Protonectarina sylveirae</i> ^b
Polybia-CP	I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-S-L-NH ₂	<i>Polybia paulista</i> ^c
Orancis-Protonectin	I-L-G-I-I-T-S-L-L-K-S-L-NH ₂	<i>Orancistrocerus drewseni drewseni</i> ^b
IsCT	I-L-G-K-I-W-E-G-I-K-S-L-F-NH ₂	<i>Opisthacanthus madagascariensis is</i> ^{d,e}
IsCT2	I-F-G-A-I-W-N-G-I-K-S-L-F-NH ₂	<i>Opisthacanthus madagascariensis is</i> ^f

a: Mendes, et al., 2004; b: Murata, et al., 2009; c: Souza, et al., 2005; d: ; e: Thipathi, et al., 2015; f: Dai, et al., 2002.

A Polybia-CP, o análogo mais próximo a PTN, obtido de veneno de vespas, com apenas uma substituição do resíduo 11 de glicina (G) por serina (S), mostrou-se com mesma eficiência que a PTN na ação antibacteriana, mas potencialmente mais ativa em *S. aureus*, com MIC de 4 µM em comparação a 8 µM para PTN (Wang, et al., 2013). Outros peptídeos curtos da família dos IsCTs, o IsCT e o IsCT2 de 13 resíduos, análogos da PTN, foram os primeiros a serem isolados de veneno de escorpião (Dai, et al., 2001 e Dai, et al., 2002), e que se mostraram potentes agentes bactericidas principalmente para Gram-positivas (*S. aureus* (ATCC 25293) – 0,7 µM) em relação as Gram-negativas (*P. aeruginosa* (ATCC 27853) – aproximadamente 67 µM). Esse comportamento indica que mudanças na sequência primária desses análogos favoreceram a atividade biológica.

Para a ação antifúngica, o teste indicou que tanto PTN como PTN/PTN₁₋₆ não demonstraram atividade para a cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* até a concentração de 100µg/ml ou 83 µM. A Polybia-CP demonstrou uma MIC na faixa de 16µM para *C. albicans* ATCC 14053 (Wang, et al., 2016) enquanto que para a PTN, Wang e colaboradores (2015) obtiveram um MIC de 32 µM para *C. albicans* ATCC 14053, na mesma ordem de grandeza que a MIC obtido para a PTN do presente trabalho, mas para a linhagem ATCC 90028.

A mistura entre dois ou mais agentes com potencial antimicrobiano é denominado de combinação terapêutica e que pode favorecer ou não a ação contra patógenos (Schelz, et al., 2006). No caso das Protonectins, obteve-se um valor de FIC (Walkenhorst, 2016) de 0,5 para bactérias Gram-positivas e de 1,0 para Gram-negativas e fungos. Isso indica que a presença da PTN₁₋₆ na mistura com a PTN possibilita, para a *P. aeruginosa* e *C.albicans*, uma interação de aditividade, ou seja, apenas um aumento dos “agentes” no caso peptídeos, não favorecendo, significativamente, a morte do patógeno. Ao contrário do que verificado para a mistura dos peptídeos na presença da *S. aureus*, onde a interação foi de sinergia indicando que essa combinação entre a PTN/PTN₁₋₆, é mais seletiva, acelerando a morte das bactérias, a menores concentrações.

Viabilidade Celular para Protonectinas

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados através das colaborações com a Dra. Diana Maria Diez Gaspar e do Prof. Dr. Miguel Castanho do IMM, FMUL, da Universidade de Lisboa, Portugal. Os resultados estão apresentados na tabela 28.

Tabela 28 – Concentração inibitória de 50% das células testadas (IC_{50}) em μM para a PTN, PTN_{1-6} e PTN/PTN_{1-6} para as células de tecido mamário (MDA-MB-231).

Peptídeos	Ação antitumoral
	MDA-MB-231
	IC_{50} (μM)
PTN	$15,91 \pm 1,06$
PTN_{1-6}	N.A.*
PTN/PTN_{1-6}	$16,73 \pm 0,87$

*N.A. – não aplicado

Nos testes de ação antitumoral, os peptídeos mostraram-se semelhantemente ativos e com uma concentração inibitória bem menor do que encontrado para atividade bactericida e fungicida (tabela 9). Isso sugere uma maior eficiência dos peptídeos em células tumorais, o que concorda com os dados de atividade lítica nas bicamadas lipídicas de PCPSCol que se assemelham em composição fosfolipídicas de membranas tumorais, que mostraram baixa razão [P]/[L] (tabela 23). Esse comportamento também pode estar relacionado ao maior grau de estruturação, verificado pelo FTIR (somatório de hélice- α e folhas- β) tanto do PTN e principalmente do PTN/PTN_{1-6} (tabela 18). A PTN com concentração inibitória por volta de $16\mu M$ para atividade antitumoral em células de câncer de mama demonstrou ação equivalente a Polybia-CP, testada em uma linhagem de células de câncer de bexiga (BIU-87) (IC_{50} de $18\mu M$), mas menos ativa que seu análogo em células de câncer de próstata (PC-3) com IC_{50} de $11\mu M$ (Wang et al., 2011).

Modelo de ação

O modo de ação da PTN sugere as seguintes etapas: o peptídeo em solução aquosa apresenta principalmente estrutura aleatória e agregação. De início, ao interagir eletrostaticamente com as bicamadas lipídicas, como verificado pelo potencial Zeta, assumem predominantemente estrutura helicoidal, mas ainda com formação de agregados aumentada em

relação ao que se encontrava em tampão. O mesmo comportamento é verificado na mistura PTN/PTN₁₋₆, mas com o diferencial de que a agregação é reduzida em relação a PTN isolada, mas não em relação ao teor presente em tampão que aumenta na presença das bicamadas. O aumento da estruturação da PTN ocorre provavelmente as custas da diminuição das estruturas aleatórias. As variações estruturais, como aumento da estruturação e redução da agregação, causadas pela presença da PTN₁₋₆, não são perceptíveis nos experimentos de determinação estrutural por RMN.

A PTN, tanto na forma isolada como na mistura, interage de forma mais superficial com a região das cabeças dos fosfolipídios como indicam os experimentos de variação de flacidez das membranas, com a sonda fluorescente DPH. Entretanto, essa interação é suficientemente importante para causar o extravasamento do conteúdo das vesículas, de forma bem semelhantes entre PTN e PTN/PTN₁₋₆, mas a mistura apresenta tendência a ser um pouco mais eficiente. A razão [P]/[L] crítica em PCPSCol e PCPSErg está bem abaixo da equivalência entre a quantidade de cargas de peptídeos e vesículas, mas em PEPG são praticamente equivalentes. Isso indica que a cooperatividade da interação e a eficiência na atividade lítica independem da neutralização das cargas e devem estar influenciadas por interações não-eletrostáticas. A presença na mistura da PTN₁₋₆ causou um leve aumento na afinidade, observada pelos valores de K_p . A tendência a maior eficiência da PTN/PTN₁₋₆ provavelmente se deve por favorecer a redução da formação de agregados e ao aumento da estruturação.

Esses resultados nos levam a alguns questionamentos em relação ao mecanismo de interação da PTN e PTN/PTN₁₋₆ com membranas. Em estudo com o análogo Polybia-CP, foi sugerido que a citotoxicidade desse peptídeo acontece por alterações morfológicas, verificado por microscopia eletrônica de varredura, na membrana celular, comprometendo seu funcionamento (Wang et al., 2011). Entretanto, nossos presentes resultados de anisotropia e resultados de RMN com a sonda paramagnética (Mn^{2+}) não indicaram o comprometimento na ordenação de empacotamento lipídico da bicamada lipídica, associado a uma interação de forma mais superficial do peptídeo. E mais, estudos ainda não publicados por microscopia de força atômica em células MDA-MB-231 não indicaram alterações morfológicas das células. Assim, sugerimos que, além de atividade lítica da bicamada lipídica nas membranas celulares, outros eventos,

como, por exemplo, alterações em demais funções relacionadas à membrana e/ou translocação de peptídeos, podem estar envolvidos na ação da PTN.

Capítulo 5 – CONCLUSÕES

O estudo das interações da JI e análogos (JIF2W e JIF2WR), e das PTN e PTN/PTN₁₋₆, com bicamadas lipídicas de caráter aniônico e zwitteriônico, tiveram por objetivo a maior compreensão de seus mecanismos de ação, principalmente do que tange aos processos de agregação/desagregação. Uma análise aprofundada da conformação estrutural desses peptídeos, por meio da espectroscopia de FTIR e dicroísmo circular, possibilitaram avaliar o grau de estruturação dos peptídeos quando estes interagem com bicamadas lipídicas, mas principalmente sugerem que a presença de maior estruturação associada à redução da formação de agregados podem ter influenciado no aumento da sua atividade lítica e da eficiência.

A análise da atividade lítica indicou que os peptídeos JI e análogos, são seletivos, por não possuírem atividade em vesículas zwitteriônicas, indicando uma interação preferencial com bicamadas lipídicas aniônicas. Isso foi confirmado na avaliação das respectivas atividades hemolíticas, especialmente para JI e JIF2WR. Os testes de atividade antibacteriana e antifúngica demonstraram que as modificações na sequência de JI que geraram o análogo, JIF2WR, foram fundamentais para maior eficiência mantendo a seletividade. Entretanto, apesar de um pouco mais eficiente para células tumorais do que as demais Jelleinas, é pouco seletivo para elas em comparação a células não tumorais. Esses resultados sinalizam que a sequência de JIF2WR poderia ser otimizada buscando análogos mais específicos para atividade antimicrobiana.

Para a PTN, o aumento da estruturação associado à desagregação na presença da PTN₁₋₆, confirmaram os achados de experimentos computacionais, embora essas variações estruturais não tenham sido passíveis de detecção na estrutura tridimensional obtida pelo RMN. Porém na presença de vesículas os achados computacionais foram confirmados e a mistura (PTN/PTN₁₋₆) mostrou mais interação em todos os ambientes testados, com maior atividade lítica em vesículas zwitteriônicas. Entretanto a ausência de atividade hemolítica aponta para o papel importante de outros componentes da membrana, dentre eles o colesterol. Em testes biológicos, foi confirmada a tendência ao aumento da eficiência bactericida da mistura. PTN assim como a mistura apresentaram maior atividade anticâncer para células de câncer de mama do tipo MDA-MB-231 em concordância com a maior atividade lítica nas vesículas PCPSCol onde também a agregação é

significativamente reduzida. Esses resultados sugerem que a sequência da PTN possa ser estudada, e análogos mais eficientes em relação a células tumorais, possam ser desenhados.

A preferência eletrostática por bicamadas lipídicas aniônicas foi evidente tanto para as Jelleínas quanto para as Protonectinas, sugerindo a alta afinidade para com essas bicamadas, além de uma interação mais superficial com os fosfolídeos da bicamada, não interferindo no empacotamento lipídico da mesma. Características como menor hidrofobicidade, anfipaticidade e substituições dos resíduos de Lys por Arg demonstraram ser de fundamental importância para a síntese de peptídeos mais seletivos e eficientes.

A ação biológica foi demonstrada para a família das Jelleínas, especialmente para o análogo JIF2WR, na atividade bactericida, apresentando resultados melhores que o medicamento controle (Cloranfenicol), enquanto que para a família das Protonectinas, a ação contra células tumorais foi destaque, contra célula de câncer de mama. A baixa atividade hemolítica de ambas as famílias de peptídeos, possibilita sua aplicação biológica, refletida nos bio-ensaios.

Capítulo 6

6.1 - Referências bibliográficas

Allende D, McIntosh T.J. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. *Biochem* 42: 1101-1108, 2003.

Aguirre, T. A., Teijeiro-Osorio, D., Rosa, M., Coulter, I. S., Alonso, M. J., & Brayden, D. J. Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. *Advanced drug delivery reviews*, 106, 223-241, 2016.

Baldissera, G., dos Santos Cabrera, M. P., Chahine, J., & Ruggiero, J. R. Role of Peptide–Peptide Interactions in Aggregation: Protonectins Observed in Equilibrium and Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry*, 54(13), 2262-2269, 2015.

Baumann, G., & Mueller, P. A molecular model of membrane excitability. *Journal of supramolecular structure*, 2(5-6), 538-557, 1974.

Barth, A. & Zscherp, C. What vibrations tell about Quarterly reviews of biophysics, 35(4), 369-430, 2002.

Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101, 2007.

Baptista-Saidemberg N.B., Saidemberg D.M., De Souza B.M., Cesar-Tognoli L.M., Ferreira V.M., Mendes M.A., Dos Santos Cabrera M.P., Ruggiero Neto J., Palma M.S. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* 56: 880-889, 2010.

Bechinger B. A dynamic view of peptides and proteins in membranes. *Cell Mol Life Sci.* 65: 3028-3039, 2008.

Bozelli, J. C., Sasahara, E. T., Pinto, M. R., Nakaie, C. R., & Schreier, S. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrypticin to lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids*, 165(4), 365-373. Brand, L., Gohlke, J. R., *Fluorescence Probes for Structure, Annual Review of Biochemistry*, 1972, v. 41, p. 843-&, 2012.

Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 238-250, 2005.

Broggio-Costa, S. T. Estudos conformacionais por dinâmica molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos Mastoparanos em misturas de TFE-águ, 2006.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Krahn, J.M., Kuszewski, J.K., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Schroeder, G.F., Simonson, T., Warren, G.L. *Crystallography and NMR System*. 2010. Disponível em: <http://cns-online.org/v1.3/>

Capparelli, R., De Chiara, F., Nocerino, N., Montella, R. C., Iannaccone, M., Fulgione, A., & Capuano, F. New perspectives for natural antimicrobial peptides: application as anti-inflammatory drugs in a murine model. *BMC immunology*, 13(1), 61, 2012.

Carlier, L., Joanne, P., Khemtémourian, L., Lacombe, C., Nicolas, P., El Amri, C., & Lequin, O. Investigating the role of GXXXG motifs in helical folding and self-association of plasticins, Gly/Leu-rich antimicrobial peptides. *Biophysical chemistry*, 196, 40-52, 2015.

CDPro software. 2004. Disponível em: <https://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/>

Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202, 2006.

Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G., & Skelton, N. J. *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Elsevier, 1995.

Chu-Kung, A. F., Nguyen, R., Bozzelli, K. N., & Tirrell, M. Chain length dependence of antimicrobial peptide–fatty acid conjugate activity. *Journal of colloid and interface science*, 345(2), 160-167, 2010.

Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (Eds.) *NMR of Proteins*. Macmillan International Higher Education, 1993.

Da Silva, Annielle Mendes Brito et al. Pro-necrotic Activity of Cationic Mastoparan Peptides in Human Glioblastoma Multiforme Cells Via Membranolytic Action. *Molecular neurobiology*, p. 1-15, 2018.

Damberg, P., Jarvet, J., & Gräslund, A. Micellar systems as solvents in peptide and protein structure determination. *Methods in enzymology*, 339, 271, 2001.

Dathe, M., & Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 71-87, 1999.

Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters*, 501(2-3), 146-150, 2001.

Dohtsu, K., Okumura, K., Hagiwara, K. I., Palma, M. S., & Nakajima, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-vepsidae). *Natural toxins*, 1(5), 271-276, 1993.

Dos Santos Cabrera M.P., Costa S.T., de Souza B.M., Palma M.S., Ruggiero J.R., Ruggiero Neto J. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J* 37: 879-891, 2008.

Dos Santos Cabrera M.P., Arcisio-Miranda M., da Costa L.C., de Souza B.M., Broggio Costa S.T., Palma M.S., Ruggiero Neto J., Procopio J. Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: a comparative biophysical study. *Arch Biochem Biophys*, 486: 1-11, 2009.

Dos Santos Cabrera, M. P., Baldissera, G., Silva-Goncalves, L. D. C., de Souza, B. M., Riske, K. A., Palma, M. S., Arcisio-Miranda, M. Combining experimental evidence and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide jelleine-I. *Biochemistry*, 53(29), 4857-4868, 2014.

Eisenberg, D., & Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148(6), 1188-1203, 2012.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., & Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of molecular biology*, 179(1), 125-142, 1984.

EMBL-EBI. PROCHECK e PROCHECK-NMR. 2010. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>

Epand RF, Schmitt M.A., Gellman S.H., Epand R.M. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1343, 2006.

Epand, R. M., D'Souza, K., Berno, B., & Schlame, M. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(1), 220-228, 2015.

Evertsson, H., Nilsson, S., Microstructures formed in aqueous solutions of a hydrophobically modified nonionic cellulose derivative and sodium dodecyl sulfate: A fluorescence probe investigation., *Carbohydrate Polymers*, v. 40, p. 293-298, 1999.

Fadel, V. Estrutura tridimensional da crotamina extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* utilizando ressonância magnética nuclear homonuclear, 2003.

Feder, R., Dagan, A., & Mor, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4230-4238, 2000.

Figueira, Tiago N. et al. Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin Pv D 1. *Nanoscale*, v. 9, n. 43, p. 16887-16899, 2017.

Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E., & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature reviews Drug discovery*, 11(1), 37-51, 2012.

Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, Cesar LM, Malaspina O, Palma MS. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 25: 919-28, 2004.

Fosgerau, K., & Hoffmann, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*, 20(1), 122-128, 2015.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337, 1990.

Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 36, 2006.

Fratini, F.; Cilia, G.; Mancini, S. & Felicioli, A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological research*, 192, 130-141, 2016.

Freire J.M., Domingues M.M., Matos J., Melo M.N., Veiga A.S., Santos N.C., Castanho M.A. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *Europ Biophys J*. 40: 481-487, 2011.

Gallo R, Murakami M. Human cathelicidin antimicrobial peptides. WO2005040192 A3, 2005.

Gaspar, D., Veiga, A. S., & Castanho, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology*, 4, 294, 2013.

Hansen, P. R. Jelleine-I analogues with improved antibacterial activity. *Peptides-Copenhagen 2010, Tales of Peptides*, 376-377, 2010.

Herrmann, T. Multi-purpose Software Suite for Protein NMR structure determination and more. 2002. Disponível em: <http://perso.ens-lyon.fr/torsten.herrmann/Herrmann/Software.html>

Holdbrook, D. A., Singh, S., Choong, Y. K., Petrova, J., Malmsten, M., Bond, P. J., ... & Saravanan, R. Influence of pH on the activity of thrombin-derived antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2018.

Holthuis, J. C., & Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, 510(7503), 48, 2014.

Hoskin DW e Ramamoorthy A Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 357-375, 2008.

Huang HW Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochem* 39: 8347, 2000.

Hugonin, L., Barth, A., Gräslund, A., & Perálvarez-Marín, A. Secondary structure transitions and aggregation induced in dynorphin neuropeptides by the detergent sodium dodecyl sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(11), 2580-2587, 2008.

Hunter, R. J. Zeta potential in colloid science: principles and applications (Vol. 2). Academic press, 2013.

IBBR. Institute for bioscience e biotechnology research. nmrPIPE software. 2018. Disponível em: <https://www.ibbr.umd.edu/nmrpipe/install.html>

Jackson, M., & Mantsch, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(2), 95-120, 1995.

Jarvet, J., Danielsson, J., Damberg, P., Oleszczuk, M., & Gräslund, A. Positioning of the Alzheimer A β (1–40) peptide in SDS micelles using NMR and paramagnetic probes. *Journal of biomolecular NMR*, 39(1), 63-72, 2007.

Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511, 2006.

Jia, F., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Kong, Z., Wang, K., ... & Wang, R. The in vitro, in vivo antifungal activity and the action mode of Jelleine-I against *Candida* species. *Amino acids*, 50(2), 229-239, 2018.

Kabsch, W., & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 22(12), 2577-2637, 1983.

Karaoui, L. R., Rania, E. L., & Chahine, E. B. Oritavancin: an investigational lipoglycopeptide antibiotic. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 70(1), 23-33, 2013.

Kaspar, A. A., & Reichert, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug discovery today*, 18(17-18), 807-817, 2013.

Keller, R. The computer aided resonance assignment tutorial, CARA Website, CANTINA Verlag, Goldau, 2004. Disponível em: <http://cara.nmr-software.org/portal/>.

Khara, J. S., Obuobi, S., Wang, Y., Hamilton, M. S., Robertson, B. D., Newton, S. M., ... & Ee, P. L. R. Disruption of drug-resistant biofilms using de novo designed short α -helical antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. *Acta biomaterialia*, 57, 103-114, 2017.

Killian J.A. Gramicidin and Gramicidin-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1113: 391-425, 1992.

Kosikowska, P., & Lesner, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 26(6), 689-702, 2016.

Khurshid, Z., Naseem, M., Yahya I Asiri, F., Mali, M., Sannam Khan, R., Sahibzada, H. A., ... & Khan, E. Significance and Diagnostic Role of Antimicrobial Cathelicidins (LL-37) Peptides in Oral Health. *Biomolecules*, 7(4), 80, 2017.

KYTE, Jack; DOOLITTLE, Russell F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of molecular biology*, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

Laird, D. J., Mulvihill, M. M., & Lillig, J. A. W. Membrane-induced peptide structural changes monitored by infrared and circular dichroism spectroscopy. *Biophysical chemistry*, 145(2-3), 72-78, 2009.

Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. eBook ISBN 978-0-387-46312-4. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4. 3ª edição, 2006.

Lax, R. The future of peptide development in the pharmaceutical industry. *PharManufacturing: The international peptide review*, 2, 10-15, 2010.

Lee, W., & Lee, D. G. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(2), 673-679, 2015.

Leite, N. B., dos Santos Alvares, D., de Souza, B. M., Palma, M. S., & Neto, J. R. Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia-MP1 to anionic lipid vesicles. *European Biophysics Journal*, 43(4-5), 121-130, 2014.

Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207-215, 2012.

Lim, K., Chua, R. R. Y., Saravanan, R., Basu, A., Mishra, B., Tambyah, P. A., ... & Leong, S. S. J. Immobilization studies of an engineered arginine–tryptophan-rich peptide on a silicone surface with antimicrobial and antibiofilm activity. *ACS applied materials & interfaces*, 5(13), 6412-6422, 2013.

Liu, L. P., & Deber, C. M. Guidelines for membrane protein engineering derived from de novo designed model peptides. *Peptide Science*, 47(1), 41-62, 1998.

Liu, X., Cao, R., Wang, S., Jia, J., & Fei, H. Amphipathicity determines different cytotoxic mechanisms of lysine-or arginine-rich cationic hydrophobic peptides in cancer cells. *Journal of medicinal chemistry*, 59(11), 5238-5247, 2016.

Löffler J, Einsele H, Hebart H, Schumacher U, Hrastnik C, Daum G Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS microbiol letters* 185: 59-63, 2000.

Lohner K, Prenner EJ Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta* 1462: 141-156, 1999.

Lohner, K. Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies. Horizon Scientific Press, in: K. Lohner (Ed.), *The Role of Membrane Lipid Composition in Cell Targeting of Antimicrobial Peptides*, Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, U.K, 2001, pp. 149–156, 2001.

M27-A3 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disponível em: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf. Acessado em: Janeiro/2017, 2008.

Mahalka A K e Kinnunen P K Binding of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides to lipid membranes: lessons from temporins B and L. *Biochim Biophys Acta* 1788: 1600-1609, 2009.

Martari, M., & Sanderson, R. D. Critical self-assembly concentration of bolaamphiphilic peptides and peptide hybrids determined by fluorescence measurements. *South African Journal of Chemistry*, 61, 47-52, 2008.

Martins, D. B., Vieira, M. R., Fadel, V., Santana, V. A. C., Guerra, M. E. R., Lima, M. L., & dos Santos Cabrera, M. P. Membrane targeting peptides toward antileishmanial activity: Design, structural determination and mechanism of interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(11), 2861-2871, 2007.

Matanic, V. C. A., & Castilla, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International journal of antimicrobial agents*, 23(4), 382-389, 2004.

Mathur, D., Prakash, S., Anand, P., Kaur, H., Agrawal, P., Mehta, A., ... & Raghava, G. P. PEPLife: A Repository of the Half-life of Peptides. *Scientific reports*, 6, 36617, 2016.

Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K. An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of Phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochem* 35: 11361-11368, 1996.

Matsuzaki K, Sugishita K., Fujii N, Miyajima K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochem* 34: 3423-3429, 1995.

Melo, M. N., Ferre, R., & Castanho, M. A. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 245-250, 2009.

Melo, M. N., & Castanho, M. A. The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. bacteria. *Frontiers in immunology*, 3, 236, 2012.

Mendes, M. A., de Souza, B. M., Marques, M. R., & Palma, M. S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*, 44(1), 67-74, 2004.

Miller LM, Bourassa MW, Smith RJ. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828: 2339-2346, 2013.

Mishra, B., Lushnikova, T., Golla, R. M., Wang, X., & Wang, G. Design and surface immobilization of short anti-biofilm peptides. *Acta biomaterialia*, 49, 316-328, 2017.

Mohanram, H., & Bhattacharjya, S. Cysteine deleted protegrin-1 (CDP-1): anti-bacterial activity, outer-membrane disruption and selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(10), 3006-3016, 2014.

Murata, K., Shinada, T., Ohfune, Y., Hisada, M., Yasuda, A., Naoki, H., & Nakajima, T. Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni drewseni*. *Amino Acids*, 37(2), 389-394, 2009.

Murayama, K., & Tomida, M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43(36), 11526-11532, 2004.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, 6ª edição, 2014.

Oliver, J. D., & Colwell, R. R. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: phospholipid composition. *Journal of bacteriology*, 114(3), 897-908, 1973.

Ong, Z. Y., Cheng, J., Huang, Y., Xu, K., Ji, Z., Fan, W., & Yang, Y. Y. Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles. *Biomaterials*, 35(4), 1315-1325, 2014.

Otting, G. Protein NMR using paramagnetic ions. *Annual review of biophysics*, 39, 387-405, 2010.

Palma, M. S. Composition of freshly harvested Brazilian royal jelly: identification of carbohydrates from the sugar fraction. *Journal of Apicultural Research*, 31(1), 42-44, 1992.

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 143-171, 2012.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Hunziker, P., & Von Fellenberg, R. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 372-378, 1997.

Perálvarez-Marín, A., Barth, A., & Gräslund, A. Time-resolved infrared spectroscopy of pH-induced aggregation of the Alzheimer A β 1–28 peptide. *Journal of molecular biology*, 379(3), 589-596, 2008.

Prossnigg, F., Hickel, A., Pabst, G., & Lohner, K. Packing behaviour of two predominant anionic phospholipids of bacterial cytoplasmic membranes. *Biophysical chemistry*, 150(1), 129-135, 2010.

Ramesh, S., Govender, T., Kruger, H. G., de la Torre, B. G., & Albericio, F. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science*, 22(7), 438-451, 2016.

Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R. C., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., ... & Capparelli, R. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of peptide science*, 17(5), 348-352, 2011.

Rouser, G., Fleischer, S. & A. Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-496, 1970.

Qiu, S., Zhu, R., Zhao, Y., An, X., Jia, F., Peng, J., ... & Wang, Q. Antimicrobial activity and stability of protonectin with D-amino acid substitutions. *Journal of Peptide Science*, 23(5), 392-402, 2017.

Sal-Man N, Oren Z, Shai Y. Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells. *Biochem* 41: 11921-11930, 2002.

Samantha Ng, M. S., Yap, J. M., Lau, Q. Y., Ng, F. M., Ong, E. H. Q., Barkham, T., ... & Arumugam, P. Structure-activity relationship studies of ultra-short peptides with potent activities

against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *European journal of medicinal chemistry*, 150, 479-490, 2018.

Saravanan R, Mohanram H, Joshi M, Domadia PN, Torres J, Ruedl C, Bhattacharjya S
Structure, activity and interactions of the cysteine deleted analog of tachyplesin-1 with lipopolysaccharide micelle: Mechanistic insights into outer-membrane permeabilization and endotoxin neutralization. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. 1818: 1613-1624, 2012.

Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., & Raussens, V. ATR-FTIR: a “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(10), 2328-2338, 2013.

Sayegh, R. S. R., Batista, I. D. F. C., de Melo, R. L., Riske, K. A., Daffre, S., Montich, G., & da Silva Junior, P. I. Longipin: An Amyloid Antimicrobial Peptide from the Harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with Preferential Affinity for Anionic Vesicles. *PLoS one*, 11(12), e0167953, 2016.

Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279-285, 2006.

Schmidtchen, A., Pasupuleti, M., & Malmsten, M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Advances in colloid and interface science*, 205, 265-274, 2014.

Schweizer, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 190-194, 2009.

Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B. J. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*, 17(10), 12276-12286, 2012.

Sevcsik E, Pabst G, Richter W, Danner S, Amenitsch H, Lohner K Interaction of LL-37 with model membrane systems of different complexity: influence of the lipid matrix. *Biophys J* 94: 4688-4699, 2008.

Shai Y Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462: 55-70, 1999.

Shai Y ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. *Biochim. Biophys Acta* 1828: 2306-2313, 2013.

Shaw, N. Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Advances in applied microbiology*, 17, 63-108, 1974.

Sinthuvanich, C., Veiga, A. S., Gupta, K., Gaspar, D., Blumenthal, R., & Schneider, J. P. Anticancer β -hairpin peptides: membrane-induced folding triggers activity. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14), 6210-6217, 2012.

Slade, N. B. L. Estudos das interações do peptídeo antimicrobiano Polybia MP1 com membranas modelo: mecanismo de ação e especificidade, 2014.

Slaninová, J., Putnová, H., Borovičková, L., Šácha, P., Čeřovský, V., Monincová, L., & Fučík, V. The antifungal effect of peptides from hymenoptera venom and their analogs. *Open Life Sciences*, 6(2), 150-159, 2011.

Souza, B. M., Mendes, M. A., Santos, L. D., Marques, M. R., César, L. M., Almeida, R. N., ... & Palma, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, 26(11), 2157-2164, 2005.

Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., & Chapman, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, 32(2), 389-394, 1993.

Strömstedt, A. A., Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 593-602, 2009.

The Antimicrobial Peptide Database (APD), disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, acessado em 10/09/2018.

Veldhuizen, E. J., Schneider, V. A., Agustiandari, H., Van Dijk, A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L., Bikker, F. J., & Haagsman, H. P. Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. *PLoS One*, 9(4), e95939, 2014.

Vieira, N. A. B., Moscardini, M. S., de Oliveira Tiera, V. A., & Tiera, M. J. Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study. *Carbohydrate Polymers*, 53(2), 137-143. 2003.

Wadhvani, P., Epand, R. F., Heidenreich, N., Bürck, J., Ulrich, A. S., & Epand, R. M. Membrane-active peptides and the clustering of anionic lipids. *Biophysical journal*, 103(2), 265-274, 2012.

Walkenhorst, W. F. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 926-935, 2016.

Wang, K., Jia, F., Dang, W., Zhao, Y., Zhu, R., Sun, M., ... & Yan, J. Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 28-35, 2016.

Wang, K., Yan, J., Liu, X., Zhang, J., Chen, R., Zhang, B., ... & Wang, R. Novel cytotoxicity exhibition mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Toxicology*, 288(1-3), 27-33, 2011.

Wang, K., Dang, W., Yan, J., Chen, R., Liu, X., Yan, W., & Wang, R. Membrane perturbation action mode and structure-activity relationships of protonectin, a novel antimicrobial peptide from the venom of neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-02311, 2013.

Wang, K., Dang, W., Xie, J., Zhu, R., Sun, M., Jia, F., ... & Ma, Z. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2365-2373, 2015.

Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., ... & Shan, A. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the postfeeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*, 2018.

Wimley, W. C., & White, S. H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Structural and Molecular Biology*, 3(10), 842, 1996.

Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, 5(10), 905-917, 2010.

Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C. A., Seow, S. V., Zhang, S., & Yang, Y. Y. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, 32(8), 2204-2212, 2011.

Wüthrich, K. NMR with proteins and nucleic acids. *Europhysics News*, 17(1), 11-13, 1986.

Yeaman MR and Yount NY Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27, 2003.

Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 5807-5822, 2014.

Yin, L. M., Edwards, M. A., Li, J., Yip, C. M., & Deber, C. M. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7738-7745, 2012.

Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal*, 294(Pt 1), 1, 1993.

Zhao, H. X., Rinaldi, A. C., Di Giulio, A., Simmaco, M. Kinnunen, P. K. J. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model membranes. Comparison of temporin B and temporin L. *Biochem* 41: 4425-4436, 2002.

Zetasizer nano user manual. Disponível em: www.malvern.com. Acessado em: junho de 2014.

Capítulo 7

7.1 – APÊNDICE

Artigos Publicados

- 1) Polydim-I antimicrobial activity against MDR bacteria and its model membrane interaction

- 2) Membrane targeting peptides toward antileishmanial activity: Design, structural determination and mechanism of interaction

- 3) Chitosan derivatives targeting lipid bilayers: Synthesis, biological activity and interaction with model membranes

- 4) Cholesterol modulates curcumin partitioning and membrane effects

RESEARCH ARTICLE

Polydim-I antimicrobial activity against MDR bacteria and its model membrane interaction

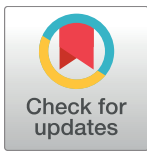
Marisa Rangel^{1,2☯*}, Fabíola Fernandes dos Santos Castro^{2☯}, Lilian Daiene Mota-Lima^{1‡}, Patricia Bianca Clissa^{1‡}, Danubia Batista Martins^{3‡}, Marcia Perez dos Santos Cabrera^{3,4☯}, Marcia Renata Mortari^{2☯}

1 Immunopathology Laboratory, Butantan Institute, Sao Paulo-SP, Brazil, **2** Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília-DF, Brazil, **3** Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil, **4** Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

☯ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* marisarangel2112@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Rangel M, Castro FFdS, Mota-Lima LD, Clissa PB, Martins DB, Cabrera MPdS, et al. (2017) Polydim-I antimicrobial activity against MDR bacteria and its model membrane interaction. PLoS ONE 12(6): e0178785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785>

Editor: Surajit Bhattacharjya, nanyang technological university, SINGAPORE

Received: February 16, 2017

Accepted: May 18, 2017

Published: June 1, 2017

Copyright: © 2017 Rangel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP (grants 2008/00173-4 to M.R.; 2012/24259-0 and 2014/08372-7 to M.P.S.C.). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq (grant 473645/2012-2 to M.R.). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES to D.B.M., fellowship recipient. The

Abstract

The rapid spread of multi-drug resistant pathogens represents a serious threat to public health, considering factors such as high mortality rates, treatment restrictions and high prevalence of multi-drug resistant bacteria in the hospital environment. Antimicrobial peptides (AMPs) may exhibit powerful antimicrobial activity against different and diverse microorganisms, also presenting the advantage of absence or low toxicity towards animal cells. In this study, the evaluation of the antimicrobial activity against multi-drug resistant bacteria of a recently described AMP from wasp, Polydim-I, was performed. Polydim-I presented activity against standard strains (non-carriers of multi-resistant genes) that are susceptible to commercial antimicrobials, and also against multi-drug resistant strains at concentrations below 1 µg/ml (0.41 µM). This is a rather low concentration among those reported for AMPs. At this concentration we found out that Polydim-I inhibits almost 100% of the tested pathogens growth, while with the ATCC strains the minimum inhibitory concentration (MIC₁₀₀) is 400 times higher. Also, in relation to *in vitro* activity of conventional drugs against multi-drug resistant bacteria strains, Polydim-I is almost 10 times more efficient and with broader spectrum. Cationic AMPs are known as multi-target compounds and specially for targeting the phospholipid matrix of bacterial membranes. Exploring the interactions of Polydim-I with lipid bilayers, we have confirmed that this interaction is involved in the mechanism of action. Circular dichroism experiments showed that Polydim-I undergoes a conformational transition from random coil to a mostly helical conformation in the presence of membrane mimetic environments. Zeta potential measurements confirmed the binding and partial charge neutralization of anionic asolectin vesicles, and also suggested a possible aggregation of peptide molecules. FTIR experiments confirmed that some peptide aggregation occurs, which is minimized in the presence of strongly anionic micelles of sodium dodecyl sulfate. Also, Polydim-I induced channel-like structures formation to asolectin lipid bilayers, as demonstrated in the electrophysiology experiments. We suggest that cationic Polydim-I targets the membrane lipids due to electrostatic attraction, partially accumulates, neutralizing the

fundors had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

opposite charges and induces pore formation. Similar mechanism of action has already been suggested for other peptides from wasp venoms, especially mastoparans.

1 Introduction

Since the beginning of the clinical use of antimicrobial agents, strains of multi-resistant bacteria have emerged. The fast dissemination of these multi-resistant pathogens represents a threat to public health, considering the high mortality rates, treatment restrictions and the prevalence in hospitals of bacteria resistant to antimicrobials [1]. Recently, an increase in the number of infections has been induced by a group of pathogens named by the acronym ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* sp. The term ESKAPE is a reference to the difficulties to eliminate infections caused by these pathogens due to several mechanisms of escape they possess, and to the urgency in the discovery of new antimicrobial drugs, capable of eliminating infections they induce [2]. Although these bacteria do not share the same mechanisms of resistance induction, they share an increasing prevalence due to the selective pressure exerted by public policies (or their absence) for antibiotics use, especially in the Intensive Care Units (ICUs) [3]. Antimicrobial resistant infections are responsible for approximately 50,000 deaths per year only in USA and Europe. Worldwide, the number of deaths attributed to antimicrobial resistant infection is estimated to be above 700,000/year. If no action is taken to control the growing rates of infection induced by such pathogens, about 10 million lives can be taken per year by the year of 2050 [4].

AMPs are ubiquitous in living organisms, and are in general, molecules of the innate immune system, which exert potent antimicrobial activity against a wide range of microorganisms, associated to the absence or reduced toxic effects towards mammalian cells [5]. This reduced toxicity is attributed to biochemical and structural differences between cell membranes of microorganisms and mammals. The lipid bilayer of the bacteria membrane is composed of negatively charged phospholipids, facing outside the cell. In mammalian cells, however, zwitterionic phospholipids facing the extracellular compartment form the membrane, which also includes cholesterol, that in animal cells decreases the lytic effects of AMPs, and is absent in bacterial membranes [6,7].

Typical AMPs consist of 10 to 50 amino acid residues with positive net charge. Folded, they may acquire mostly four types of secondary structures: α -helix, β -sheet, combined α -helix and β -sheet, and extended. In general, the mechanism of action of AMPs is either directed by electrostatic interaction towards the microbe membrane, followed by pore formation or membrane rupture, or penetrate the bacterial cytosol by passing through an outer membrane protein, or by channels formed by the AMPs, or by a flip-flop mechanism, and exert antimicrobial effect by inhibiting protein or DNA synthesis [8,9,10]; alternatively, AMPs may modulate the host immunity system [11].

Two main general mechanisms of action for peptide disruption of membrane were proposed: pore formation through the lipid bilayer or the carpet mechanism that could either cause intermittent leaky defects on the membrane or its lysis as a detergent. Further detailed description of the mechanisms of pore formation and bacterial membrane destabilization by AMPs can be revised on previous articles [12–19].

The development of microbial resistance against AMPs is rare [20]. Although some pathogens are capable of expressing mechanisms to avoid the AMP target and bypass the host defenses [15,21], AMPs represent one of the most promising strategies in the fight against

infections and resistance to antimicrobial drugs. There is a major interest, regarding public health, in the development of new antimicrobial classes, since in the last four decades just three were introduced as medicines (lipopeptides, oxazolidinones and streptogramins) [22,23]. Besides being rare that bacteria develop mechanisms of resistance against antimicrobial drugs which target membrane lipids, these antimicrobials are active against slow-growing or dormant bacteria and on biofilms [24]. In addition to the already proven antibacterial activity of AMPs individually administrated [25], there is the possibility of combined use with conventional drugs [22,26,27].

Wasp venoms are composed by substances developed through an elaborated evolution process, and effectively used to self-defense, immobilization or capture of the prey. The venom of social wasps contains a variety of bioactive compounds, with a number of pharmacological activities, including antimicrobial activity [28,29]. Several bioactive peptides were isolated from wasp venoms, and the most studied class is the one of the mastoparans. Mastoparan peptides are rich in lysine residues and play an important role in the stimulation and release of biogenic amines such as mast cells histamine. Furthermore, mastoparans present potent antimicrobial activity [30].

Polydim-I is a peptide recently isolated from the venom of the Neotropical wasp *Polybia dimorpha* that is active against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massaliense* infections *in vitro* and *in vivo* [31]. The peptide has 22 amino acid residues. Although presenting an amphipathic structure due to the presence of hydrophobic amino acid residues (methionine, leucine, valine, and proline) intercalated with negatively charged ones, as other wasp AMPs do, Polydim-I also presented particular intrinsic characteristics, which made it be considered a new class of AMP. Morphological analysis of *M. abscessus* subsp. *massaliense* cell surface indicated that Polydim-I activity could be related to cell membrane integrity disruption. Besides the efficacy demonstrated on the reduction of *M. abscessus* subsp. *massaliense* infections in macrophages and mice models, Polydim-I also showed selective toxicity. Toxicity in macrophages was only 10% when they were treated with concentrations 15–16 times higher (121.6 µg/mL) than the concentration used to reduce in 50% the infection in the same cells (7.6 µg/mL). Furthermore, the haemolytic activity against human erythrocytes (only 2.5% at 121.6 µg/mL) can be considered insignificant [31].

The present study aimed at expanding the characterization of the antimicrobial potential of Polydim-I, through the determination of its minimum inhibitory concentration (MIC) against ATCC sensitive bacteria strains and ESKAPE pathogens. Additionally, the detection of defects on resistant bacteria cell membrane by SEM, indicating pore-formation as a possible mechanism of action [31] led us to confirm the possibility of pore formation and to evaluate by other methods its structural features and mechanism of interaction with the lipid matrix that could make it a candidate to drug development studies.

2 Materials and methods

2.1 Peptide synthesis

Polydim-I (AVAGEKLWLLPHLLKMLLTPP-NH₂; m/z 2441.7 [M+H]⁺) was synthesized using Fmoc chemistry by AminoTech P & D (Sao Paulo, Brazil). The correct sequence and purity (>99%) were evaluated by HPLC and mass spectrometry.

2.2 Antibacterial activity

ATCC (American Type Culture Collection) strains were acquired from BioMerieux as a part of the kits Lyfocults® of the quality control of the equipment Vitek2® of the same company. The multi-resistant strains were provided by the bacterial library of the Microbiology

Laboratory of the Centro Universitário de Brasília (UNICEUB). The microorganisms used were: *Staphylococcus aureus* ATCC2 5923, *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (MRSA); *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterococcus faecalis* vancomycin resistant. *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing; extended spectrum betalactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*; metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenems.

MICs for Polydim-I against bacteria strains were determined by 2-fold serial broth micro dilution in Müller-Hinton broth (Difco™, BD, USA) in 96-well plates. Each well received 90 μ l of peptide solutions plus 90 μ l of the broth. In each well 20 μ l of bacterial suspension was added, resulting in a final volume of 200 μ l at the concentration of 10^5 CFU/ml. Controls were: DMSO 2.5% (vehicle) with and without bacterial suspension, Polymyxin B, Meropenem, and Vancomycin (all from Sigma-Aldrich Co., USA). Following inoculation, the plates were incubated at 37°C for 18 h before measuring the turbidity of the cultures at 595 nm in an ELISA reader (MultiSkan FC®, Thermo Scientific, USA) to assess bacterial growth. The results were expressed as inhibition percentage of optical density (OD) against a control in the absence of the peptide or the control antibiotics. MIC₅₀ was calculated through non-linear regression of the dose-response growth inhibition curves for Polydim-I against the ATCC strains, and MIC₁₀₀ was the concentration that completely inhibited bacterial growth.

2.3 Large unilamellar vesicles preparation for spectroscopy experiments (LUV)

Multi-layered vesicles (MLVs) were prepared from films of asolectin (Sigma-Aldrich Co., USA) deposited on the bottom of round flasks after solvent (chloroform) evaporation under N₂ flow, followed by vacuum drying for at least 3 h. Films were hydrated with buffer (citrate/phosphate pH 5.5 containing 150 mM NaF), at 40°C, to reach a final lipid concentration of 10 mg/mL and vortex mixed. MLVs were submitted to an extrusion process through polycarbonate membranes (Whatman® Nuclepore Track-etch Membrane, Sigma-Aldrich Co., USA) in two steps: first, through 400 nm membranes (6 times), then through two stacked 100 nm membranes, using an Avanti mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., USA), at 40°C, rendering LUVs. For ATR-FTIR experiments vesicles were prepared in deuterated buffer and left incubating for 2h prior to spectra acquisition.

Peptide samples were prepared by diluting the stock solution (in D₂O for IR experiments) with buffer/deuterated buffer, or with buffer containing either 40% 2,2,2-trifluoroethanol (or 2,2,2-trifluoroethanol-d₃, TFE), or 8 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) or asolectin (AZO) LUVs, at 100 and 250 μ g/mL.

2.4 Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were obtained in the absence and in the presence of peptide at 20 μ M concentration, at 25°C, recorded from 260 to 202 or 190 nm (depending on signal-to-noise ratio) with a Jasco-710 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan) Spectra were acquired using 0.5 cm path length cell, averaged over ten scans, at a scan speed of 50 nm/min, bandwidth of 1.0 nm, 0.5 s response and 0.2 nm resolution. Baseline correction was applied. The mean-residue ellipticity, $[\Theta]$ (deg cm²/dmol), was calculated with the relationship $[\Theta] = 100\theta/(lcn)$, where θ (mdeg), is the observed ellipticity, 'l' the path length in cm, 'c' (mM) the peptide concentration, and 'n' the number of peptidic bonds. Spectra were fitted with the software CDPro (configured with CONTIN/LL and using the reference set SMP56).

2.5 Attenuated Total Reflectance-Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

FTIR spectra were recorded in the range from 1600 to 1700 cm^{-1} with the spectrophotometer Spectrum Two (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK), fitted with ATR device. Aliquots of 7 μL of each sample were deposited on top of the ATR crystal device. To obtain the difference spectra, samples were analyzed in the absence and in the presence of peptide at 1 mM concentration. For each spectrum 20 scans were collected with resolution of 2 cm^{-1} . The background was the clean crystal. To assign the wave numbers of the component bands in the spectra, baseline correction was applied, overlapping bands were resolved and the second-derivative spectra were smoothed by 13-data point Savitsky-Golay.

The ATR-FTIR spectra were analyzed to give the estimates of the relative contents of the different secondary structure elements included in the whole area of the amide I band based on the fraction of total area under the peak. The deconvolution of the amide I region considered the following peaks and assignments to the secondary structure elements: between 1620–1625 cm^{-1} , aggregated β -sheet; 1625–1640 cm^{-1} β -sheet, from 1645–1655 cm^{-1} , α -helix; 1656–1670 cm^{-1} , distorted helix; 1670–1680 cm^{-1} , turns [32,33].

2.6 Size and zeta potential determinations

The Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) was used to determine size and the zeta potential of AZO LUVs in the absence and in the presence of the peptide. Peptide solutions were prepared in buffer, pH 5.5, in plastic vials and an aliquot of the vesicle suspension was added to a final concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 30 minutes equilibration at 25°C the preparation was transferred to a disposable cuvette for size evaluation. Then, the same preparation was transferred to a DTS1070 cell (Malvern Instruments, England) for zeta potential measurement. Values of viscosity and refractive index were 0.8872 cP and 1.330, respectively.

2.7 Giant unilamellar vesicles (GUVs), bilayer formation and electrophysiology

The giant unilamellar vesicles were prepared from asolectin (Sigma-Aldrich Co., USA) and formed by electroswellling, using the device Vesicle Prep Pro (Nanon Technologies GmbH, Germany) following the protocol described by Rangel et al., 2011 [34]. Lipid bilayers were formed from GUVs after added to the borosilicate glass chips NPC-1 aperture. Electrical measurements were performed with the automated Patch-Clamp device Port-a-Patch® (Nanon Technologies GmbH, Germany) as previously described [34].

3 Results

3.1 Antibacterial activity

The growth inhibition results of Polydim-I against ATCC bacteria strains are summarized in Table 1. The peptide presented low MIC against *Staphylococcus aureus*, with a MIC₅₀ of 4.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Against *Pseudomonas aeruginosa*, however, concentrations higher than 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were tested, and yet the MIC₅₀ and MIC₁₀₀ could not be precisely calculated. Peptide concentrations that inhibited 50% of the growth of *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* and *Escherichia coli* were, respectively: 73.2, 84.0 and 50.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *E. coli* was the Gram-negative bacteria more susceptible to the peptide treatment. MIC₁₀₀ values were equal or superior to 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all tested ATCC bacteria. As a control of inhibition of the bacterial growth, commercial antimicrobial drugs were tested against the same standard strains (Table 2).

Table 1. Polydim-I activity against ATCC bacteria strains (in µg/ml, with 95% confidence limits for MIC₅₀ presented in parentheses). MICs were determined by 2-fold serial micro dilution in Müeller-Hinton broth in 96-well plates. Each well received 90 µl of peptide plus 90 µl of broth. In each well 20 µl of bacterial suspension was added, resulting in a final volume of 200 µl at the concentration of 10⁵ CFU/ml. The plates were incubated (37°C, 18 h) and turbidity was measured at 595 nm to assess bacterial growth. The results were expressed as inhibition percentage of optical density (OD) against a control in the absence of the peptide. Three independent experiments were performed in triplicate.

Polydim-I(µg/ml)	ATCC bacteria strains				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. calcoaceticus</i>
MIC ₅₀	4.1 (1.5–11.5)	73.2 (56–95.6)	50.7 (33–78)	> 400	84 (65–109)
MIC ₁₀₀	400	400	>400	>400	>400

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.t001>

To confirm the standard response of the strains used in this study, commercial drugs with reduced or absent activity against bacteria expressing resistance genes were tested. Thus, vancomycin was tested against VRE strains, and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. In parallel, antimicrobial drugs indicated for the treatment of infections caused by multi-resistant microorganisms were also tested: vancomycin against MRSA strains and e polymyxin B on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. (Table 3). Vancomycin inhibitory activity on MRSA strains was above 90% on both tested concentrations (10 and 100 µg/ml), and below 30% against the VRE strain. Iminipen only inhibited the growth of ESBL-producing *E.coli*, which is the only Gram-negative bacterium sensitive to this drug. KPC, *P. aeruginosa* and *A. calcoaceticus-baumannii* Cplx express carbapenem resistance, but are susceptible to polymyxin B.

The results of the evaluation of the Polydim-I inhibitory activities against the strains expressing multi-resistant genes are shown in Table 3. Polydim-I presented a potent inhibition of the multidrug resistant bacteria growth, inhibiting 100% of all strains at concentration of 1µg/ml (0.41µM) except for *Acinetobacter* sp. that presented a MIC₁₀₀ of 5µg/ml (2.05µM, Table 3). The MIC₅₀ for the peptide against the multi-resistant bacteria would be below 1µg/ml concentration, and were not calculated. Polydim-I is much more efficient against ESKAPE pathogens than the ubiquitous drugs employed.

3.2 Secondary structure evaluation

CD and ATR-FTIR spectroscopy were used to investigate Polydim-I secondary structure in the aqueous environment and that induced by the presence of membrane mimetic systems. SDS solutions above the critical micelle concentration and asolectin LUVs present anionic

Table 2. Inhibition of ATCC bacteria strains by commercial antibiotics, in percentage ± SEM. Each well received 90 µl of antibiotic solutions plus 90 µl of broth. In each well 20 µl of bacterial suspension was added, resulting in a final volume of 200 µl at the concentration of 10⁵ CFU/ml. The plates were incubated (37°C, 18 h) and turbidity was measured at 595 nm to assess bacterial growth. The results were expressed as inhibition percentage of optical density (OD) against a control in the absence of the control antibiotics. Three independent experiments were performed in triplicate.

Drugs	Concentration (µg/ml)	ATCC bacteria strains				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. calcoaceticus</i>
Vancomycin	10	90.9 ± 1.3	74.6 ± 2.3	NT	NT	NT
	100	95.2 ± 0.7	89.7 ± 0.4	NT	NT	NT
Meropenem	10	NT	NT	97.5 ± 1.7	94.9 ± 4.8	99.0 ± 0.6
	100	NT	NT	96.1 ± 0.05	96.7 ± 5.3	100
Polymyxin B	10	NT	NT	87.6 ± 6.7	98.9 ± 0.1	92.5 ± 1.75
	100	NT	NT	85.3 ± 5.3	97.9 ± 2.0	99.8 ± 0.1

NT: non tested because there is no indication for use

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.t002>

Table 3. Inhibition of multi-resistant bacteria strains by Polydim-I and commercial antibiotics, in percentage ± SEM. Experimental details as described for Table 2. Three independent experiments were performed in triplicate.

Drug/peptide(MW)	Concentration (µg/ml) / µM	GPC			GNB	GNBNF	
		MRSA	VRE	<i>E. coli</i> ESBL	KPC	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
Polydim-I(2441.7 [M+H] ⁺)	1 / 0.41	97.6 ± 0.1	98.5 ± 11.6	100.2 ± 0.3	97.8 ± 1.3	100.9 ± 0.3	87.4 ± 1.7
	5 / 2.05	99.2 ± 0.8	99.4 ± 11.5	100.0 ± 0.1	102.7 ± 1.2	100.9 ± 1.1	100.1 ± 0.6
	30 / 12.3	101.3 ± 0.2	98.5 ± 11.6	99.7 ± 0.1	104.2 ± 0.2	100.3 ± 0.9	100.7 ± 0.2
Meropenem (383.5 g/mol)	10 / 26.1	NT	NT	93.0 ± 0.2	0.7 ± 0.07	1.8 ± 0.4	0.9 ± 0.05
	100 / 260.1	NT	NT	98.6 ± 0.5	0.8 ± 0.02	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.4
Polymyxin B (1204 g/mol)	10 / 8.3	NT	NT	100.5 ± 0.5	99.0 ± 0.7	99.8 ± 0.0	88.5 ± 1.2
	100 / 83	NT	NT	99.8 ± 0.05	100.0 ± 0.5	99.4 ± 0.5	98.3 ± 1.3
Vancomycin (1449 g/mol)	10 / 6.9	90.7 ± 0.05	26.5 ± 0.8	NT	NT	NT	NT
	100 / 69	95.4 ± 0.4	29.0 ± 0.2	NT	NT	NT	NT

GPC: gram-positive cocci. **GNB:** gram-negative bacteria. **GNBNF:** gram-negative bacteria non-spore forming. **NT:** non tested because there is no indication for use.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.t003>

character, a common feature of bacterial membranes [15]. Solutions were buffered at pH 5.5, mimicking the acidic environment of infected tissues and making His residues protonated.

CD spectrum (Fig 1) of Polydim-I in buffer suggests an unordered structure and the peptide spectra in 40% TFE and in 8 mM SDS solutions exhibit the features of α-helical conformations with double minima around 208 and 223 nm. In the presence of anionic azolectin vesicles, the spectrum shows some deviation of the helical features, which could indicate the contribution of aggregated peptides. Nevertheless, the spectra do not indicate a preferential interaction with anionic environments as already found with other antimicrobial peptides [34,35,36].

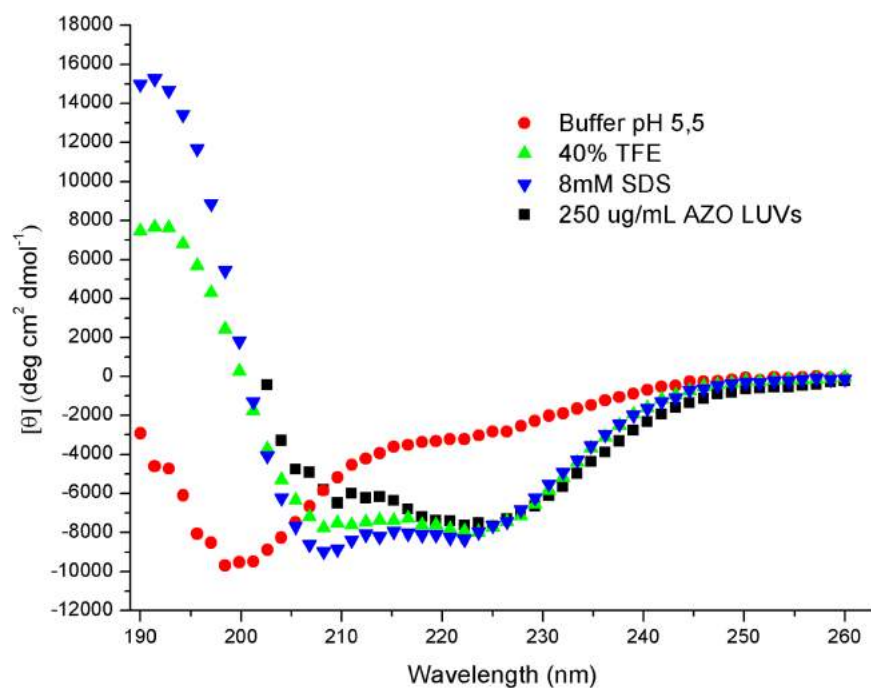


Fig 1. CD spectra of Polydim-I, obtained at 20 µM concentration, at 25°C, in different environments. Spectra are the average of 10 accumulations obtained at 50 nm/min. No smooth has been applied.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.g001>

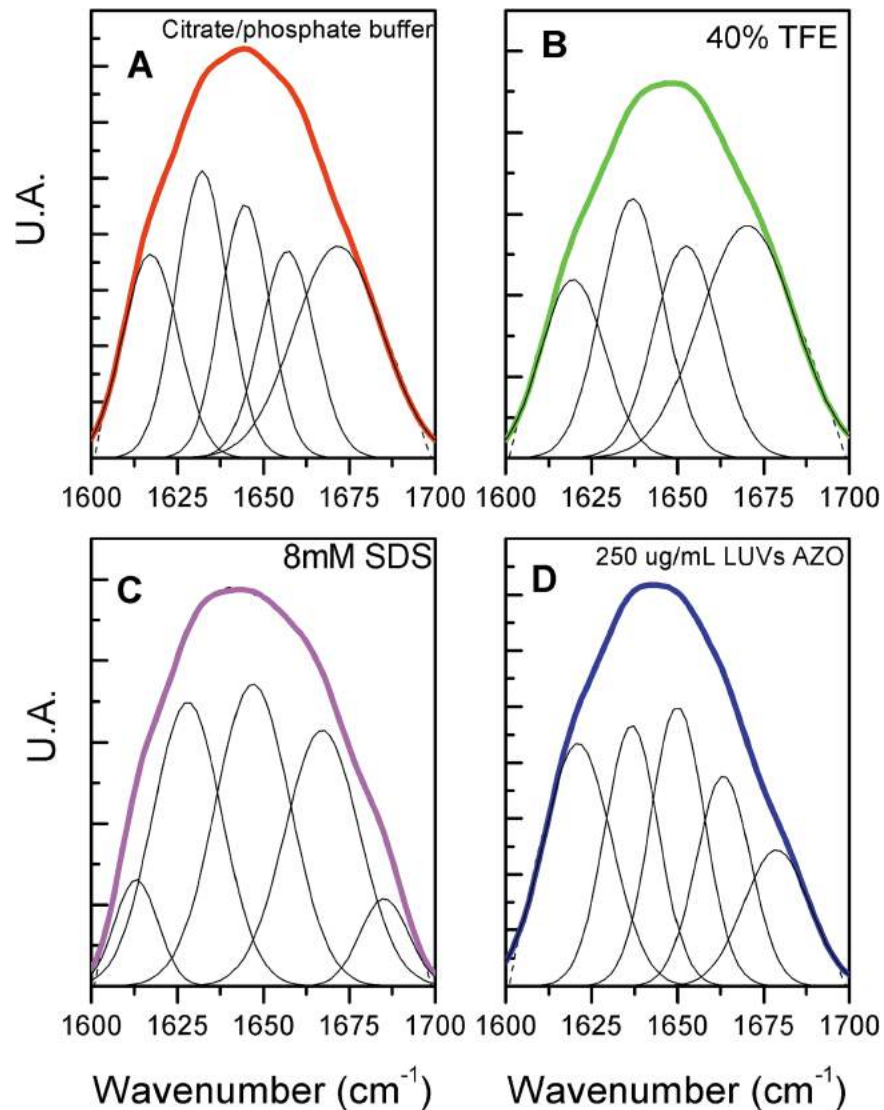


Fig 2. Deconvolution of the amide I band (1600–1700 cm^{-1}) of the FTIR spectra of Polydim-I in different deuterated environments. The component peaks were obtained from the second derivatives (not shown) and result from a Gaussian curve fitting. The dashed lines are the experimental FTIR spectra (averaged over 20 scans) after the 13-data point Savitzky-Golay smoothing. The colored lines correspond to the sum of the components. The grey lines represent the deconvolution of the spectra in the different wave numbers. Spectra were acquired at 1 mM Polydim-I, at 25 C.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.g002>

Fig 2 shows the spectra of the amide I region in the different environments, which superimpose the sum of the fitted components (100%). The deconvolution identifies the structural contributions at the respective wavenumbers. At 1620 cm^{-1} , the aggregated forms, at 1635 cm^{-1} , the β -sheet, at 1645 cm^{-1} the random structures, at 1654 cm^{-1} , the α -helix, and above 1665 cm^{-1} , turns. In buffer, turns and random coil prevail, although some aggregated forms and β -sheet could be detected. These forms could result from peptide-peptide salt bridges and/or hydrophobic interactions. In TFE solution, known as a helical inductor environment, α -helix structures appeared at the expenses of turns and random coil reduction. In the presence of SDS micelles, the aggregated forms contributions significantly decrease with a proportional increase of the α -helix content. Although AZO LUVs exhibit an anionic character, it is mostly made of

Table 4. Secondary structure elements (%) of Polydim-I as determined by the deconvolution of CD and FTIR spectra.

	Secondary structure evaluation (%)							
	Buffer, pH 5.5		40% TFE		8 mM SDS		250 µg/mL AZO LUV	
	CD	IR	CD	IR	CD	IR	CD	IR
α-helix	8	-	25	21	29	32	24	23
β-sheet	32	21	23	25	22	28	21	21
turns	23	45	23	36	22	34	25	31
aggregated	ND	16	ND	18	ND	6	ND	25
random coil	37	18	30	-	28	-	31	-

ND, not determined; -, absent

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.t004>

zwitterionic phospholipids and Polydim-I spectra in this environment hold similarities with the TFE solution spectra, however with an increased content of aggregated forms. The β-sheet content remained constant in the different media.

Table 4 compares the contributions of the secondary structure elements as obtained from CD and FTIR experiments. This latter technique allows an estimative of the aggregated content of peptide. In buffer, β-sheet, turns and aggregation could be due to electrostatic attraction between positively and negatively charged residues, either intra- or inter-chains. These structures contribute somewhat differently in the deconvolution of CD and IR spectra. The presence of the helix inductor TFE, and the membrane mimetics, SDS solution and AZO vesicles suspension, induce significant contents of helical and β-sheet structures. In the presence of the strong anionic environment of SDS micelles, we find the lowest aggregation content and highest ordered structure content. Low aggregation is an important feature to maximize antimicrobial activity and the higher anionic character of SDS when compared to asolectin LUVs suggests the relevance of the stronger electrostatic interactions, which can also be found in Gram-negative and Gram-positive bacteria [15].

We also observed that Polydim-I structure should be of low amphipathicity, considering the calculated hydrophobic moment of 0.109 [37]. Amphipathicity has been often related to the activity of antimicrobial peptides on membranes, however as postulated by Wimley (2010) [38] it is not necessary for peptides to exhibit a perfect amphipathicity for improved biological activity and specificity.

3.3 Zeta-potential determinations

Considering that Polydim-I might target the phospholipid matrix of cell membranes as other antimicrobial peptides do, the binding to and accumulation on the outer leaflet of vesicles are important steps for membrane destabilization, before pore formation or the occurrence of any bilayer destabilization. These events can be assessed through zeta potential measurements. Zeta-potential values reflect the remaining charge density which were neither neutralized nor screened. Changes in zeta potential are used to quantify the extension of the interaction between peptides and phospholipid vesicles and changes in size are related to peptides inducing vesicles aggregation or acting in the detergent mode [39]. In the absence of peptide, AZO vesicles are characterized by an average zeta-potential value of -19.7 ± 0.6 mV (ζ_0). Fig 3 shows that the interaction with the positively charged peptide causes the vesicles charging up as the peptide concentration increases. The variation of vesicle size does not indicate strong aggregation or micellization and it ranged from 115 to 179 nm throughout the experiment. Polydim-I gradually increases zeta-potential, tending to a plateau at concentrations above 10 µM. This finding either indicates poor binding or peptide aggregation on the vesicle surface.

Considering the results from the FTIR experiments that indicated around 31% peptide aggregation in AZO vesicles (Table 4), this latter possibility seems to be the case.

3.4 Lipid bilayers electrical measurements

The peptide Polydim-I was able to induce channel-like activity in lipid bilayers (LBs) of asolectin at concentrations ranging from 0.7 to 2 μM ($n = 6$, independent experiments), using a symmetrical 150 mM HCl solution, within 10 min incubation time. Higher concentrations of the peptide ($> 5\mu\text{M}$) induced fast (2–3 seconds) LB breakdowns after applying our standard initial protocol ($V_{\text{hold}} = -100$ mV). Pore formation was observed under positive and negative voltage pulses (Fig 4A and 4B), and the current *versus* voltage relation ($I \times V$) showed no rectification. In fact, the $I \times V$ regression resulted in a straight line passing near 0 ($R^2 = 0.9850$), with constant slope of 0.2088, indicating that the pores formed by Polydim-I in the lipid bilayer are ohmic conductors, i.e., the pore resistance does not change with the applied voltage (V_{hold}) (Fig 4C). Average unitary channel conductance was calculated under different V_{hold} pulses of -120, -100, +100 and +120 mV, and they are presented in Table 5, although no significant statistical differences were found between these conditions (non-parametric one-way ANOVA followed by Dunn’s multiple comparison test). The highest conductance opening was observed at the V_{hold} of -100 mV, reaching 2159 pS. Pores of different conductance levels were observed (Fig 4, Table 5), suggesting the organization of peptide monomers to form larger channel-like structures. P_{open} and dwell time values were estimated for V_{hold} of -100 and +100 mV under constant stimulus protocol, and are shown in Table 5. Dwell times were very short and similar for both conditions (280 and 320 ms respectively; unpaired t-test did not detect difference between the two conditions), while P_{open} was higher at +100 mV pulse (9.5%) than at -100mV (5.5%).

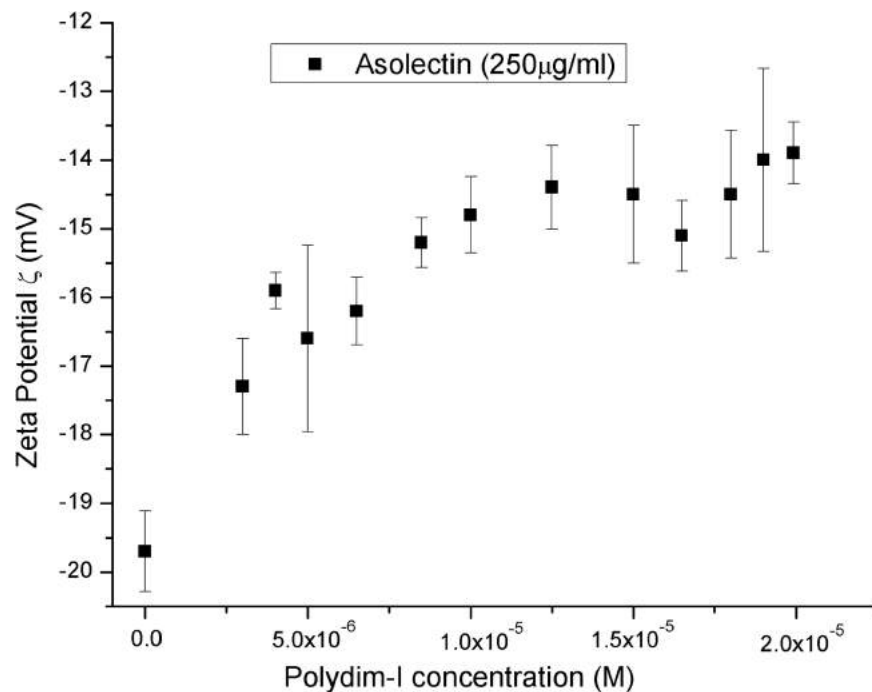


Fig 3. Zeta-potential isotherm obtained at 25°C, in the absence (ζ_0) and presence of 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ AZO vesicles. A series of buffered peptide solutions, pH 5.5, at increasing concentrations were mixed with an aliquot of AZO vesicles suspension and left for 30 minutes to equilibrate. Error bars represent the standard deviation of 3 measurements.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.g003>

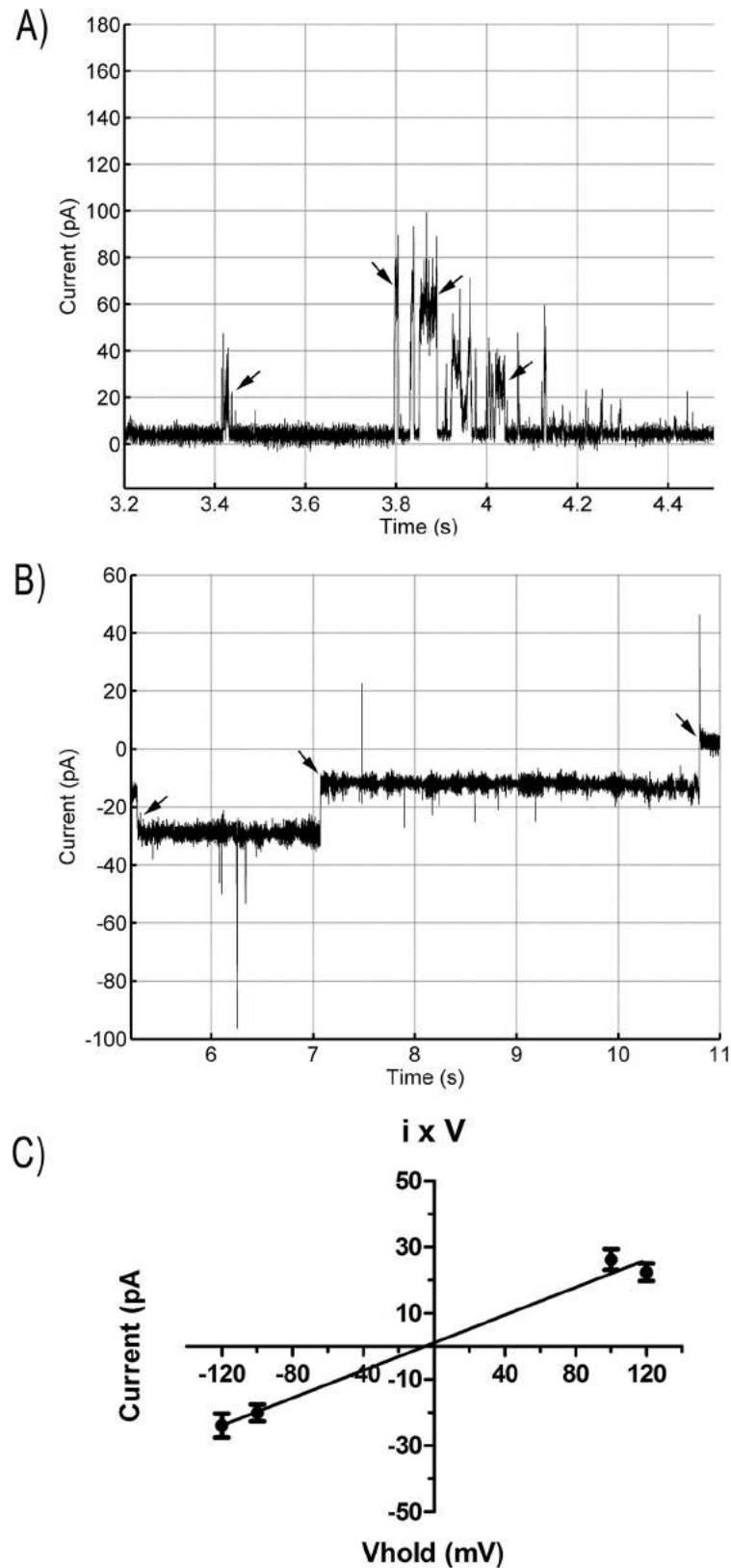


Fig 4. Representative recordings of Polydim-I (0.7 to 2 μ M) single channel incorporation in AZO bilayers using a Nanion Port-a-Patch device and PatchControl software. Solution: 150 mM HCl

(symmetrical). Arrows indicate some channel apertures or closings. A) $V_{\text{hold}} = +100\text{mV}$, Pore conductances = 265 and 629 pS; B) $V_{\text{hold}} = -100\text{mV}$, Pore conductance = 161 pS; C) Representative current-voltage linear relation of the pores formed by Polydim-I peptide in AZO bilayers ($R^2 = 0,9850$; slope of 0.2088). Measurements of the single channels currents and duration of apertures were performed using PatchMaster software. Other analyses were performed in GraphPad Prism 5.0 Software. Six independent experiments were performed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.g004>

4 Discussion

The peptide Polydim-I was isolated from the venom of the social wasp *Polybia dimorpha* from the Brazilian savanna. This peptide presented *in vitro* and *in vivo* activities against the rapid growth of mycobacteria *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* [31] that is known to cause infectious diseases in humans in hospital environments after intramuscular injections and other small invasive procedures [31,40]. The *M. abscessus* subsp. *massiliense* presented cell wall disruptions after the treatment with Polydim-I, as verified by scanning electron microscopy (SEM), possibly due to the pore formation. The antibiotic clarithromycin, an inhibitor of protein synthesis, didn't alter the morphology of the mycobacteria [31].

Another specie of social wasp from the same genus, *P. paulista*, also presents AMPs with strong activity against standard ATCC microbes, evaluated with the same strains used in the present work [41,42]. Polydim-I was active against standard ATCC strains, with lower MIC₅₀ against *S. aureus* and *E. coli*. Other strains, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus baumannii* were less sensitive to the peptide (Table 1). This may be due to a less permeable membrane of these later strains that endow the microorganism with some intrinsic resistance and could have reduced the peptide permeability [43–45]. Besides LPS presence in gram-negative bacteria, membrane lipid composition varies among different bacteria species and strains, and the lipid composition of membranes has been referred as crucial to the activity of lipid targeting antimicrobials [10,24,46,47].

Polydim-I activity against standard ATCC strains is lower than that presented by conventional antibiotics (Tables 1 and 2). The only response similar to a reference drug (Vancomycin) was the MIC₅₀ against *S. aureus*. The difference in the response of the bacteria strains with no resistance mechanisms is that the conventional antibiotics can easily reach and bind to their targets [48]. Since in these strains there is no inactivation or elimination of the antimicrobial agent, all the molecules transported into the cell will exert their effect on the molecular targets, successfully eliminating the microorganism [49].

The phenotype of the multi-resistant microorganisms tested in this study differs from the standard strains by the ability to produce extended spectra beta lactamases and carbapenemases. These are present at high concentrations in the periplasmic space, and inactivate the beta-lactam antibiotics by ring hydrolysis. The main mechanism of Gram-positive bacteria resistance is characterized by the changes in the receptor for the antimicrobial molecules, generally located on the plasma membrane or in the cell wall [6,48,50,51].

Table 5. Polydim-I induced pores in anionic (AZO) bilayers according to the applied voltage (V_{hold}). Mean (\pm SEM), minimum and maximum conductance of pores obtained in 3–6 different experiments for each V_{hold} condition. Dwell time (time duration of channel aperture) and P_{open} of pores (probability of pore aperture during a recording, calculated by the sum of time of all apertures under a V_{hold} divided by the total time of recording in that same V_{hold} condition) averaged after 3 experiments. Measurements of the single channels currents and duration of apertures were performed using PatchMaster software. Other analyses were performed in GraphPad Prism 5.0 software.

V_{hold} (mV)	Conductance (pS)	Minimum conductance (pS)	Maximum conductance (pS)	Dwell time (ms)	P_{open} (%)
-120mV	211.4 \pm 29.4	20.8	843.3		
-100mV	291.6 \pm 26.9	18.0	2159.0	280 \pm 140	5.5
+100mV	256.6 \pm 18.2	31.0	944.0	320 \pm 110	9.5
+120mV	209.6 \pm 25.0	41.7	483.3		

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178785.t005>

The control experiments with the multi-resistant strains and the standard drugs attested the good accuracy and sensitivity of the assays. The multi-resistant bacteria are far more sensitive to this peptide than the ATCC strains. MIC₁₀₀ was very low, and it was not possible to calculate MIC₅₀ due to the strong activity of the peptide (Table 3). These results indicated a higher and more specific response of the multidrug resistant pathogens to Polydim-I in comparison with the standard strains.

The Gram-negative multi-resistant bacteria were inhibited by peptide concentrations lower than polymyxin B and meropenem, which in the presence of different resistance mechanisms are the only therapeutic choices. Gram-negative bacteria can express one or more resistance mechanisms, conferring resistance against antibiotics such as cephalosporins, aminoglycosides, quinolones and other classes of antimicrobials [52,53]. Bacterial infections caused by multidrug resistant pathogens have become more frequent, making the empiric therapeutic choice a true challenge [54].

The results with Gram-positive multi-resistant bacteria were also very promising since Polydim-I inhibited 98% of the growth of MRSA and VRE strains at the concentration of 1 µg/mL. Vancomycin inhibited up to 95% of the growth of MRSA at 10 and 100 µg/mL while in the same concentrations growth inhibition of VRE was only 26.5–29% due to the resistance of this strain to this antibiotic.

Polydim-I was described by das Neves et al (2016) as a new class of AMP peptide [31]. We can expect some differences in the activity due to its novel sequence when comparing with other wasp peptides such as mastoparans. For instance, unlike most mastoparans, Polydim-I does not affect mammal cells, but presented selective toxicity towards bacteria [31]. Selective toxicity of AMPs towards bacteria is predominantly due to its interaction with the lipid bilayer, and the differences of composition between mammal cells and bacteria, that confer anionic character to the latter [55]. In the present manuscript we found that Polydim-I was more effective against ESKAPE bacteria when compared to ATCC antibiotic sensitive strains. Nevertheless, some AMPs have shown to be more active against MDR strains of bacteria when compared to susceptible ones. Vila-Farres and co-workers (2012) compared the MICs of 15 different AMPs and found that HNP-1 (Defensin Human Neutrophil Peptide-1) showed better activity against colistin-resistant *A. baumannii* (3.25 mg/L) when compared to the MIC for colistin susceptible *A. baumannii*, which was 15 times higher (50 mg/L). Mastoparan from *Ves-pula lewisi* presented a MIC four times lower for the resistant strain, only 1 mg/L, when compared to the sensitive one [56]. Mastoparan, as Polydim-I, causes abnormalities in the cell surface of bacteria [57].

Reasons for the stronger activity of Polydim-I against ESKAPE pathogens could be attributed to the differences on lipid composition of bacteria presenting mechanisms of resistance and sensitive ones [24,58], which have been compared since the 1970's. Changes in net charge, fluidity and thickness of the lipid bilayer can be expected together with the lipid composition alterations caused by the expression of some of the known mechanisms of resistance [59]. Modifications in the lipid compositions of resistant bacteria might change the interaction of the AMPs with the lipid matrix [55,56,59]. According to Lohner (2009), qualitative and quantitative differences of membrane lipid compositions among microbes, and the changes that occur due to the expression of resistance mechanisms is an important goal of lipidomics, which will give support to a better understanding of membrane-AMP interactions [55].

A probable, but not exclusive, mechanism of action of Polydim-I is the destabilization of the bacterial membrane by interaction with the lipid bilayer, in the same manner as other AMPs, inducing the free flow of water and solutes inwards and outwards the cells, leading to lysis. Therefore, the mechanisms of resistance, such as the production of inactivating enzymes,

cannot affect the peptide action on the bacterial membrane. Polydim-I was effective 30 days after infection induced in mice in a previous study, reinforcing the hypothesis that no mechanism of resistance was induced during the experiment [31]. Since das Neves [31] raised the hypothesis of possible pore formation, we further investigated the peptide structure and interaction with mimetic membranes to confirm the occurrence of that mechanism.

Polydim-I, with +2.5 net charge and mean hydrophobicity, 0.080, calculated according to Eisenberg et al., 1984 [37], was found to exhibit helical and β -sheet structures at approximately the same content, and it may aggregate in the absence of stronger electrostatic interactions (Fig 2 and Table 4). This feature could be part of its selective performance. It binds to negatively charged vesicles, as indicated in the zeta potential experiments, partially neutralizing its charges (Fig 3). Polydim-I induced the disruption of the mycobacteria cell wall, as observed by scanning electron microscopy, but did not present toxicity as no macrophage membranes damage was observed [31]. Together these characteristics, low cytotoxicity and tendency to aggregate in environments with low anionic character, as are mammalian membranes, suggest that the selectivity of Polydim-I towards microbial membranes is related to differences in the electrostatic interaction with membranes that leads or not to aggregation of the peptide. The selective behavior of other wasp venom peptides from *Polybia* species was also correlated to important electrostatic interactions [60].

In our experiments with artificial lipid bilayers, Polydim-I presented channel-like activity as shown by the electrical measurements (Table 5 and Fig 4). Low concentration of the peptide was crucial to obtain stable electrical pore recordings in the artificial bilayers. The pore conductance under the applied V_{hold} presented no significant differences between positive and negative stimuli. The pores showed an ohmic $I \times V$ relation, and therefore the channel resistance does not change with the voltage applied in the bilayer. The pores formed by Polydim-I remain open for short periods of time (about 300ms), and have a higher probability to open under positive voltage pulses.

The formation of conductive pores was previously described for other peptides isolated from solitary and social wasp venoms, such as anoplín [61], HR-1 [39], eumenine mastoparan-EF and-ER [34], and eumenitin, eumenitin-F and eumenitin-R [34,62]. Some of these wasp peptides formed rectified pores, whose conductance (or resistance) changes according to the V_{hold} (see [34] Rangel et al., 2011).

Polydim-I linked two compartments isolated by a lipid bilayer, allowing ions to pass through. Ion movement across the formed pores result in measurable currents that were analyzed as conductance of those pores. The aim of this experiment was to show that the direct interaction of the peptide with membrane lipids can be responsible, at least, for ionic unbalance in the bacteria. Furthermore, pore formation in artificial lipid bilayers also indicates that the peptide does not necessarily require a protein receptor in the membrane to interact with it. It goes directly to the lipid matrix. Polydim-I formed pores of different conductance levels, suggesting that several peptide molecules (and/or even clusters) organize to form larger pores, with 100 times higher conductance than the average minimum observed. Lipid bilayer breakdown usually occurred a few seconds after larger pores incorporation. These observations also corroborate the findings that indicated some peptide aggregation.

In our results the evidence of Polydim-I aggregation was found in four different experiments: ATR-FTIR, CD spectroscopy, zeta potential determination and electrical measurement of lipid bilayers. We have observed that MIC_{50} was 5 to 100 times lower than MIC_{100} for most of the ATCC sensitive bacteria strain. Besides the differences of lipid bilayer compositions among bacteria used in our study and the electrostatic peptide interactions, the lower antimicrobial effect of Polydim-I in these ATCC strains at higher concentrations might be due to the increasing aggregation in that condition [15]).

5 Conclusions

Despite of great advances in medicine, the continuously acquired domain over many diseases is systematically threatened by the raising of severe infections' incidence, caused by bacteria with unprecedented adaptation and dissemination capabilities. In the present study, the wasp peptide Polydim-I presented antimicrobial activity against standard bacteria strains deprived of mechanisms of resistance, and against multi-resistant strains. Furthermore, the inhibition of bacterial growth was more potent when the peptide was tested against strains expressing elaborated mechanisms of drug resistance. Polydim-I was more potent on inhibiting the growth of multi-resistant bacteria than commercial antibiotics. Our results also showed the interactions of this peptide with mimetic membranes, indicating that at least one of the modes of action would be pore formation in the bacterial membrane that would minimize the development of resistance mechanisms as a membrane receptor is not necessarily required [55]. This set of experiments also suggests that the selective mode of action of Polydim-I towards bacterial cells is possibly related to strong electrostatic interactions.

The significant difference of activity of the peptide against ESKAPE pathogens when compared to ATCC strains indicates that studies on the differences of the membrane lipid composition between these bacteria could be important to the design of new drugs. Polydim-I activity against many MDR pathogens seems to be an additional quality of this peptide, as it already showed to be safe to mice in *in vivo* assays and against mammal cells *in vitro*, and effective on both experimental models [31]. Polydim-I has a potential use as antimicrobial drug because it has broad spectrum against MDR microbial, regardless their mechanism of resistance. Moreover, Polydim-I could be used as a protective layer in materials to avoid biofilm formation.

As pointed out by Mingeot-Leclercq and Décout [59] it is a major challenge "to shift from a 'hit' scaffold to a 'lead compound'". This molecule can lead to the development of antibacterial drugs against bacteria strains that causes high morbidity index in patients with infectious diseases.

Supporting information

S1 Table. Raw data of inhibition rates of antibiotics and Polydim-I against ATCC bacteria.
(PDF)

S2 Table. Raw data of inhibition rates of antibiotics and Polydim-I against MDR strains.
(PDF)

S3 Table. Raw data from the CD spectra acquisition for Polydim-I in the different environments.
(XLSX)

S4 Table. Raw data from the FTIR spectra acquisition for Polydim-I in the different environments.
(XLSX)

S5 Table. Raw data from the zeta potential experiments for Polydim-I in the presence of AZO LUVs.
(XLSX)

S6 Table. Data that originated Fig 4C graph.
(PDF)

S7 Table. Data from bilayer recordings used in Table 5.
(PDF)

S1 File. Data points from representative bilayer recording shown in Fig 4A.
(TXT)

S2 File. Data points from representative bilayer recording shown in Fig 4B.
(TXT)

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. M. A. Fossey and M. Boscolo for the use of equipments, CD and ATR-FTIR, respectively.

Author Contributions

Conceptualization: MR MPSC MRM.

Data curation: MR DBM MPSC MRM.

Formal analysis: FFSC PBC LDML DBM MR.

Funding acquisition: MR MPSC MRM.

Investigation: FFSC PBC LDML DBM.

Project administration: MR MRM.

Resources: MR MPSC MRM.

Supervision: MR MPSC MRM.

Validation: MR MPSC MRM.

Visualization: DBM MR MPSC PBC.

Writing – original draft: MR FFSC MPSC.

Writing – review & editing: MR MPSC MRM.

References

1. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005> PMID: 15831827
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB et al. (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48: 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011> PMID: 19035777
3. Cooper MA, Shlaes D (2011) Fix the antibiotics pipeline. *Nature* 472: 32. <https://doi.org/10.1038/472032a> PMID: 21475175
4. O'Neill J (2014) Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Wellcome Trust. pp. 1–20.
5. Bulet P, Stöcklin R, Menin L (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198: 169–184. PMID: 15199962
6. Hancock RE (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1: S93–99.
7. Matsuzaki K (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1376: 391–400. PMID: 9804997
8. Boman HG, Agerberth B, Boman A (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61: 2978–2984. PMID: 8514403
9. Park CB, Kim HS, Kim SC (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 253–257. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159> PMID: 9514864

10. Park SC, Park Y, Hahm KS (2011) The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int J Mol Sci* 12: 5971–5992. <https://doi.org/10.3390/ijms12095971> PMID: 22016639
11. Zhang LJ, Gallo RL (2016) Antimicrobial peptides. *Curr Biol* 26: R14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017> PMID: 26766224
12. Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462: 55–70. PMID: 10590302
13. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81: 1475–1485. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X) PMID: 11509361
14. Lee MT, Chen FY, Huang HW (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* 43: 3590–3599. <https://doi.org/10.1021/bi036153r> PMID: 15035629
15. Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2> PMID: 12615953
16. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098> PMID: 15703760
17. Boland MP, Separovic F (2006) Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1178–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.010> PMID: 16580625
18. Bechinger B, Lohner K (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1529–1539. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.001> PMID: 16928357
19. Haney EF, Hancock RE (2013) Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers* 100: 572–583. <https://doi.org/10.1002/bip.22250> PMID: 23553602
20. Peschel A, Sahl HG (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4: 529–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441> PMID: 16778838
21. Sperandio B, Regnault B, Guo J, Zhang Z, Stanley SL, Sansonetti PJ et al. (2008) Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J Exp Med* 205: 1121–1132. <https://doi.org/10.1084/jem.20071698> PMID: 18426984
22. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 6: 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006> PMID: 16890021
23. Coates AR, Halls G, Hu Y (2011) Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol* 163: 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x> PMID: 21323894
24. Mingeot-Leclercq MP, Décout JL (2016) Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. *Med. Chem. Commun.* pp. 586–611.
25. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF (2007, 2 (1)) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central Eur. J. Biol.* pp. 1–33.
26. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA (2010) Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 6: e1001067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067> PMID: 21060861
27. Fox JL (2013) Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat Biotechnol* 31: 379–382. <https://doi.org/10.1038/nbt.2572> PMID: 23657384
28. Nakajima T (1986) Pharmacological biochemistry of vespine venoms. In: *Venoms of the Hymenoptera*. New York: Academic Press, p.309–327. 18 p.
29. Mortari MR, Cunha AO, Ferreira LB, dos Santos WF (2007) Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther* 114: 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.009> PMID: 17399793
30. Mendes MA, de Souza BM, Palma MS (2005) Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon* 45: 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.09.015> PMID: 15581688
31. das Neves RC, Trentini MM, de Castro e Silva J, Simon KS, Bocca AL, Silva LP et al. (2016) Antimicrobial Activity of a New Peptide Polydim-I Isolated from Neotropical Social Wasp *Polybia dimorpha*. *PLoS One* 11: e0149729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149729> PMID: 26930596
32. Sal-Man N, Oren Z, Shai Y (2002) Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells. *Biochemistry* 41: 11921–11930. PMID: 12269837

33. Tomasinsig L, Skerlavaj B, Papo N, Giabbai B, Shai Y, Zanetti M (2006) Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. *J Biol Chem* 281: 383–391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510354200> PMID: 16257969
34. Rangel M, Cabrera MP, Kazuma K, Ando K, Wang X, Kato M et al. (2011) Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. *Toxicon* 57: 1081–1092. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.014> PMID: 21549739
35. dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Fontana R, Konno K, Palma MS, Azevedo WF et al. (2004) Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Pept Res* 64: 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00173.x> PMID: 15317499
36. Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Fontana R, Rangel M et al. (2006) Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides* 27: 2624–2631. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.013> PMID: 16762455
37. 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. PMID: 6502707
38. Wimley WC (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol* 5: 905–917. <https://doi.org/10.1021/cb1001558> PMID: 20698568
39. Dos Santos Cabrera MP, Arcisio-Miranda M, da Costa LC, de Souza BM, Broggio Costa ST, Palma MS (2009) Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: a comparative biophysical study. *Arch Biochem Biophys* 486: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.03.009> PMID: 19328184
40. Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca LeS, Leão SC, ELT, Rocha ILL et al. (2009) Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 47: 2149–2155. <https://doi.org/10.1128/JCM.00027-09> PMID: 19403765
41. Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, César LM, 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.026> PMID: 16129513
42. de Souza BM, da Silva AV, Resende VM, Arcuri HA, Dos Santos Cabrera MP, Ruggiero Neto J et al. (2009) Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 30: 1387–1395. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.008> PMID: 19463874
43. Nikaido H (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382–388. PMID: 8153625
44. Delcour AH (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794: 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005> PMID: 19100346
45. Zgurskaya HI, López CA, Gnanakaran S (2015) Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis* 1: 512–522. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00097> PMID: 26925460
46. Epand RF, Savage PB, Epand RM (2007) Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochim Biophys Acta* 1768: 2500–2509. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.023> PMID: 17599802
47. Epand RF, Pollard JE, Wright JO, Savage PB, Epand RM (2010) Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3708–3713. <https://doi.org/10.1128/AAC.00380-10> PMID: 20585129
48. Kong KF, Schnepfer L, Mathee K (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 118: 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x> PMID: 20041868
49. E.W. K (2006) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
50. Slama TG (2008) Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4: S4.
51. Rice LB (2006) Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Med* 119: S11–19; discussion S62-70.
52. Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 119: S3–10; discussion S62-70.
53. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M (2013) Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 62: 429–436. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.051631-0> PMID: 23222859
54. Orsini J, Mainardi C, Muzyllo E, Karki N, Cohen N, Sakoulas G (2012) Microbiological profile of organisms causing bloodstream infection in critically ill patients. *J Clin Med Res* 4: 371–377. <https://doi.org/10.4021/jocmr1099w> PMID: 23226169

55. Lohner K, (2009) New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen Physiol Biophys* 28: 105–116.
56. Vila-Farres X, Garcia de la Maria C, López-Rojas R, Pachón J, Giralt E, Vila J (2012) In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 18: 383–387. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03581.x> PMID: 21672084
57. Li ML, Liao RW, Qiu JW, Wang ZJ, Wu TM (2000) Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. *Int J Antimicrob Agents* 13: 203–208. PMID: 10724025
58. Dunnick JK, O'Leary WM (1970) Correlation of bacteria lipid composition with antibiotic resistance. *J Bacteriol* 101: 892–900. PMID: 4314544
59. Mingeot-Leclercq MP, Décout JL (2016) Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. *Med Chem Commun* 7: 586–611.
60. Leite NB, da Costa LC, Dos Santos Alvares D, Dos Santos Cabrera MP, de Souza BM, Palma MS et al. (2011) The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids* 40: 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0511-9> PMID: 20195659
61. Dos Santos Cabrera MP, Arcisio-Miranda M, Broggio Costa ST, Konno K, Ruggiero JR, Procopio J et al. (2008) Study of the mechanism of action of anoplín, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C-terminus. *J Pept Sci* 14: 661–669. <https://doi.org/10.1002/psc.960> PMID: 17994639
62. Arcisio-Miranda M, dos Santos Cabrera MP, Konno K, Rangel M, Procopio J (2008) Effects of the cationic antimicrobial peptide eumenitín from the venom of solitary wasp *Eumenes rubronotatus* in planar lipid bilayers: surface charge and pore formation activity. *Toxicon* 51: 736–745. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.023> PMID: 18206199



Membrane targeting peptides toward antileishmanial activity: Design, structural determination and mechanism of interaction



Danubia Batista Martins^a, Maira Ramos Vieira^b, Valmir Fadel^a,
Viviane Aparecida Camargo Santana^b, Mirian Elisa Rodrigues Guerra^a, Marta Lopes Lima^{c,d},
Andre G. Tempone^d, Marcia Perez dos Santos Cabrera^{a,b,*}

^a Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Centre for Parasitology and Mycology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Decoralin
Antimicrobial peptides
Peptide-lipid bilayer interactions
NMR
Molecular dynamics simulations
Aminophospholipids

ABSTRACT

Background: Leishmaniasis threatens poor areas population worldwide, requiring new drugs less prone to resistance development. Antimicrobial peptides with antileishmanial activity are considered among fulfilling alternatives, but not much is known about the mode of action of membrane-targeting peptides, considering promastigote and infected macrophage membranes. In a previous work, structural features of very active known peptides were prospected using molecular dynamics simulations.

Methods: Combining sequences of these peptides, analogs were designed. The structure of analog DecP-11 was validated by NMR. *In vitro* bioassays determined the peptide cytotoxicity toward mammalian cells, IC₅₀ values on promastigotes and amastigotes, and membranolytic activity compared to Decoralin, one of the parent peptides. With biophysical methods, the mechanism of interaction with membrane mimetic systems was investigated.

Results: The designed peptide exhibits potent cytolytic and membrane permeabilizing activities, and decreased antileishmanial activity compared to the parent peptide. Interactions with lipid bilayers mimicking those of promastigotes, infected macrophage and mammalian cells showed that these peptides strongly bind to vesicles with intense lytic activity at low concentrations. Additionally, circular dichroism and light scattering experiments showed changes in the secondary structure of peptides and in vesicle size, depending on vesicles compositions. Altogether they suggest that DecP-11 antileishmanial activity is impaired by the aggregation and that aminophospholipids are probably involved.

Conclusions: DecP-11 potent cytolytic and membranolytic activities with lack of selectivity toward promastigote model membranes warrant further structural studies to improve selectivity.

General significance: Strong interactions of peptides with aminophospholipids, abundant in parasite membranes, potentially lead to aggregated forms impairing activity.

1. Introduction

Bioactive peptides are known for their structural features as low molecular weight, cationicity and amphipathicity, which have been extensively correlated to their antimicrobial, tumoricidal and hemolytic activities [1,2]. Despite their different sources and sequences, they usually share a common target, the phospholipid matrix of the cell membrane [2,3]. This represents an advantage because membrane compositions were conserved throughout evolution [2,4]. As a consequence, mechanisms of resistance are harder to develop and justify the efforts driven in the search for alternative antibiotics and anticancer

compounds with improved selectivity. Many of these peptides also exhibit antileishmanial activity [5–11] and similarly, their mode of action involves, among others, alterations of the plasma membrane permeability (including pore-forming activity), which leads to cell death [5,6].

The main lipids in eukaryotic cell membranes are the zwitterionic phospholipids phosphatidylcholine (PC), its analog, sphingomyelin (SPM), and phosphatidylethanolamine (PE) and the sterol, cholesterol (Chol). At physiologic pH and healthy conditions, PC, SPM, and Chol prevail at the outer leaflet of the membranes [2], while PE and ca. 10% phosphatidylserine (PS) are found in the inner leaflet [12–14]. The lipid

* Corresponding author at: Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
E-mail address: cabrera.marcia@gmail.com (M.P. dos Santos Cabrera).

composition of *Leishmania* membranes differs from those of eukaryotes [5,6]. This difference is the basis of the action of drugs like miltefosine, an analog to lysophospholipids, in clinical use for visceral leishmaniasis [15,16]. The plasmatic membrane of the extracellular promastigote form of *Leishmania* is densely covered by an anionic polysaccharide, the lipophosphoglycan, which is responsible for the net negative charge of its surface. Instead, the intracellular amastigote form exhibits mostly glycoinositolphospholipids and anionic phospholipids that also ascribe a negative surface charge to their membranes [6], and promote a preferential interaction with cationic antimicrobial peptides [10]. Additionally, *Leishmania* membranes contain a mixture of sterols, predominantly ergosterol [17] instead of cholesterol found in eukaryotic membranes [6]. Infected or non-infected macrophage membranes also differ in relation to their lipid composition [18]. While basic knowledge about antimicrobial peptides structure-function relationships and their interactions with membranes is rapidly accumulating, much less is known on how the subtle differences among lipid bilayers influence the efficiency of cationic peptides [19].

Among antimicrobial peptides from wasp venoms, the undecapeptide Decoralin (PDB ID: 2N9A), in its amidate form [20], and the tetradecapeptide EMP-ER [21] showed antileishmanial activity on promastigotes, with IC₅₀ values of 11 and 20 μM, respectively. Widely known as antileishmanials are the antimicrobial peptides found in amphibian secretions as Phylloseptin-1 (19 residues) [11], Bombinin H4 (20 residues) [22,23] and Temporins A and B (13 residues) [24,25], which present IC₅₀ values of 0.5, 1.7 and 8.5 μM, respectively. Previous studies demonstrated that these peptides target the lipid membrane and assume a helical conformation in the presence of membrane mimetics. These observations and the need for alternative drugs targeting one of the world's neglected diseases [6,7] lead us to focus on the search for peptides of shorter chain length through an optimized study of structure-function relationships.

In the present work, we used molecular dynamics simulations (MD) of peptides with known antileishmanial activity, Phylloseptin-1 (PH-1), Temporin B (TB) and amidated Decoralin (DCN), to search for their ubiquitous and remarkable structural characteristics and then, to design a new peptide whose structural features could match those of the reference peptides (Table 1). To verify if this objective was achieved, the designed peptide, DecP-11, was submitted to a NMR structure determination in 30% trifluoroethanol (TFE) solution, which is considered an environment that mimics the anisotropic character of lipid bilayers [26]. Then, this peptide was assayed for cytotoxicity (toward NCTC cells) and antileishmanial activity *in vitro* (toward promastigotes and amastigotes) in comparison to DCN, to a cyclic DCN analog and miltefosine. The results obtained in the bioassays lead to the investigation of peptides interactions with vesicles, whose lipid compositions approximately mimic those of promastigotes [22,27] infected macrophages [18] and mammalian erythrocytes [28,29]. We found that peptides strongly bind to vesicles and their lytic activity is intense at low concentrations. Combining circular dichroism (CD) and dynamic light scattering (DLS) results, that means, changes in the secondary structure of peptides and in vesicle size observed at the different vesicle compositions, suggest that the antileishmanial activity of DecP-11 is impaired by aggregation and that aminophospholipids are probably involved.

Table 1

Sequences of the antileishmanial peptides used as references and the designed DecP-11, with the respective net charge (z), mean hydrophobicity values (< H >) and hydrophobic moment, calculated according to Eisenberg et al., 1984 [30]. Positively charged residues in bold.

		z	< H >	μ
DCN [20]	SLLSLRKLLIT _{NH2}	+ 3	0.028	0.403
TB [24]	LLPIVGNLLKSL _{NH2}	+ 2	0.195	0.307
PH-1 [11]	FLSLIPHAINAVSAIAKHN _{NH2}	+ 3	0.085	0.240
DecP-11	SWLSLRKLLINSL _{NH2}	+ 3	0.014	0.371

2. Methods

2.1. Design of DecP-11

Molecular dynamics simulations were carried out in 30% 2,2,2-trifluoroethanol solution as described in SI (2.1.1) and summarized in Table S11, for the peptides PH-1, TB and DCN. The characteristics of their secondary structure profile were analyzed in relation to parameters that were considered important for antimicrobial activity as length and stability of the helical stretch and amphipathicity [1,31]. Then, modifications to the DCN sequence were made and simulations were performed until the sequence of DecP-11 was obtained, matching the structural parameters found for PH-1, the most active peptide.

2.2. Peptide synthesis, purification and mass spectrometry analyses

Peptides were supplied by GenScript (Piscataway, NJ). Mass spectrometry analyses showed MW according to expected and purity above 97% for linear peptides and 80% for the cyclic Decoralin. Concentration of peptides in the experiments was corrected according to their respective data on purity.

2.3. Bioassays

2.3.1. Reagents

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; thiazol blue), M-199 medium, RPMI-PR – 1640 medium (without phenol red), Hank's balanced salts and others were obtained from Sigma (Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Merck (Brazil). SYTOX Green was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Brazil).

2.3.2. Parasites, mammalian cells, and animal maintenance

Leishmania (L.) infantum (MHOM/BR/1972/LD) promastigotes were cultured in M-199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.25% hemin at 24 °C. Intracellular amastigotes forms were obtained from the spleens of previously infected golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) by differential centrifugation. The macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice by washing with RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% FBS). NCTC (clone L-929) murine conjunctive cells were maintained in RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% FBS) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. BALB/c mice and Golden hamsters were maintained as described elsewhere [33]. Animal procedures were performed with the approval of Research Ethics Commission (CEUA IAL 02/2011) in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

2.3.3. Activity of the peptides on leishmania promastigotes

DCN, DecP-11 and cDec peptides were dissolved in DMSO and tested to the highest concentration of 100 μM in M-199 medium, supplemented with 10% FBS. Briefly, promastigotes were seeded at 1 × 10⁶ cells/well in 96-well microplates and incubated with peptides for 48 h at 24 °C. Miltefosine was used as a standard drug. Promastigotes viability was determined using the colorimetric MTT assay as previously described [33].

2.3.4. Activity of the peptides on leishmania amastigotes

Briefly, 1 × 10⁵ peritoneal macrophages/well were infected with *Leishmania (L.)-infantum* amastigotes at 1:10 ratio (macrophage/amastigotes) for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Infected macrophages were incubated with the peptides for 120 h at 37 °C in 5% CO₂. Miltefosine was used as standard drug. Finally, cells were fixed in methanol, stained with Giemsa and 200 macrophages per concentration tested and control were counted under a light microscope [33].

2.3.5. Cytotoxicity against mammalian cells

NCTC clone L-929 cells were seeded at 6×10^4 cells/well in 96-well microplates and incubated with peptides for 48 h (maximal concentration of 200 μM) at 37 °C in a 5% CO_2 . The viability of the cells was also determined by MTT assay at 570 nm [33].

2.3.6. Plasma membrane permeabilization assays in *L. (L.) infantum* promastigotes

The Sytox Green assay was performed to detect membrane alterations in the permeability of the promastigotes plasma membrane [34]. Briefly, promastigotes were harvested at late exponential growth phase, seeded at 2×10^6 /well in Hank's medium supplemented 10 mM glucose and incubated with 1 μM SYTOX Green for 15 min in the dark. Then, peptides were added at the IC_{90} value and the fluorescence intensity was measured during 1 h incubation, using the FilterMax F5Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) with excitation and emission wavelength set at 485 and 520 nm, respectively. Maximum permeabilization was obtained with 0.1% Triton X-100. Internal controls consisted of untreated promastigotes and medium without any cells as negative control and blank, respectively [34].

2.3.7. Statistical analysis

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) against both forms of *Leishmania (L.) infantum* and the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) against NCTC cells were calculated using sigmoid dose-response curves in Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The 95% confidence intervals of one representative assay are also reported (in parentheses). At least two independent assays were performed for each activity tested. The differences were statistically defined by the two-tailed unpaired Students *t*-test, and an ANOVA test was used to test its significance ($P < 0.05$).

2.4. Assays in mimetic membranes

2.4.1. Reagents

Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) supplied the phospholipids egg sphingomyelin (eSPM), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) sodium salt (PG), and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine, sodium salt, (PS). Sigma-Aldrich Co. (S. Louis, MO) supplied egg L- α -lysophosphatidylcholine (L), cholesterol (Chol), ergosterol (Erg), and 5,6-carboxyfluorescein (CF). All materials were used as supplied. Other chemicals were of high quality analytical grade.

2.4.2. Large unilamellar vesicle (LUV) preparations

Films were made according to the procedures previously described (Dos Santos Cabrera et al., 2014) [35] at the following lipid compositions: PC/PS 82:18, 63:37 and 50:50; PE/PS 50:50 and 72:28; PC/PG 50:50; PEPSErg 47:28:25 (mimicking the membrane of the promastigote) [22]; PCPEPSL 39:29:18:14 (mimicking the membrane of the infected macrophage) [18], and 40:36:24 PC/eSPM/Chol (mimicking an average red blood cell) [28,29]. Then, they were hydrated with appropriate buffers (10 mM HEPES, containing 150 mM NaF, pH 7.4 for the zeta potential experiments or 10 mM TRIS/HCl, with 1 mM Na_2EDTA and 25 mM CF, pH 7.4 for the CF-filled LUVs) at room temperature or at 40 °C when cholesterol or ergosterol was present, to give lipid concentration around 10 mM. LUVs with a mean diameter of 125–130 nm were obtained after extrusion.

2.4.3. Zeta potential determination and size measurements

The binding of peptides was assessed through the changes in zeta potential of the anionic LUVs with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Aliquots of vesicle suspension to give a final concentration of 50 or 33.3 μM (for peptides with +3 or

+2 net charge, respectively) were added to buffered peptide solutions, pH 7.4, in 1.5 mL plastic vials. Each preparation was equilibrated for 30 min at 25 °C. Next, each preparation was transferred to a disposable cuvette for size evaluation and, afterwards, to a DTS1070 cell (Malvern Instruments) for zeta potential measurement, considering water viscosity and refraction index of 0.8872 cP and 1.330, respectively [36]. Quantifying peptide partition from the aqueous media to lipid bilayers reports the extension of the interaction. This was carried out according to the method proposed by Freire et al. (2011) [36]: $\frac{\zeta_{\text{final}}}{\zeta_0} = 1 + \frac{X_L z_{\text{pep}}}{f_{\text{PL}} [L] z_{\text{lip}}}$. [P] where z_{pep} and z_{lip} are the net charges of peptide and lipids, respectively; ζ_{final} and ζ_0 are the zeta potential values obtained, respectively, at each peptide concentration and in the absence of peptide; X_L is the molar fraction of bound peptide; [L] and [P] the lipid and peptide concentrations, respectively; and f_{PL} the fraction of anionic phospholipids in the vesicles. From this relation X_L is determined and partition constant (K_P) can be calculated from $X_L = \frac{K_P \gamma_L [L]}{1 + K_P \gamma_L [L]}$ [37].

2.4.4. Dye leakage

CF leakage experiments were performed using the Perkin Elmer LS45 spectrofluorometer (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK), at 25 °C, with LUVs as previously described [35]. The percentage of CF release was calculated using the following equation: % leakage = $100 \times (F - F_0)/(F_{100} - F_0)$, where F is the observed fluorescence intensity, F_0 and F_{100} correspond, respectively, to the fluorescence intensities in the absence of peptides and to 100% leakage, as determined by the addition of 20 μl of 10% Triton X-100 solution. F_{100} has been corrected for the corresponding dilution factor.

2.4.5. Circular dichroism (CD) measurements

CD spectra were acquired for 20 μM peptide in buffer, in 40% TFE and 8 mM SDS solution and in the presence of 100, 200 and 300 μM LUV suspension in the different lipid compositions. Spectra were recorded from 260 to 200 nm with a Jasco-815 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan), at 25 °C, using a 0.5 cm cell path length, averaged over eight scans, at a scan speed of 50 nm/min, bandwidth of 1.0 nm, 0.5 s response and 0.1 nm resolution. Following baseline correction, the observed ellipticity (θ (mdeg)) was converted to mean residue ellipticity ($[\Theta]$ (deg cm^2/dmol)) using the relationship $[\Theta] = 100\theta/(l c n)$, where l is the path length in centimeters, c is peptide millimolar concentration, and n the number of peptide bonds. Contents of secondary structure elements were estimated by CDSSTR program on the DICHROWEB online server.

2.4.6. NMR spectroscopy and molecular modeling

The lyophilized peptide was dissolved in 550 μl of a 30% trifluoroethanol (TFE) perdeuterated aqueous solution (5% D_2O) to yield a concentration of 2.1 mM. After solubilization, small amounts of HCl solution was added until pH = 5.1. All two-dimensional ^1H -NMR experiments were carried out on a Varian Unity 600 spectrometer operating at 599.887 MHz for ^1H frequency, at 298 K. The proton chemical shifts were referenced to 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, DSS (0.00 ppm). All two-dimensional experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the States method. The spectra width was typically 6.6 kHz. Detailed information on spectra analysis and molecular modeling are supplied as SI [38–42].

3. Results

3.1. Design of DecP-11

As described in SI, molecular dynamics simulations of peptides PH-1, TB and DCN indicated the predominance of the α -helical pattern (Figure S11) with significant differences among them in the stability and

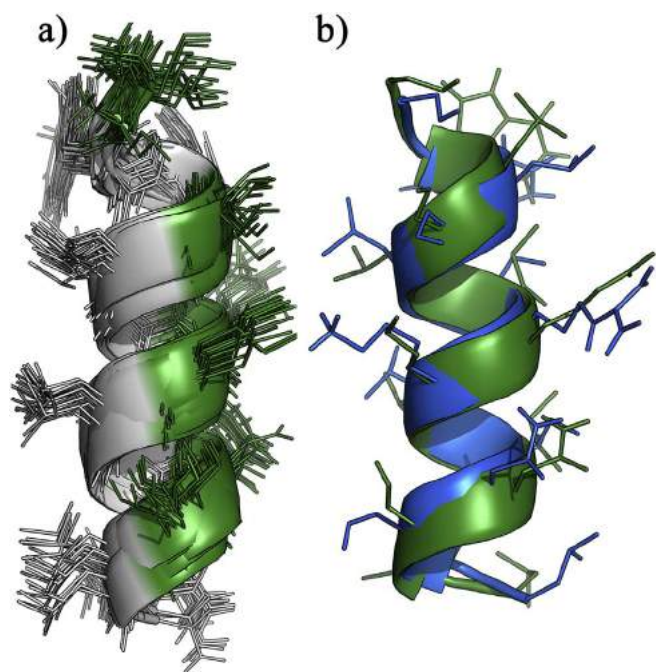


Fig. 1. NMR and MD structures of DecP-11. a) Superposition of final 20 calculated structures of the peptide in 30% TFE at 298 K, pH 5.1, displaying the backbone and the hydrophobic amino acids in gray and the polar in green. b) Overlay of a representative structure obtained from NMR (in green) and that obtained in MD experiments (in blue). The C-terminals are shown at the bottom.

length of the helical stretch (Table S12). Considering the features of the peptide exhibiting the lowest inhibitory concentration (IC_{50}) in the antileishmanial activity on promastigotes [11], PH-1, and those of DCN, which exhibited a closer structure (Figure S12a), small sequence modifications were made to DCN, considering also the features of TB. Then, simulations were successively performed until DecP-11 was obtained.

Cyclic peptides have been considered more active than their linear counterparts and could help to understand influences of the secondary structure [43]. Thus, we simulated and tested a cyclic Decoralin (c-Dec), whose features are included in Table S12 and Figure S11. As a consequence of losing the amidation of the C-terminal, c-Dec has a lower charge than DCN and does not exhibit an amphipathic structure (Figure S11).

3.2. NMR spectroscopy

The structure of DecP-11 was experimentally determined in 30% TFE solution to verify if the designed characteristics could be obtained. Sequential resonance assignments were performed based on the combined use of two-dimensional TOCSY and NOESY. Table S13 displays the 1H -NMR chemical shifts. For the molecular modeling, 209 distance constraints containing 64 medium range constraints were collected and taken into account for structure calculation using UNIO. Along this refinement the Target Function evolved from $18.92 \pm 0.04 \text{ \AA}^2$ to $2.12 \pm 0.34 \text{ \AA}^2$ and the backbone RMSD from $0.26 \pm 0.18 \text{ \AA}$ with no NOE violation $> 0.2 \text{ \AA}$. The 20 structures were energy minimized using the Gromacs program to reach 10.0 kJ/mol. After minimization, the bundle of structures was used to represent the solution three-dimensional structure of DecP-11 in 30% TFE at 298 K and pH 5.1. It shows an average content of 77.5% of α -helix configurations and the set of most frequent structures (12/20) exhibit 11 residues (79%) in this configuration. Table S14 shows the statistics of the structure calculation and Ramachandran statistics for the final structures showing 100% of ϕ and ψ angles in the most favored region. These experimental data were deposited at BMRB under ID 27060. Also, comparing the RMSD values

of the representative bundle of DecP-11 structures, (Table S14, 0.26 \AA for the backbone and 0.57 \AA for all heavy atoms), with those obtained for the peptide DCN, (0.33 \AA e 0.69 \AA respectively [32]), indicate that the designed peptide presents less flexibility than its parent analog.

The amphipathic property of DecP-11 can be seen by the colored structure with the K, R, S and N in green, at one side of the peptide and I, L and W, in grey, at the other side, as displayed in the superposition of the 20 final models of DecP-11 (Fig. 1). We also compared the NMR bundle of 20 structures with a representative MD structure, which showed good agreement. The average RMSD value between them is 0.98 \AA for the backbone and 2.41 \AA for all atoms, considering backbone fitting. Table S12 also shows a good agreement between simulated structures and those experimentally obtained.

3.3. Antileishmanial activity and cytotoxicity of peptides

The antileishmanial activity of DCN, its analog c-Dec and DecP-11 was assayed in promastigotes and intra-macrophage amastigotes (Table 2). DCN and DecP-11 showed IC_{50} values of 76 and $114 \mu\text{M}$ against *L. infantum* promastigotes, and CC_{50} value of 62 and $18 \mu\text{M}$ against NCTC mammalian cells, respectively. Miltefosine was used as a standard drug and resulted in IC_{50} value of $16 \mu\text{M}$ against promastigotes and intracellular amastigotes, with CC_{50} value of $241 \mu\text{M}$. The peptides DCN and DecP-11 are non-selective as they showed no activity against the intracellular amastigotes and toxicity against the macrophages. The c-Dec analog was completely devoid of activity toward these cells and no toxicity was observed to macrophages.

Table 2

Biological activity of DCN, DecP-11 and c-Dec peptides.

Compound	<i>L. (L.) infantum</i> promastigotes	<i>L. (L.) infantum</i> amastigotes	NCTC
	IC_{50}^a (μM)	IC_{50}^a (μM)	CC_{50}^b (μM)
	CI95%	CI95%	CI95%
DCN	76.2 (67.33 – 86.20)	NS	62.4 (39.75–98.09)
DecP-11	114.7 (100.3 – 131.1)	NS	18.0 (13.87–23.56)
c-Dec	NA	NA	> 200
Miltefosine	16.7 (13.07–21.52)	16.4 (15.45–17.46)	241.4 (206.9–281.6)

CI95%: 95% confidence interval. NA: Not active ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$); NS: Not selective.

^a IC_{50} : 50% inhibitory concentration.

^b CC_{50} : 50% Cytotoxicity concentration.

3.3.1. Plasma membrane permeabilization assays in *L. (L.) infantum* promastigotes

The permeabilizing activity of peptides DCN and DecP-11 was assessed by the measurement of the fluorescence of the Sytox Green dye. The entrance of this dye requires severe damage to the plasma membrane due to its relatively high molecular weight ($M_w = 600 \text{ Da}$). Once it achieves the cytoplasm, it binds exclusively to the nucleic acids enhancing its fluorescence. For both peptides, the rapid influx of Sytox Green, leading to increased fluorescence, could be measured immediately after the addition of peptides. At 90% inhibitory concentration, IC_{90} , the fluorescence intensity of DecP-11 was comparable to that achieved in promastigotes, when they were completely permeabilized by the treatment with a 0.1% Triton X-100 detergent solution. In contrast, DCN increased the fluorescence at a lower rate, reaching 64% of the maximum intensity of the control (Fig. 2).

3.4. Assays in mimetic membranes

Aiming to improve our designing technique based on MD simulations, to obtain a deeper insight into the structure-function

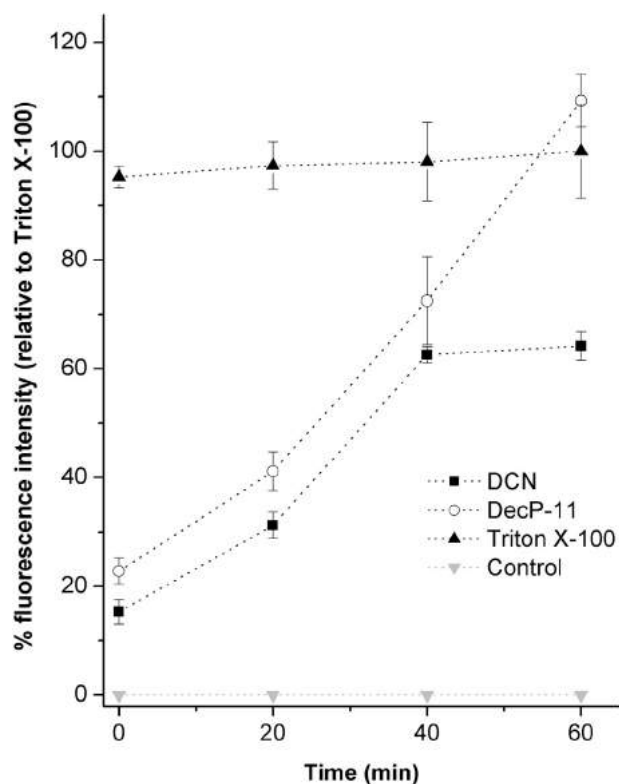


Fig. 2. DCN and DecP-11 (200 μ M) plasma membrane permeabilization of *L. infantum* promastigotes. The entrance of Sytox Green dye was monitored by the increase of its fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 520 nm) during 1 h incubation with the peptides. Triton X-100 was used to achieve maximum permeabilization.

relationships of the designed peptides in comparison to the synthetic DCN, and to search for the reason of the lack of selectivity of DecP-11, experiments with lipid vesicles mimicking the membranes of the promastigote, of the infected macrophage and of erythrocytes were carried out. Since these mimetic systems are composed by three or four different phospholipids, a set of simpler LUVs made of two phospholipids was also used to study their influence on the binding of the peptides.

3.4.1. Zeta potential and size measurements

To quantify the interaction of peptides with lipid bilayers, zeta potential measurements were performed and using the mathematical model proposed by Freire et al. (2011) [36] the lipid/water partition constants (K_p) were calculated. Fig. 3 depicts the adsorption isotherms of peptides to PEPSErg vesicles, considering the peptide concentration range in which no signs of vesicles aggregation were observed. DecP-11 exhibits the more efficient charge neutralization, especially on infected macrophage mimetic membrane. DCN did not reach charge neutralization in the promastigote mimetic membrane and c-Dec shows the lowest binding. Fig. 4 compares the K_p values determined for the anionic bilayers.

Considering that DCN and DecP-11 have the same net charge and a relatively small difference in relation to their mean hydrophobicity, we investigated the influence of the anionic character of the bilayers by determining K_p values in the presence of increasing concentrations of PS and by substituting PS by PG. The increase in PS content showed poor effect on the peptides' binding to these vesicles. Changing the anionic phospholipid to PG significantly increased the binding of DCN, but not the binding of DecP-11. Additionally, we tested the effects of changing PE by PC, which showed a similar trend, this means a significant increase in DCN binding and a limited effect on the binding of DecP-11. However, for vesicles containing PE, when we reduced the content of PS, K_p values significantly decreased for DecP-11 and had a limited effect on the binding of DCN. Then, we compared these results with K_p values obtained with vesicles

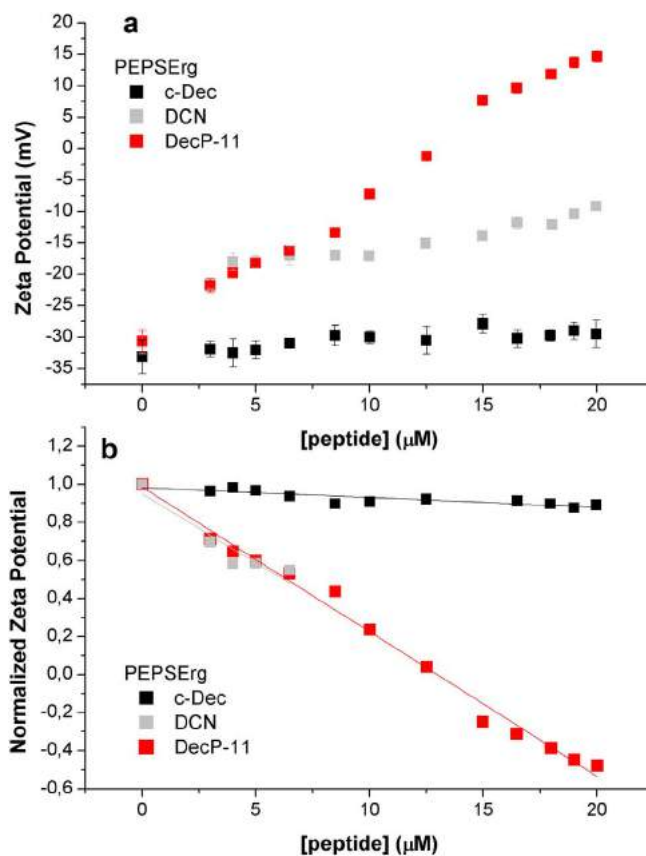


Fig. 3. Zeta potential isotherms and graphical method to determine the partitioning (K_p) of peptides in LUVs, at 25 °C. a) Examples of isotherms of the peptides, for DCN (gray) and DecP-11 (red) at 50 μ M vesicles concentration and for c-Dec (black) at 33 μ M LUVs. b) Example of the graphical determination of K_p .

containing Erg, mimicking the promastigote membranes. This sterol seems to have a limited effect on the peptides' binding. We also evaluated the peptides' binding to vesicles mimicking infected macrophage membranes: K_p values for DCN remained at a comparable level with PC/PS 82:18 vesicles (same anionic content), but for DecP-11 a significant decrease was observed. The cyclic peptide, c-Dec, exhibited a poor binding to the vesicles mimicking promastigote and infected macrophages, well correlated to the results obtained in the bio-assays. Fig. 4 summarizes these results. The determined K_p values are of the same order already found for other antimicrobial peptides with different lipid bilayers, inclusive by different methods [37,44].

As a general trend, K_p values denote more intensive interaction of DecP-11 with the different bilayers than DCN, except for PE/PS 72:28 and PE/PS/Erg 47:28:25, where both peptides bind at equivalent levels. Overall it suggests that besides the electrostatic interactions other physical-chemical features of the zwitterionic phospholipids influence binding.

The changes in the size of vesicles induced by the presence of peptides could indicate aggregation tendencies or a detergent-like mechanism of action. We observed that c-Dec does not induce changes in size of vesicles in any of the compositions of the bilayers tested (data not shown). However, DCN induces significant aggregation on PE/PS 50:50, PE/PS 72:28 and PE/PS/Erg, corresponding to the presence of higher concentration of anionic lipids together with PE. DecP-11 induces the highest aggregation in the presence of these LUVs, although some less intense changes also occur in the remaining environments, except with PC/PS 82:18 vesicles (Fig. 5).

3.4.2. Lytic activity

The permeabilization of lipid vesicles is an important feature of the mechanism of action of some peptides, which target the phospholipid

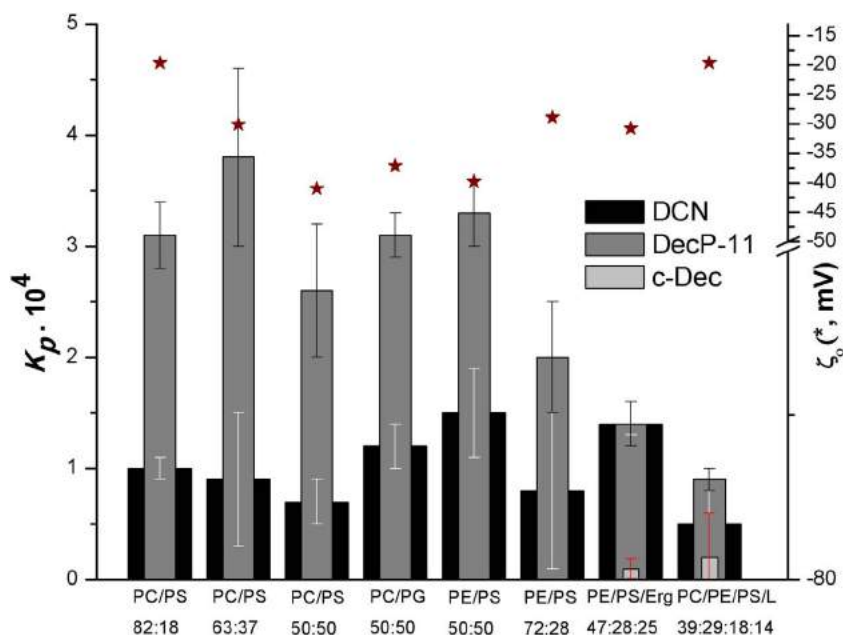


Fig. 4. Calculated partition constants (K_p) for DCN, DecP-11 and c-Dec values, shown as black, gray and light gray bars, respectively, from zeta potential measurements (ζ_0 , mV) to vesicles of different lipid compositions, at pH 7.5, 25 °C. (*) indicate the zeta potential of vesicles in the absence of peptides (right y-axis).

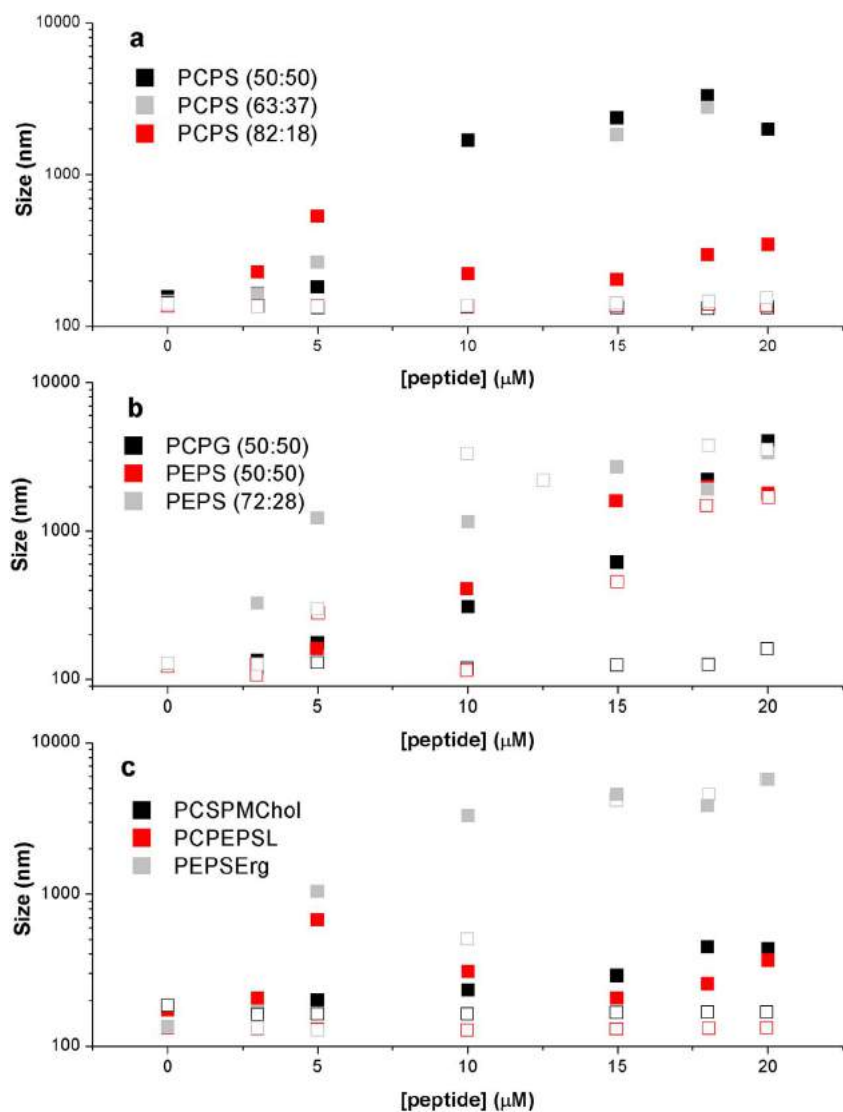


Fig. 5. Size variations of the different LUVs compositions induced by peptides at 25 °C. a) Effect of PS concentration; b) Effect of PE and PG lipids; c) Zwitterionic and anionic mimetic membranes. DCN, open symbols, DecP-11, closed symbols. Error bars were removed for clarity; they range around 18 nm.

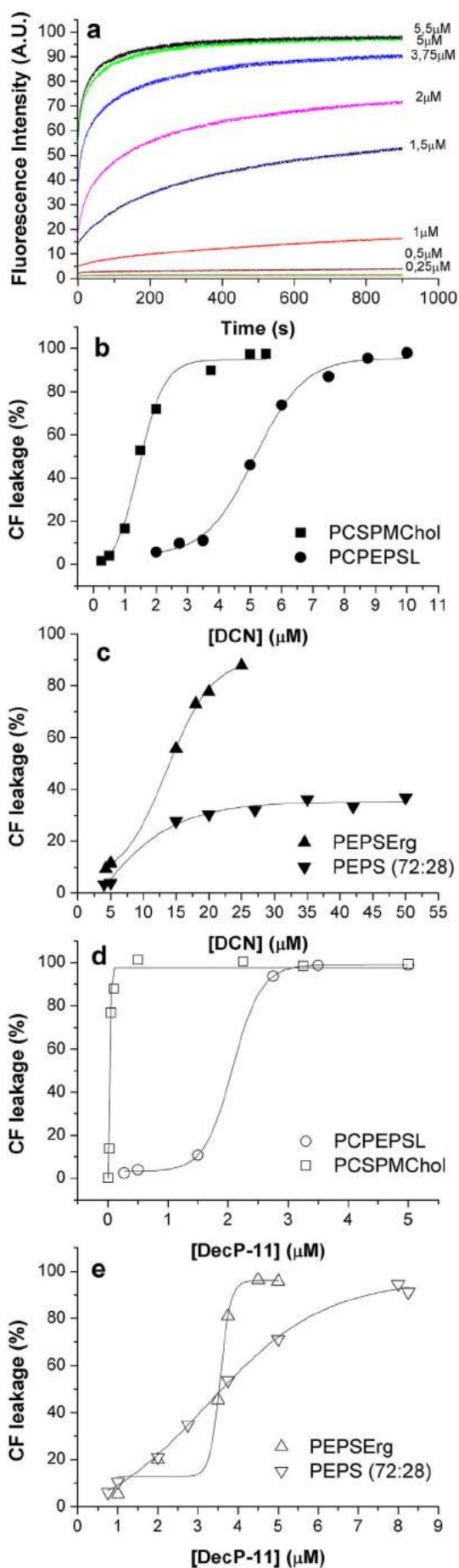


Fig. 6. Lytic activity of peptides observed after 15 min contact with 100 μM LUVs, at 25 $^{\circ}\text{C}$. Dose response curves were fitted according to the sigmoidal Boltzmann model. a) Kinetics of DCN in PCSPMChol, shown as an example. Dose response curves of peptides in PCSPMChol and PCPEPSL. b) DCN and d) DecP-11. Dose response curves of peptides in PEPSErg and PEPS. c) DCN and e) DecP-11.

matrix of the cell membrane and induce pores or defects in these membranes. Fig. 6 demonstrates that DCN and DecP-11 are lytic to PEPSErg, PCPEPSL and PCSPMChol and PEPS, while c-Dec (plots not shown) is not lytic probably due to its poor binding to the same vesicles, as indicated by the zeta potential experiments. DecP-11 presents the most intense lytic activity, reaching almost 100% CF leakage with 5 μM peptide or less. Some of dose-response curves of this peptide and DCN exhibit a sigmoidal dependence with the concentration of peptides $[P]$ and a threshold ratio with the lipid concentration $[L]$, $[P]/[L]$, can be inferred. Threshold $[P]/[L]$ in PEPSErg and PCPEPSL are for DCN 0.063 and 0.029, respectively and for DecP-11 are 0.028 and 0.017 in the same vesicles. In the presence of the zwitterionic PCSPMChol $[P]/[L]$ is 0.007 for DCN. The dose response curve for DecP-11 in this zwitterionic vesicle does not show a sigmoidal dependence as well as the dose response curves for both peptides in PEPS 72:28. It is important to mention that the intense lytic activity was already observed below and around 5 μM peptide and at this point the aggregation of vesicles was limited.

Comparing DCN and DecP-11, differences are limited to higher DCN concentration required to achieve the same lytic activity. Both peptides do not exhibit a selective behavior (Fig. 6b and d). Analyzing the activity of these peptides in promastigotes model systems (Fig. 6c and e), they also show a similar lytic behavior. Since the content of the anionic phospholipid PS is the same in PEPSErg and PEPS 72:28, we could attribute the increased lytic activity in the former model either to the presence of ergosterol or to the lower content of PE. Taking into account the respective K_p values, the latter possibility seems to be more probable.

3.4.3. Circular dichroism spectroscopy

CD experiments were performed in 40% TFE solution, in the presence of SDS micelles and of different LUVs. Figure SI3 shows that in buffer DCN and DecP-11 exhibit different spectra: the spectrum of DCN is compatible with random coil structure while that of DecP-11 shows helical characteristics with stronger absorption around 222 and 208 nm. The remaining different environments, either anionic or zwitterionic, induce structure changes in both peptides, most of them also featuring a helical pattern. In general, DecP-11 displays higher molar ellipticity ($[\Theta]_{222\text{nm}}$) than DCN, which indicates increased binding revealed in K_p determinations. Table 3 summarizes the contributions of several secondary elements to the obtained spectra. The results obtained in TFE solution are in good accordance with the structure profile determined in the NMR experiments, which showed 11 residues in α -helix. Although the different LUVs compositions have limited effects on DecP-11 binding, the presence of PC seems to favor intense helical conformations while the presence of PE, in the absence of PC, favor the aggregated forms as indicated in the β -strand contents (Table 3).

Some spectra also exhibit lower mean residue ellipticity values at 222 nm than at 208 nm, ($[\Theta]_{222\text{nm}} < [\Theta]_{208\text{nm}}$), a feature attributed to an aggregation tendency of the peptides in those environments [45]. This tendency was observed for DCN in PEPSErg and for DecP-11 in PCSPMChol. In the presence of PEPSErg and PEPS 72:28 LUVs, DecP-11 exhibit a much noisier and less characteristic spectra than observed in the remaining conditions (Figure SI3, inset). As the deconvolution applied to these spectra indicated a high content of β -strand, we assumed that intense peptide aggregation is occurring, which agrees with the significant LUVs' size increase (Fig. 5b and c). Comparing these spectra with those previously described for different kinds of β -strand structures [46], we found that in the presence of PCPEPSL LUVs the spectrum resembles that of anti-parallel β -strands, while in PEPS it seems that a mixture of anti-parallel and parallel β -strands coexist. These are denoted by their more intense absorption bands at approximately 227 nm and a wider range, from 230 to 210 nm, respectively.

Table 3

Contributions of the secondary structure elements to the spectra, as calculated from DICHROWEB [47] for DCN and DecP-11 in the different environments.

%	α -helix		β -strand		Turns		Random	
	DCN	DecP-11	DCN	DecP-11	DCN	DecP-11	DCN	DecP-11
Buffer	5	68	36	2	14	10	44	20
40% TFE	68	69	5	5	8	9	19	17
8 mM SDS	45	75	16	6	10	12	29	7
PCSPMChol ^a	17	71	29	5	10	11	44	13
PCPEPSL ^a	57	68	20	11	5	10	18	11
PEPSErg ^a	48	3	19	45	11	18	22	34
PEPS 72:28 ^a	38	7	14	38	12	13	36	42

^a [LUVs] = 300 μ M;

4. Discussion

The unusual features of the amastigote cell surface is one of the obstacles to the development of drug candidates against *Leishmania* [17]. The pathogen has the ability to develop mechanisms that bypass its host defensive barriers [48], including the acquisition of some of the host lipids and the expression of specialized molecules on the cell surface considered determinants of virulence [17]. In this sense the role of membrane in the interaction between the parasite and the host could be seen as a focal point for drug targeting [49].

Insect secretions represent an abundant pond where peptides have evolved with time and can be prospected. Antimicrobial peptides combine features for an interesting antileishmanial drug candidate, as membrane internalization – that would enable direct killing of the amastigote – and low propensity for resistance development [50]. Peptides isolated from different sources as amphibians [11,36], insects [20], and marine organisms [51] have shown antileishmanial activity. These peptides presented potent activity at micromolar concentrations, but often accompanied by hemolytic activity [23,45,52]. Thus, new analogs have been designed by several approaches, including the combination of part of sequences of very active peptides from different species, in an attempt to add functionalities and subtract undesirable effects. This approach seems promising as exemplified by CA(1–8)M (1–18), a hybrid peptide with higher activity on *Leishmania* than cecropin A without the hemolytic activity of melittin [52], its parental peptides.

In this work we designed peptides based on structural parameters, as obtained from MD simulations, from PH-1, TB and DCN, peptides that showed antileishmanial activity. The alternative, DecP-11, that exhibits structural parameters closer to those of the most active peptide was synthesized and analyzed by NMR. It was further tested for its antileishmanial activity in comparison to DCN and its cyclic version, c-Dec. The designing of DecP-11 based on MD simulations showed good agreement with the NMR determined structures with RMSD value of 2.17 Å for all atoms.

DCN, c-Dec and DecP-11 were then analyzed for their cytotoxicity against NCTC cells and their antileishmanial activities against *L. infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. In relation to miltefosine, DCN and DecP-11 showed, respectively, 4- and 13-fold higher mammalian cytotoxicity and decreased antileishmanial activity, 22% and 15% that of the control drug, while the cyclization of DCN totally abolished these activities. Cyclization had been described to improve the biological activity of linear peptides by promoting intramolecular hydrogen bonds and restricting conformations that increase membranolytic activities [45,53]. However, the cyclization of the DCN caused a severe loss of its binding capacity to mimetic membranes regardless the lipid composition. Similar effects were found for magainin 2 and melittin, since cyclization significantly reduced their affinity to zwitterionic phospholipid membranes and to a lesser extent to the negatively charged ones [43]. Cyclization reduced the net charge of c-Dec compared to DCN and abolished its amphipathic structure (Figure SI1),

probably determining a significant loss of its binding capacity and thus impairing the biological activity. Indeed, amine N-H groups in cyclic peptides are thought to have a special function correlated with the number of intramolecular hydrogen bonding and membrane diffusion rates [53]. However, in the particular case of c-Dec, MD simulations indicated that intramolecular H-bonds are not stable and that the area inside the peptide ring is large enough ($7.62 \times 6.24 \text{ \AA}^2$) to accommodate water molecules, which hydrogen bond to the N-H and C-O groups.

DCN had already been tested for its antileishmanial activity against *L. major* promastigotes exhibiting IC₅₀ of 11 μ M and hemolytic activity in human erythrocytes with EC₅₀ of 79 μ M [20], which is equivalent to the CC₅₀ concentration on NCTC cells presently determined. In many instances, the antileishmanial activity seems to be dependent on the *Leishmania* species. In our study, the *L. infantum* promastigotes were almost 7 times less susceptible than *L. major* under effect of DCN [20]. Differential inter-species susceptibility is expected, considering the pathogens high metabolic variance and their abilities to survive in distinct host tissues producing different pathogenicity, particularly cutaneous leishmaniasis to *L. major* or visceral leishmaniasis to *L. infantum* promastigotes [54].

The intracellular influx of Sytox green dye caused by DCN and DecP-11, likewise observed for Temporins (tested against *L. donovani* promastigotes) [24], indicates a typical effect of peptides targeting the membrane [22,24,36]. Unexpectedly, DecP-11 showed a more potent permeabilization effect than DCN on promastigotes. This finding suggests different binding, and/or membrane perturbation characteristics, or even the involvement of other events besides those related to the membrane barrier function [1], which lead us to investigate peptide-lipid bilayers interactions.

In terms of cationicity, DCN and DecP-11 possess the same charge therefore electrostatic forces guiding the attraction can be ruled out. However, the binding potential of DecP-11 is higher than that of DCN, around 2- to 3-fold, in all kinds of model membranes tested, except in PEPSErg, the promastigote mimetic membrane (Fig. 4), although showing in every case a lower threshold [P]/[L] ratio. The calculated mean hydrophobicity of both peptides is comparable, however investigating their respective retention times on RP-HPLC, we found that DecP-11 requires a higher content of hydrophobic solvent to elute, corresponding to a more hydrophobic compound [55]. Generally speaking, differences in the binding potential and lytic activity between DCN and DecP-11 could be attributed to the increased hydrophobic character and longer chain length of the latter peptide. Nevertheless, the faster dye intracellular influx of DecP-11 shown in promastigotes is probably determined by an additional factor, the higher content of aggregated forms. Within experimental error, variation in phospholipid composition and of the anionic character little affects the binding capacity of both peptides. This excludes the possibility of different binding potential and suggests that other contributions beyond the electrostatic interaction are more significant for their biological activity (Fig. 4).

This is particularly true for electrically neutral membranes where the reduced charge leads to the higher relevance of the hydrophobic interactions [1] as indicated by the high cytotoxicity of DecP-11 toward NCTC line cells and the hemolytic activity of DCN [20]. Also, the trend exhibited in the threshold $[P]/[L]$ ratio of the model systems, which show lower values for the less charged LUVs, indicates that the lytic activity is mainly influenced by the hydrophobicity of the peptides. In agreement, DecP-11 showed the most intense lytic activity on zwitterionic LUVs, mimicking erythrocytes, well correlated with its higher cytotoxicity toward NCTC cells, while DCN showed a lower cytotoxicity and lower lytic activity. Peptides able to lyse red blood cells are those presenting high helicity and high permeabilizing efficiency on zwitterionic membranes [1]. Higher helicity and higher hemolytic activity are characteristics found for bombinin H4 in relation to bombinin H2 [23].

DecP-11 was generated from PH1, TB and DCN, from which just DCN exhibits some hemolytic activity [20], while the others are non-hemolytic [56,57]. PH1 has positively charged residues at positions 7, 17 and 18, TB at position 10 and DecP-11, following DCN, at positions 7 and 8. The four peptides are amidated at the C-terminal meaning that they all have another positive charge at the N-terminal (Table 1). Thus, PH1 and TB have well distributed charges, while DCN and DecP-11 do not. Additionally, we observed that their CD spectra in water are predominantly characteristic of random coil conformation (data not shown), but while DCN maintains this conformation in buffer, DecP-11 exhibits a markedly helical pattern (Figure S13). As thermodynamic studies showed that helix formation involves a significant portion of the interaction energy of magainin 2 with lipid bilayers [43], we checked if this structural feature of DecP-11 would be responsible for the intense lytic activity on the zwitterionic vesicles, by repeating the experiment in the presence of enough urea solution to avoid the pre-formed helical structure. We found that the lytic activity is not influenced by the peptide starting the interaction either at a random coil or at a helical conformation (Figure S14). These structurally related observations suggest that the charged residues of DecP-11, concentrated in the middle of the chain and easily screened by the saline buffer, facilitate stronger hydrophobic interactions with the acyl chains of phospholipids. While this feature increases the lytic activity on zwitterionic LUVs and the hemolysis, it also might prevent the peptide to reach intracellular targets as would be the case with amastigotes inside macrophages [58].

Peptides strongly bound to the bilayer might require much higher concentrations to kill parasites and these concentrations would be cytotoxic to mammalian cells, abolishing selectivity. Neither DecP-11 nor DCN showed selectivity toward the *L. infantum* forms relative to mammalian cells. Actually DCN was as active toward promastigotes as toward NCTC cells and DecP-11 was much more active toward NCTC cells (Table 2). Important differences between the membrane lipid composition of amastigotes and promastigotes as lower content of metalloproteinase Gp63 and strongly reduced anionic lipophosphoglycan coat [17,59] prompt the idea that amastigotes would be more peptide-sensitive than promastigotes. In practice, *Leishmania* amastigotes have proven more resistant than promastigotes to several peptides [22,59]. In this concern, it must be kept in mind that amastigotes have a lower cationic character and are localized inside an acid parasitophorous vacuole. Therefore, besides the decreased electrostatic attraction, the peptide has to cross another membrane and be competent in a highly acid environment [60].

Considering the mimetic systems of promastigotes and infected macrophages, DCN and DecP-11 strongly bind and are lytic to them (Fig. 4 and 6), exhibiting more intense permeabilization in the latter model. Binding is less pronounced in the more complex models than in the simpler two-components LUVs, but both peptides are less lytic on PEPS 72:28. In the presence of these LUVs the dose-response curves do not exhibit sigmoidal dependence, suggesting differences in their mechanisms of lysis, which possibly reflect the aggregation process

indicated in the DLS and CD experiments.

The α -helix conformation of bioactive peptides, a secondary structure acquired by their interaction with membranes, has been correlated with biological activity [1,2]. CD experiments determined that the α -helix was the main pattern adopted, except for DecP-11 in the presence of *Leishmania* promastigote mimetic membranes and the simpler model PEPS 72:28. DCN and DecP-11, respectively with 11 and 14 residues in the chain and exhibiting no signs of kinks in the MD and NMR experiments, probably do not form intramolecular β -strands. Thus, we assume that the spectra deconvolution indicating these structures are probably the result of intermolecular interactions favored by some LUVs compositions, especially those containing PE and PS. Light scattering experiments also show that DCN induces aggregation on PE/PS 50:50, PE/PS 72:28 and PE/PS/Erg, corresponding to the presence of higher concentration of anionic lipids together with PE. DecP-11 induces the highest aggregation in the presence of these LUVs (Fig. 5) and presents the highest β -strand content (Table 3). Despite the intense binding to promastigote mimetic membranes, the high content of β -strand structures in DecP-11 was probably crucial for its lower antileishmanial activity in relation to DCN, which shows much lower β -strand content (Table 3). In analogous peptides, whose structural differences modulate aggregation in the presence of membranes, the increased activity parallels their disassembly, as found for bombinins H2/H4 against *Leishmania* [22] and for dermaseptins against bacteria [61]. Peptides aggregated in β -strands may be impaired in their disturbing activity on membranes, or delayed to reach other targets in the *Leishmania* cells and thus exhibiting lower activity, as was the case in Gram-negative bacteria for oligomerized melittin [43].

PE is one of the major phospholipids in mammalian membranes that turn exposed in the outer leaflet of bilayers, together with PS, when cells are compromised [12,13]. And these lipids are abundant on promastigote, infected macrophages and amastigote membranes. DecP-11 shows strong binding affinity, regardless of the lipid composition of the model systems, and we showed that this does not simply depend on the electrostatic component involved, rather the presence of the aminophospholipids, PE and PS, exerts a specific role [14], inducing aggregation that negatively influenced the antileishmanial activity of the peptide at lower concentration.

5. Conclusion

In the present work, we validated by NMR the designed structure of DecP-11, an analog of DCN. DecP-11 exhibits antileishmanial activity toward *L. infantum* promastigotes and lacks selectivity toward mammalian cells. DecP-11 strongly partitions in anionic vesicles of different compositions and charge density at equivalent levels indicating that hydrophobic interactions prevail. It is lytic to promastigotes and to anionic and zwitterionic phospholipid vesicles. However, the shorter chain DCN, with similar partition coefficients and less intense lytic activity, shows lower IC_{50} value for promastigotes. This apparent contradiction could be explained considering the differences induced by the presence of the aminophospholipids PE and PS, in the absence of PC, in the secondary structure of DCN and DecP-11 and the observed aggregation behavior of DecP-11. In the environment mimicking the promastigote membrane, the helical DecP-11 assumes mostly β -strand structures and induces strong size increase of these vesicles. Peptides aggregated in β -strands may be impaired in their disturbing activity on membranes, or delayed to reach other targets in the *Leishmania* cells and thus exhibiting lower activity. Thus, the design of new antileishmanial peptides should attempt to avoid sequences that are prone to assume aggregated forms in the presence of aminophospholipids.

Author contributions

D.B.M., M.R.V., V.F., V.A.C.S., M.E.R.G and M.L.L performed the experiments. D.B.M., V.F., M.E.R.G, M.L.L. and A.G.T. analyzed the

data and interpreted the results. M.P.S.C designed the study. V.F., M.L.L., A.G.T. and M.P.S.C wrote the manuscript. All authors reviewed and discussed the results.

Funding

This study was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/24259-0 and 2014/08372-7 to M.P.S.C.; 2014/11877-3 to M.R.V.; 2015/17331-5 to V.A.C.S.; and 2013/50228-8 to AGT).

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

D.B.M, M.L.L and M.E.R.G. are PhD fellowship recipients from CAPES and CNPq. The authors acknowledge *The Brazilian Biosciences National Laboratory* (LNBio) for the NMR time under proposal RMN – 18763, Prof. Dr. Joao Ruggiero Neto for the use of the CD spectropolarimeter and Prof. Mauricio Boscolo for the use of the spectrofluorometer.

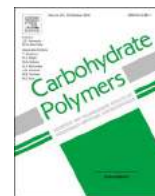
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.003>.

References

- M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 71–87.
- N. Papo, Y. Shai, Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* 24 (2003) 1693–1703.
- M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 27–55.
- M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389–395.
- M. Torrent, D. Pulido, L. Rivas, D. Andreu, Antimicrobial peptide action on parasites, *Curr. Drug Targets* 13 (2012) 1138–1147.
- A.K. Marr, B.S. McGwire, W.R. McMaster, Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides, *Future Microbiol.* 7 (2012) 1047–1059.
- S.L. Cobb, P.W. Denny, Antimicrobial peptides for leishmaniasis, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11 (2010) 868–875.
- Z. Raja, S. André, C. Piessse, D. Sereno, P. Nicolas, T. Foulon, B. Oury, A. Ladram, Structure, antimicrobial activities and mode of interaction with membranes of bovel phylloseptins from the painted-belly leaf frog, *Phyllomedusa sauvagii*, *PLoS One* 8 (2013) e70782, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070782>.
- M. Simmaco, G. Kreil, D. Barra, Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1551–1555.
- L. Rivas, J.R. Luque-Ortega, D. Andreu, Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1570–1581.
- S.A. Kückelhaus, J.R. Leite, M.I. Muniz-Junqueira, R.N. Sampaio, C. Bloch, C.E. Tosta, Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia), *Exp. Parasitol.* 123 (2009) 11–16.
- M.C. Larson, J.E. Woodliff, C.A. Hillery, T.J. Kearl, M. Zhao, Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 1501–1507.
- D.A. Phoenix, F. Harris, M. Mura, S.R. Dennison, The increasing role of phosphatidylethanolamine as a lipid receptor in the action of host defense peptides, *Prog. Lipid Res.* 59 (2015) 26–37.
- R.M. Eppard, C. Walker, R.F. Eppard, N.A. Magarvey, Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta* 2016 (1858) 980–987.
- K. Zhang, S.M. Beverley, Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 170 (2010) 55–64.
- K.S. Fernandes, P.E. Narcizo de Souza, M.L. Dorta, A. Alonso, The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1859 (2017) 1–9.
- T. Naderer, J.E. Vince, M.J. McConville, Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host, *Curr. Mol. Med.* 4 (2004) 649–665.
- C. Henriques, G.C. Atella, V.L. Bonilha, W. de Souza, Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*, *Parasitol. Res.* 89 (2003) 123–133.
- A. Mor, Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities, *FEBS J.* 276 (2009) 6474–6482, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07358.x>.
- K. Konno, M. Rangel, J.S. Oliveira, M.P. Dos Santos Cabrera, R. Fontana, I.Y. Hirata, I. Hide, Y. Nakata, K. Mori, M. Kawano, H. Fuchino, S. Sekita, J. Ruggiero Neto, Decoralin, a novel linear cationic alpha-helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*, *Peptides* 28 (2007) 2320–2327.
- M. Rangel, M.P. Dos Santos Cabrera, K. Kazuma, K. Ando, X. Wang, M. Kato, K. Nihei, I.Y. Hirata, T.J. Cross, A.N. Garcia, E.L. Faquim-Mauro, M.R. Franzolin, H. Fuchino, K. Mori-Yasumoto, S. Sekita, M. Kadowaki, M. Satake, K. Konno, Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps, *Toxicol.* 57 (2011) 1081–1092.
- M.L. Mangoni, N. Papo, J.M. Saugar, D. Barra, Y. Shai, M. Simmaco, L. Rivas, Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H, *Biochemistry* 45 (2006) 4266–4276.
- M.L. Mangoni, D. Fiocco, D. Barra, M. Simmaco, Bombinins in Handbook of Biologically Active Peptides, (2006), pp. 333–337 (chapter 50).
- M.L. Mangoni, J.M. Saugar, M. Dellisanti, D. Barra, M. Simmaco, L. Rivas, Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 984–990.
- M.L. Mangoni, Temporins, anti-infective peptides with expanding properties, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 1060–1069.
- M.D. Diaz, M. Fiorini, K. Burger, S. Berger, Evidence of complete hydrophobic coating of bombesin by trifluoroethanol in aqueous solution: an NMR spectroscopic and molecular dynamics study, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 1663–1669.
- M.K. Wassef, T.B. Fioretti, D.M. Dwyer, Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes, *Lipids* 20 (1985) 108–115.
- K. Lohner, E.J. Prenner, Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 141–156.
- M.V. Lizenko, T.I. Regeard, A.M. Bakhirev, E.I. Lizenko, Lipid composition of cells and low-density lipoproteins in blood serum of human and some vertebrate species, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 47 (2011) 428–437.
- D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.* 179 (1984) 125–142.
- H.S. Won, M.D. Seo, S.L. Jung, S.J. Lee, S.J. Kang, W.S. Son, H.J. Kim, T.K. Park, S.J. Park, B.J. Lee, Structural determinants for the membrane interaction of novel bioactive undecapeptides derived from gaegurin 5, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4886–4895.
- M.E.R. Guerra, V. Fadel, V.G. Maltarollo, G. Baldissera, K.M. Honorio, J.R. Ruggiero, M.P. Dos Santos Cabrera, MD simulations and multivariate studies for modeling the antileishmanial activity of peptides, *Chem. Biol. Drug Des.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12970>.
- J.Q. Reimão, F.A. Colombo, V.L. Pereira-Chioccolata, A.G. Tempone, Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *Exp. Parasitol.* 130 (2012) 195–199.
- E.G. Pinto, D.C. Pimenta, M.M. Antoniazzi, C. Jared, A.G. Tempone, Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol.* 135 (2013) 655–660.
- M.P. Dos Santos Cabrera, G. Baldissera, L.C. Silva-Gonçalves, B.M. de Souza, K.A. Riske, M.S. Palma, J.R. Ruggiero, M. Arcisio-Miranda, Combining experimental evidence and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide Jelleine-I, *Biochemistry* 53 (2014) 4857–4868 <http://dx.doi.org/10.1021/bi5003585>.
- J.M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 481–487, <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-010-0661-4>.
- N.C. Santos, M. Prieto, M.A.R.B. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 123–135.
- F.G.S. Delaglio, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 277–293.
- R. Keller, The computer aided resonance assignment tutorial, CARA Website, CANTINA Verlag, Goldau, 2004 (Available: <http://cara.nmr-software.org/portal/>).
- T. Herrmann, UNIO10-Automated NMR analysis for protein structure determination and more, Available at <http://www.unio-nmr.eu>, (2002).
- T.G.P. Herrmann, Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 209–227.
- A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 905–921.
- T. Unger, Z. Oren, Y. Shai, The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action, *Biochemistry* 40 (2001) 6388–6397.
- M.P. Dos Santos Cabrera, M. Arcisio-Miranda, R. Gorjão, N.B. Leite, B.M. de Souza, R. Curi, J. Procopio, J. Ruggiero Neto, M.S. Palma, 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 (2012) 4898–4908 <http://dx.doi.org/10.1021/bi201608d>.
- [45] S.E. Blondelle, B. Forood, R.A. Houghten, E. Perez-Payá, Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments, *Biopolymers* 42 (1997) 489–498.
- [46] A. Miconsaia, F. Wien, L. Kerna, Y. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *PNAS*, (2015), pp. E3095–E3103, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- [47] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 668–673.
- [48] S.J. Turco, A. Descoteaux, The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 46 (1992) 65–94.
- [49] R. Zufferey, S. Allen, T. Barron, D.R. Sullivan, P.W. Denny, I.C. Almeida, D.F. Smith, S.J. Turco, M.A. Ferguson, S.M. Beverley, Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44708–44718.
- [50] A.K. Marr, S. Cen, R.E.W. Hancock, W.R. McMaster, Identification of synthetic and natural host defense peptides with leishmanicidal activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 2484–2491, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02328-15>.
- [51] J.R. Luque-Ortega, L.J. Cruz, F. Albericio, L. Rivas, The antitumoral decapeptide IB-01212 kills *Leishmania* through an apoptosis-like process involving intracellular targets, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1608–1617.
- [52] D. Andreu, J. Ubach, A. Boman, B. Wählin, D. Wade, R.B. Merrifield, H.G. Boman, Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity, *FEBS Lett.* 296 (1992) 190–194.
- [53] T. Rezai, B. Yu, G.L. Millhauser, M.P. Jacobson, R.S. Lokey, Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2510–2511.
- [54] G.D. Westrop, R.A. Williams, L. Wang, T. Zhang, D.G. Watson, A.M. Silva, G.H. Coombs, Metabolomic analyses of *Leishmania* reveal multiple species differences and large differences in amino acid metabolism, *PLoS One* 10 (2015) e0136891.
- [55] T. Tachi, R.F. Epand, R.M. Epand, K. Matsuzaki, Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity, *Biochemistry* 41 (2002) 10723–10731.
- [56] J.R.S.A. Leite, L.P. Silva, M.I.S. Rodrigues, M.V. Prates, G.D. Brand, B.M. Lacava, R.B. Azevedo, A.L. Bocca, S. Albuquerque, C. Bloch Jr., Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus, *Peptides* 26 (2005) 565–573.
- [57] M. Simmaco, G. Mignogna, S. Canofeni, R. Miele, M.L. Mangoni, D. Barra, D. Temporini, Antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*, *Eur. J. Biochem.* 242 (1996) 788–792.
- [58] J.K. Ghosh, D. Shao, P. Guillaud, L. Ciceron, D. Mazier, I. Kustanovich, Y. Shai, A. Mor, Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31609–31616.
- [59] G. Eggmann, K. Sweeney, H.L. Bolt, N. Rozatian, S.L. Cobb, P.W. Denny, The role of lipophosphoglycan in the resistance of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides, *Molecules* 20 (2015) 2775–2785.
- [60] M. Vermeersch, R.I. da Luz, K. Toté, J.P. Timmermans, P. Cos, L. Maes, In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 3855–3859.
- [61] L. Gaidukov, A. Fish, A. Mor, Analysis of membrane-binding properties of dermaseptin analogues: relationships between binding and cytotoxicity, *Biochemistry* 42 (2003) 12866–12874.



Chitosan derivatives targeting lipid bilayers: Synthesis, biological activity and interaction with model membranes

Danubia Batista Martins^b, Fábio Domingues Nasário^a, Laiz Costa Silva-Gonçalves^c, Vera Aparecida de Oliveira Tiera^a, Manoel Arcisio-Miranda^c, Marcio José Tiera^a, Marcia Perez dos Santos Cabrera^{a,b,*}

^a Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Câmpus São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, SP, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Câmpus São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, SP, Brazil

^c Laboratório de Neurobiologia Estrutural e Funcional (LaNEF), Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu, 862, 04023-062, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Quaternized chitosan
Chitosan-lipid bilayer interaction
Hydrophobic/hydrophilic balance
Lytic activity
Antimicrobial and tumoricidal activities
Charge cluster mechanism

ABSTRACT

The antimicrobial activity of chitosan and derivatives to human and plant pathogens represents a high-valued prospective market. Presently, two low molecular weight derivatives, endowed with hydrophobic and cationic character at different ratios were synthesized and characterized. They exhibit antimicrobial activity and increased performance in relation to the intermediate and starting compounds. However, just the derivative with higher cationic character showed cytotoxicity towards human cervical carcinoma cells. Considering cell membranes as targets, the mode of action was investigated through the interaction with model lipid vesicles mimicking bacterial, tumoral and erythrocyte membranes. Intense lytic activity and binding are demonstrated for both derivatives in anionic bilayers. The less charged compound exhibits slightly improved selectivity towards bacterial model membranes, suggesting that balancing its hydrophobic/hydrophilic character may improve efficiency. Observing the aggregation of vesicles, we hypothesize that the “charge cluster mechanism”, ascribed to some antimicrobial peptides, could be applied to these chitosan derivatives.

1. Introduction

The demand for biodegradable and non-toxic antimicrobials is an increasing field of research for controlling plant pathogens and a variety of harmful microorganisms to human health. Chitosan has been one of the most studied polysaccharides for this purpose. To provide additional properties and applications to chitosan, the synthesis and characterization of new derivatives has been extensively explored through its functionalization with hydrophobic and hydrophilic groups (Benediktsdóttir, Gudjónsson, Baldursson, & Másson, 2014; Huo et al., 2010). Special attention has been given to its use in antimicrobial coatings (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010; Rabea, Badawy, Stevens, Smaghe, & Steurbaut, 2003), fungicides (Rabea et al., 2005; Radulescu et al., 2015), bactericides (Li et al., 2011; Seo, King, Prinyawiwatkul, & Janes, 2008), packaging materials (González-Aguilar et al., 2009), and

crop protection (Bautista-Baños et al., 2006). Regarding its antimicrobial activity, the mechanism of action is influenced by intrinsic parameters, such as the molecular weight, the degree of deacetylation, the amphiphilic nature, the chelating ability and the physical state (Kong et al., 2010). Also, its activity is dependent on the type of microorganism and other environmental conditions as pH and ionic strength (Kong et al., 2010; Rabea et al., 2003).

In general, the antimicrobial activity of plain chitosan is more effective at pH \ll 6.0 due to protonation of the amino groups, which provides water solubility and a positive charge density to the macromolecular chain, enabling stronger interactions with the cell membrane of the microorganisms (Kong et al., 2010). Although the exact mechanism of action is unknown, it is well accepted that this interaction may lead to the damage of the cell membrane and leaking of the intracellular constituents (Jung, Kim, Choi, Lee, & Kim, 1999; Xing, Chen,

Abbreviations: PC, egg-phosphatidylcholine; PG, egg-phosphatidylglycerol; PS, phosphatidyl-L-serine

* Corresponding author at: Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE, UNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses: danubiab4@hotmail.com (D.B. Martins), fabio.nasario@iqm.unicamp.br (F.D. Nasário), laizdacostasilva@yahoo.com.br (L.C. Silva-Gonçalves), verapoli@ibilce.unesp.br (V.A. de Oliveira Tiera), arcisio.miranda@unifesp.br (M. Arcisio-Miranda), mjt@ibilce.unesp.br (M.J. Tiera), cabrera.marcia@gmail.com, marciap@ibilce.unesp.br (M.P. dos Santos Cabrera).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.011>

Received 28 July 2017; Received in revised form 21 October 2017; Accepted 5 December 2017

Available online 06 December 2017

0144-8617/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Liu, Cha, & Park, 2009). The activity may occur even at low concentrations ($\ll 0.2 \text{ g L}^{-1}$) through the binding to negatively charged surface of the microorganisms, causing agglutination, while for higher concentrations the binding may also provide a positive surface maintaining the cells in suspension (Sudarshan, Hoover, & Knorr, 1992).

The molecular weight is considered one of the most important parameters for providing antibacterial and antifungal activity and has been extensively studied (Seyfarth, Schliemann, Elsner, & Hipler, 2008). However, the results found in the literature are controversial; they depend on the physical state (in solution or solid coating) and the type of fungi or bacteria used (González-Aguilar et al., 2009; Guo et al., 2008; Xing et al., 2008). For example, quaternary derivatives have been reported to exhibit good antifungal activities against *Botrytis cinerea* Pers. and *Colletotrichum lagenarium*, and the results indicated that high molecular weight derivatives were more efficient than the low ones (Guo et al., 2008). Also, high activity has been reported against *Candida* species and *Escherichia coli* for oligomeric chitosans (Kulikov et al., 2014).

Based on studies using phospholipid vesicles as model membranes it has been shown that the interaction of chitosan with large unilamellar vesicles resulted in positively decorated vesicles due to chitosan adsorption onto the membrane. It is suggested that the adsorption process involves both electrostatic and hydrophobic interactions (Quemeneur, Rinaudo, & Pépin-Donat, 2008). Moreover, alterations in the vesicles structure have been shown to take place by insertion of chitosan chains into the membranes (Fang, Chan, Mao, & Leong, 2001; Mertins, Cardoso, Pohlmann, & da Silveira, 2006; Mertins, Sebben, Pohlmann, & da Silveira, 2005).

To produce highly active derivatives against bacteria species, the attaching of hydrophobic groups (de Oliveira Pedro et al., 2013; Viegas de Souza et al., 2013) and biologically active moieties is an important strategy (Fernandez-Megia, Novoa-Carballeda, Quiñoa, & Riguera, 2007). The limitation of hydrophobic derivatives is mainly due to their poor aqueous solubility at neutral pH and quaternary derivatives seem to be a good alternative to overcome this limitation (Rúnarsson et al., 2010). We have previously shown that the interaction of chitosan and its *N*-dodecyl and poly(ethylene glycol) derivatives with 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine vesicles altered the gel–liquid crystalline phase transition temperature and decreased both the enthalpy and cooperativity of the phase transition (de Oliveira Tiera, Winnik, & Tiera, 2010). These results indicate that adsorption on vesicles surface and incorporation of these amphiphilic derivatives into the lipid bilayer could lead to vesicles disruption and reorganization (Mertins & Dimova, 2013).

Considering the importance of microbial membranes as the target for new drugs to avoid the rapid development of resistance mechanisms, we engineered cationic derivatives of chitosan with features that could profit from this advantage for new antimicrobial or antitumor agents. From highly deacetylated chitosans of low molecular weight we prepared compounds that were subjected to a reductive amination reaction with dodecylaldehyde, and subsequently quaternized with methyl iodide to provide solubility at neutral pH. Then, we assessed the antimicrobial activity toward Gram-positive and Gram-negative strains and the cytotoxicity toward human cervical carcinoma cells. The results obtained in the bio-assays lead us to investigate the interaction of the precursors and derivatives with model membranes of different lipid compositions that mimic bacterial (Lohner & Prenner, 1999; Matsuzaki, Sugishita, Fujii, & Miyajima, 1995), tumoral (Dobrzyńska, Szachowicz-Petelska, Sulkowski, & Figaszewski, 2005; Zwaal, Comfurius, & Bevers, 2005) and erythrocyte membranes (Lohner & Prenner, 1999). This novel and embracing approach helps to understand the mode of action underlying these activities of chitosan and derivatives, which are underexplored and neither clear nor easy to comprehend (Verlee, Mincke, & Stevens, 2017). Considering the hypothesis that the cationic charge of these compounds will make them target the anionic membranes, we determined their binding through zeta potential measurements. Then,

their ability to disturb the model membranes was evaluated by the lytic activity and changes of the lipid packing monitored in fluorometric experiments. Using dynamic light scattering we verified the clustering ability of the compounds. The results are discussed in relation to the degree of substitution of the derivatives, which impart different hydrophobic/hydrophilic features, and interpreted under the light of the mechanisms of action similarly proposed for cationic antimicrobial peptides as the charge cluster mechanism (Eband, Maloy, Ramamoorthy, & Eband, 2010). The high local density of cationic charges in chitosans clusters anionic phospholipids away from the zwitterionic ones, disturbing the barrier properties of the membranes, promoting leakage and also recruiting other vesicles for charge neutralization.

2. Experimental section

2.1. Materials

Chitosan, 85% DDA was purchased from Polymar Co., Fortaleza, Ceará, Brazil. Dodecylaldehyde, methyl iodide, sodium cyanoborohydride, deuterium chloride (35%) in deuterium oxide, deuterium oxide, 5,6-carboxyfluorescein (CF), diphenylhexatriene (DPH), cholesterol, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Egg L- α -phosphatidylcholine (PC) and egg L- α -phosphatidylglycerol sodium salt (PG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine sodium salt (PS) and cardiolipin (CL) were supplied by Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Dulbeccó's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and penicillin/streptomycin were purchased from Life Technologies (São Paulo, Brazil). SpectraPore membranes (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) were employed for dialysis. All solvents and reagents were of high quality analytical grade and used as received. Water was deionized or ultrapure.

2.2. Synthesis of the derivatives of chitosan

The synthesis is summarized in Fig. S11. The derivatives were synthesized using 98% deacetylated (by ^1H NMR) and degraded chitosan sample (CH2; Mw 12.0 kDa and Mw/Mn 1.34; Fig. S12a), which was obtained following a previously described procedure (Tiera et al., 2006). Shortly, CH2 was subjected to hydrophobic modification through reductive amination with dodecylaldehyde (Desbrières, Martinez, & Rinaudo, 1996), and the dodecylated derivative (CHDD) was quaternized as detailed elsewhere (Rúnarsson, Holappa, Jónsdóttir, Steinsson, & Másson, 2008).

To produce a derivative containing 20% dodecyl groups (CHDD20), 0.5 g of CH2 was dissolved in a mixture of 90 mL acetic acid 2% and 50 mL ethanol. The pH was adjusted to 5.7 and, while stirring, 0.15 mL of dodecylaldehyde dissolved in 20 mL ethanol was drop wise added to the reaction mixture. It was continuously stirred for 24 h at room temperature; sodium cyanoborohydride (6:1, $\text{NaCNBH}_3:\text{NH}_2$, mol mol $^{-1}$) was added after the first hour. Thereafter, the reaction mixture was precipitated by adding aqueous NaOH (1.0 mol L $^{-1}$), centrifuged, washed with water and methanol and dried at 50 °C for 24 h (Table 1). The quaternization using methyl iodide (Rúnarsson et al., 2008) was carried by dispersing 0.5 g of the CHDD20 in 25 mL DMF/water (50:50) under vigorous magnetic stirring. Based on the amino groups content of CHDD20, sodium hydroxide and methyl iodide were added to the solution at equivalent ratios of 3:1 and 6:1, respectively. Then, the mixture was stirred at room temperature and after 48 h the addition was repeated at the same ratio. This step was again repeated twice to generate CH30 and three times for CH50. The pH was monitored and maintained above 7.0 by addition of solid sodium hydroxide (Rúnarsson et al., 2008). The reaction mixture was dialyzed (using a membrane of 3500 g mol $^{-1}$ MWCO) against water for 5 days

changing the dialysis water twice a day. The product was freeze dried in a lyophilizer (Thermo Electron Corporation, USA), and subsequently purified in a Soxhlet system using chloroform to remove non-reacted dodecylaldehyde. The derivatives were characterized by ^1H NMR, recorded using a Bruker ARX-500 500 MHz spectrometer.

2.3. Preparation of chitosan and derivatives solutions

Chitosan derivatives (~1 mg) were dissolved in acetic acid 0.01 mol L^{-1} at the stoichiometric amount plus 10% excess considering the fraction of protonable amine groups. The solution was kept under stirring for at least 12 h at room temperature. This stock solution was diluted with equal volume of buffer, Tris-HCl 30 mM for the dye leakage experiments and biological tests or buffer citrate/phosphate ($10\text{ mmol L}^{-1}\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $10\text{ mmol L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $150\text{ mmol L}^{-1}\text{NaF}$) pH 5.5 for the biophysical experiments.

2.4. Bactericidal assay

The antimicrobial activity was assayed by the suppression of growth of *E. coli* (DH5 α strain, Invitrogen) and *S. aureus* (ATCC 25923) incubated with different concentrations of chitosan derivatives. Bacteria were grown in Luria-Bertani broth liquid medium to an OD_{600} of 0.3 ($240 \times 10^6\text{ CFU mL}^{-1}$). Samples were diluted to a concentration of $24 \times 10^6\text{ CFU mL}^{-1}$ and incubated for 3 h at 37°C with different concentrations of chitosan derivatives. Next, the OD_{600} of the samples was measured in a Spectrophotometer Hitachi U-2910 (Hitachi High Technologies, San Jose, USA) or in a FlexStation 3.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

2.5. Cell cytotoxicity

The cell toxicity was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction inhibition assay (Berridge & Tan, 1993). Human cervical carcinoma (HeLa) cells were cultured at 37°C in humidified air with 5% CO_2 in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol L^{-1} glutamine, 100 units mL^{-1} penicillin and 100 mg mL^{-1} streptomycin. The cells were plated at a density of 5000 cells per well in 96-well plates in $100\ \mu\text{L}$ of culture medium. The cells were incubated for 24 h with the desired concentration of chitosan derivatives. Next, $10\ \mu\text{L}$ of MTT (10 mg mL^{-1}) were added to each well. After 2 h, $100\ \mu\text{L}$ of DMSO were added to each sample that was incubated at room temperature until complete cell lysis. The absorbance of the formazan was measured at 570 nm in Ultra Microplate Reader EL 808 (Bio-Tek Instruments).

2.6. Self-association: determination of the Critical Aggregation Concentrations (CAC)

The aggregation properties of chitosan and derivatives were investigated using pyrene as a probe in a Cary Eclipse – Varian fluorescence spectrometer, at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Stock solutions were added to a citrate/phosphate buffered solution of pyrene ($5.0 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$; pH 5.5) under magnetic stirring, and fluorescence spectra were recorded after each addition. The ratio between the fluorescence intensities of peaks I (375 nm) and III (386 nm) of pyrene emission spectrum (I_1/I_3 ratio) was used to evaluate the polarity of the local environment and to determine the CAC (Vieira, Moscardini, Tiera, & Tiera, 2003). Pyrene was excited at 310 nm (slit 20 nm) and the emission (slit 1.5 nm) was recorded from 350 to 550 nm.

2.7. Large unilamellar vesicle (LUV) preparations

Lipid films at the desired composition were prepared by mixing aliquots of the stock solutions of phospholipids, evaporating the solvent under a gentle nitrogen flow, and further drying under vacuum for at

least 3 h. Then, films were hydrated with appropriate buffers (either 10 mmol L^{-1} Tris-HCl, $1\text{ mmol L}^{-1}\text{Na}_2\text{EDTA}$, containing 25 mmol L^{-1} CF, pH 7.4 for the CF-filled LUVs, or $10\text{ mmol L}^{-1}\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $10\text{ mmol L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $150\text{ mmol L}^{-1}\text{NaF}$, pH 5.5 in the biophysical experiments) and vortex mixed at room temperature rendering solutions around 10 mmol L^{-1} lipid concentration. The actual lipid concentration was confirmed by phosphorus analysis (Rouser, Fkeischer, & Yamamoto, 1970). LUVs were obtained within a diameter range of 105–130 nm after 6 times extrusion through 400 nm pore size polycarbonate membranes (Nuclepore Track-etch Membrane, Whatman, USA), followed by 11 times extrusion through 100 nm pore size polycarbonate membranes using a Liposofast mini-extruder (Avestin Inc., Ontario, Canada), at room temperature. LUVs containing entrapped carboxyfluorescein (CF) were separated from free CF using a Sephadex G25 M gel column (PD-10, GE Healthcare Life Sciences) and eluted with Tris-HCl buffer containing $1\text{ mmol L}^{-1}\text{Na}_2\text{EDTA}$ and $150\text{ mmol L}^{-1}\text{NaCl}$, pH 7.4. LUVs were used within 24 h of preparation, kept under refrigeration (8°C) and protected from light. Vesicle size was confirmed by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). LUVs of the following lipid composition (molar ratio) were prepared: 70:30 PC/PG, 50:50 PG/CL, 60:20:20 PC/PS/Chol and 100% PC, mimicking respectively the membranes of Gram-negative and Gram-positive bacteria (Lohner & Prenner, 1999; Matsuzaki et al., 1995), tumors (Dobrzyńska et al., 2005; Zwaal et al., 2005) and erythrocytes (Lohner & Prenner, 1999).

2.8. Dye leakage

Experiments were conducted in an ISS PC1 spectrofluorometer (ISS, Urbana Champaign, IL, USA), at 25°C , using a 1 cm quartz cell. A $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ suspension of CF-filled LUVs was obtained by diluting the LUVs preparation with the 10 mmol L^{-1} Tris-HCl buffer, pH 7.4 described above. An aliquot of the chitosan derivative stock solution was added to the magnetically stirred vesicle suspension. CF fluorescence intensity was monitored at 520 nm wavelength with a 0.5 slit width (excitation wavelength 490 nm and 1.0 nm slit width). The percentage of CF released was calculated as $\% \text{ leakage} = 100 \times (F - F_0) / (F_{100} - F_0)$, where F is the observed fluorescence intensity, F_0 and F_{100} are, respectively, the fluorescence intensities in the absence of polycations and at 100% leakage, as determined by the addition of $20\ \mu\text{L}$ of 10% Triton X-100 solution. F_{100} has been corrected for the corresponding dilution factor.

2.9. Size and zeta potential determinations

The Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) was used to determine aggregation of LUVs induced by the chitosan derivatives and precursors, through its size mode and the corresponding zeta potential changes to verify the binding of the same samples to the LUVs. Chitosan derivative solutions were prepared in buffer, pH 5.5, in plastic vials and an aliquot of the vesicle suspension was added to a final concentration of $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Each preparation was first equilibrated for 30 min at 25°C and then transferred to a disposable cuvette for the size evaluation. Afterward, the same preparation was transferred to a DTS10700 cell (Malvern Instruments) for zeta potential measurement.

3. Results

3.1. Synthesis and characterization

Chitosan derivatives (Fig. 1) were prepared from CH2 sample in a two steps process. I) After the reductive amination reaction with dodecyl aldehyde, the ^1H NMR spectra of the generated derivative, CHDD20, exhibit three new signals after substitution by the dodecyl group: a singlet at 1.30 ppm, corresponding to the protons of the methyl

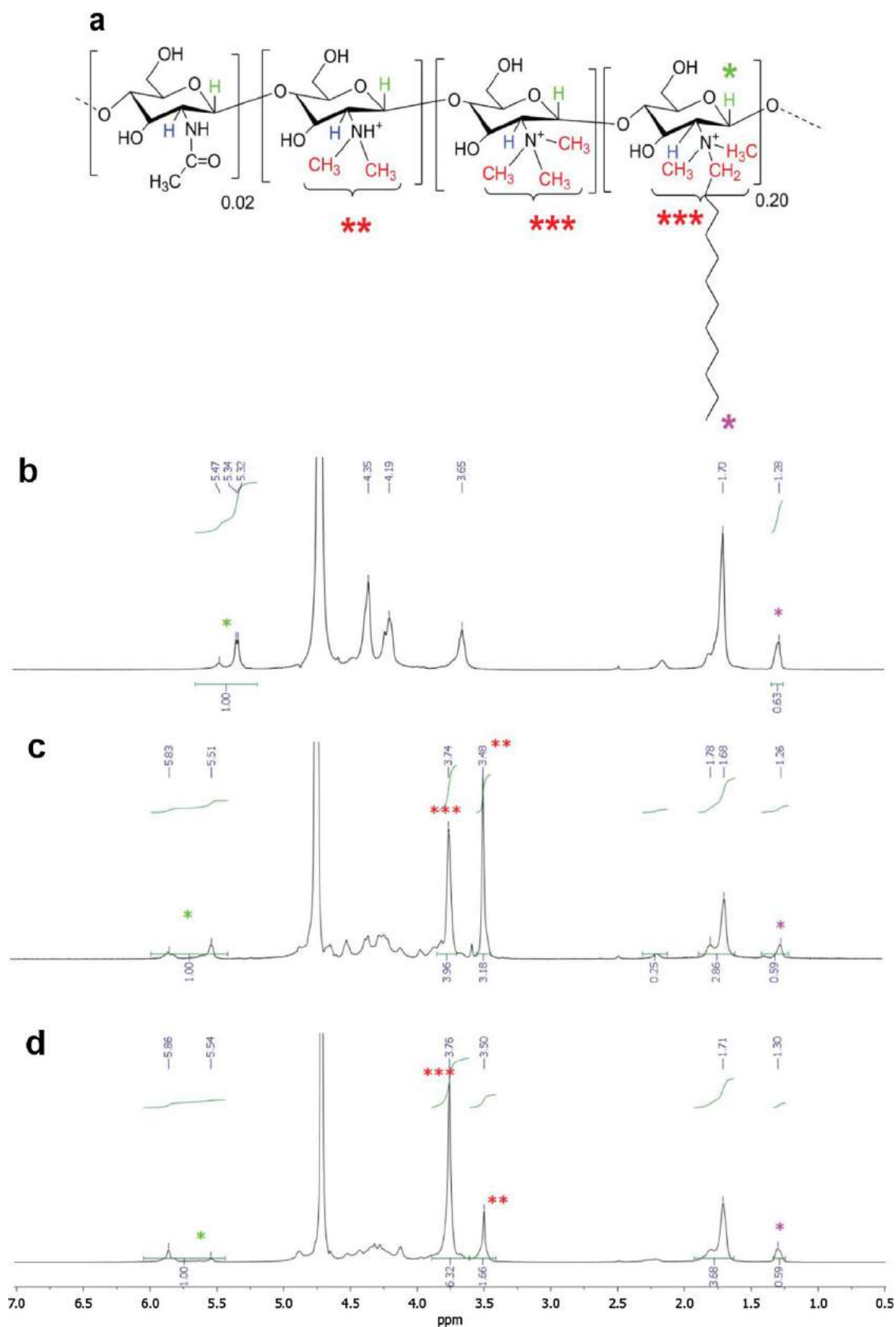


Fig. 1. ^1H NMR spectra of CH derivatives. (a) Structure; (b) CHDD20, the dodecylated derivative; and the quaternary derivatives, (c) CH30 and (d) CH50. Acquisition temperature: 70 °C; solvent: $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (1%). (***) dimethylated and (***) trimethylated groups.

group on the dodecyl chain; a signal at 1.70 ppm corresponding to protons in the hydrocarbon chain; and that at 2.15 ppm corresponding to the methylene protons of the carbon atom linked to the amino group of chitosan (Fig. 1b, CHDD20). The attachment of dodecyl groups to CH2 framework alters the ^1H NMR spectrum most notably in respect to the anomeric protons of substituted and non-substituted glucosamine units. This signal undergoes a downfield shift from 5.34 to 5.47 ppm, which results from substituted glucosamine rings. The integrated areas of the signal at 1.30 ppm and those assigned to the anomeric protons of chitosan chains at 5.20–5.60 ppm were used to calculate the degree of substitution by DD by Eq. (1) (Desbrières et al., 1996).

$$DS_{\text{Dod}} = \frac{I_{\text{CH}_3}}{I_{\text{H}_1} + I_{\text{H}_{1s}}} \quad (1)$$

II) After the quaternization step, the reacted CHDD20 with CH_3I , produced two different methylated derivatives, CH30 and CH50, whose ^1H NMR spectra are shown in Fig. 1c and d, respectively. The quaternization reaction takes place on the free and dodecylated amino groups as indicated in Fig. 1a. The degrees of substitution for dimethylated (% GDM) and trimethylated units (% GTM) were estimated from the signals appearing at 3.48 and 3.74 ppm. % GTM was estimated taking into account the contribution of the trimethyl groups of both, dodecylated and non-dodecylated units. The signal of trimethylated amino groups overlaps the signal of the H-2 protons of the glucosamine rings, appearing shifted to downfield in the range of 3.67–3.85 ppm (Rúnarsson et al., 2007). Therefore, GDM and GTM were estimated using the relationships 2 and 3 (Rúnarsson et al., 2008).

$$GDM = \frac{A_{\text{N}(\text{CH}_3)_2}}{A_{\text{H}_1} \times 6} \quad (2)$$

$$GTM = \frac{(A_{\text{N}(\text{CH}_3)_3} - 1)}{A_{\text{H}_1} \times 10.8} \quad (3)$$

where A_{H_1} refers to the signals at 5.40–5.90 ppm range due to the anomeric protons of substituted and non-substituted glucosamine residues. The factor “–1” in Eq. (3) numerator subtracts the contribution of the H-2 hydrogen signal, and the factors “6” and “10.8” refer to protons of the dimethylated and trimethylated units, respectively. The term 10.8 accounts for nine protons from trimethylated amino groups plus the contribution arising from methyl groups inserted on dodecylated amino groups.

To verify the importance of the hydrophobic moiety for the activity of the chitosan derivatives a quaternized compound, MeCH2, was also produced (Fig. SI2b). The ^1H NMR spectrum of MeCH2 exhibited new signals, most notably at 3.72, 3.47 and 3.29 ppm, corresponding to trimethylated, dimethylated and monomethylated units, respectively, that confirmed the methylation of deacetylated chitosan. The attachment of methyl groups brings further changes in the resonances of protons in close proximity to the substitution site, specifically, protons H-1 and H-2 of the glucosamine unit. The anomeric proton signal undergoes a downfield shift, from 5.3 ppm to 5.5 ppm, while the signal at 3.61 ppm shifts to 3.79 ppm. The substitution degrees for trimethylated and dimethylated units were estimated using the relationships 2 and 3 and the monomethylated units were estimated using the relationship.

$$GDM = \frac{A_{\text{NCH}_3}}{A_{\text{H}_1} \times 3} \quad (4)$$

As the quaternary derivatives, CH30 and CH50, were obtained at mild reaction conditions, i.e., the reductive amination step was performed at low temperature, pH 5.0 and the methylation step at room temperature, we considered that polydispersity of the polymers were kept under limited variation. The composition of chitosan intermediates and synthesized derivatives are summarized in Table 1. Derivatives mostly differentiate by the dimethylated and trimethylated contents as shown in Table 1 and Fig. 1.

Table 1

Physico-chemical properties of chitosan derivatives. % GTM, % GDM and % GMM are the estimated contents of trimethylated, dimethylated and monomethylated units. % DD stands for the content of dodecyl groups.

Polymer	% GMM	% GDM	% GTM	% NH_2	% DD
MeCH2	15.3	53.3	8.2	23.2	–
CHDD20	–	–	–	77.9	20.1
CH30	–	52.9	27.0	–	20.1
CH50	–	27.6	49.3	3.0	20.1

3.2. Amphiphilic properties

The interaction of amphiphilic polycations with cell membranes has been shown to depend on their hydrophilic/hydrophobic balance providing higher antimicrobial activities by the appropriated adjustment. This intrinsic property might strength the interaction with the cell membrane and could also introduce intra- and intermolecular interactions that affect antimicrobial activity. Derivatives of chitosan may aggregate as a result of intra- and intermolecular association. At pH around 5.5 and lower, derivatives are positively charged, and it is expected that self-association is driven by the hydrophobic effect. The I_1/I_3 ratio of the fluorescence vibronic bands of pyrene report the onset of aggregation of polydisperse samples (Philippova et al., 2001), and allows the estimation of the critical aggregation concentration values (CACs). They were graphically estimated, as shown in Fig. 2, from the plots of I_1/I_3 in the presence of increasing concentrations of the derivatives, which show clear breaks due to self-association. For example, CH30 and CH50 exhibit a steep decrease in the I_1/I_3 ratios at 4.5×10^{-3} and $31 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, respectively, while for CH2 the CAC under the same conditions is 57 g L^{-1} (Table 2). This illustrates how differently the hydrophobic effect of dodecyl groups overcomes electrostatic repulsion between positively charged groups, leading to the formation of intra- and/or intermolecular aggregates at these concentrations.

When concentrations of chitosan and derivatives are above the respective CAC values the interaction with cells and lipid bilayers may be affected by aggregated forms being less available as they were in solution (Kulikov et al., 2016).

3.3. Bio-assays

The antimicrobial activity of the derivatives CH30 and CH50 was determined in comparison to their parent compounds, CH2 and CHDD20, and a quaternized non-hydrophobic derivative, MeCH2, against Gram-negative (*E. coli*) and Gram-positive (*S. aureus*), which are representative of the most clinically important bacteria (Fig. 3). We

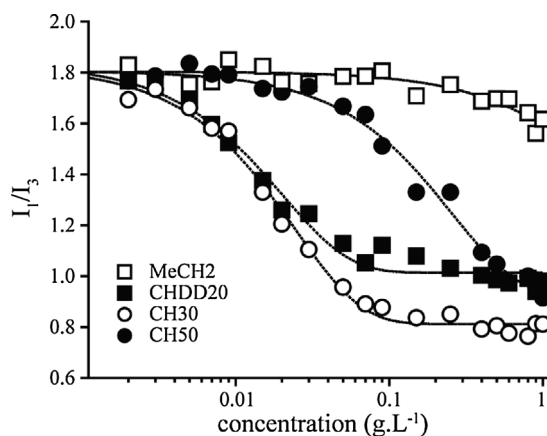


Fig. 2. Fluorometric CAC determination of derivatives through I_1/I_3 ratio of the probe pyrene, at pH 5.5.

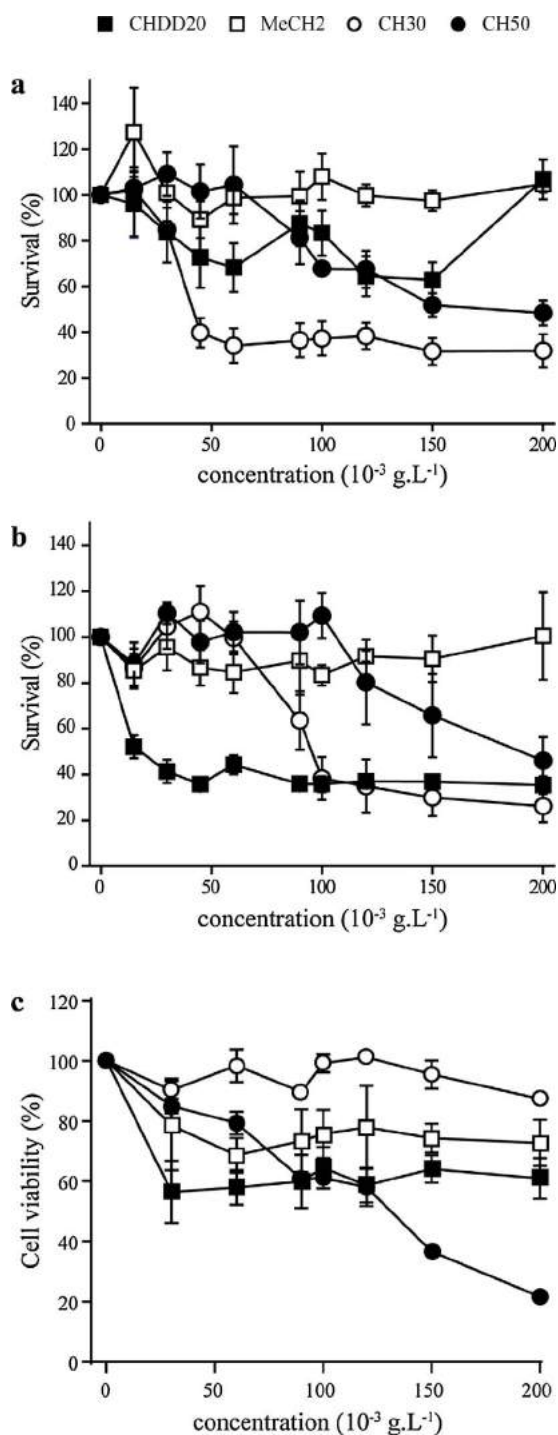


Fig. 3. Effect of chitosan derivatives concentration on the survival curves for *E. coli* (a) and *S. aureus* (b), and on the viability of human cervical carcinoma cells (c). Bacteria and cells were incubated with different concentrations of chitosan derivatives for 3 h and 24 h, respectively. The survival rates were determined by the optical density in 600 nm (OD_{600}) and the cell viability was assessed by MTT reduction.

observed that CH2 (Fig. S13a) and MeCH2 do not exhibit antimicrobial activity at any tested concentration, while the hydrophobic functionalized derivative, CHDD20, is as active as CH30 and CH50 just against *S. aureus*. However, when considering concentrations below $100 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$, CHDD20 is more active than CH30 and CH50 against *S. aureus*, while against *E. coli*, CH30 is the most active. Nevertheless, none of the compounds totally eradicated bacteria, showing the minimum survival rate of 20% for *E. coli*. We must emphasize that the contact time of 3 h is longer than previously

determined as required for significant bacterial cell wall permeability (Nabrezhnykh, Bakholdina, Gorbach, & Solov'eva, 2009). Also, the possible influence of iodide counter-ions was investigated along the experiments with the chitosan compounds. The control experiments show that at the maximum concentration of $4 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$, it presents very limited influence on cell viability or survival (Fig. S13b). These findings demonstrated that hydrophobic character and the presence of cationic groups are equally important for the development of a broad spectrum compound and that additional efforts are required in the development of chitosan derivatives with optimum antibacterial properties. In this sense, investigating the possible forms of chitosan derivatives interactions with lipid bilayers could positively contribute to the design of improved compounds.

The cytotoxic activity of chitosan derivatives toward human cervical carcinoma cells was assessed by the MTT assay. Fig. 3c shows that MeCH2 and CH30 do not exhibit cytotoxicity at $200 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. While CH2 (Fig. S13a) and MeCH2 show small activity at half this concentration, CH2DD20 reduces cell viability to 60% at concentrations above $25 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. Just CH50 shows significant cytotoxicity, reducing the formazan production in a concentration-dependent manner.

The correlation between antimicrobial, cytotoxicity and physicochemical features as shown in Table 2 indicates that (1) the cationic charge is important for bioactivity; (2) but, the hydrophobicity conferred by dodecylation is even more important; (3) cationic charge and hydrophobicity produce better compounds either as antimicrobials or as tumoricidal agents; (4) the balance between cationicity and hydrophobicity obtained in CH30 is more suitable for the antimicrobial activity while that balance obtained in CH50 is better for the tumoricidal activity. Considering the CAC values, the concentration range in which the antimicrobial and cytotoxic activities of chitosan and derivatives were obtained include those where aggregated forms would be found in solution. This means that chitosan derivatives start exerting activities in their respective aggregated forms.

3.4. Interactions with membrane models

It has been demonstrated that chitosan is active at the cell surface of bacteria and leads to permeabilization. Also, it has been demonstrated that electrostatic and non-electrostatic interactions are important for the antimicrobial activity (Verlee et al., 2017). Thus, it seems relevant to investigate the activity of chitosan and its derivatives on model membranes to understand their mechanisms of action.

3.4.1. Lytic activity

Investigating the lytic activity of our compounds will indicate if they can target the cell membrane, permeabilize it and compromise its barrier properties. CH30 and CH50 are lytic compounds at low concentrations towards LUVs made of PC and PC/PG (70:30 mol%, named PCPG), while the lytic activity is moderate towards LUVs made of PC/PS/Chol (60:20:20 mol%, named PCPSChol), and PG/CL (50:50 mol%, named PGCL) (Fig. 4). In relation to the precursor CHDD20, CH30 and CH50 exhibit much intense activity, except on PGCL, where an

Table 2

Physicochemical features and bioactivity of chitosan and derivatives. % GTM is the estimated contents of trimethylated units or charged units. CAC is the critical aggregation concentration. % survival and % cell viability as obtained at $150 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$.

Polymer	% GTM	CAC ($\times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$)	<i>E. coli</i> % survival	<i>S. aureus</i> % survival	HeLa cells % cell viability
CH2	-	57	144±12	176±4	77±3
MeCH2	8.2	77	97±4	91±10	74±5
CHDD20	-	3.5	63±8	37±2	64±5
CH30	27.0	4.5	32±6	30±8	96±5
CH50	49.3	31	51±4	66±18	37±2

Highlighted in grey are the best results obtained by the derivatives.

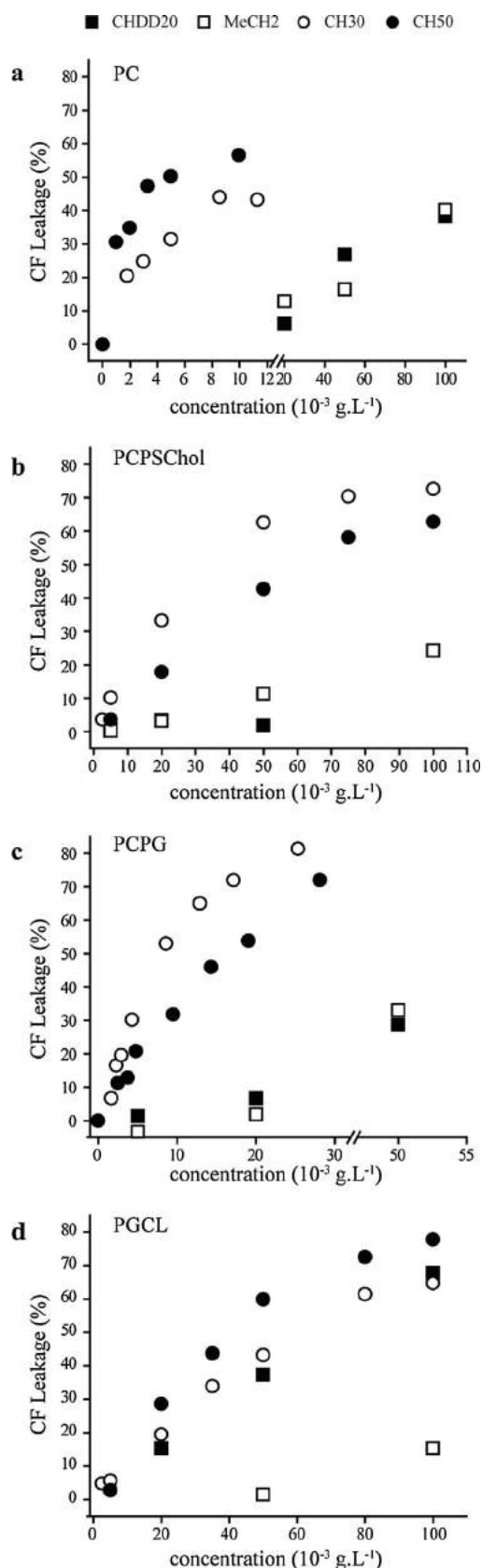


Fig. 4. The permeabilizing effect of chitosan derivatives in different membrane mimetic systems as determined from the dye leakage of the entrapped CF. 100% leakage is that induced by Triton. Dose-response curves obtained after 10 min contact time, at 25 °C with LUVs made of (a) PC, (b) PC/PS/Chol (60:20:20 mol%), (c) PC/PG (70:30 mol%), (d) PG/CL (50:50 mol%).

equivalent activity was observed. For MeCH₂ limited lytic activity was detected at concentrations above $50 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, while for CH₂ (Fig. S14) some activity was found in PC and PGCL vesicles. CH₃₀ and CH₅₀ exhibit similar kinetic profile tending to a plateau after 5 min contact. Nevertheless, 100% leakage is not achieved for any derivative. Strong flocculation occurs in some cases above 5 min contact time with CH₃₀ around $25 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ and with CH₅₀ above $14 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ in PCPG LUV. The dose-response curves indicate that the interaction of these derivatives is not cooperative; the calculated Hill coefficients are close to 1. CH₃₀ exhibits more intense lytic activity than CH₅₀ on the anionic vesicles PCPG and PCPSchol and slightly less intense activity on the zwitterionic PC. These observations suggest a more selective performance of CH₃₀, probably as a result of a more suitable hydrophobic/hydrophilic balance. Although CH₅₀ shows more intense lytic activity than CH₃₀ on PGCL, both derivatives and precursors are much less efficient in this vesicle that mimics Gram-positive bacteria membranes. Bilayers containing cholesterol and cardiolipin are known for being less fluid than those where these phospholipids are absent (dos Santos Cabrera et al., 2012). Moreover, chitosan activity was reported to be negatively influenced by cell membrane fluidity in experiments with resistant fungi (Verlee et al., 2017). This could be the reason for the lytic activity appearing quite similar in PGCL for CH₅₀, CH₃₀ and CHDD₂₀, while in PCPG the derivatives are significantly more efficient.

3.4.2. Zeta potential measurements

Once that our compounds are lytic to vesicles mimicking the membranes of bacteria and tumors, zeta potential measurements will indicate the importance of the electrostatic attraction and confirm that binding occurs. For zeta potential measurements the permanently charged compounds, CH₃₀, CH₅₀ and MeCH₂, were considered. They neutralize membrane charges by binding to the more fluid membranes, PCPG and PC, with a significant preferential interaction with the anionic one. Fig. 5 shows that increasing the concentration of chitosan derivatives increase the initial electro-kinetic potential (ζ_0) as a consequence of the polycation binding to the vesicles surface and neutralization of charges. On PGCL, MeCH₂ exhibits a more pronounced charge neutralization effect, while in PCPSchol, CH₅₀ is the more efficient, in good agreement with its superior effect in HeLa cells. CH₃₀ shows poor binding to these less fluid bilayers. Their respective isotherms, as well as the dose-response curves of the lytic activity, suggest that the partition of these chitosan derivatives depends on the fluidity of vesicle compositions. This was confirmed when the interaction of CH₃₀ and CH₅₀ was investigated on PC/PS/Ergosterol (40:40:20 mol %) LUVs. In this environment that mimics *C. albicans* membranes and in PCPG, CH₃₀ and CH₅₀ performed similarly (Fig. S15). CH₅₀ is more efficient in promoting charge neutralization than CH₃₀, as could be expected from its higher cationic character, except on PGCL. Although deprived of biological and lytic activities, MeCH₂ shows efficient charge neutralization in the anionic vesicles tested, and shows potential reversal in PCPG and PCPSchol. For CH₃₀, the potential reversal occurs around $23 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ in PCPG. At this concentration flocculation was observed in the leakage experiments. With CH₅₀ the isotherm obtained in PCPG shows an abrupt increase in zeta potential at the concentration around $5 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, and the potential reversal occurs around $8 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Also, flocculation was observed. Most isotherms tend to a plateau, suggesting that compounds are aggregating. The aggregation is supported by vesicle size measurements (Fig. 6).

Whereas results of the bioassays clear indicate that CH₃₀ would be more efficient as an antimicrobial and CH₅₀ more efficient as an antitumoral, and also that CH₃₀ would be equally effective against Gram-negative and Gram-positive bacteria, results using mimetic membranes does not discriminate their action in the same way. The mechanism of action of CH₃₀ and CH₅₀ seems to be directed by electrostatic interactions. CH₃₀ with lower cationic character is more lytic towards PCPG and PCPSchol, the less anionic lipid bilayers, while CH₅₀ is more lytic

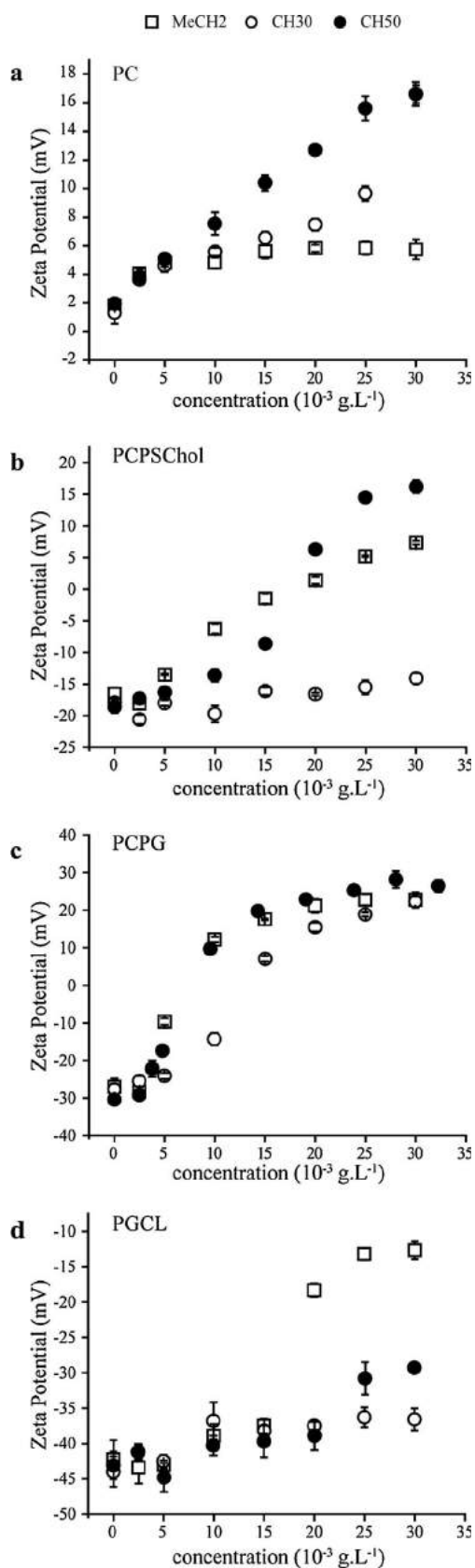


Fig. 5. Zeta potential isotherms obtained with LUVs after 30 min equilibration time, at pH 5.5 and 25 °C. Zeta potential for LUVs in the absence of chitosan derivatives (ζ_0 , mV) are: (a) PC, +1.2 ± 0.2; (b) PCPSchol, -18 ± 1; (c) PCPG, -29 ± 2 mV; (d) PGCL -43 ± 2.

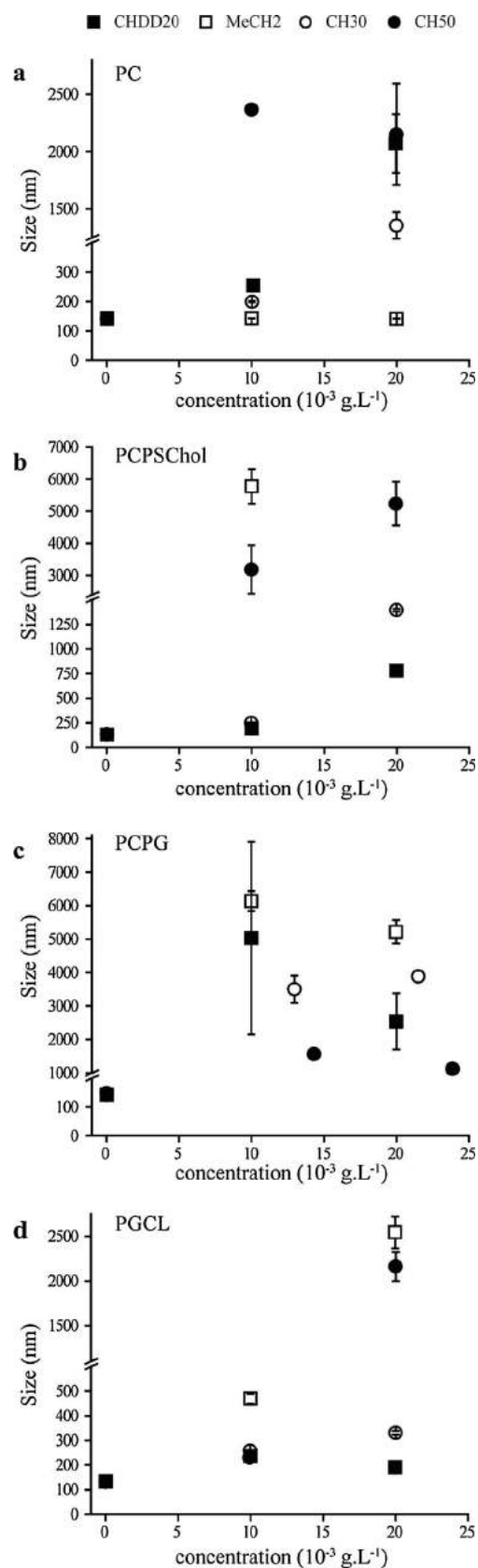


Fig. 6. Vesicles size determinations obtained with LUVs after 30 min equilibration time, at pH 5.5 and 25 °C. LUVs size in the absence of chitosan derivatives (in nm): (a) PC, 143 ± 2; (b) PCPSchol, 133 ± 1; (c) PCPG, 148 ± 2; (d) PGCL, 133 ± 1.

towards PGCL. Nevertheless, experiments with lipid vesicles were very helpful to demonstrate that derivatives endowed with hydrophobicity and net charges, as CH30 and CH50, were the most promising candidates for further developments as antimicrobials.

3.4.3. Vesicle size determinations

The size variations of vesicles indicate the extent of aggregation that our compounds could induce as a consequence of intense electrostatic attractions or hydrophobic interactions. Fig. 6 shows changes in vesicles size induced by the increasing concentrations of chitosan derivatives. In the presence of PC vesicles, they show significant size increase, except for MeCH2. Although CHDD20 induce significant size increase at $20 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, poor lytic activity was observed in PC. Thus, these data could be correlated to the lack of (or limited) strong interactions; electrostatic in the case of CHDD20 and non-electrostatic for MeCH2. Derivatives CH30 and CH50 are endowed with both types of interactions.

In the presence of PCPSchol LUVs, MeCH2 induce the highest size increase that may denote vesicles aggregation, at $10 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. MeCH2 is followed by CH50, while CH30 and CHDD20 show moderate size increase at $20 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Nevertheless, just CH50 and CH30 show significant lytic activity at $50 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ in this model membrane. And only CH50 showed cytotoxicity towards HeLa cells. The CAC of CH30 and CHDD20 are below $20 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. Taken together these data suggest that a) CH30 activity is impaired by the lower fluidity of cholesterol-containing bilayers, and by its aggregated state in solution that hinders its binding, as seen in the zeta potential measurements; b) CH50 activity is increased by the higher content of positively charged groups that enhances binding, and by a higher CAC value; and c) the cationic MeCH2 strongly binds and aggregates vesicles but the lack of hydrophobic character impairs its activity.

In relation to the bacterial model membranes, chitosan derivatives induce intense size increase, denoting vesicles aggregation, in PCPG, around $10 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ concentration. Limited aggregation was observed in PGCL. This could be attributed to three oppositely acting conditions in PCPG and PGCL: a) the availability of plenty of anionic groups (PGCL) to neutralize chitosan and derivatives positively charged groups; b) strong remaining repulsion between LUVs (PGCL); and c) reduced fluidity of PGCL LUVs.

4. Discussion

There are some recognized advantages when antimicrobials target the membrane of cells, as their highly preserved features and essentiality among several bacterial species throughout evolution, their ability to act on the membranes of dormant bacteria and on biofilms, and their decreased probability of resistance development (Mingeot-Leclercq & Décout, 2016; Zasloff, 2002). Biophysical parameters of these membranes rule the activity of membrane-active compounds as the amphiphilic character, fluidity, intrinsic curvature and clustering of lipids (Mingeot-Leclercq & Décout, 2016). Thus, to achieve an optimized interaction, the antimicrobial compounds must be endowed with a specific balance between the hydrophobic and hydrophilic character, which includes a significant content of cationic charges, and an accurate evaluation of the molecular weight (Mingeot-Leclercq & Décout, 2016; Verlee et al., 2017).

Amphiphilic antibacterial aminoglycosides have been developed from an old class of drugs, the aminoglycosides, as an alternative to overcome the difficulties imposed by the emergence of resistant bacteria. This new class, which includes chitosan and derivatives, may be made to target the anionic lipid bilayer of bacteria (Mingeot-Leclercq & Décout, 2016; Verlee et al., 2017). The interaction starts with the electrostatic attraction between protonated amino groups of chitosan and derivatives and the negatively charged components of the bacterial cell surface. This surface may become decorated with chitosan and be permeabilized leaking the intracellular content (Nabrezhnykh et al.,

2009; Verlee et al., 2017; Wu, Long, Xiao, & Dong, 2016). The results of the present work also point out to this mechanism of action, which has been often associated with antimicrobial peptides. This class of substances has called the attention of researchers for over two decades because its mechanism of action does not require specific receptors, and thus also presents a different strategy to overcome the development of resistance towards antibiotic therapy.

It has been reported that chitosan with approximately the same characteristics of Mw and deacetylation degree as our CH2 exhibits MIC around $200 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ for *S. aureus* and *E. coli* at pH 6.9 (Kulikov et al., 2016), however, in the present work we did not find antimicrobial activity for CH2 even at $500 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$. It was also the case with MeCH2, while the literature reports that fully quaternized chitosan has higher antibacterial activity than the parent chitosan (Wu et al., 2016). Nevertheless, CH30 and CH50 exhibited antibacterial activity at comparable levels toward Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *S. aureus*, mimicked respectively by PCPG and PGCL. Accordingly they presented lytic activity in these lipid vesicles, although being more intense in PCPG. CH50 also exhibited cytotoxic activity towards HeLa cells. This set of activities was not displayed by their precursors, although the hydrophobic CHDD20 showed similar antibacterial activity towards *S. aureus*. Thus, it justifies and encourages studies involving modifications of natural chitosan that focus on fine-tuning hydrophobic and electrostatic interactions.

As pointed out for chitosan-resistant fungi (Verlee et al., 2017), the differences found in the interaction of the presently developed derivatives with lipid bilayers also evidence characteristics already described for chitosan, as the impairment effect of membrane fluidity on the membrane-related activity. Binding and lytic activity of CH30 and CH50 were reduced when bilayers contained cholesterol or cardiolipin, lipids that strongly influence membrane packing and fluidity. Also, for Gram-positive bacterial membranes, which contain cardiolipin, it was demonstrated that a mutant lacking the outer layer rich in teichoic acids had impaired chitosan activity (Verlee et al., 2017). Moreover, exposure to chitosan caused important morphological changes in the cell wall (Kulikov et al., 2016). These findings evidence the importance of strong electrostatic interactions as a way to overcome the membrane reduced fluidity. Although deprived of antibacterial activity, our precursor, MeCH2, with a high CAC value, showed increased binding on PGCL bilayers probably as a result of the high availability of positively charged groups. For many antibacterial compounds, including chitosan, the antibacterial activity depends on solubility (Kulikov et al., 2016). For Gram-negative bacteria, studies demonstrated that chitosan disturbs the inner membrane and induces leakage. Accordingly, we found that on PCPG LUVs, binding of CH30, CH50 and MeCH2 are comparable; however, MeCH2 shows much reduced permeabilization and lacks activity toward *E. coli* (Verlee et al., 2017).

The literature is rich in relation to the antitumoral activity of chitosans, however in this field of application chitosan is mostly used as a carrier or nanoparticle. However, its appeal as a pH-responsive compound could equally be of interest to our compounds, considering that the mechanism where the target is the membrane could be verified. Cancer cells expose increased content of anionic PS in the outer leaflet of the cytoplasmic membrane, favoring electrostatic interactions (Zwaal et al., 2005) as in the case of antibacterial activity. Other appealing features of chitosan should be considered as its facilitated adsorption at the cancer cell membrane due to electrostatic interactions and to the presence of secondary and tertiary amino groups, and the abundant possibilities of hydrogen-bonding that enhances for longer the adhesive effect (Suarato, Li, & Meng, 2016). From our set of compounds, CH50 was the only derivative endowed with significant activity toward HeLa cells. It has already been reported that chitosan may bind non-covalently with cholesterol (Verlee et al., 2017), suggesting the importance of other interactions besides the electrostatic. We also verified that the presence of cholesterol in the lipid bilayers, turning them less fluid, reduced the binding and lytic activity of the derivatives on the model

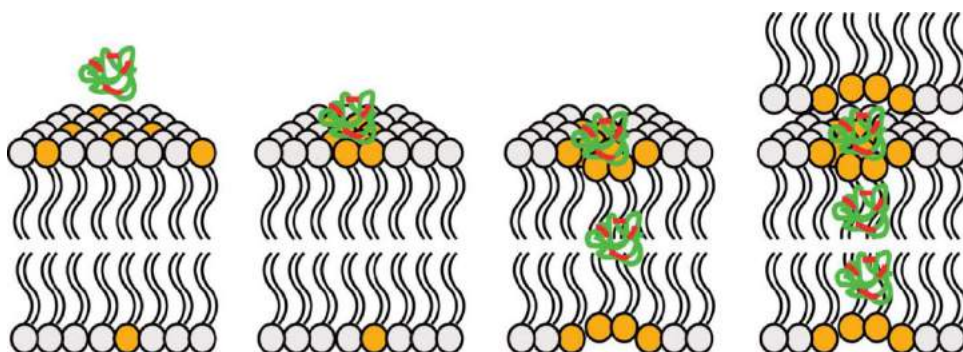


Fig. 7. Model of the lytic activity of chitosan derivatives. The electrostatic attraction between quaternary chitosans, acting as aggregates, binds them to the vesicles surface, clusters anionic phospholipids, disturbs the lipid packing, leaks vesicles' content, attracts or extracts the anionic phospholipids from the opposite layer and also attracts and packs other vesicles as denoted by the size increase. The clustering of vesicles hinders the total leakage of vesicles' content.

membrane PCPSchol, despite the presence of 30% anionic PS. CH50 is the derivative that most strongly binds and neutralizes the charges of PCPSchol, although it is not the most efficient as a membranolytic compound in this vesicle.

The kinetics of the lytic activity observed for CH30 and CH50 resembles those found for antimicrobial peptides, however the dose-response curves are different: lytic antimicrobial peptides usually exhibit a sigmoid shaped curve and a cooperative behavior (Cabrera et al., 2014; dos Santos Cabrera et al., 2009), while the present chitosan derivatives do not. The stronger effect of CH50 than that of CH30 on PC vesicles is also compatible with the effect of highly charged cationic peptides. For those peptides, the increased charge abolishes the selective behavior towards anionic bilayers (Dathe, Nikolenko, Meyer, Beyermann, & Bienert, 2001). Significant similarities with lytic peptides behavior are also found in the effects of the present chitosan derivatives on the zeta potential isotherms, except for the potential reversal observed at lower concentration. Aggregated particles probably made of chitosan and phospholipids were denoted by the size increase and also visually observed. This finding and the fact that our chitosan derivatives do not reach 100% leakage of vesicles content oppose to the features generally attributed to the detergent-like mechanism (Henzler Wildman, Lee, & Ramamoorthy, 2003). This mode of action was recently attributed to nanocapsules of chitosan.⁵² However, the features exhibited by our derivatives suggest that their mode of action could be attributed to the formation of chitosan/phospholipids aggregates and is comparable to the charge cluster mechanism, which was recently ascribed to peptides with high positive charge density (Eband, Maloy, Ramamoorthy, & Eband, 2010). Another characteristic of these peptides that promote charge cluster is the fact that the ratio between MICs in *S. aureus* to *E. coli* is above 1, which we also found in our chitosan compounds. A kind of charge clustering was also proposed for supported chitosan derivatives with antimicrobial activity (Li et al., 2011). Fig. 7 summarizes the sequence of events that were observed and correlated with this mechanism.

5. Conclusions

CH30 and CH50 differentiate by the number of charged groups in the polymer chain, which is higher in CH50. Both derivatives exhibit antimicrobial and cytotoxic activities, which are increased in relation to the precursor compounds. The experiments with model membranes evidenced that these amphiphilic chitosan derivatives show strong affinity for phospholipid bilayers, capable of inducing significant lytic activity at concentrations around $10 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, when vesicles composition was of higher fluidity, or around $40 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, for vesicles containing cardiolipin or cholesterol. Although the mechanism of the antimicrobial activity of chitosan and derivatives are not well understood, the leakage of intracellular compounds has already been observed (Fernandes et al., 2014; Rabea et al., 2003). One of the proposed mechanisms associates the electrostatic interaction between cationic groups of chitosan and the anionic groups of the membrane that

induce the leakage of the cell contents (Fernandes et al., 2014; Li et al., 2011). This interaction that starts from electrostatic attraction and targets the phospholipid matrix of cell membranes has been often associated to antimicrobial peptides and represents a strategy to overcome the mechanisms of bacterial resistance. The results of the present work point out to the advantages of parallel investigation of chitosan derivatives effects on the lipid bilayer of cell membranes and suggest that besides improving the hydrophobic/hydrophilic balance of compounds, modifications that increase CAC and reduce aggregated contents could improve efficiency.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, to, M.J.T. (2009/11707-2; 2012/03619-9); M.A.-M. (2012/02065-0); M.P.D.S.C. (2010/11823-0; 2012/24259-0; 2014/08372-7).

The authors are grateful to Dr. Antonio Carlos Pignatari and Dr. Magnus Régios da Silva (Federal University of São Paulo) for kindly providing *S. aureus* (ATCC 25923) and HeLa cells, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.011>.

References

- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>.
- Benediktsdóttir, B. E., Gudjónsson, T., Baldursson, Ó., & Másson, M. (2014). N-alkylation of highly quaternized chitosan derivatives affects the paracellular permeation enhancement in bronchial epithelia in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(1), 55–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.04.002>.
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>.
- Cabrera, M. P., Baldissera, G., Silva-Gonçalves, L. da, C., De Souza, B. M., Riske, K. A., Palma, M. S., ... Arcisio-Miranda, M. (2014). Combining experimental evidence and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide jelleine-I. *Biochemistry*, 53(29), 4857–4868. <http://dx.doi.org/10.1021/bi5003585>.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150.
- de Oliveira Pedro, R., Takaki, M., Gorayeb, T. C. C., Del Bianchi, V. L., Thomeo, J. C., Tiera, M. J., & de Oliveira Tiera, V. A. (2013). Synthesis, characterization and anti-fungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 168(1), 50–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.006>.
- de Oliveira Tiera, V. A., Winnik, F. M., & Tiera, M. J. (2010). Interaction of amphiphilic derivatives of chitosan with DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 100(1), 309–313. <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-009-0375-y>.

- Desbrières, J., Martinez, C., & Rinaudo, M. (1996). Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(1), 21–28 [Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782715>].
- Dobrzyńska, I., Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S., & Figaszewski, Z. (2005). Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276(1–2), 113–119. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-005-3557-3>.
- dos Santos Cabrera, M. P., Arcisio-Miranda, M., da Costa, L. C., de Souza, B. M., Broggio Costa, S. T., Palma, M. S., ... Procopio, J. (2009). Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: A comparative biophysical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 486(1), 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2009.03.009>.
- dos Santos Cabrera, M. P., Arcisio-Miranda, M., Gorjão, R., Leite, N. B., De Souza, B. M., Curi, R., ... Palma, M. S. (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(24), 4898–4908. <http://dx.doi.org/10.1021/bi201608d>.
- Epand, R. F., Maloy, W. L., Ramamoorthy, A., & Epand, R. M. (2010). Probing the charge cluster mechanism in amphiphilic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 49(19), 4076–4084. <http://dx.doi.org/10.1021/bi100378m>.
- Fang, N., Chan, V., Mao, H. Q., & Leong, K. W. (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: Effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, 2(4), 1161–1168.
- Fernandes, M. M., Francesco, A., Torrent-Burgués, J., Carrión-Fité, F. J., Heinze, T., & Tzanov, T. (2014). Sonochemically processed cationic nanocapsules: Efficient antimicrobials with membrane disturbing capacity. *Biomacromolecules*, 15(4), 1365–1374. <http://dx.doi.org/10.1021/bm4018947>.
- Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñó, E., & Riguera, R. (2007). Conjugation of bioactive ligands to PEG-grafted chitosan at the distal end of PEG. *Biomacromolecules*, 8(3), 833–842. <http://dx.doi.org/10.1021/bm060889x>.
- González-Aguilar, G. A., Valenzuela-Soto, E., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F., Martínez-Téllez, M. A., Villegas-Ochoa, M. A., ... Ayala-Zavala, J. F. (2009). Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya Maradol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 15–23. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3405>.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., & Li, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 694–697. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.027>.
- Henzler Wildman, K. A., Lee, D.-K., & Ramamoorthy, A. (2003). Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry*, 42(21), 6545–6558. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0273563>.
- Huo, M., Zhang, Y., Zhou, J., Zou, A., Yu, D., Wu, Y., ... Li, H. (2010). Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 394(1–2), 162–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.001>.
- Jung, B.-O., Kim, C.-H., Choi, K.-S., Lee, Y. M., & Kim, J.-J. (1999). Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *Journal of Applied Polymer Science*, 72(13), 1713–1719. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1713:AID-APP7>>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1713:AID-APP7>>3.0.CO;2-T).
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnykh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V., & Tikhonov, V. E. (2014). Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some Candida species and clinical isolates of Candida albicans: Molecular weight-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 169–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.017>.
- Kulikov, S. N., Bayazitova, L. T., Tyupkina, O. F., Zelenikhin, P. V., Salnikova, M. M., Bezrodnykh, E. A., & Tikhonov, V. E. (2016). Evaluation of a method for the determination of antibacterial activity of chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(5), 502–507. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683816050100>.
- Li, P., Poon, Y. F., Li, W., Zhu, H.-Y., Yeap, S. H., Cao, Y., ... Chan-Park, M. B. (2011). A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nature Materials*, 10(2), 149–156. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2915>.
- Lohner, K., & Prenner, E. J. (1999). Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1–2), 141–156.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N., & Miyajima, K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34(10), 3423–3429.
- Mertins, O., & Dimova, R. (2013). Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: Membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*, 29(47), 14552–14559. <http://dx.doi.org/10.1021/la4032199>.
- Mertins, O., Sebben, M., Pohlmann, A. R., & da Silveira, N. P. (2005). Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: A step by step study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 138(1–2), 29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.07.004>.
- Mertins, O., Cardoso, M. B., Pohlmann, A. R., & da Silveira, N. P. (2006). Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(8), 2425–2431.
- Mingeot-Leclercq, M.-P., & Décout, J.-L. (2016). Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. *MedChemComm*, 7(4), 586–611. <http://dx.doi.org/10.1039/C5MD00503E>.
- Naberezhnykh, G. A., Bakholdina, S. I., Gorbach, V. I., & Solov'eva, T. F. (2009). New chitosan derivatives with potential antimicrobial activity. *Russian Journal of Marine Biology*, 35(6), 498–503. <http://dx.doi.org/10.1134/S106307400906008X>.
- Philippova, O. E., Volkov, E. V., Sitnikova, N. L., Khokhlov, A. R., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. *Biomacromolecules*, 2, 483–490. <http://dx.doi.org/10.1021/BM005649A>.
- Quemener, F., Rinaudo, M., & Pépin-Donat, B. (2008). Influence of polyelectrolyte chemical structure on their interaction with lipid membrane of zwitterionic liposomes. *Biomacromolecules*, 9(8), 2237–2243. <http://dx.doi.org/10.1021/bm800400y>.
- Rúnarsson, Ö. V., Holappa, J., Nevalainen, T., Hjalmsdóttir, M., Järvinen, T., Loftsson, T., ... Másson, M. (2007). Antibacterial activity of methylated chitosan and chitooligomer derivatives: Synthesis and structure activity relationships. *European Polymer Journal*, 43(6), 2660–2671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.03.046>.
- Rúnarsson, Ö. V., Holappa, J., Jónsdóttir, S., Steinsson, H., & Másson, M. (2008). N-selective one pot synthesis of highly N-substituted trimethyl chitosan (TMC). *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 740–744. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.03.008>.
- Rúnarsson, Ö. V., Holappa, J., Malainer, C., Steinsson, H., Hjalmsdóttir, M., Nevalainen, T., & Másson, M. (2010). Antibacterial activity of N-quaternary chitosan derivatives: Synthesis, characterization and structure activity relationship (SAR) investigations. *European Polymer Journal*, 46(6), 1251–1267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.03.001>.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smaghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. <http://dx.doi.org/10.1021/bm034130m>.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. I., Rogge, T. M., Stevens, C. V., Höfte, M., Steurbaut, W., & Smaghe, G. (2005). Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Management Science*, 61(10), 951–960. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1085>.
- Radulescu, M., Fica, D., Oprea, O., Fica, A., Andronescu, E., & Holban, A. M. (2015). Antimicrobial Chitosan based formulations with impact on different biomedical applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 16(2), 128–136.
- Rouser, G., Fkeischer, S., & Yamamoto, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5(5), 494–496.
- Seo, S., King, J. M., Prinyawitkul, W., & Janes, M. (2008). Antibacterial activity of ozone-depolymerized crawfish chitosan. *Journal of Food Science*, 73(8), M400–M404. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00922.x>.
- Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., & Hipler, U.-C. (2008). Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against Candida albicans, Candida krusei and Candida glabrata. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1–2), 139–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.029>.
- Suarato, G., Li, W., & Meng, Y. (2016). Role of pH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. *Biointerphases*, 11(4), 04B201. <http://dx.doi.org/10.1116/1.4944661>.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257–272. <http://dx.doi.org/10.1080/08905439209549838>.
- Tiera, M. J., Qiu, X.-P., Bechaouch, S., Shi, Q., Fernandes, J. C., & Winnik, F. M. (2006). Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. *Biomacromolecules*, 7(11), 3151–3156. <http://dx.doi.org/10.1021/bm060381u>.
- Verlee, A., Minck, S., & Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.
- Viegas de Souza, R., Takaki, M., de Oliveira Pedro, R., dos Santos Gabriel, J., Tiera, M., & de Oliveira Tiera, V. (2013). Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. *Molecules*, 18(4), 4437–4450. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18044437>.
- Vieira, N. A. B., Moscardini, M. S., Tiera, V. A. d. O., & Tiera, M. J. (2003). Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: A fluorescence probe study. *Carbohydrate Polymers*, 53(2), 137–143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00048-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00048-1).
- Wu, M., Long, Z., Xiao, H., & Dong, C. (2016). Recent research progress on preparation and application of N, N, N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Research*, 434, 27–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.002>.
- Xing, K., Chen, X. G., Li, Y. Y., Liu, C. S., Liu, C. G., Cha, D. S., & Park, H. J. (2008). Antibacterial activity of oleoyl-chitosan nanoparticles: A novel antibacterial dispersion system. *Carbohydrate Polymers*, 74(1), 114–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.024>.
- Xing, K., Chen, X. G., Liu, C. S., Cha, D. S., & Park, H. J. (2009). Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits Escherichia coli and Staphylococcus aureus by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 127–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.013>.
- Zaslouff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <http://dx.doi.org/10.1038/415389a>.
- Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(9), 971–988. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-4527-3>.



Cholesterol modulates curcumin partitioning and membrane effects

Natália B. Leite^{a,1}, Danúbia B. Martins^b, Vinicius E. Fazani^b, Maira R. Vieira^a,
Marcia P. dos Santos Cabrera^{a,b,*}

^a Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Curcumin
Cholesterol
Lipid bilayer effects
Phospholipid membranes
Lipid/water partition coefficients
Large and giant vesicles

ABSTRACT

Curcumin, a polyphenol molecule, presents a wide range of biological activities as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing. Although some strengths attributed to curcumin derive from promiscuous biological activity, possibly because curcumin can interfere on many membrane located processes, knowledge of underlying interactions are lacking. Mammalian cell membranes characteristically contain 25 to 50% cholesterol/phospholipid ratio; however, most studies involving lipid bilayers and curcumin consider pure phosphatidylcholine and compare effects of curcumin on membranes with those of cholesterol. We investigated the interaction of curcumin with lipid bilayers containing cholesterol mimicking mammalian cells, and used spectroscopy techniques to determine partition coefficients, rigidity parameters and lytic activity. We found that curcumin partitions into different lipid bilayers (10^4 order coefficients that vary by less than a factor of two), containing cholesterol or not, and in the presence of sphingomyelin or phosphatidylserine. Curcumin decreases rigidity in all tested compositions, except that containing 40% cholesterol in which it increases the lipid packing order. In addition, curcumin induces leakage from giant unilamellar vesicles on a cholesterol concentration dependent way. Our results are compatible with the hypothesis of curcumin interaction with membranes being modulated by the liquid disordered phase and by the coexistence of liquid-ordered/liquid disordered phases. In bilayers containing cholesterol, curcumin assumes a more superficial location, drastically stiffens the 40% cholesterol bilayer and decreases the lytic effect. Our study may help researchers in the analysis of the biological effects of curcumin and curcumin-derived formulations by calling the attention to the discriminating role of the cholesterol content.

1. Introduction

The polyphenol curcumin has been intensively studied in the past years due to its broad range of reported activities going from antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-angiogenic, anti-fungal, antimicrobial and wound healing activities [1, 2]. The antioxidant activity is attributed to the ability of curcumin molecule of donating hydrogen ions and of neutralizing reactive oxygen intermediates [3]. Since oxidative processes are related to the development of many diseases as the coronary, cancer and aging-derived neuropathology [4–6], the applicability of curcumin has been intensively speculated [7–9], however, far from a consensus. Recently, Nelson et al. [10] showed that there is no evidence of success on placebo-controlled clinical trials of curcumin and they consider, after

reviewing the medicinal chemistry aspects of curcumin, that it is an unstable, reactive, promiscuous, non-bioavailable compound and, therefore, a highly improbable lead [10]. In this controversial scenario, the study of mechanisms involved in curcumin biological activities clearly demand further efforts [11, 12] and a biophysical approach in these studies could be enlightening.

In general, the biological effects of curcumin have been explained by the binding and/or interference with enzymes, receptors, transporters and signal transduction systems. Nevertheless, these important mechanisms mostly occur in membrane environments, both inside and through lipid bilayers, and this could be the link among apparently unrelated structures and processes [12, 13]. Actually, evidence is accumulating towards curcumin activity being related not only to a single isolated target but also to the modulating role of the membrane [12,

* Corresponding author at: Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: cabrera.marcia@gmail.com (M.P. dos Santos Cabrera).

¹ Present address: Departamento de Física, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFMT), Instituto de Ciências Naturais, Exatas e Educação (ICENE), Univerdecidade, Uberaba, MG, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.018>

Received 13 December 2017; Received in revised form 14 May 2018; Accepted 30 May 2018

Available online 06 June 2018

0005-2736/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

14–17]. While there are reports of variable distribution of curcumin across different tissues, they could be also attributed to several experimental shortcomings [10].

Being a highly hydrophobic molecule, curcumin, with an octanol/water partition coefficient (logP) around 3 [5], and endowed with potential to form many hydrogen bonds - intrinsic features of its amphiphaticity - it is not surprising that strong interactions with lipid bilayers were found [13, 18, 19]. Studies by Andersen's and Huang's groups [11, 13, 19, 20] found, emphasized or suggested the following important features. (1) At concentrations of the order of 100 μ M, curcumin exhibits destabilization effects on membranes, but at much lower concentrations it modulates the function of membrane proteins. (2) Apparently, no active sites in proteins were identified to be targeted by curcumin and its action is attributed to disorders in the membrane. (3) Curcumin has a high partition coefficient in relation to the bilayer. (4) Curcumin thins the lipid bilayer by increasing the membrane area. (5) It starts partitioning to the interface and at higher concentrations stepwisely inserts into the acyl chain region, keeping its monomeric state. (6) Curcumin decreases lipid bilayers stiffness. Other groups demonstrated that as a consequence of curcumin partition into lipid bilayers, certain membrane properties as the fluidity and the phase transition temperature are affected [21, 22]. In addition, curcumin induces fusion of lipid raft domains by modifying the boundary between the ordered and disordered phases [23]. In addition, it was recently found, theoretically and experimentally, that curcumin either (a) lies on the bilayer head group region, acting as a "carpet", forming a steric barrier and thus stiffening the bilayer, or (b) inserts into the membrane core and increases fluidity oppositely to cholesterol (Chol) condensing effect. Moreover, membrane hydration modulates fluidity, which increases at the higher hydration levels [12].

Studies involving the bioactivity of phytochemicals range above hundreds per year and are of fundamental importance for understanding the mechanism of interaction with membranes and supporting new ways of delivery to cells [5, 24–26]. To be bioavailable, drugs must bind to specific targets and/or to cell membranes and in some way permeate this barrier. It has been demonstrated that curcumin reduces the energy required to cross lipid bilayers and increases channel activity of proteins [11] suggesting its use as a supporting drug in more complex treatments. In addition, Chol related diseases were reported to affect membrane fluidity in a similar way as reported for some phytochemicals, including curcumin [27]. However, studies involving curcumin and lipid bilayers have mostly been carried out with pure phosphatidylcholine (PC). In the present work, we focused on the role of Chol in the interaction of curcumin and lipid bilayers, mimicking the ubiquitous composition of mammalian membranes, by determining its partition coefficients, effects on membrane rigidity and lytic activity of curcumin. Results are discussed considering that the mixture of lipids in these bilayers are present either in the liquid disordered (l_d) phase or in the in liquid-ordered/liquid-disordered (l_o/l_d) coexistence of phases. We propose that the cholesterol content has a discriminating role on the mode of interaction of curcumin, modulated by the coexistence (or not) of different lipid phases in the bilayer, which differently modify the partitioning, the rigidity and the lytic effect.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) supplied phospholipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (Egg, Chicken, SPM), cholesterol (Chol) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2,1,3benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (NBD-PE), used as supplied. Sigma-Aldrich Co. (S. Louis, MO) supplied curcumin and chlorophyll *a*. Other chemicals were high-quality analytical or spectroscopic grade.

2.2. Preparation of the curcumin solution and buffers

The curcumin solution was freshly prepared in amber glass vials by diluting around 1.2 mg of the 2 h oven-dried sample at 55–60 °C in 1.5 mL dimethylsulfoxide (DMSO) and kept protected from light. DMSO was used due to the limited solubility of curcumin in aqueous media [13], and was kept below 0.7% in experiments to avoid detrimental effects on the vesicles [20]. Curcumin solutions in water are affected by lower solubility at pH < 7 and lower stability at alkaline pH values. Thus, experiments were carried out at pH 7, in buffers containing NaCl (or NaF for DLS experiments) at the physiological concentration of 150 mM, either in 20 mM Hepes for large unilamellar vesicles, LUVs [20], or in 10 mM Tris/HCL for giant unilamellar vesicles, GUVs. In the latter case, to avoid osmotic pressure effects, the osmolarity of the sucrose (inside GUVs) and buffer solutions (outside) were checked with an osmometer (Osmette A 5002, Precision Systems, Inc., USA) and carefully matched.

2.3. Vesicles preparation

Lipid stock solutions in chloroform were mixed to give the following compositions: PC (100%), PC/Chol 80:20, PC/Chol 60:40, PC/SPM/Chol 60:20:20, PC/PS/Chol 60:20:20. LUVs could additionally contain chlorophyll *a* and giant GUVs contained the zwitterionic fluorescent probe NBD-PE, both at 0.5% (mol). To obtain lipid films, the stock solutions were evaporated under nitrogen flux in round-bottomed test tubes. Next, they were dried under vacuum for 3 h to remove solvent traces.

2.3.1. LUVs

To obtain LUV suspensions around 5 to 10 mM lipid concentration for spectroscopy experiments, the phospholipid films were hydrated with Hepes buffer at room temperature or for vesicles containing Chol or SPM above 40 °C/50 °C, respectively. Suspensions were extruded 6 times through 400 nm polycarbonate membranes and then 11 times through 100 nm membranes in the Avanti Mini extruder. LUVs that had been refrigerated and protected from light were used within 24 h of preparation. The vesicle size was confirmed by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), showing an average diameter of 125 to 130 nm (polydispersity index ranging from 0.09 to 0.14). Lipids concentration was determined by the accurate weighing of each lipid or of the vacuum dried film.

2.3.2. GUVs preparation by spontaneous formation

Phospholipid films in the desired composition (around 1 mg) were pre-hydrated for 20 min at 60 °C with N₂-saturated water. Each tube was sealed and kept at 37 °C for at least 12 h; then 3 mL of 0.3 M sucrose solution was added, and the tube was resealed and left at 37 °C for an additional 24 h period. GUVs, appearing as a cloud suspended in the solution, were harvested into a polystyrene tube [28].

2.4. Determination of partition coefficients (K_p)

Spectrophotometric titrations were carried out in the presence of buffer or LUVs of different composition, at 25 °C, first, to obtain the molar absorptivity constants (ϵ) and then, the adsorption isotherms of curcumin, which will allow the determination of the K_p . PMMA cuvettes (Sarstedt ref. 67755) of 10 mm path length were used, since they showed less undesirable curcumin binding to the walls than quartz cuvettes. To avoid unnecessary contact of curcumin with the aqueous environment, which favors binding to the cuvettes' walls, the order of aliquots addition was buffer, vesicle suspension, and curcumin solution. At each aliquot added, either of the curcumin stock solution, in the experiment to determine ϵ , or of the vesicle suspension to determine K_p , an absorption spectrum was recorded from 320 to 650 nm with a UV-Vis spectrophotometer Shimadzu UV2600 model (Shimadzu Corp.,

Japan). Duplicate experiments were performed. Spectra were corrected for changes due to vesicles addition and scattering effects (titration of vesicle suspension in the absence of curcumin), and for dilution effects to curcumin concentration and for the baseline. The second derivative was obtained to determine the wavelength of maximum absorbance [13]. The molar absorptivity (ϵ) was determined for the buffer and each vesicle composition ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the curcumin concentration range of 0 to $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ from the intensity (Abs) data. These experiments indicated that to avoid deviation of the Beer-Lambert law, probably due to insolubility effects of curcumin, K_p should be determined at $12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for the different vesicles compositions, whose concentrations ranged from 0 to around $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. K_p was determined by fitting plots with [29]

$$\frac{Abs(L)}{Abs_0} = 1 + \left(\frac{Abs_{max}}{Abs_0} - 1 \right) \frac{K_p \gamma_L [L]}{1 + K_p \gamma_L [L]}$$

where $Abs(L)$, Abs_0 and Abs_{max} are, respectively, the absorbance in the presence of LUVs, in the absence, and the maximum absorbance obtained; $[L]$ is the phospholipid concentration; K_p is the molecular lipid/water partition coefficient, and γ_L being the molar volume of the lipid [29].

2.5. Chlorophyll and curcumin fluorescence anisotropy

Experiments were performed in an ISS PC1 spectrofluorometer (Urbana Champaign, IL, USA) equipped with Glan-Thompson polarizers in the excitation and emission pathways set at 90° and 0° , respectively, during 21 iterations. Fluorescence spectra were collected at 25°C . Experiments were performed according to two different conditions: (1) for chlorophyll anisotropy: excitation and emission wavelength were set at 430 and 678 nm with bandwidths at 2 nm and 1 nm, respectively, and PMMA cuvettes (Sarstedt ref. 67755) were used [30]. LUVs suspension at $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phospholipid concentration, whose films contained the lipophilic fluorescent probe chlorophyll *a*, were titrated by adding aliquots of the curcumin solution. The probe (chlorophyll) is a reporter of the order of the phospholipid acyl chains [30]. (2) For curcumin anisotropy: excitation and emission wavelength were set at 425 and 560 nm, respectively, with bandwidths at 2 nm, and a 1 cm path length quartz cell was used. A $12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin solution was titrated by adding aliquots of LUVs suspension. At each titration step, either in the experiment with the probe chlorophyll or in the experiment with curcumin, the fluorescence anisotropy (r) was calculated using the equation $r = (F_{||} - GF_{\perp}) / (F_{||} + 2GF_{\perp})$, where $F_{||}$ is the fluorescence emission intensity parallel to the excitation plane, F_{\perp} is the normal component to the same plane, and G is the instrumental factor.

2.6. GUVs observation

Aliquots of the vesicle suspension were diluted into Tris/HCl buffer. An observation chamber of $120 \mu\text{L}$ was constructed from a common microscope slide, a coverslip, and a 2-mm-thick Teflon spacer. GUVs solution was pipetted into the chamber and left to settle down before observation. The differences in refractive index and density, between sucrose inside and buffer solution outside the vesicles, provided the required contrast for observation under the phase contrast microscope (Zeiss Axio Vert. A1 equipped with CCD camera Axiocam IC-Zen Lite 2012, Jena, Germany) and stabilized GUVs by gravity. Curcumin solution was added to the observation chamber with a conventional micropipette to final concentrations of 22.2, 12.2 and $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Bound curcumin molar fraction is given by $X_{BC} = K_p[\text{curcumin}]$ [31]. A minimum of 20 vesicles with diameters ranging from 20 to $50 \mu\text{m}$ were individually considered for observation under $40\times$ phase contrast objective, at each lipid composition, during 30 min. At the end of each observation, fluorescence images (Burner Mercury HBO 50 AC lamp

and 460–490 nm excitation filter) were taken to monitor other possible morphological changes. Vesicles loosing contrast were counted to calculate the number of events (% of total number of observations). Before the addition of curcumin solution, GUVs were observed in a control experiment.

2.7. Turbidity measurement

Absorption spectra collected for the ϵ determination (see Section 2.4) were analyzed for their relative change in turbidity at 500 nm in relation to the spectra obtained in the absence of curcumin [32]. A correction for the absorbance of curcumin in buffer was applied.

2.8. DLS experiment

The Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) was used in its Dynamic Light Scattering (DLS) mode to determine the changes in LUVs size induced by curcumin as a complement to the turbidity measurement. Aliquots of curcumin solution were added to plastic vials containing Hepes buffer and an aliquot of the vesicle suspension to a final concentration of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Each preparation was equilibrated for 30 min, at 25°C , then transferred to a disposable cuvette (DTS10700 cell, Malvern Instruments) for the size evaluation.

3. Results

3.1. Curcumin strongly partitions to phospholipid bilayers containing cholesterol

The binding of curcumin to phospholipid bilayers was demonstrated through the marked blue shift observed in the fluorescence spectra when a curcumin solution was titrated with large unilamellar vesicle suspensions (LUVs). In buffer, the emission spectrum of curcumin exhibits a peak at 560 nm (Fig. 1A). As soon as a LUV aliquot is added, the emission intensity increases constantly in the range of $50\text{--}500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lipid concentration for PC, PC/Chol 80:20 and 60:40 compositions, while the peak is displaced towards lower wavelength (λ) values (Fig. 1B). Blue shift and fluorescence intensity increase of curcumin spectra were associated with its interactions with environments of lower viscosity and lower polarity [33]. Our observations indicate that curcumin partitions to these vesicles, moving from the polar environment of the aqueous buffer to the non-polar region of the lipid bilayers.

3.1.1. Fluorescence anisotropy of curcumin

Curcumin fluorescence anisotropy showed increased values with the addition of lipid suspension, due to a slower rotational diffusion of the curcumin-membrane complex as compared to curcumin alone. For example, anisotropy values for curcumin in PC:Chol 60/40 range from 0.15 in the absence of lipids to 0.39 at $1.6 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phospholipid concentration, close to the maximum theoretical value [34]. Fig. 1C also shows curcumin partitioning to the membranes and confirms that the content of Chol modulates this process. Changes in curcumin anisotropy values followed the order $\text{PC} < \text{PC/Chol } 80:20 < \text{PC/Chol } 60:40$, reflecting that curcumin lays in a more restricted environment caused by the higher Chol content. Experiments performed by Filippov and collaborators [35] show that increasing Chol content reduces the lateral diffusion coefficient of DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) bilayers, while the addition of curcumin to DMPC/Chol mixtures slightly reduces the lateral diffusion. This is in agreement with our findings showing that curcumin, highly partitioned into PC bilayers, exhibits a low anisotropy in the absence of Chol and a very high anisotropy at 40% Chol, reflecting its reduced mobility in this bilayer of reduced lateral diffusion characteristics.

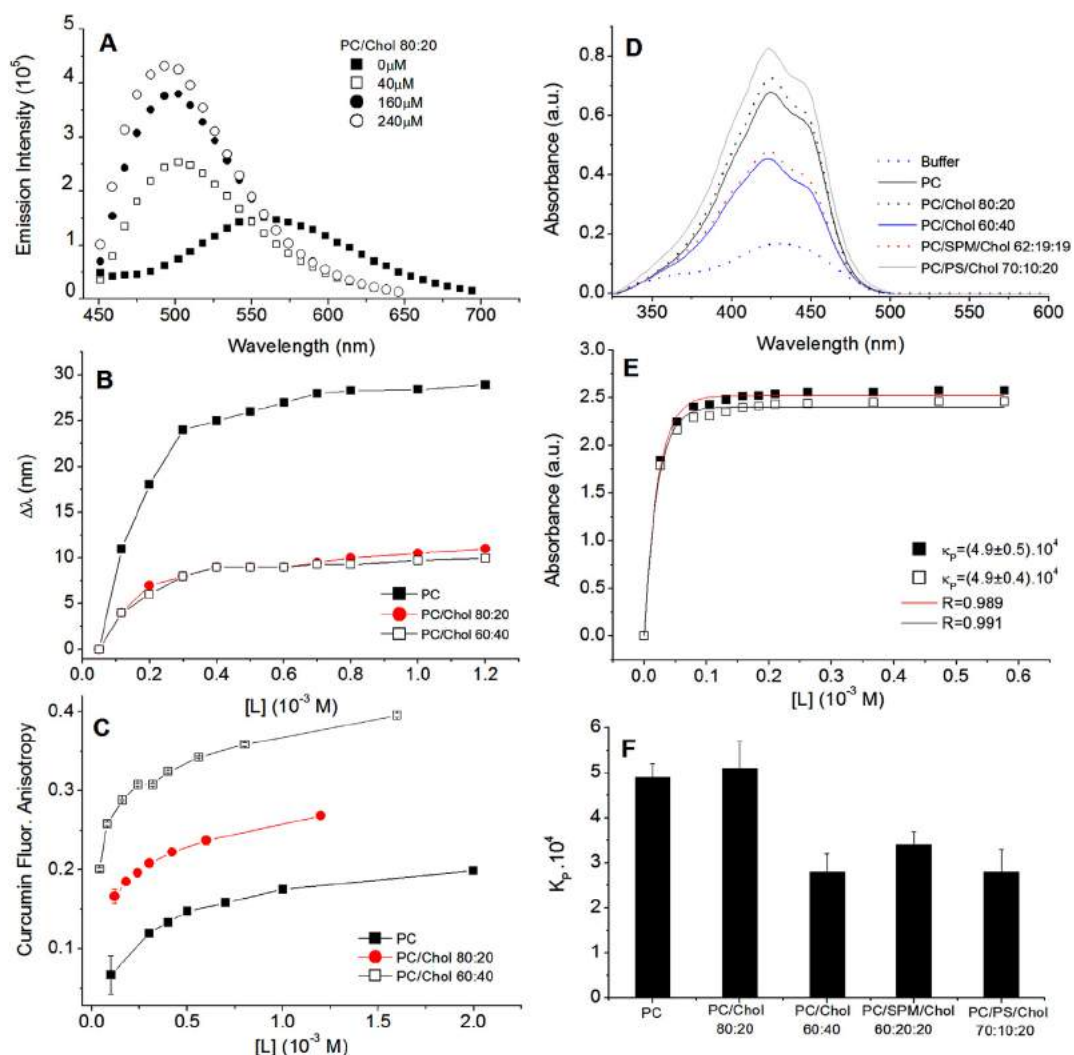


Fig. 1. Curcumin partitioning to LUVs of different lipid composition. (A) Examples of fluorescence spectra of curcumin ($12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence of increasing concentration of phospholipids [L], at 25°C , pH 7, obtained with LUVs made of PC/Chol 80:20. (B) Spectral shifts, $\Delta\lambda$, of the maximum fluorescence intensity peaks. (C) Average fluorescence anisotropy of curcumin under LUVs titration. (D) Curcumin ($12.2 \mu\text{M}$) absorption spectra in buffer (maximum wavelength, $\lambda_{\text{max}} = 428 \pm 1 \text{ nm}$) and in the presence of LUVs at $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 425 \pm 1 \text{ nm}$), 25°C . (E) Example of curcumin K_p determination in the presence of PC LUVs. Average K_p was found to be $(4.9 \pm 0.3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$; R-values correspond to the correlation coefficient of the fit. (F) Calculated molecular lipid/water partition coefficients, K_p , values for curcumin.

3.2. Determination of curcumin partition coefficients

The molecular lipid/water partition coefficients (K_p) in vesicles of different lipid composition were determined considering the effects of Chol levels, at 20 and 40% (mol/mol), and of the presence of SPM or of the anionic phospholipid PS. Although bioavailability studies in humans indicate that 0.1 to $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ is the plasmatic concentration range of flavonoids [36], we considered the concentration effect of membranes and the solubility parameters of curcumin, limited to $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [13, 19, 20], to define the range of concentrations to be tested. Depending on the environment, the graphical determination of ϵ values had to be limited to 0 to 12 or 0 to $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ due to deviation from the Beer-Lambert law that possibly denotes aggregation. Jasim and Ali [37] found that this same limited solubility range depends on the solvent used. Curcumin spectra in $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes buffer, containing $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, exhibits a maximum absorption at $428 \pm 1 \text{ nm}$, and ϵ values of $(15.4 \pm 0.5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ were determined (Fig. S11a). The process of obtaining ϵ values for curcumin is exemplified in Fig. S11b and c. Table S11 shows the wavelength of the maximum absorption (λ_{max}) and ϵ values, which increased significantly in the presence of the different vesicles in relation to that obtained in

buffer. Curcumin molar absorptivity has been reported in the range of $20,000$ to $50,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in most solvents [5].

The interaction of curcumin with phospholipid bilayers can be described similarly to its interaction with the surfactant sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate [38]. The aqueous spectra of curcumin shows a peak at 425 nm and a shoulder at 360 nm , which correspond to absorption bands of diferuloyl and feruloyl groups, respectively [38]. At low lipid concentration ($26.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), some contact of curcumin with water occurs as denoted by the shoulder at 360 nm in the spectra (Fig. S11d). By increasing the lipid to curcumin ratio the absorbance increases, blue shift is observed and the shoulder disappears, because of the curcumin hydrophobic interactions with the apolar region of the acyl chains. This event is observed at approximately $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lipid concentration, which means a molecular ratio around 4:1 PC/curcumin. Fig. 1D shows that in the presence of vesicles of different lipid compositions (lipid to curcumin ratio > 6) spectra do not exhibit the shoulder observed in their absence at 360 nm , and the maximum absorbance corresponds to the diferuloyl peak.

Fig. 1E (complemented by Fig. S11d and e) illustrates the graphical determination of K_p for PC vesicles, in the absence of Chol, and Fig. 1F compares the average K_p values obtained for the remaining vesicle

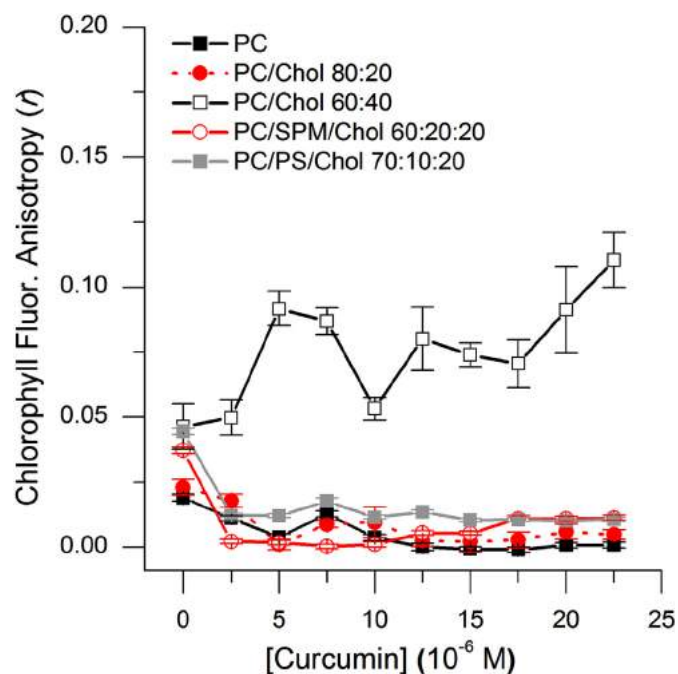


Fig. 2. Bilayers rigidity parameter. The fluorescence anisotropy, r , of the probe chlorophyll incorporated in distinct LUVs compositions under curcumin solution titration, at pH 7 and 25 °C. Vesicle concentration was kept at $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and samples were incubated previously to the measurements during 4 h in the dark.

compositions. These results showed that curcumin partitions into these lipid bilayers four orders of magnitude more than into the aqueous environment with physiological salt content. In addition, Chol at 20% does not reduce curcumin partitioning in relation to PC vesicles, but at 40% Chol K_p values are significantly reduced. Higher ordered lipid bilayers are known to reduce K_p values in comparison to the less ordered and flexible ones [33]. The presence either of 10% PS or of 20% SPM also affects curcumin partitioning, reducing it to comparable levels as 40% Chol does. At pH 7, curcumin exhibits a slightly negative character [39], which can contribute to electrostatic repulsion towards the anionic PS and the reduced affinity for these vesicles. The equivalent partitioning of curcumin towards the PS and the SPM containing bilayers may underlie some of its promiscuous activities as the lack of selectivity between normal versus cancer cells [10].

3.3. Curcumin stiffens bilayers with 40% Chol

Fig. 2 shows the fluorescence anisotropy of chlorophyll that can report the disturbing of the lipid packing order on the distinct lipid bilayers promoted by increasing concentrations of curcumin. The increase of average anisotropy, r , reflects an increased acyl chain order, indicative of higher lipid bilayer rigidity, while the decrease of r suggests that the lipid packing order is decreased. In the absence of curcumin the average values of r showed to be dependent on the increase of the Chol fraction ($r = 0.019 \pm 0.001$ for PC and $r = 0.046 \pm 0.009$ for PC:Chol 60/40, for example). The higher Chol content in the absence of curcumin leads to higher average anisotropy values of bilayers because of the Chol effect of increasing the membrane stiffness by decreasing molecular free-volumes and by increasing the lipid acyl chains order [35]. The data for PC vesicles showed an initial fluctuation followed by an anisotropy reduction as long as the curcumin concentration was increased. It suggests that curcumin disturbed the lipid bilayer by reducing its packing order. MD simulation results in DMPC showed that curcumin increases the presence of water molecules in the bilayer [12]. In addition, a tendency to decrease the hydrocarbon chain order,

indicating more flaccid bilayers, was observed in this simulation and in POPC bilayers simulations [11]. However, in POPC/Chol 60:40 our experiments showed higher r values. At this condition, average anisotropy had a pronounced growth along curcumin titration indicating that the molecule increased the lipid packing order. The presence of SPM and Chol each at 20% showed the same effect as observed with PC/Chol 80:20. Regardless of the vesicle composition, at 20% Chol, curcumin does not increase the anisotropy or it does not stiffen lipid bilayers, but at 40% Chol, increasing curcumin concentration produces higher anisotropy values.

3.4. Curcumin preferentially lyses the more flaccid GUVs

Focusing in the lipid compositions that showed the most striking features, GUVs were composed of PC, PC/Chol 80:20 and 60:40 to observe morphological changes. At the phase contrast observation GUVs show a bright circular surface, which delimits each GUV and represents the lipid bilayer. The brightness is due to the difference of the refractive index between the solutions inside and outside the vesicles. Monitoring this brightness along with curcumin interaction we observed that the shine is reduced and the phase contrast is lost as the inner content leaks and mixes with the outside environment (Fig. 3). Fluorescence images did not show other possible morphological changes as buds or lipid aggregates. In the absence of curcumin, GUVs were observed during 30 min, as control references (complemented in Fig. S12), and showed to be stable.

Our experiments showed that curcumin has a membranolytic activity inducing leakage from GUVs, regardless of the lipid composition. At the curcumin concentration of $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($X_{BC} = 0.29$ and 0.30 for PC and PC/Chol 80:20, respectively), 39% of the PC vesicles under observation lost phase contrast within 30 min, while for GUVs made of PC/Col 80:20 leakage was observed for 24%. This is indicative of defects impairing the barrier properties of the lipid bilayer. The loss of phase contrast was not accompanied by vesicles changes in morphology. It means that the spherical circumference and vesicle size were kept unchanged during the whole process. Differences in time efflux were also found for each GUV composition. Among vesicles that lost phase contrast, those composed of PC, in great majority, showed total loss within 15 min of observation, while those of PC/Chol 80:20 exhibit the same effect after 25 min. The number of GUVs made of PC:Col 60/40 that lost phase contrast was considerably reduced, for example, at $12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin ($X_{BC} = 0.37$), 5% of vesicles were observed losing contrast during the observation time. These findings indicate that the presence of Chol with its membrane condensing effect delay or severely impair the sucrose efflux.

3.5. Does curcumin show some kind of detergent-like activity?

For vesicles made of PC and PC/Chol 80:20 we observed that curcumin induces lysis of GUVs and decreases stiffness in LUVs, while for those vesicles made of PC/Chol 60:40 the opposite was observed in both cases. Additionally, bilayers containing 40% Chol, PS or SPM exhibit similar anisotropy in the absence of curcumin, but in the presence of curcumin they show a different profile. While the former increases the anisotropy the latter two, decrease. These events suggested a possible detergent-like effect of curcumin, depending on Chol concentration. The solubilization process of LUVs can be followed through changes in the light scattering [32, 40]. Fig. 4A shows the effect of increasing curcumin concentration on the turbidity of vesicles suspension in relation to the turbidity observed in the absence of curcumin. Among zwitterionic LUVs the relative turbidity decrease follows the order PC/Chol 60:40 > PC/SPM/Chol 60:20:20 > PC/Chol 80:20 > PC, while with the anionic PC/PS/Chol LUVs there is a turbidity increase. These effects could be attributed either to a solubilization effect or size change. However, DLS experiments (Fig. 4B) show that there is no size change, except a limited increase of size of the 40%

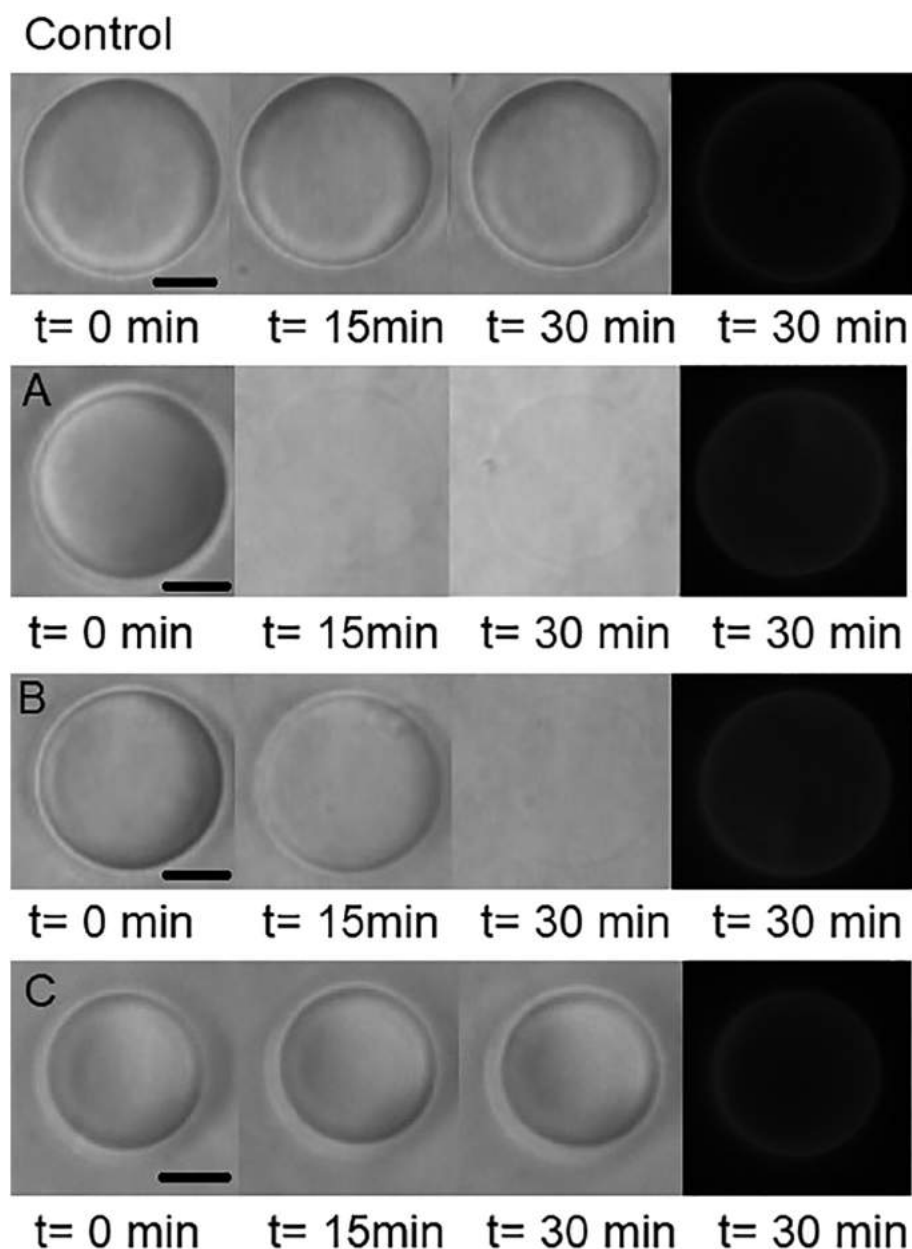


Fig. 3. Curcumin effect by single vesicle observation. Examples of phase contrast and fluorescence microscopy images of GUVs observed for 30 min. Under phase contrast, single vesicles were accompanied followed by the acquisition of the sample fluorescence images. Experiments were carried out at room temperature. Control, experiment performed in the absence of curcumin for PC GUVs (see additional controls in Fig. S12). (A) PC GUV in the presence of $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin ($X_{\text{BC}} = 0.29$). (B) PC/Chol 80:20 GUV in the presence of $6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin ($X_{\text{BC}} = 0.30$). (C) PC/Chol 60:40 GUV in the presence of $12.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin ($X_{\text{BC}} = 0.37$). The size bar represents $10 \mu\text{m}$.

Chol LUVs that might reflect some curcumin aggregation on the vesicle surface at the $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin concentration. These light scattering experiments indicate that curcumin exerts a detergent-like effect, which is apparently independent of the lipid packing order, without affecting vesicles size.

4. Discussion

Although Chol is an important component of animal cells, ranging from 25 to 50% cholesterol/phospholipid ratio, and standing out under health and disease conditions [41, 42], most research on the interactions of curcumin and lipid bilayers do not take into account the presence of Chol. In the present work, model membranes containing either 20 or 40% Chol were taken as mimetic systems for mammalian membranes representing, approximately, the physiological limits [41], and the interaction with curcumin was investigated with a biophysical approach.

4.1. In 40% cholesterol bilayers, curcumin further increases the lipid packing order

Similarities and divergences on the influence of Chol and curcumin in membrane properties were discussed in several works [12, 26, 27]. Ingólfsson et al. [11] found that besides curcumin other phytochemicals are located in the bilayer/solution interface, suggesting a common mechanism. By molecular dynamics simulations, they showed that curcumin lies in the backbone region, which is the same region where Chol is normally located [42]. Another very recent work advanced by proposing two models for curcumin interaction with PC lipid bilayers: one, where curcumin establishes hydrogen bonds with head groups, lying on the interface with the aqueous environment when the bilayer is dehydrated; and another, where curcumin reaches the acyl chain region, similarly to Chol, but contrarily to it, does not stiffen the bilayer. Instead, it makes the bilayer more flaccid and increases the presence of water molecules in this region [12]. These different effects, dependent on the bilayer hydration level, where attributed to the presence of salts, buffer solutions or macromolecular solutes. We found that Chol, as a

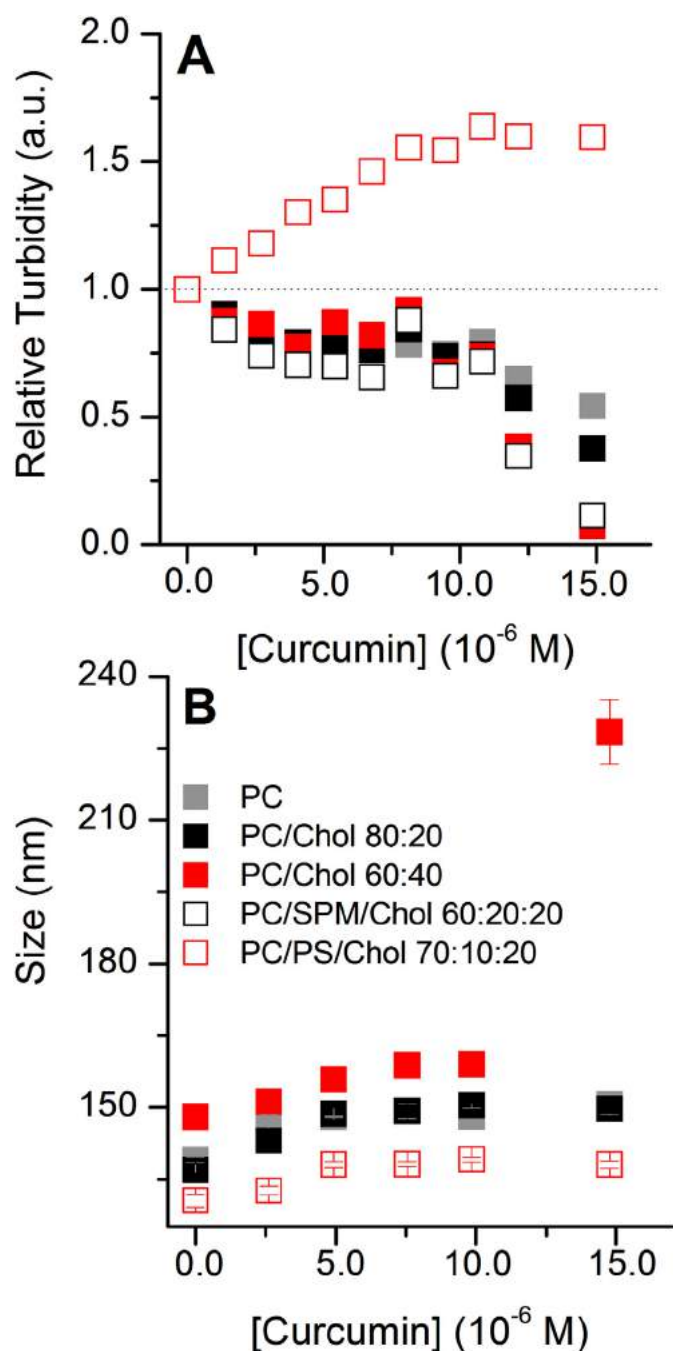


Fig. 4. Curcumin detergent-like and size effects investigation. (A) Relative turbidity change (at 500 nm) of LUVs suspension ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phospholipids) induced by increasing curcumin concentration, at 25°C . (B) Determination of LUVs size variation using DLS.

macromolecular solute, at 20% concentration in POPC bilayers practically does not affect the interaction of curcumin, which partitions at the same ratio (Fig. 1F), slightly decreases the anisotropy (Fig. 2), meaning some fluidization effect, confirmed by the decrease in the relative turbidity (Fig. 4A). The large blue shift observed in the fluorescence experiments (Fig. 1B) is compatible with curcumin being embedded in an environment of higher viscosity and lower polarity [33] as proposed for bilayers at higher hydration level [12]. When Chol concentration was raised to 40%, the effect was similar to that observed with dehydrated bilayers as, a more superficial location, a decreased partitioning (Fig. 1F) and exhibiting the stiffening effect (Fig. 2). At Chol concentrations around 30%, the lateral diffusion of lipids in membranes is

significantly decreased due to a smaller free area/lipid, which would impair the embedding of curcumin molecules [35]. Taken together these fluorescence spectroscopy results raised the question of curcumin having a preferential partitioning to bilayers in the liquid disordered phase (l_d).

4.2. The membranolytic activity of curcumin increases in vesicles at a liquid disordered phase

Curcumin concentrations as low as $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, around 0.30 bound mole fraction, were found to induce leakage from PC and PC/Chol 80:20, although to a lesser extent in vesicles containing Chol. This kind of event is characteristic of molecules that promote defects on the barrier properties of membranes as exemplified by antimicrobial peptides [28, 43, 44], and it was observed for curcumin in this work for the first time, to the best of our knowledge. Differences in the leakage kinetics due to the presence of Chol were also found. The lytic effect was practically abolished for vesicles containing 40% Chol, even at $22.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin (0.74 bound mole fraction). It suggests that Chol in some way hinders the curcumin-membrane interaction, demonstrated by the delay and decrease in the lytic activity, and is probably related to the effect of Chol modulating the rigidity of membranes. Once that curcumin strongly partitions to these vesicles and exhibits intense blue-shift, the practical absence of the lytic effect is compatible with curcumin acting as a protecting carpet on the surface of the membrane as postulated by Alsop et al. [12].

4.3. Cholesterol contents modulates curcumin mode of interaction in lipid ordered/disordered bilayers

Fig. 1F shows that the different bilayers used in this study could be divided into two groups in relation to the partitioning of curcumin: one with higher K_p values and the other one with around half these values. Main differences among these groups are related to higher anisotropy (Fig. 2), higher phase transition temperature (T_m), PS with $+14^\circ\text{C}$ and -1 net charge, and zwitterionic SPM with T_m around 40°C . Higher T_m temperatures are associated with less fluid membranes. In addition, SPM has high affinity for Chol, both packing tightly in ordered domains and these effects are recognized to influence other interactions [45].

The differences in curcumin interactions with lipid bilayers can be discussed in terms of the l_o/l_d phase coexistence, which we believe sheds new light to the effects of curcumin on lipid bilayers. Almeida et al. [46] obtained the binary and ternary phase diagrams for mixtures of POPC, egg SPM and Chol. For the binary mixtures PC/Chol 80:20 and PC/Chol 60:40 at the temperature of 25°C , the diagram shows the coexistence of l_o and l_d phases. POPC has a T_m around -2°C , but can form l_o phase in the presence of Chol either below or above the T_m , enabling phase separation. Chol concentration to form exclusively a l_o phase would be above 45%, thus at the concentrations we considered, membranes will exhibit the coexistence of l_o/l_d phases [46]. For the mixture PC/SPM/Chol 60:20:20, we observed a decreased partition coefficient, much like that found for PC/Chol 60:40, and the ternary diagram indicates the l_o/l_d coexistence region or the “rafts region”. Chol is known for inducing the phase separation between low (POPC) and high T_m lipids (SPM), especially at room temperature, and can interact preferentially with SPM (higher hydrogen bonding potential). These effects give place to the l_o/l_d phases coexistence [46–48]. Considering the interaction of these bilayers with curcumin, evidence was found showing that it modulates the structure of lipid rafts by localizing at the interface of the l_o/l_d phases with probable interactions of its hydroxyl groups and the phospholipid head groups [23]. Tsamaloukas and collaborators [45] have described similar effects when they explored the interactions of Triton X-100 on the organization of bilayers as PC/Chol, PC/SPM, PC/Chol/SPM and pure PC. They found partition coefficients according to the following order $\text{PC} > \text{PC/SPM} \approx \text{PC/Chol} > \text{PC/Chol/SPM}$. They suggested that the reduction in Triton X-100

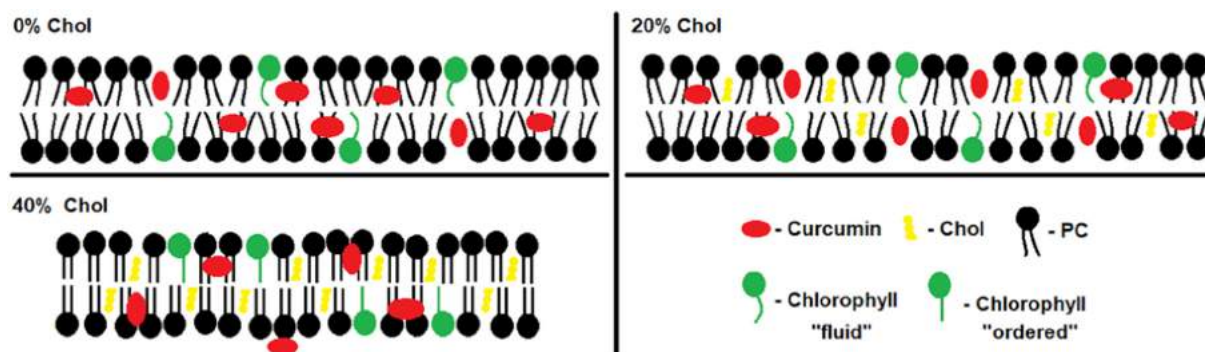


Fig. 5. Schematic representation of curcumin action. Model of the mechanism for the cholesterol modulation of curcumin interaction with lipid bilayers.

interaction with PC/Chol/SPM in comparison to the other lipid compositions occurs because the interactions involved at SPM/Chol contacts oppose to Triton X-100 incorporation, implying that SPM/Chol interactions are energetically more favorable. Taken together we suggest that gradually reducing the PC content, either in vesicles containing 40% Chol or 20% SPM and 20% Chol, or 20% Chol impairs the preferential interaction of curcumin with PC and reduces the lytic activity in relation to that observed in PC. Fig. 5 illustrates our suggested mechanism for the cholesterol modulation of curcumin interaction with lipid bilayers. In model membranes containing either 0% or 20% Chol bilayers are less ordered, as indicated by the chlorophyll probe, and curcumin extensively partitions. In the presence of 40% Chol, a more ordered lipid packing is indicated by the results of the anisotropy of the chlorophyll probe, partitioning is reduced and curcumin assumes mostly a more superficial location.

Although curcumin targeting proteins and the different components of the membrane cannot be excluded by the present work, curcumin certainly affects lipid bilayers features, by strongly partitioning into them ($10^4 K_p$ values) and reducing the anisotropy (except at 40% Chol concentration), even for those with an anionic character. There are reports of variable distribution of curcumin across different tissues attributed to several experimental shortcomings, in the preparation of samples, in the use of high concentrations – above critical aggregation concentration – and in the detection assays [10]. Besides improving experimental conditions when required, our results point to the need of considering different Chol levels in the analysis of these tissues and other biological effects.

5. Conclusions

Several phytochemicals have been studied for their potential as drugs, as templates for drug design or nutraceuticals, however investigation of the molecular mechanisms underlying their biological activities have not been keeping the same pace. Curcumin is one of the most searched, and once its effects on membranes were appreciated, comparisons with the role of Chol in membranes were straightforward done. Nevertheless, results presented in this work provide evidence of a modulating effect of Chol on curcumin-lipid bilayer interaction. The partitioning of curcumin into lipid bilayers revealed strongest affinity for PC and PC/Chol 80:20, which was reduced either by increase of Chol to 40%, or by the presence of 20% SPM, or even by 10% PS. Blue shifts of curcumin fluorescence showed that in the presence of Chol curcumin binds at a more superficial location. Moreover, anisotropy of the probe chlorophyll revealed that, except for the bilayer containing 40% Chol, curcumin increases bilayer flaccidity. Curcumin also showed a membranolytic mechanism by inducing the leakage of the internal content of GUVs, which is reduced by increasing the content of Chol. We propose that in vesicles containing 40% Chol (or even 20% Chol plus 20% SPM) where the l_o/l_d phases coexist, curcumin, with a preferential location on the interface of those phases and a preferential

interaction with PC, will be impaired in the partitioning, and in the lytic activity. This proposal was based on the fact that at 40% Chol, phospholipids packed in a higher order accommodate less curcumin molecules at a more superficial location, further increasing the packing, reducing flaccidity, and almost abolishing lysis. On the opposite side of the highly disordered PC vesicles, curcumin partitions more and deeper, attracting more water molecules into the bilayer [12], with the effects of increasing flaccidity and exerting detergent-like effects, which lead to an increased lytic activity.

Abbreviations

LUV large unilamellar vesicle
GUV giant unilamellar vesicle

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.018> associated with this article can be found, in online version.

AcknowledgmentFunding sources

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP Nos. 2012/24259-0, 2014/08372-7, 2014/06713-1, 2014/11877-3. DBM and VEF are recipients of CAPES scholarships.

The authors are thankful to Prof. Dr. M. C. Bisinoti and A. B. Moreira for the use of the spectrophotometer (FAPESP 2012/23066-4) and Prof. Dr. P. Rahal for the use of the fluorescence microscope.

Appendix A. Supplementary data

Additional figures of spectroscopy experiments and determination of ϵ values for curcumin. Table of molar absorptivity values (ϵ) for curcumin in several lipid compositions (PDF). Controls for GUVs experiment. Supplementary data to this article can be found online at doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.018>.

References

- [1] K.I. Priyadarsini, Chemical and structural features influencing the biological

- activity of curcumin, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 2093–2100.
- [2] R.I. Maheshwari, A.K. Singh, J. Gaddipati, R.C. Srimal, Multiple biological activities of curcumin: a short review, *Life Sci.* 78 (2006) 2081–2087.
- [3] A. Sarkar, R. De, A.K. Mukhopadhyay, Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 2736–2748.
- [4] S. Teixeira, C. Siquet, C. Alves, I. Boal, M.P. Marques, F. Borges, J.L. Lima, S. Reis, Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 1099–1108.
- [5] K.I. Priyadarsini, Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 10 (2009) 81–95.
- [6] T. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamada, Curcumin and Alzheimer's disease, *CNS Neurosci. Ther.* 16 (2010) 285–297.
- [7] M.M. Yallapu, P.K.B. Nagesh, M. Jaggi, S.C. Chauhan, Therapeutic applications of curcumin nanoformulations, *AAPS J.* 17 (2015) 1341–1356.
- [8] Y. Sunagawa, Y. Katanasaka, K. Hasegawa, T. Morimoto, Clinical applications of curcumin, *PharmaNutrition* 3 (2015) 131–135.
- [9] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, M. Bebawy, F. Luk, R.S. Mason, R. Rohanizadeh, Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century, *Curr. Neuropharmacol.* 11 (2013) 338–378.
- [10] K.M. Nelson, J.L. Dahlin, J. Bisson, J. Graham, G.F. Pauli, M.A. Walters, The essential medicinal chemistry of curcumin, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 1620–1637.
- [11] H.I. Ingólfsson, P. Thakur, K.F. Herold, E.A. Hobart, N.B. Ramsey, X. Periolo, D.H. de Jong, M. Zwama, D. Yilmaz, K. Hall, T. Maretzky, H.C. Hemmings Jr., C. Blobel, S.J. Marrink, A. Koçer, J.T. Sack, O.S. Andersen, Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 1788–1798.
- [12] R.J. Alsop, A. Dhaliwal, M.C. Rheinstädter, Curcumin protects membranes through a carpet or insertion model depending on hydration, *Langmuir* 33 (2017) 8516–8524.
- [13] H.I. Ingólfsson, R.E. Koeppel, O.S. Andersen, Curcumin is a modulator of bilayer material properties, *Biochemist* 46 (2007) 10384–10391.
- [14] H. Ligeret, S. Barthelemy, R. Zini, J.-P. Tillement, S. Labidalle, D. Morin, Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 919–929.
- [15] P. Tyagi, M. Singh, H. Kumari, A. Kumari, K. Mukhopadhyay, Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane, *PLoS One* 10 (2015) e0121313, 1–15.
- [16] Y.A. Mahmoud, Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions, *Br. J. Pharmacol.* 150 (2007) 200–208.
- [17] P. Singh, R.K. Kesharwani, K. Misra, S.I. Rizvi, The modulation of erythrocyte Na^+/K^+ -ATPase activity by curcumin, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 1023–1030.
- [18] A. Kunwar, R. Barik, K. Pandey, K.I. Priyadarsini, Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1513–1520.
- [19] W.C. Hung, F.Y. Chen, C.C. Lee, Y. Sun, M.T. Lee, H.W. Huang, Membrane-thinning effect of curcumin, *Biophys. J.* 94 (2008) 4331–4338.
- [20] Y. Sun, C.C. Lee, W.C. Hung, F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin, *Biophys. J.* 95 (2008) 2318–2324.
- [21] H. Tsuchiya, Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity, *Food Chem.* 120 (2010) 1089–1096.
- [22] B. Pawlikowska-Pawłęga, H. Dziubińska, E. Król, K. Trębacz, A. Jarosz-Wilkolazka, R. Paduch, A. Gawron, W.I. Gruszecki, Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 254–265.
- [23] M. Tsukamoto, K. Kuroda, A. Ramamoorthy, K. Yasuhara, Modulation of raft domains in a lipid bilayer by boundary-active curcumin, *Chem. Commun.* 50 (2014) 3427–3430.
- [24] A. Karewicz, D. Bielska, B. Gzyl-Malcher, M. Kepczynski, R. Lach, M. Nowakowska, Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 88 (2011) 231–239.
- [25] G. Chen, Y. Chen, N. Yang, X. Zhu, L. Sun, G. Li, Interaction between curcumin and mimetic biomembrane, *Sci. China Life Sci.* 55 (2012) 527–532.
- [26] B. Roy, P. Guha, R. Bhattarai, P. Nahak, G. Karmakar, P. Chettri, A.K. Panda, Influence of lipid composition, pH, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug, *J. Oleo Sci.* 65 (2016) 399–411.
- [27] D. Margina, D. Gradinaru, G. Manda, I. Neagoe, M. Ilie, Membranar effects exerted in vitro by polyphenols – quercetin, epigallocatechin gallate and curcumin – on HUVEC and Jurkat cells, relevant for diabetes mellitus, *Food Chem. Toxicol.* 61 (2013) 86–93.
- [28] Y. Tamba, S. Ohba, M. Kubota, H. Yoshioka, H. Yoshioka, M. Yamazaki, Single GUV method reveals interaction of tea catechin (–)-epigallocatechin gallate with lipid membranes, *Biophys. J.* 92 (2007) 3178–3194.
- [29] N.C. Santos, M. Prieto, M.A.R.B. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 123–135.
- [30] M. Drăgușin, L. Țugulea, C. Ganea, The effects of the natural antioxidant quercetin and anions of the Hoffmeister series on liposomes marked with chlorophyll a, *Gen. Physiol. Biophys. J.* 29 (2010) 41–49.
- [31] G. Schwarz, S. Stankowski, V. Rizzo, Thermodynamic analysis of incorporation and aggregation in a membrane. Application to the pore forming peptide alamethicin, *Biochim. Biophys. Acta* 861 (1986) 141–151.
- [32] H. Ahyayauch, M.I. Collado, A. Alonso, F.M. Goñi, Lipid bilayers in the gel phase become saturated by Triton X-100 at lower surfactant concentrations than those in the fluid phase, *Biophys. J.* 102 (2012) 2510–2516.
- [33] D. Patra, E. El Khoury, D. Ahmadi, S. Darwish, R.M. Tafesh, Effect of curcumin on liposome: curcumin as a molecular probe for monitoring interaction of ionic liquids with 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposome, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 317–327.
- [34] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, Boston, MA, 2006.
- [35] A.V. Filippov, S.A. Kotenkov, B.V. Munavirov, A.V. Khaliullina, O.I. Gnezdilov, O.N. Antzutkin, Effect of curcumin on lateral diffusion in lipid bilayers, *Mendeleev Commun.* 26 (2016) 109–110.
- [36] A.L. Cheng, C.H. Hsu, J.K. Lin, M.M. Hsu, Y.F. Ho, T.S. Shen, J.Y. Ko, J.T. Lin, B.R. Lin, W. Ming-Shiang, H.S. Yu, S.H. Jee, G.S. Chen, T.M. Chen, C.A. Chen, M.K. Lai, Y.S. Pu, M.H. Pan, Y.J. Wang, C.C. Tsai, C.Y. Hsieh, Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions, *Anticancer Res.* 21 (2001) 2895–2900.
- [37] F. Jasim, F. Ali, Measurements of some spectrophotometric parameters of curcumin in 12 polar and nonpolar organic solvents, *Microchem. J.* 39 (1989) 156–159.
- [38] H. Zhou, Q. Yang, X. Wang, Spectrometric study on the binding of curcumin with AOT: effect of micelle-to-vesicle transition, *Food Chem.* 161 (2014) 136–141.
- [39] Z. Wang, M.H.M. Leung, T.W. Kee, D.S. English, The role of charge in the surfactant-assisted stabilization of the natural product curcumin, *Langmuir* 26 (2009) 7–11.
- [40] B. Mattei, A.D.C. França, K.A. Riske, Solubilization of binary lipid mixtures by the detergent Triton X-100: the role of cholesterol, *Langmuir* 31 (2014) 378–386.
- [41] M.V. Lizenko, T.I. Regeard, A.M. Bakhirev, E.I. Lizenko, Lipid composition of cells and low-density lipoproteins in blood serum of human and some vertebrate species, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 47 (2011) 428–437.
- [42] Y. Song, A.K. Kenworthy, C.R. Sanders, Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins, *Protein Sci.* 23 (2014) 1–22.
- [43] T.M. Domingues, K.A. Riske, A. Miranda, Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide gomesin by observing giant unilamellar vesicles, *Langmuir* 26 (2010) 11077–11084.
- [44] M.P. Dos Santos Cabrera, D.S. Alvares, N.B. Leite, B. Monson De Souza, M.S. Palma, K.A. Riske, J. Ruggiero Neto, New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles, *Langmuir* 27 (2011) 10805–10813.
- [45] A. Tsamaloukas, H. Szadkowska, H. Heerklotz, Nonideal mixing in multicomponent lipid/detergent systems, *J. Phys. Condens. Matter* 18 (2006) 1125–1138.
- [46] R.F. De Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416.
- [47] C.K. Haluska, A.P. Schröder, P. Didier, D. Heissler, G. Duportail, Y. Mély, C.M. Marques, Combining fluorescence lifetime and polarization microscopy to discriminate phase separated domains in giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.* 95 (2008) 5737–5747.
- [48] D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* 327 (2010) 46–50.