RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/03/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de São José do Rio Preto

Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo

São José do Rio Preto 2020 Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto Coorientadora: Dr^a. Dayane dos Santos Alvares

São José do Rio Preto 2020

M618i	Miasaki, Kenneth Massaharu da Fonseca Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo / Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki São José do Rio Preto, 2020 97 p. : il., tabs., fotos
	Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: João Ruggiero Neto Coorientadora: Dayane dos Santos Alvares
	1. Biologia Molecular. 2. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 3. Modelos biológicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dra. Iolanda Midea Cuccovia USP – Câmpus de São Paulo

Prof^a. Dra. Rosangela Itri USP – Câmpus de São Paulo

> São José do Rio Preto 24 de Março de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. João Ruggiero Neto pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigado por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, por toda a atenção, pela confiança depositada em mim e, claro, pela orientação que me guiou para o melhor caminho.

À minha coorientadora Dayane dos Santos Alvares por ensinar a realizar e analisar diversas técnicas experimentais, pela confiança, atenção e por toda ajuda. Muito obrigado pela valiosa companhia, amizade, discussões e orientação.

À Prof^a Márcia Perez dos Santos Cabrera e ao Prof. Eloi da Silva Feitosa pela parceria e por disponibilizarem água ultra-pura tão necessária nos sensíveis experimentos realizados.

Aos técnicos de laboratório Barbosa e Bruno, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

À colega de laboratório Taisa Giordano Viegas, por toda ajuda e amizade.

À minha família, que sempre me incentivou a estudar e me deu liberdade de fazer o que me faz feliz. Jamais poderei retribuir a vocês tudo o que foi feito por mim.

Aos amigos da faculdade e departamento que enfrentam e caminham os mesmos caminhos que eu e entendem todas as dificuldades, obrigado por toda a alegria trazida nos momentos de descontração e pelos conselhos.

A todos os professores e pessoas que se dedicam a educação e a ciência, sem vocês não haveria progresso.

As professoras Iolanda Midea Cuccovia e Rosangela Itri por terem aceitado fazer parte da banca de avaliação.

E claro, ao meu cachorro Boizão que também faz parte da família e me traz felicidade e alegria todos os dias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Processo – 88882.434300/2007-01.

"Um grão de arroz pode virar a balança. Um homem pode ser a diferença entre a vitória e a derrota" – Mulan (Filme)

RESUMO

Os peptídeos sintéticos L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂, Q = +3e) e seu análogo acetilado (acL1A, Q = +2e) utilizados neste estudo foram projetados para que tenham características estruturais semelhantes ao peptídeo Polybia-MP1 extraído do veneno da vespa Polybia paulista, em que um dos dois resíduos ácidos ocupa a segunda posição na região Nterminal, e resíduos básicos são terceiros e/ou quartos vizinhos dos resíduos ácidos. Esses peptídeos possuem significativa atividade bactericida seletiva para bactérias Gram-negativas, especialmente Escherichia coli, sem serem hemolíticos. Estudos anteriores, em sistemas modelo, demonstraram que a acetilação do N-terminal resultou no aumento da atividade lítica em vesículas aniônicas (8POPC/2POPG) em comparação com o L1A, o que sugeriu perturbação do empacotamento lipídico de modo mais eficaz para o análogo que é menos carregado. Considerando que a membrana plasmática de bactérias Gram-negativas contém majoritariamente fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG), o presente trabalho propôs investigar o impacto dos peptídeos L1A e acL1A em membranas modelo compostas por 3POPE/1DOPG utilizando uma variedade de técnicas experimentais. Os resultados demonstraram que ambos os peptídeos induziram segregação lipídica, sendo o análogo acetilado mais eficiente em recrutar PG e segregar PE.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, membranas modelo, monocamadas de Langmuir, DLS, CD, espectroscopia de fluorescência, microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

The synthetic peptides L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂, Q = +3e) and its acetylated analog (acL1A, Q = +2e) used in this study were designed to have some structural features similar to the peptide Polybia-MP1 extracted from the venom of the wasp *Polybia paulista*, in which one of the acidic residues occupies the second position on the N-terminus region and basic residues are third and/or fourth neighbors of the acidic residues. These peptides display significant bactericidal activity against Gram-negative bacteria, especially *Escherichia coli*, being non-hemolytic. Previous work performed in model membrane systems has shown that the N-terminal acetylation led to an increase on the lytic activity in anionic vesicles (8POPC/2POPG) compared with L1A, suggesting that the less charged peptide has higher ability to perturb the lipid-packing. Considering that the Gram-negative cell membranes contain mainly phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylglycerol (PG), the present work proposed to investigate the impact of L1A and acL1A on model membranes composed of 3POPE/1DOPG using a variety of experimental techniques. The results suggested that both peptides induced lipid segregation being the acetylated analog more efficient in recruiting PG and segregating PE.

Keywords: Antimicrobial peptides, model membranes, Langmuir monolayer, DLS, CD, fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: I) Ilustração da sequência e características dos peptídeos L1A e acL1A, +, A e	P
representam resíduos ácidos, básicos, apolares e polares, respectivamente. II) Representaçã	ăо
da projeção helicoidal (Helix wheel projection) do peptídeo L1A para ilustrar as propriedad	des
de alfa-hélice	21
Figura 2: Regiões espectrais e cromóforos contribuintes em proteínas	25
Figura 3: Espectro de CD com curvas características de cada estrutura secundária	26
Figura 4: Partícula e íons atraídos formando uma camada dupla	28
Figura 5: Diagrama de Jablonski: descrição da maioria dos mecanismos de relaxação de	
estados excitados de moléculas	30
Figura 6: Espectros de absorção (acima) e emissão (abaixo) dos aminoácidos fluorescentes	;
triptofano (TRP), tirosina (TYR) e fenilalanina (PHE) em água pH 7,0	31
Figura 7: Espectro de emissão de uma amostra contendo triptofano e tirosina, onde o	
comprimento de excitação foi fixado em 275 nm (azul) e em 295 nm (vermelho)	33
Figura 8: Monocamada lipídica	33
Figura 9: Placa de Wilhelmy utilizada para medir a tensão superficial.	35
Figura 10: Cuba de Langmuir	36
Figura 11: (A) Desenho esquemático de uma isoterma de Langmuir e as diferentes possíve	is
fases (G, gasosa; LE, líquido-expandida; LC, líquido-condensada e S, sólida) que podem	
ocorrer durante uma compressão. (B) Compressibilidade e módulo de compressibilidade er	m
função da área por molécula	37
Figura 12: Isoterma de compressão π -A de DPPC puro em água em diferentes temperaturas	.S
(20, 24, 28 e 32 °C)	38
Figura 13: Cuba caseira de área constante.	40
Figura 14: Diagrama de um microscópio de epifluorescência.	41
Figura 15: Estrutura molecular dos lipídios POPE (A) e DOPG (B) e do marcador	
fluorescente Texas-Red PE (C).	42
Figura 16: Acima: Extrusor Avanti acoplado a duas seringas. Abaixo: Componentes do	
extrusor. \sim 17 Fi = 1 + 4 + 1 + 1	44 ~
Figura 1/: Figura ilustrativa demonstrando o aumento na pressão de superficie apos a injeç	2a0
Tigura 18. Cuba agazira da área constanta com ionala ártica	51
Figura 18: Cuba caserra de area constante com janeia optica	31
rigura 19: Especiros representativos de dicroismo circular de 10 µM de LIA (A) e acLIA	(В)
150 mM NoE mH 7.4 o T = 20 °C	11 50
150 mivi NaF pH 7,4 e 1 = 20° C	
de linídios (ILI) nora soluções com 10 µM de L1A (quadrados) e sel 1A (sírgulos) em contentração	.0 toto
aem vasíoulas compostas de 2POPE/1DOPC (P) Isotarmas de adsoraño obtidas por CD	tato
titulando concentração crescente de LUVs [1] de 2POPE/1DOPG em 10 µM de 11A	
(quadrades) a set 1 Å (círcules) om 150 mM NaE pH 7.4. Ås linhas contínues representam	0
ajusta utilizando a Eq. 9. Os arros foram obtidos a partir da trás madidas a rapresentam os	0
ajuste utilizando a Eq. 9. Os erros forani obtidos a partir de tres medidas e representani os	51
Figura 21: À esquerda: Gráfico de barras representando a mudança do potencial zeta das	
vesículas de 3POPE/1DOPG (branco) induzido nelos nentídeos I 1A (preto) e acl 1A (cinz	(a)
À direita: Gráficos representativos da distribuição de tamanho de LUVs de 3POPE/1DOPC	ла). Э
na ausência (A) e na presenca de L1A (B) e acL1A (C) obtida por DLS. As cores diferente	s
na autoriora (11) e na pretença de E111 (E) e acE111 (C) obtida por DED. As cores diference	

representam repetições dos experimentos. $[L] = 40 \ \mu M$, $[P] = 2 \ \mu M$. Estes experimentos foram Figura 22: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência do Triptofano dos peptídeos puros (A) L1A e (B) acL1A, e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG, (C) L1A/LUVs e (D) acL1A/LUVs na presença de concentração crescente de acrilamida. $[L] = 500 \mu M e [P] =$ Figura 23: Gráficos representativos de Stern-Volmer de L1A (símbolos quadrados) e acL1A (símbolos redondos) da fluorescência do Triptofano suprimida pela acrilamida em solução salina (símbolos fechados) e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG (símbolos abertos). [L] Figura 24: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE puro e POPE coespalhado com concentração crescente de (A) L1A ou (B) acL1A. (C) Isotermas de compressão de POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (linha vermelha) ou acL1A (linha azul). (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C). Subfase: 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. Todos Figura 25: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas de POPE puro (primeira fileira) e co-espalhado com 7,2 mol% L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm......64 Figura 26: Comparação entre a área teórica ocupada pelos peptídeos (círculos abertos) com a área de clusters induzidos pelo L1A (círculos pretos) ou acL1A (círculos cinzas) coespalhados com POPE em função da concentração de peptídeos. A área ocupada pelos peptídeos foi calculada através das imagens de MF de POPE na presença de peptídeos na pressão de 15 mN/m a 20 °C......65 Figura 27: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE coespalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 10 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A)......65 Figura 28: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira fileira) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol % de marcador Figura 29: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE coespalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A).....67 Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador Figura 31: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de DOPG puro (preto) e DOPG co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas mostradas em (A).69 Figura 32: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por DOPG puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou

acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm......70 Figura 33: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e 3POPE/1DOPG co-espalhado com concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 20 °C (C) Comparação do efeito de 7,2 mol% de peptídeo. (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C).71 Figura 34: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira) e das misturas ternárias 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas, para as misturas de lipídio/peptídeo, X_{peptídeo}=0,072. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm......72 Figura 35: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e coespalhada com concentrações crescentes de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 10 °C. (C) Variação da pressão de colapso do peptídeo em função da fração de peptídeo co-espalhado com a mistura lipídica. (D) Área em excesso da área molecular Figura 36: Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas de 3POPE/1DOPG na ausência (preto) e na presença de concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B), em 150 mM NaCl pH 7,4, 10 °C calculado a partir das isotermas mostradas na Figura 35 (A) e (B), respectivamente......74 Figura 37: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, X_{peptídeo}=0,072. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Figura 38: Porcentagem da área dos domínios líquido-condensados (LC) em função da Figura 39: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG (preto) e 3POPE/1DOPG co-espalhados com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas mostradas em (A).....76 Figura 40: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, X_{peptídeo}=0,072. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm.77 Figura 41: Inserção dos peptídeos L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em monocamadas lipídicas compostas por POPE (A), DOPG (B) e 3POPE/1DOPG (C) em 150 mM NaCl, pH 7,4, 20 °C. Máxima variação da pressão de superfície $\Delta \pi$ em função da pressão inicial $\pi_{inicial}$. As linhas contínuas representam o ajuste linear e os desvios padrão foram obtidos a partir de no mínimo três medidas......79 Figura 42: Variação induzida na pressão de superfície inicial de 30 mN/m (A) obtida dos experimentos de inserção (Figura 41) e variação de área relativa $\Delta A/A_0$ (B) para os peptídeos L1A (preto) e acL1A (cinza) em monocamadas de POPE, DOPG e 3POPE/1DOPG obtida a partir das isotermas representadas nas figuras 24, 31 e 33......80

Figura 43: (A) Variação temporal da pressão de superfície (linha azul) da monocamada de 3POPE/1DOPG induzida pela inserção de acL1A na pressão inicial de 30 mN/m e da área escura (linha preta). A seta indica injeção de peptídeo na subfase de 150 mM NaCl, pH 7,4. (B) Imagens representativas de microscopia de fluorescência da monocamada de 3POPE/1DOPG sem inserção de peptídeo (controle, acima), e para a monocamada após (*t*=1000s) a injeção de acL1A na subfase (abaixo). Escala igual a 50 µm. (C) Porcentagem média de área escura (± desvios padrão) observada em monocamadas formadas por POPE puro e mistura lipídica 3POPE/1DOPG na ausência (controle) e na presença de L1A ou acL1A a pressão de superfície inicial de 30 mN/m. Todas as medidas foram repetidas no Figura 44: Isotermas de compressão dos peptídeos puros L1A (linha contínua) e acL1A (linha tracejada) em subfase composta por NaCl 150 mM, pH 7,4 a 20 °C.....94 Figura 45: Termogramas de aquecimento de 3POPE/1DOPG na ausência de peptídeos e na presença de L1A ou acL1A na razão L/P = 15 adquiridas na taxa de 0,5 °C/min......95 Figura 46: Porcentagem de area ocupada por 1,9 nmol de peptídeos (L1A a acL1A, linha preta e cinza, respectivamente) durante a compressão de filmes de peptídeos puros publicados em (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018). Esse número de moléculas de peptídeos corresponde a 7,2 mol% de peptídeos quando co-espalhados com lipídios na interface97

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Diferentes composições lipídicas dependendo da espécie de bactéria1	19
Tabela II: Características dos peptídeos L1A e acL1A.	21
Tabela III: Mudanças do diâmetro hidrodinâmico (D _H) e variação relativa do potencial zeta	
$(\Delta\zeta/\zeta_0)$ das vesículas devido à presença dos peptídeos na razão L/P=20	56
Tabela IV: Parâmetros de supressão e desvios da emissão de fluorescência do triptofano à	
ligação do peptídeo onde (a): K _{SV} é a constante de Stern-Volmer; (b): <i>KVSVLKVSVb</i> é a	
razão da constante de Stern-Volmer em vesículas (KVSVL) e em solução salina (KVSVb);	
(c): Δλ é o "blue-shift"	59
Tabela V: Pressão de máxima inserção (PMI) obtida a partir dos experimentos de inserção	
(Figura 41)	79
Tabela VI: Parâmetros termodinâmicos das MLVs de 3POPE/1DOPG na ausência de	
peptídeos e na presença de L1A ou acL1A. (^a) Parâmetros para duas transições de fase	
simétricas indicadas por setas na Figura 45 de DSC.) 6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM - Atomic Force Microscopy - Microscopia de Força Atômica

BAM – Brewster Angle Microscopy - Microscopia de Ângulo de Brewster

- CCD Charge-Coupled Device Dispositivo de carga acoplada
- CD Circular Dichroism Dicroísmo Circular
- CMC Concentração Micelar Crítica

DSC - Differential Scanning Calorimetry - Calorimetria Diferencial de Varredura

DLS – Dynamic Light Scattering – Espalhamento Dinâmico de Luz

EXC – espectro de excitação

Phe - Fenilalanina

PE - Fosfatidiletanolamina

PG – Fosfatidilglicerol

G – Gás (Fase)

HPLC - *High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência LUVs - *Large Unilamellar Vesicles* - Vesículas Unilamelares Grandes

LC – Líquido-condensada (Fase)

LE - Líquido-expandida (Fase)

MF – Microscopia de Fluorescência

MLVs - Multilamellar Vesicles - Vesículas Multilamelares

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

acL1A – Peptídeo sintético acL1A (ac-IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH2)

L1A – Peptídeo sintético L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH2)

PMI – Pressão máxima de inserção

Tyr – Tirosina

Trp – Triptofano

TFE - Trifluoroetanol

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina

 $POPG-1\mbox{-}palmitoil\mbox{-}2\mbox{-}oleoil\mbox{-}sn\mbox{-}glicero\mbox{-}3\mbox{-}fosfoglicerol$

Texas-Red - 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DOPG – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DPPG – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

C – Coulomb

u – massa molecular

<H> - hidrofobicidade média

nm – nanômetros

D_H – diâmetro hidrodinâmico

D – coeficiente de difusão translacional

m²/s – metros quadrados por segundo

k_B – constante de Boltzmann

- T temperatura
- $\eta viscosidade$
- mV milivolts
- ζ (potencial) zeta
- μ mobilidade eletroforética

 $\eta-viscosidade \ do \ meio$

 ϵ_r – constante dielétrica da água

 ε_0 – permissividade do vácuo

 $f(\kappa R') - função de Henry$

 κ – inverso do comprimento de Debye

R'- raio médio das partículas

mN/m - mili Newton por metro

 γ_0 – tensão superficial original da subfase líquida pura

 γ_f – tensão superficial após adição de surfactante abaixo da CMC

w - espessura da placa de Wilhelmy

d - largura da placa de Wilhelmy

F - força resultante que age na placa de Wilhelmy

 γ – tensão superficial

 F_{grav} – força gravitacional que age na placa de Wilhelmy

 F_{emp} – força ascendente que age na placa decorrente do empuxo

 θ – ângulo de contato da subfase com a placa de Wilhelmy

A – área da cuba

C_s - compressibilidade do filme

 C_s^{-1} – módulo de compressibilidade

 $\Delta \pi$ - variação de pressão de superfície induzida pelos peptídeos adsorvidos na interface

C_p - concentração de peptídeos na subfase

C_{sat} - concentração de saturação de peptídeos

 $\mu M - micromolar$

 Γ_{max} – concentração em excesso de peptídeo na superfície

ln - logaritmo natural

R – constante universal dos gases perfeitos

 $Å^2$ – angstrom ao quadrado

 $M\Omega cm-mega\ ohm\ centimetro$

A' – absorbância em 279 nm

l – caminho óptico

c' - concentração da amostra

 ϵ – coeficiente de absortividade molar

NaCl-cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

µm – micrometro

nm/min – nanômetros por minuto

 θ ' – elipticidade observada

 Θ – elipticidade molar por resíduo

grau.cm²/dmol – grau centímetros quadrados por decimol

c – concentração peptídica

Nr – número de resíduos de aminoácidos

 Θ_{obs} – elipticidade molar média observada em 222 nm

 Θ_C – elipticidade molar de random coil

 Θ_H – elipticidade molar de um peptídeo totalmente em estrutura alfa-hélice

f_H – fração de estrutura alfa-hélice

x – número de grupos CO não ligados por ligação de hidrogênio em um peptídeo carboxilado

K_p - constante de partição molar

L ou [L] – concentração de lipídeos

 Θ_{max} – elipticidade molar máxima em 222 nm

 γ' – volume lipídico molar

I₀ - intensidade de fluorescência inicial

I - intensidade de fluorescência observada

K_{SV} – constante de Stern-Volmer

[Q] – concentração de acrilamida

mL – mililitros

cm² – centímetros quadrados

mm/min – milímetros por minuto

Aideal – área ideal

Ai - área molecular média do componente i

Xi - fração molar do componente i

A_{real} – área real

A_{iL} – área molecular média considerando o número de moléculas de lipídeos

n_L – número de moléculas de lipídeos espalhados

n_p – número de moléculas de peptídeos espalhados

A_{ex} – área em excesso

A₁₂ – área molecular média da mistura

 x_1 – fração molar do componente 1

x₂ - fração molar do componente 2

A₁ – área molecular do componente 1 para dada pressão de superfície

A2 - área molecular do componente 2 para dada pressão de superfície

 δ – derivada parcial

 π_i – pressão de superfície inicial desejada

 $\pi_{\rm f}$ – pressão de superfície no equílibrio

min – minutos

 Θ_{222} – elipticidade molar em 222 nm

 Θ_{208} – elipticidade molar em 208 nm

P ou [P] - concentração de peptídeos

M⁻¹ – inverso de molar

d.nm – diâmetro em nanômetros

 $\Delta \gamma / \gamma_0 - variação$ relativa do potencial zeta

f_{PG} – fração de lipídeos PG

z_p - carga líquida do peptídeo

 KV_{SV}^{L} – constante de Stern-Volmer em vesículas

KV^{*b*}_{*SV*} – constante de Stern-Volmer em solução salina

 $\Delta\lambda$ – blue-shift

 T_m – temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina

 π_{col} – pressão de superfície de colapso

 $\Delta A/A_0$ – variação de área relativa

 ΔA – variação de área

 $A_0 - \text{área em } 30 \text{ mN/m}$

 $\Delta \pi_{30}$ – variação induzida na pressão de superfície inicial de 30 mN/m

 ΔC_p – variação de capacidade calorífica

kJ.mol⁻¹K⁻¹ – kilo Joule multiplicado por um sobre mol Kelvin

 ΔH – variação de entalpia

kJ/mol – kilo Joule por mol

SUMÁRIO

<u>1.</u> INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO	24
1.2 METODOLOGIA TEÓRICA	25
1.2.1 EXPERIMENTOS COM VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVS)	25
1.2.1.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	25
1.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética	27
1.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência	29
1.2.2 EXPERIMENTOS COM MONOCAMADAS	33
1.2.2.1 Área variável	35
1.2.2.2 Área constante	38
1.2.2.3 Domínios	40
1.2.2.4 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 MATERIAIS	42
2.2 MÉTODOS	43
2.2.1 EXPERIMENTOS COM VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVS)	43
2.2.1.1 Soluções de peptídeos	43
2.2.1.2 Preparação de LUVs	43
2.2.1.3 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	44
2.2.1.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética	45
2.2.1.5 Supressão da intensidade de fluorescência do triptofano por acrilamida	46
2.2.2 EXPERIMENTOS COM MONOCAMADAS	47
2.2.2.1 Isotermas de compressão	47
2.2.2.1.1 Concentração de lipídios	47
2.2.2.1.2 Análise das isotermas	47
2.2.2.1.3 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)	49
2.2.2.2 Adsorção do peptídeo em monocamadas lipídicas	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 ANÁLISE DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DOS PEPTÍDEOS L1A E SEU ANÁLOGO A	CETILADO
QUANDO ADSORVIDO NA SUPERFÍCIE DE LUVS CONTENDO 3PE/1PG E MEDIDAS DE AFI	NIDADE
POR EXPERIMENTOS DE ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	52
3.2 ANALISE DA INTERAÇÃO DOS PEPTÍDEOS L1A E ACL1A COM LUVS: MEDIDAS DE P	OTENCIAL
ZETA E DE DIÂMETRO DAS LUVS OBTIDAS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E ESPAI	LHAMENTO
DINAMICO DE LUZ, RESPECTIVAMENTE.	55
3.3 SUPRESSAO DE EMISSAO DE FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO POR ACRILAMIDA	_
MONITORADA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	57
3.4 IMPACTO DOS PEPTÍDEOS L1A E ACL1A EM MONOCAMADAS LIPÍDICAS.	60

3.4.1 EFEITOS DOS PEPTÍDEOS NA MORFOLOGIA DOS DOMÍNIOS DE MONOCAMADAS LIPÍDICAS 60

3.4.1.1 Monocamadas de POPE	62
3.4.1.1.1 POPE - Temperatura 20 °C	62
3.4.1.1.2 POPE - Temperatura 10 °C	65
3.4.1.1.3 POPE - Temperatura 30 °C	67
3.4.1.2 Monocamadas de DOPG	69
3.4.1.3 Monocamadas de 3POPE/1DOPG	70
3.4.1.3.1 3POPE/1DOPG – Temperatura 20 °C	70
3.4.1.3.2 3POPE/1DOPG – Temperatura 10 °C	72
3.4.1.3.3 3POPE/1DOPG – Temperatura 30 °C	76
3.4.2 Inserção dos peptídeos L1A e acL1A em monocamadas à área constante	
VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	78
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	86
<u>APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES</u>	94
COMPRESSÕES DE MONOCAMADAS DE PEPTÍDEOS PUROS	94
IMPACTO DOS PEPTÍDEOS L1A E ACL1A NO COMPORTAMENTO TERMOTRÓPICO DE MEMBRANA	AS
LIPÍDICAS COMPOSTAS DE 3POPE/1DOPG ANALISADO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE	
VARREDURA.	95
ÁREA TEÓRICA OCUPADA POR PEPTÍDEOS	97

1. Introdução

Peptídeos líticos com atividade antimicrobiana são sequências lineares de até 40 resíduos de aminoácidos, ricos em resíduos hidrofóbicos e resíduos básicos distribuídos em suas sequências de modo a formarem estruturas anfipáticas, alfa-hélices ou folhas-beta em contato com agentes indutores de estruturas secundárias tais como bicamadas lipídicas, álcoois e micelas de surfactantes (FJELL et al., 2012;LUO; BALDWIN, 1997). A presença de grupos básicos confere seletividade a membranas lipídicas aniônicas devido a interações eletrostáticas. Evidências coletadas durante as três últimas décadas mostram que a atividade lítica e antimicrobiana destes peptídeos é centrada na fase lipídica da membrana celular (EPAND; VOGEL, 1999;HANCOCK; FALLA; BROWN, 1995;ZASLOFF, 2002). Um estudo particularmente importante mostrou que não há diferença na atividade antimicrobiana de peptídeos compostos por isômeros D ou L de aminoácidos, sugerindo que o processo lítico ocorre diretamente na membrana lipídica, sem a necessidade de receptores de membrana específicos (CHEN, Y. et al., 2006;WADE et al., 1990). Estes receptores de membrana são necessários para a maioria dos antibióticos convencionais, fazendo com que os peptídeos antimicrobianos (PAMs) sejam seus possíveis substitutos (BOMAN, 2003;EPAND; VOGEL, 1999;HANCOCK; FALLA; BROWN, 1995;WADE et al., 1990;ZASLOFF, 2002).

Uma grande quantidade de dados experimentais de atividade lítica destes peptídeos em membranas modelo e de simulação de dinâmica molecular acumulados nas últimas três décadas permitiu a proposição de vários modelos para o mecanismo de ação desses peptídeos (BECHINGER, 2015;EPAND; EPAND, 2009;HANEY et al., 2010;HUANG; CHEN; LEE, 2004;MATSUZAKI et al., 1996;NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011;PARENTE; NIR; SZOKA, 1990;POKORNY; BIRKBECK; ALMEIDA, 2002;SENGUPTA et al., 2008). Apesar destes modelos, o entendimento completo do mecanismo de ação é ainda elusivo e alguns peptídeos podem apresentar mais de um mecanismo de ação dependendo da razão peptídeo/lipídio utilizada no experimento (BECHINGER; LOHNER, 2006). Todos estes mecanismos têm em comum a primeira etapa que é a adsorção do peptídeo na membrana que é dependente das interações intermoleculares envolvidas no processo de adsorção: forças eletrostáticas e não eletrostáticas. As interações eletrostáticas, no entanto, têm uma contribuição significativa na energia de adsorção do peptídeo na bicamada.

A composição lipídica de membranas varia extensamente dependendo do micro organismo ou do tipo de célula, além de haver diferenças entre a membrana interna e externa de uma célula. Em células de mamíferos e plantas, por exemplo, lipídios carregados negativamente estão localizados na monocamada interna, sendo a monocamada externa zwitteriônica (neutra), e, dessa forma, as interações peptídeos-lipídios são de curto alcance do tipo dipolo-dipolo e são fracas para peptídeos catiônicos (ALVARES;CABRERA;RUGGIERO NETO. Em bactérias, o fosfolipídio zwitteriônico predominante é a 2016). fosfatidiletanolamina (PE). Geralmente, bactérias Gram-negativas possuem conteúdo maior de PE do que bactérias Gram-positivas, e algumas dessas bactérias Gram-positivas possuem conteúdo muito baixo de fosfolipídios zwitteriônicos. Independentemente de ser bactéria Grampositiva ou negativa os lipídios aniônicos predominantes são fosfatidilglicerol (PG) ou cardiolipina (CL) (verTabela I) (EPAND; EPAND, 2009) sendo que uma fração significativa destes está localizada na monocamada externa da membrana plasmática. Devido à característica catiônica, os peptídeos antimicrobianos podem agir seletivamente em membranas bacterianas que possuem lipídios aniônicos expostos e que conferem carga negativa à membrana, não agindo nas membranas de células de mamíferos, as quais normalmente são zwitteriônicas.

Nos seres vivos as membranas lipídicas são muito complexas contendo diversos componentes e uma investigação acerca de suas interações com peptídeos antimicrobianos (PAMs) seria imensamente trabalhosa, se não impossível. Dessa forma, são utilizadas membranas modelo: membranas lipídicas artificiais e simplificadas que permitem manipular sua estrutura, composição e tamanho (CHAN; BOXER, 2007;CLIFTON et al., 2020). É possível utilizar essas membranas para investigar estrutura e função de certos lipídios, canais interações de lipídios com drogas e outras nanopartículas (SZOKA; iônicos. PAPAHADJOPOULOS, 1980). Membranas modelo são ferramentas que permitem avaliar o comportamento de proteínas (neste estudo são os PAMs) e lipídios numa membrana de forma que, dependendo do modelo, pode-se inferir sobre diferentes aspectos de uma membrana para, então, ter um panorama geral do sistema (EEMAN; DELEU, 2009; REBAUD; MANITI; GIRARD-EGROT, 2014; STEFANIU; BREZESINSKI; MÖHWALD, 2014). Os sistemas biomiméticos mais comuns são monocamadas lipídicas, vesículas lipídicas, e bicamadas lipídicas suportadas. Cada modelo, embora possua vantagens e desvantagens, mimetiza o arranjo lipídico de membranas naturais (MOURITSEN; BAGATOLLI, 2015).

Fenécia da hactária	% Total de lipídio					
Especie da Dacteria	CL	PG	PE			
Bactérias Gram-negativas						
E. coli	-	15	80			
E. cloacae	3	21	74			
Y. kristensenii	20	20	60			
R. mirabilis	5	10	80			
K. pneumoniae	6	5	82			
P. aeruginosa	11	21	60			
Bactéri	ias Gram-positivas					
Staphylococcus aureus	42	58	0			
Streptococcus pneumoniae	50	50	0			
Bacillus cereus	17	40	43 ^a			
Bacillus polymyxa ^b	8	3	60			
B. subtilis	4	70	12			
S. pyogenes	Componente majoritário	-	Traços			

Tabela I: Diferentes composições lipídicas dependendo da espécie de bactéria.

^a Esse valor corresponde a bactéria cultivada a 37 °C. Um valor maior de PE entre 50 a 60% é geralmente encontrado para essa espécie quando cultivada a 15 °C.

^b Contém 26% de lisolipídios; 16% de lisofosfatidilcolina e 10% de lisofosfatidilserina

Fonte: Adaptado de (EPAND; SAVAGE; EPAND, 2007; EPAND; EPAND, 2009)

A adsorção do peptídeo na bicamada lipídica é modulada por alguns fatores como distribuição de cargas do peptídeo, estrutura e carga da cabeça polar dos lipídios, bem como estrutura de cadeias acíclicas e seus comprimentos, além do pH do meio e a presença de íons.

O processo de adsorção na membrana lipídica é, em geral, descrito como o acoplamento de dois processos: partição do peptídeo na monocamada externa da membrana e da formação da estrutura secundária, em geral alfa-hélice, anfipática. A formação da estrutura anfipática favorece energeticamente que os resíduos hidrofóbicos busquem uma região de constante dielétrica mais baixa, ou seja, a região hidrofóbica da bicamada (ALMEIDA; LADOKHIN; WHITE, 2012;BUENO et al., 2014;DATHE, 1999;NYMEYER; ZHOU, 2008;WIMLEY; CREAMER; WHITE, 1996). Dessa forma, além das cargas envolvidas nesse processo, a

estrutura do peptídeo e sua sequência irão afetar fortemente a atividade lítica. Vários trabalhos têm evidenciado que este processo acoplado de partição e formação da estrutura anfipática tem como consequência a perturbação do empacotamento lipídico na membrana, com a consequente alteração das características elásticas da bicamada (FOŠNARIČ; IGLIČ; MAY, 2006).

Nos anos recentes foram investigadas correlações entre a capacidade de peptídeos líticos em perturbar o empacotamento lipídico de membranas modelo e sua atividade lítica nessas membranas (BOMAN, 2003; BROGDEN, 2005; BUENO et al., 2014; HAMILL et al., 2008; ALVARES; VIEGAS; RUGGIERO NETO, 2017; SCHEINPFLUG et al., 2017). Sob este enfoque é associada uma variedade de técnicas experimentais que fornecem informações sobre adsorção, penetração e perturbação do empacotamento lipídico em bi e monocamadas lipídicas induzidas por peptídeos. Um dos peptídeos investigados é o mastoparano sintético L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂) e seu análogo acetilado (acL1A) (ALVARES; VIEGAS; RUGGIERO NETO, 2018; ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018; ZANIN et al., 2013;ZANIN et al., 2016). Estes peptídeos possuem várias características similares ao mastoparano natural Polybia-MP1 tais como: (i) sequência do N-terminal, (ii) distribuição de resíduos de aminoácidos semelhante: um resíduo ácido ocupando a segunda posição na região N-terminal, e resíduos básicos são terceiros e/ou quartos vizinhos dos dois resíduos ácidos. Isso está melhor representado na figura 1 (I) a seguir. Estudos de dinâmica molecular do L1A em solução aquosa de trifluoroetanol (TFE), um indutor de hélice alfa, mostrou que a acetilação no N-terminal estabiliza a conformação hélice anfipática (ZANIN et al., 2016). Além deste efeito estabilizador, esta modificação pode proteger o peptídeo de ataques proteolíticos, o que é considerado como um mecanismo de resistência alternativo (ANDREU; RIVAS, 1998).

Os peptídeos utilizados possuem como diferença mais significativa a carga em condições fisiológicas sendo +3 para o L1A, e +2 para o análogo acetilado (Tabela II). A representação da projeção helicoidal do peptídeo L1A revela que aminoácidos polares estão majoritariamente concentrados de um lado enquanto que aminoácidos apolares estão concentrados de outro (Figura 1 (II)).

	L1A	acL1A
Carga em pH 7,4 (C)	+3	+2
Massa molecular (u) ^a	2025,45	2067,48
Hidrofobicidade média <h>^b</h>	-2,04	-2,04
Número de resíduos	18	18

Tabela II: Características dos peptídeos L1A e acL1A.

Fonte: ^aGenscript; ^b(EISENBERG et al., 1984)

Figura 1: I) Ilustração da sequência e características dos peptídeos L1A e acL1A. –, +, A e P representam resíduos ácidos, básicos, apolares e polares, respectivamente. II) Representação da projeção helicoidal (Helix wheel projection) do peptídeo L1A para ilustrar as propriedades de alfa-hélice.

<u>L1A</u>

I D G L K A I W K K V A D L L K N T - NH₂ + A - A A + A A A + + A A - A A + P P

<u>acL1A</u>

ac - I D G L K A I W K K V A D L L K N T - NH₂ A - A A + A A A + + A A - A A + P P



Fonte: I) Elaborado pelo autor. II) Adaptado de <u>http://lbqp.unb.br/NetWheels/</u>, (MOL; CASTRO; FONTES, 2018).

O peptídeo L1A e o análogo acetilado mostraram atividade bactericida seletiva a bactérias Gram-negativas sem serem hemolíticos. A atividade para *E. coli*, no entanto, foi maior que para *Pseudomonas aeruginosa* (ZANIN et al., 2016). A investigação procurando correlações entre capacidade de perturbar o empacotamento lipídico em mono e bicamadas e a atividade lítica destes peptídeos em membranas modelo mostra que: (i) ambos os peptídeos possuem significativa atividade interfacial (Figura 44, pág. 94), (ii) a carga no N-terminal desfavorece a penetração do peptídeo em monocamadas e em vesículas zwiteriônicas e aniônicas (POPC, DPPC, DPPG, 8POPC/2POPG), (iii) a presença concomitante de resíduos básicos e ácidos na sequência do peptídeo como terceiros e/ou quartos vizinhos o estabiliza na região hidrofóbica da membrana, (iv) quando misturados com lipídios na interface água-ar, os peptídeos preferem a fase líquido-expandida, prevenindo lipídios aniônicos de formarem uma fase condensada (ALVARES;WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

Estes resultados foram obtidos utilizando membranas modelo na composição lipídica PC/PG, entretanto, L1A mostrou-se ser seletivo a bactérias Gram negativas cuja membrana plasmática possui fosfatidiletanolamina (PE) como lipídio zwitteriônico em alta concentração como mostrado na Tabela I. Embora as cabeças polares de PC e PE possuam dois grupos com cargas opostas formando dipolo elétrico, a cabeça de PC possui área de secção reta maior do que a secção reta das caudas formando um cone truncado, fazendo com que esse lipídio assuma uma curvatura positiva quando em bicamadas. PE, no entanto é o oposto: a secção reta de sua cabeça polar é menor que a secção reta das caudas conferindo a este fosfolipídio um formato cônico truncado invertido, induzindo curvatura negativa quando em membranas (ISRAELACHVILI, 2015). Trabalhos anteriores onde foi avaliado o impacto do peptídeo MP1 em diversas composições lipídicas mostraram por microscopia de força atômica que na presença de PE, esse peptídeo induz a formação de poros muito grandes em bicamadas em suporte sólido. De acordo com esse resultado, a análise do influxo de partículas com diferentes raios de giro em vesículas gigantes (GUVs) sugeriu que, na presença de PE, o MP1 induziu a formação de poros/defeitos grandes (LEITE et al., 2015).

Resultados preliminares utilizando calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) sugeriram que L1A e mais eficientemente acL1A foram capazes de induzir segregação lipídica em vesículas compostas por 3POPE/1DOPG (Figura 45, pág. 95). Segregação lipídica é um mecanismo alternativo que foi sugerido para o aumento na permeabilidade de membrana após a partição de PAMs: um agente antimicrobiano catiônico induz separação de componentes lipídicos, resultando em agregados de lipídios

aniônicos/peptídeos e possivelmente a formação de defeitos nas fronteiras destes domínios lipídicos. Defeitos nas fronteiras entre diferentes fases foram sugeridos como responsáveis pelo aumento de vazamento de lipossomas na temperatura de transição de fase em que domínios nas fases gel e líquido-cristalina podem coexistir (EPAND; EPAND, 2009). Porém, como domínios e fases segregadas ocorrem naturalmente, essa característica *per se* não leva a toxicidade. Segundo Epand (EPAND; EPAND, 2009), devido à grande heterogeneidade molecular das membranas, interfaces de domínios são estabilizadas concentrando outras moléculas em suas interfaces para diminuir a tensão de membrana. Quando domínios são formados como consequência da adição de um agente antimicrobiano, o tempo para a membrana se rearranjar e acomodar essa mudança na sua organização é insuficiente, fazendo com que as fronteiras desses domínios sejam instáveis levando a um aumento na permeabilidade das membranas. Além disso, esses peptídeos podem agregar lipídios aniônicos e perturbar domínios já existentes na membrana, podendo induzir a morte da bactéria. Separação lateral induzida também já foi proposta como um mecanismo contribuinte para a atividade antimicrobiana de diversos peptídeos antimicrobianos (FINGER et al., 2015;SCHEINPFLUG et al., 2017).

Foi também evidenciado que regiões de membrana associadas à divisão celular possuem composições distintas do resto da membrana (MATSUMOTO et al., 2006;WELTI; GLASER, 1994) e também que domínios existem em membranas de microorganismos como *E. coli* devido a segregação de PE/PG (VANOUNOU; PAROLA; FISHOV, 2003).

1.1 Objetivo

As evidências experimentais expostas nos parágrafos acima motivaram a investigar o impacto dos peptídeos L1A e seu análogo acetilado utilizando monocamadas de Langmuir e vesículas unilamelares grandes (LUVs) como sistemas modelo miméticos de membrana plasmática de E. coli, contendo POPE e DOPG. Estas membranas modelo foram utilizadas para estudar o impacto dos peptídeos L1A e acL1A no empacotamento lipídico da composição escolhida, 3POPE/1DOPG utilizando várias técnicas experimentais: (i) isotermas de adsorção dos peptídeos em vesículas unilamelares grandes (LUVs) por dicroísmo circular (CD) e medidas de potencial zeta para avaliar as afinidades destes peptídeos à estas membranas; (ii) supressão de fluorescência do triptofano por acrilamida para avaliar a inserção destes peptídeos na fase hidrofóbica da membrana; (iii) isotermas de compressão de monocamadas lipídicas puras e de misturas com peptídeos visualizadas por microscopia de fluorescência para avaliar o impacto destes peptídeos no equilíbrio de fases líquido-expandida/líquido-condensada (LE/LC); (iv) inserção destes peptídeos em monocamadas à área constante a fim de obter a pressão de superfície acima da qual o peptídeo não insere; (v) e inserção na pressão de superfície em que uma monocamada pode ser comparada à compactação de uma bicamada com visualização por microscopia de fluorescência para observar a indução de domínios durante a inserção como complemento das isotermas de compressão e de supressão de fluorescência do triptofano.

1.2 Metodologia Teórica

1.2.1 Experimentos com vesículas unilamelares grandes (LUVs)

1.2.1.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Dicroísmo circular (*Circular Dichroism*, *CD*), em suma, é definido como a absorção desigual de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita. Quando moléculas assimétricas interagem com a luz, elas podem absorver luz polarizada para a direta ou esquerda em intensidades diferentes, além de terem diferentes índices de refração para as duas ondas. Dicroísmo circular normalmente é representado em grau de elipticidade, que é definido como o ângulo cuja tangente é a razão entre o eixo menor e o eixo maior da elipse formada pela soma das diferentes intensidades da luz circularmente polarizada para a direita e esquerda (FASMAN, 1996;GREENFIELD, 2009;SREERAMA; WOODY, 2004).

Algumas das moléculas assimétricas citadas são, por exemplo, estruturas secundárias de proteínas. Cada elemento estrutural possui um espectro de CD característico, como, por exemplo, alfa-hélice, folha-β e *random coil*. Partindo da intensidade de CD, é possível obter alguns parâmetros que se relacionam com transições eletrônicas dos elétrons que compõem as moléculas, que está relacionado ao ângulo das ligações peptídicas, que, por conseguinte se relaciona com o comprimento de onda de absorção. Isso quer dizer que para alguns comprimentos de onda ocorre absorção desigual de luz circularmente polarizada que está relacionado com as transições eletrônicas dos átomos que compõem as moléculas (Figura 2). Dessa forma, é possível investigar as estruturas dessas moléculas partindo do espectro de CD (SREERAMA; WOODY, 2004).



Fonte: Adaptado de (SREERAMA; WOODY, 2004).

Neste estudo foi utilizada espectroscopia de dicroísmo circular para obter informações a respeito das estruturas secundárias dos peptídeos utilizados. Como citado anteriormente, cada estrutura secundária está relacionada a um espectro característico (Figura 3). Bandas positivas significam absorção de luz circularmente polarizada para a direita, enquanto que bandas negativas significam absorção de luz circularmente polarizada para a esquerda. Por exemplo, proteínas cuja estrutura contém alfa-hélice possuem bandas negativas de mesma magnitude em 222 e 208 nm e uma banda positiva em aproximadamente 190 nm. A banda em 222 nm, por exemplo, está relacionada com as pontes de hidrogênio intra-cadeia entre os grupos NH-CO, e independe de seu comprimento. Proteínas com β -hélices possuem bandas negativas em 218 nm e bandas positivas em 195 nm. Para proteínas com folha- β , o espectro contém bandas negativas em torno de 210 a 220 nm e uma banda positiva entre 195 e 200 nm. Proteínas desordenadas (*random coil*), no entanto, possuem elipticidade baixa abaixo de 210 nm e bandas negativas em torno de 195 nm (CORRÊA; RAMOS, 2009;FASMAN, 1996;GREENFIELD, 2009).



Figura 3: Espectro de CD com curvas características de cada estrutura secundária.

Fonte: Adaptado de www.proteinchemist.com.

1.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética

É possível determinar o tamanho médio das partículas em solução. Isso é feito utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Esse experimento consiste em incidir "luz" numa amostra contendo as partículas investigadas em solução. Essas partículas tendem a se mover difusamente de acordo com o movimento Browniano, ou seja, colidem constantemente com as moléculas do solvente, resultando em um movimento aleatório. Estas colisões fazem com que uma quantidade de energia seja transferida, o que induz ao movimento das partículas. Essa transferência de energia é, de certa forma, constante, e tem maior impacto em partículas menores, fazendo com que elas se movam mais rápido do que partículas maiores. Alguns parâmetros influenciam a velocidade das partículas nesse meio como: temperatura, viscosidade e, claro, tamanho. A relação entre esses parâmetros é dada pela relação de Stokes-Einstein (Eq. 1) onde o diâmetro hidrodinâmico (D_H) das partículas é relacionado pelo coeficiente de difusão translacional D, dado em m²/s:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

(Eq. 1)

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade. Para essa equação descrever acuradamente o sistema, o movimento das partículas deve ser regido apenas pelo movimento Browniano, ou seja, se houver sedimentação das partículas não há movimento aleatório, levando a resultados incorretos. Além disso, existe a limitação derivada da precisão do equipamento levando a um limite na determinação do diâmetro da partícula.

A luz que incide nas partículas da amostra é espalhada em todas as direções. Devido à interferência destrutiva e construtiva, surge um padrão com regiões escuras e claras. Um detector que pode ser colocado em um dado ângulo relativo ao feixe inicial, recebe luz com esse padrão. Esse processo é repetido em intervalos de tempo pequenos e é possível comparar a intensidade da luz no detector em cada ponto. Nessa flutuação de intensidade de luz está contida a informação da escala do movimento das partículas: partículas pequenas mostram mais flutuações do que partículas grandes. A partir da intensidade registrada no tempo, é possível obter uma função de correlação, que descreve por quanto tempo uma partícula está localizada no mesmo ponto na amostra. Dessa função é possível gerar um gráfico com um decaimento exponencial, que representa uma medida indireta do tempo que as partículas precisam para mudar suas posições iniciais. Dessa forma é possível, utilizando a equação de Stokes-Einstein, determinar o coeficiente de difusão e então o tamanho médio das partículas em solução.

Também é possível obter medidas do potencial Zeta das partículas na amostra. Partículas carregadas suspensas em uma solução contendo íons interagem entre si por meio de forças eletrostáticas. As partículas atraem íons de cargas opostas a elas que se ligam fortemente as suas superfícies, formando uma camada de íons chamada camada de Stern. Esses íons, por conseguinte, atraem íons de cargas opostas a eles, formando uma camada mais difusa, de forma que quando a partícula se move, a camada de Stern se move junto com a partícula, e os íons mais difusos não. Essa segunda camada de íons blinda a carga dos íons na camada de Stern, e por serem mais difusos, o plano que define sua fronteira chama-se plano de cisalhamento, e é nesse plano que é calculado o potencial Zeta (Figura 4). O potencial Zeta é, então, definido como o potencial elétrico na interface da dupla camada de íons na camada de cisalhamento, relativo a um ponto na subfase muito distante da interface, e é medido normalmente em mV. Dessa forma, a presença de partículas carregadas, íons e quais tipos de íons em solução irá afetar a medida de potencial Zeta.



Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Wikimedia Commons.

O potencial zeta é calculado pela mobilidade eletroforética das partículas em solução que estão sob um campo elétrico definido por eletrodos de cargas opostas. As partículas em solução encontram resistência devido à viscosidade do meio, e assim que alcançam o equilíbrio, atingem uma velocidade constante. No equipamento utilizado, é possível calcular por velocimetria Doppler a laser a mobilidade eletroforética, já que a velocidade da partícula está relacionada com a flutuação da intensidade da luz espalhada. O potencial zeta pode ser estimado para amostras com partículas com tamanhos entre 5 nm e 10 µm (DOMINGUES et al., 2008).

O potencial zeta (ζ) de uma suspensão de vesículas é, então, dado pela equação de Smoluchowski:

$$\zeta = \mu \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_o} \frac{1}{f(\kappa R')}$$

(Eq. 2)

onde μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio, ε_r é a constante dielétrica da água, ε_0 é a permissividade do vácuo e f($\kappa R'$) é a função de Henry, onde κ e R' são o inverso do comprimento de Debye e o raio médio das vesículas, respectivamente.

1.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência

Fluorescência e fosforescência são fenômenos luminescentes, ou seja, resultados de uma emissão de luz que ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. A fluorescência é a emissão de luz a partir de uma substância que absorveu luz ou radiação eletromagnética normalmente em comprimentos de onda menores do que a luz emitida (*Stokes shift*). Esse fenômeno acontece "imediatamente" (ordem de nano segundos): assim que cessa a incidência da radiação na amostra, a emissão proveniente do efeito da fluorescência cessa também. Isso difere da fosforescência em que a emissão a partir da amostra continua após algum tempo (entre 1 a 1000 segundos).

A fluorescência tem como princípio a emissão de luz de um material decorrente de um relaxamento de um elétron de uma molécula, átomo, ou nanoestrutura a partir de um estado excitado para um estado fundamental (LAKOWICZ, 2013). A molécula excitada pode relaxar para seu estado fundamental de diversas formas em que não há a emissão de um fóton, ou seja, uma relaxação/transição não-radioativa (Figura 5), como por exemplo através de dissipação de calor (vibrações). Também pode ocorrer a relaxação não-radioativa a partir da interação com uma outra molécula, efeito conhecido como supressão. Um experimento onde as consequências deste efeito são analisadas é a espectroscopia de fluorescência, descrito posteriormente. Na maioria dos casos a luz emitida possui um comprimento de onda maior (e consequentemente energia menor) do que a da radiação absorvida. Porém, se a radiação absorvida for muito intensa, é possível um elétron absorver a energia de dois fótons, e a radiação emitida pode ter comprimento de onda menor ou igual (fluorescência de ressonância) ao comprimento de onda da radiação absorvida.



Figura 5: Diagrama de Jablonski: descrição da maioria dos mecanismos de relaxação de estados excitados de moléculas.

Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Wikimedia Commons

Um fluorímetro (ou fluorômetro) é um equipamento que funciona da seguinte forma: radiação eletromagnética parte de uma fonte de radiação e passa por um monocromador que irá transmitir a radiação em um comprimento de onda específico. O intervalo desse comprimento de onda dependerá da lâmpada utilizada e das condições experimentais. A radiação incidirá na amostra que pode absorver determinados comprimentos de onda, e, se ocorrer a fluorescência, emite radiação em todas as direções. Para detectar a radiação emitida pela amostra, um detector é colocado a 90° da direção do feixe de radiação que excita a amostra para minimizar a radiação transmitida ou refletida, depois de passar por um monocromador. Existem variações na construção dos espectrofluorímetros, mas no geral o princípio é da forma como descrito.

Para obter o espectro de fluorescência de um composto, o comprimento de onda da radiação de excitação é mantido constante, usualmente é escolhido um comprimento de onda que o composto absorve extensamente. O comprimento de emissão da amostra é medido, e dessa forma é obtido um espectro da emissão da amostra, com a intensidade em unidades arbitrárias no eixo Y e o comprimento de onda no eixo X.

Para medir o espectro de excitação, o monocromador da emissão se mantém constante, enquanto o monocromador da excitação varia seu comprimento de onda. Geralmente o espectro de excitação é semelhante ao espectro de absorção descrito acima, já que a intensidade de fluorescência é proporcional à absorção.

A espectroscopia tem como base o uso de fluoróforos: compostos químicos fluorescentes. Existem dois tipos de fluoróforos, os intrínsecos e os extrínsecos. Os intrínsecos ocorrem naturalmente como aminoácidos aromáticos, clorofila, flavinas, derivados de

piridoxila e NADH. Fluoróforos extrínsecos são adicionados na amostra para fornecer fluorescência ou para mudar propriedades espectrais da amostra. Estes são a rodamina, fluoresceína, dansila etc (LAKOWICZ, 2013).

Para este estudo foi utilizado como sonda o resíduo triptofano, um fluoróforo intrínseco. Assim como o triptofano, os aminoácidos tirosina e fenilalanina também são fluorescentes, e possuem seus respectivos comprimentos de onda de excitação. Em água pH 6 a 23 °C, o triptofano possui um comprimento de excitação máximo em 280 nm, a tirosina nessas mesmas condições em 275 nm e a fenilalanina em 260 nm (CHEN, R. F., 1967). A emissão desses compostos é diferente, entretanto, sendo para o triptofano, tirosina e fenilalanina, respectivamente, 353, 304 e 282 nm (Figura 6). Em proteínas, normalmente a emissão da tirosina é suprimida devida a interação com a cadeia peptídica ou devido à transferência de energia para o triptofano, e por isso que frequentemente a desnaturação de proteínas resulta em emissão da tirosina. A emissão da fenilalanina só é observada quando a proteína não possui em sua sequência resíduos de triptofano ou tirosina (Lakowicz, 2006).

Figura 6: Espectros de absorção (acima) e emissão (abaixo) dos aminoácidos fluorescentes triptofano (TRP), tirosina (TYR) e fenilalanina (PHE) em água pH 7,0.



Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2013).

O resíduo de triptofano é, de certa forma, diferente da maioria dos aminoácidos fluorescentes. Sua emissão é sensível ao ambiente, e por isso é utilizado para investigar mudanças conformacionais em proteínas como associação proteína-proteína, interação de ligantes e desenovelamento de proteínas. Além disso, a fluorescência do triptofano é passível

de ser suprimida por algumas moléculas como acrilamida, iodeto, e grupos dissulfeto próximos (LAKOWICZ, 2013).

A supressão de fluorescência pode ocorrer de duas maneiras: a supressão dinâmica/colisional e a supressão estática. É possível o fluoróforo ir para um estado excitado, e ao invés de retornar ao estado fundamental emitindo um fóton através do fenômeno de fluorescência, ocorre o retorno sem emitir um fóton devido a um "choque" com uma molécula supressora. Este fenômeno é conhecido como supressão dinâmica. O outro caso ocorre quando é formado um complexo fluoróforo-supressor.

Neste estudo foi utilizado dessas propriedades do resíduo de triptofano para investigar o ambiente que os peptídeos utilizados estão inseridos. O experimento consiste em titular um supressor numa solução contendo peptídeos na ausência e presença de suspensão de LUVs. O supressor (*quencher*) utilizado foi a acrilamida. Considerando uma solução contendo peptídeos que possuem em sua sequência triptofanos, é esperado que a acrilamida suprima a intensidade da fluorescência conforme ocorra sua titulação. Dessa forma, em uma solução contendo apenas peptídeos, é esperado grande supressão da fluorescência do triptofano, já que os peptídeos estão expostos na solução. A outra condição consiste em titular acrilamida numa solução que contém, além dos peptídeos, LUVs. Se os peptídeos não interagirem com as LUVs e continuarem expostos ao solvente, a acrilamida irá suprimir a fluorescência do mesmo jeito. Porém, se os peptídeos interagirem com as vesículas e se inserirem nas mesmas, os resíduos de triptofano podem se inserir na membrana, sendo "protegidos" da ação da acrilamida. Dessa forma, é possível comparar quão intensa é a supressão para os dois casos, e inferir se ocorre a inserção do peptídeo nas membranas de LUVs.

Como o fluoróforo utilizado é o triptofano, foi utilizado um comprimento de onda de excitação de 295 nm. Como mencionado, o comprimento de onda de excitação da tirosina é próximo do comprimento de onda de excitação máximo do triptofano, e os experimentos de fluorescência comumente excitam a amostra a 295 nm para evitar a excitação da tirosina, e observar apenas a emissão do triptofano (Figura 7). Mesmo que os peptídeos utilizados não contenham tirosina, foi utilizado esse comprimento de onda por convenção e comparação com dados da literatura.

Figura 7: Espectro de emissão de uma amostra contendo triptofano e tirosina, onde o comprimento de excitação foi fixado em 275 nm (azul) e em 295 nm (vermelho).



Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2013).

1.2.2 Experimentos com monocamadas

Os lipídios anfifílicos, como os utilizados neste estudo, possuem a característica de se auto-organizar em ambientes aquosos de forma espontânea, dirigida por forças eletrostáticas e efeito entrópico. Nesses casos os lipídios podem formar estruturas como micelas, vesículas etc. Porém, se os lipídios estiverem numa interface água-ar, por exemplo, as cabeças polares dos lipídios ficarão voltadas para a parte aquosa e as caudas apolares ficarão voltadas para o ar. Assim, ocorre a formação de um filme monomolecular, ou seja, uma monocamada lipídica cuja espessura corresponde ao tamanho de uma molécula de fosfolipídio (Figura 8). Esse sistema simples é muito utilizado para determinar algumas características a respeito do filme, que variam dependendo de alguns parâmetros que serão abordados posteriormente.





Adaptado de (LI; ZHAO; SUN, 2018).

Solventes, como a água, possuem uma característica intrínseca chamada de tensão superficial, que é a tendência das superfícies do fluido de ocupar a menor área de superfície possível. Em interfaces água-ar, a atração das moléculas de água entre si (coesão) é maior do que a atração das moléculas de água e as moléculas do ar (adesão), e assim, o efeito resultante é uma força dirigida lateralmente paralela à superfície, fazendo com que o líquido se comporte como se sua superfície tivesse uma membrana elástica. Ou seja, é um efeito proveniente de um desequilíbrio das forças que agem na interface e é proporcional a sua área. A tensão superficial depende não só do solvente utilizado, mas também da temperatura, de forma que quanto maior a temperatura menor a tensão. A água, por suas moléculas se ligarem por ligações de hidrogênio, possui uma tensão superficial maior comparada com outros líquidos, 72,8 mN/m a 20 °C (BARNES; GENTLE, 2011;PALLAS; HARRISON, 1990).

Moléculas de lipídios, por serem compostos orgânicos anfifílicos, são classificadas como surfactantes, que são compostos que diminuem a tensão superficial entre dois líquidos, entre um gás e um líquido, ou entre um líquido e um sólido. Nesses casos em que a tensão superficial foi alterada devido à formação de monocamadas de surfactantes, é conveniente definir a pressão de superfície, π , como a redução na tensão de superfície após o evento (BARNES; GENTLE, 2011;GENNIS, 1989):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_f \tag{Eq. 3}$$

onde γ_0 é a tensão superficial original da subfase líquida pura, γ_f é a tensão superficial após a adição de surfactante abaixo da CMC (concentração micelar crítica). Como normalmente a tensão superficial é reduzida após a adsorção das moléculas na interface, o valor da pressão de superfície aumenta de zero para um valor positivo. Os experimentos de monocamadas são descritos em função da pressão de superfície, obtida através da tensão superficial.

A medição da tensão superficial pode ser feita de diversas maneiras, porém, deve-se escolher com cuidado a técnica dependendo do sistema investigado. No presente trabalho foi utilizado o método Wilhelmy para a medição da tensão superficial. Esse método consiste em mergulhar parcialmente uma placa (que pode ser metálica ou de papel filtro) - chamada de placa de Wilhelmy, segundo o cientista que a usou pela primeira vez, na superfície do líquido, e medir a força que age sobre ela, decorrente da tensão superficial (Figura 9). O menisco em contato com a placa situa-se em uma linha cujo comprimento corresponde ao dobro da soma da

espessura da placa e da sua largura 2(w+d). A força resultante é descrita da seguinte forma (BLUME, 2018; MAGET-DANA, 1999):

$$F = 2\gamma(w+d)\cos\theta + F_{grav} - F_{emp}$$
(Eq. 4)

onde γ é a tensão superficial, F_{grav} é a força gravitacional na placa, F_{emp} é a força ascendente do empuxo e θ é o ângulo de contato. Este ângulo, entretanto, raramente é medido e é assumido ser zero, situação em que a placa está perfeitamente molhada. O efeito do empuxo vai depender do quão imerso a placa está, e se a mesma estiver nivelada com a superfície, então o empuxo pode ser desprezado. Para o equipamento utilizado, entretanto, é possível calibrar a altura da placa de forma que a pressão de superfície seja zero naquele ponto, excluindo a necessidade de considerar este efeito. Estas placas são acopladas a tensiômetros ou microbalanças (BARNES; GENTLE, 2011).



Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Creative Commons.

No presente trabalho foram utilizadas monocamadas de duas formas: em que a área é variável e em que a área é constante.

1.2.2.1 Área variável

O primeiro caso é investigado utilizando uma cuba de Langmuir (Figura 10). Essa cuba possui barreiras móveis que se situam na interface água-ar controladas de acordo com as condições experimentais. Após espalhar lipídios diretamente na interface, essas barreiras percorrem a superfície, diminuindo a área em que essas moléculas estão situadas fazendo com que essas moléculas se aproximem entre si e consequentemente aumentam as interações entre elas. Esse filme formado na interface é conhecido como monocamada de Langmuir: filme com espessura de uma molécula diluída em material orgânico insolúvel espalhado na interface águaar de uma cuba de Langmuir ou cuba de Langmuir-Blodgett. Pode-se também espalhar peptídeos ou lipídios e peptídeos previamente misturados.





Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Creative Commons.

Essa técnica consiste, então, em monitorar a pressão de superfície em função da área da cuba (A). O software utilizado fornece a opção de inserir como parâmetro a quantidade de lipídio espalhada, tornando possível o cálculo da área média por molécula, e assim, um gráfico de pressão de superfície por área média por molécula é obtido, chamado de isoterma de Langmuir. Na medida em que o filme é comprimido, a pressão de superfície aumenta, ocorrem mudanças na orientação e na densidade de empacotamento da monocamada, e então os lipídios na interface podem passar por diferentes fases bidimensionais, cada fase separada por uma transição (Figura 11), de forma que as isotermas π -A para um filme são análogas às isotermas pressão-volume (P-V) para um gás (ROBINSON; BIRDI, 1984).

As diferentes fases que o filme pode assumir são: fase gasosa (G), fase líquidoexpandida (LE), fase líquido-condensada (LC) e fase sólida (S) (Figura 11, (A)). Cada fase é definida pela extensão das interações das moléculas da monocamada, sendo estas, por exemplo, interações eletrostáticas repulsivas entre as cabeças polares, ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água, interações de van der Waals entre as cadeias acíclicas etc. Figura 11: (A) Desenho esquemático de uma isoterma de Langmuir e as diferentes possíveis fases (G, gasosa; LE, líquido-expandida; LC, líquido-condensada e S, sólida) que podem ocorrer durante uma compressão. (B) Compressibilidade e módulo de compressibilidade em função da área por molécula.



Fonte: Adaptado de (BLUME, 2018).

Decorrida a compressão, a compressibilidade do filme (C_s) diminui devido a um aumento na densidade (Figura 11 (B)). Também é possível obter o módulo de compressibilidade (C_s^{-1}), que será abordado posteriormente (Eq. 14). Usualmente, é possível observar mudanças de fase do filme lipídico numa isoterma, porém isso vai depender do tipo de lipídio ou da mistura de lipídios que compõem o filme lipídico, a presença de peptídeos, e condições de subfase como força iônica, pH e temperatura como exemplificado na Figura 12. Na fase gasosa, usualmente em pressões abaixo de 0,5 mN/m, as moléculas estão muito espaçadas, levando a uma fraca interação entre elas, podendo ser altamente compressíveis. Na transição da fase gasosa para a líquido-expandida (do ponto de vista experimental, sua existência ainda é questionada) (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2010), é observado o valor da área por molécula em que a pressão começa a aumentar a partir de 0 mN/m (*lift-off*). Nesta fase a compressibilidade ainda é alta, porém, ocorre um aumento nas interações entre as cadeias acíclicas e as cabeças polares. Na transição de fase LE-LC, é observada uma diminuição na inclinação da curva e dependendo do caso, um platô. Ao passar de fase fluida de baixa densidade para a fase condensada de mais alta densidade, pode ocorrer o rearranjo das moléculas formando agregados chamados de domínios, que podem ser visualizados através de diversas técnicas experimentais como microscopia de fluorescência (MF), microscopia de ângulo de Brewster (*Brewster angle microscopy*, BAM) e microscopia de força atômica (*Atomic force microscopy*, AFM) (BLUME, 2018). A discussão a respeito da formação destes domínios será abordada em detalhes posteriormente. Na fase líquido-condensada a compressibilidade se torna mais baixa e as interações entre as cadeias acíclicas, agora, relativamente mais ordenadas, aumentam. A última fase que os lipídios podem se encontrar na interface é a sólida. Neste caso, as moléculas se aderem através de forças de van der Waals entre as cadeias acíclicas, ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e a subfase e forças estéricas. Além disso, as moléculas estão altamente ordenadas e sua compressibilidade é a mais baixa de todas as fases. Se a compressão continuar, é possível ocorrer o colapso do filme, onde o ordenamento molecular é destruído e a monocamada pode se deformar, romper ou perder material para a subfase (indicado com uma seta na Figura 11) (BAOUKINA et al., 2008;LEE, 2008;SAAD et al., 2009). Nesse ponto é possível obter a menor área por molécula (GENNIS, 1989).

Figura 12: Isoterma de compressão π-A de DPPC puro em água em diferentes temperaturas (20, 24, 28 e 32 °C).



1.2.2.2 Área constante

O segundo caso é investigado utilizando uma cuba de área constante (

Figura 13). Nesse sistema lipídios são espalhados na interface até a pressão de superfície se equilibrar e atingir um valor desejado (π) e a variação da pressão superficial ($\Delta \pi$) é

monitorada após a injeção de uma solução de peptídeo na concentração desejada na subfase. Se os peptídeos alterarem a pressão de superfície, é dito que os peptídeos adsorveram na interface e foram capazes de inserir-se no filme. Essa técnica registra a pressão de superfície em função do tempo fornecendo uma cinética de adsorção.

É também possível inserir peptídeos na subfase e monitorar a variação da pressão de superfície conforme os mesmos adsorvem na interface limpa (sem filme lipídico pré-formado). A variação da pressão de superfície induzida pela adsorção de peptídeos em função de sua concentração na subfase (C_p) dá origem a isoterma de Gibbs, a partir da qual pode-se obter a concentração de saturação, C_{sat}, considerada como a mínima concentração acima da qual a pressão de superfície não altera com o aumento da concentração de peptídeos na subfase. Para a subfase na condição de 150 mM NaCl, pH 7,4, foi observado que essa concentração é bem similar para o L1A e seu análogo acetilado correspondendo a 0,9 e 0,7 (± 0,1) µM, respectivamente. Assim, utiliza-se uma concentração de peptídeos na subfase acima dessa para se certificar de que a variação de pressão induzida pela inserção dos peptídeos na interface seja a máxima garantida. A partir dos dados obtidos abaixo dessas concentrações, a concentração em excesso de peptídeo na superfície Γ_{max} é obtida utilizando a equação de adsorção de Gibbs: $\Gamma = \frac{\Delta \pi}{\operatorname{RTln}(C_{\rm p})}$, onde $\Delta \pi$ é a variação de pressão de superfície induzida pelos peptídeos adsorvidos na interface, R é a constante universal dos gases perfeitos e T é a temperatura. Se uma monocamada de moléculas é formada na interface, o inverso de Γ_{max} corresponde a área média por molécula da molécula adsorvida. Resultados obtidos pelo grupo de pesquisa nas mesmas condições mencionadas anteriormente forneceram valores de 30 e 50 \AA^2 para os peptídeos L1A e acL1A, os quais são menores do que o esperado para moléculas orientadas perpendicularmente ou paralelas a interface, correspondendo a ~180 e ~400 Å², respectivamente (ALVARES et al., 2016). Além disso, esses valores são menores dos que obtidos pelas isotermas de compressão de peptídeos puros (Apêndice A), levando a conclusão de que as monocamadas formadas pela adsorção desses peptídeos consistem em mais de uma lamela de moléculas acumuladas (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

A atividade interfacial de peptídeos é descrita como a habilidade de uma molécula se ligar a uma membrana, particionar numa interface água-ar e alterar a organização e empacotamento dos lipídios (RATHINAKUMAR; WALKENHORST; WIMLEY, 2009;RATHINAKUMAR; WIMLEY, 2008) e depende de suas propriedades físico-químicas e de um balanço entre as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os peptídeos, moléculas de água e lipídios. Essas monocamadas em que moléculas adsorvidas induzem a uma mudança na tensão superficial são chamadas de monocamadas de Gibbs, diferente das monocamadas espalhadas descritas anteriormente, as monocamadas de Langmuir. Estudos anteriores confirmaram que transições de fase do tipo LE-LC podem ocorrer em monocamadas de Gibbs contendo lipídios (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2010), e assim, levando a possibilidade da formação de domínios, passíveis de serem visualizados por microscopia, por exemplo.

Figura 13: Cuba caseira de área constante.

Fonte: elaborado pelo autor

1.2.2.3 Domínios

Um domínio lipídico pode ser definido de forma mais geral possível como qualquer região numa membrana que difere na composição lipídica de outras regiões (MATSUMOTO et al., 2006;WELTI; GLASER, 1994). Embora o termo "domínio" possua essa definição, ele é utilizado para diversas estruturas, já que domínios lipídicos existem em membranas modelo e em membranas biológicas. Neste trabalho, entretanto, usou-se o termo para se referir às formas escuras vistas por MF em monocamadas, núcleos densos que são formados por lipídios na fase LC na presença de uma fase menos densa enquanto que regiões escuras formadas por peptídeos e/ou peptídeo/lipídio serão chamadas de agregados/clusters.

A formação dos domínios é determinada pelas interações intermoleculares entre os próprios lipídios e outros fatores como as condições iônicas, temperatura, pH e outros componentes que compõem a monocamada como peptídeos e impurezas.

1.2.2.4 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)

Os experimentos de monocamadas foram visualizados por microscopia de fluorescência. Esse tipo de microscopia óptica consiste em utilizar os fenômenos de fluorescência ou fosforescência para a visualização da amostra.

A maioria dos microscópios de fluorescência são microscópios de epifluorescência, ou seja, a radiação que excita a amostra passa pelo mesmo caminho que a radiação fluorescente emitida pela amostra. Em um microscópio de epifluorescência (Figura 14) uma fonte emite radiação em comprimentos de onda específicos que atravessa um filtro chamado de filtro de excitação. Esse filtro permite a passagem de um comprimento de onda específico, que pode ser selecionado dependendo do experimento. Após atingir um espelho dicroico e uma objetiva de magnificação escolhida, a radiação incide na amostra fluorescente, refletindo de volta para a objetiva. Ao passar por ela, segue para um espelho dicróico e um filtro de emissão que ambos permitem apenas a passagem de radiação com comprimentos de onda específicos, para, finalmente, a imagem passar pela ocular ou um detector.



Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Wikimedia Commons

4. Considerações finais

Neste trabalho foi investigada a adsorção do peptídeo sintético L1A e de seu análogo acetilado acL1A bem como a consequente perturbação do empacotamento lipídico em membranas modelo de 3POPE/1DOPG utilizando diversas técnicas experimentais.

Em membranas biológicas, a difusão dos componentes da membrana não ocorre livremente, dando origem a domínios que são regiões ricas em componentes diferentes. Essas regiões segregadas ocorrem naturalmente, tendo diferentes funções dependendo do tipo de célula. No entanto, quando a segregação é induzida por peptídeos, a membrana é desestabilizada devido a defeitos na região lipídica no entorno dos peptídeos. Além disso, se regiões segregadas contendo lipídios que induzem curvatura negativa, como o PE, ocorrerem, então a membrana pode ser ainda mais desestabilizada. Esses defeitos e desestabilização induzidos por peptídeos podem facilitar a permeação da membrana. Dessa forma, a segregação induzida por peptídeos pode ser um mecanismo adicional a atividade antimicrobiana ao (i) afetar a formação de domínios responsáveis pela função da membrana, (ii) aumentar a carga negativa local e/ou (iii) dificultar o rearranjo lipídico.

Os diversos resultados obtidos revelaram que: (i) o peptídeo acetilado, que embora possua menor carga em comparação ao L1A, possui a mesma afinidade a LUVs compostas por PE/PG, levando a conclusão de que a redução de carga do N-terminal não é relevante para a quantidade de peptídeos adsorvidos na membrana nessa composição; (ii) a redução da carga no N-terminal não é significativa para a inserção na parte hidrofóbica de bi e monocamadas aniônicas, no entanto, acL1A induziu maior valores de MIP em monocamadas de POPE comparado com L1A; (iii) o acL1A é mais eficaz que o L1A em perturbar o empacotamento lipídico de membranas de PE/PG, sequestrando lipídios aniônicos criando regiões ricas em fosfolipídios aniônicos e peptídeos e criando regiões segregadas ricas em lipídios zwitteriônicos. As fronteiras destas regiões podem ser instáveis contribuindo para aumentar a eficiência lítica dos peptídeos. Esse efeito não foi observado para misturas de PC/PG (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018), evidenciando o papel da composição lipídica das membranas para a atividade dos peptídeos. Esses resultados podem ser correlacionados com a melhor eficiência antibacteriana encontrada para o acL1A comparada com o L1A em experimentos com E. coli (ZANIN et al., 2016). Mais correlações entre a segregação lipídica e a atividade lítica desses peptídeos requerem mais investigações as quais estão em progresso no nosso laboratório.

Todos os resultados obtidos até aqui sugerem que a atividade antimicrobiana desses peptídeos pode ter uma grande contribuição da segregação lipídica, especialmente para o peptídeo acetilado.

Referências

ALI, S; BROCKMAN, H. L.; BROWN, R. E. **Structural determinants of miscibility in surface films of galactosylceramide and phosphatidylcholine: effect of unsaturation in the galactosylceramide acyl chain.** *Biochemistry*, v. 30, n° 47, p. 11198–205, 1991.

ALI, Shaukat et al. **Cholesterol's Interfacial Interactions with Galactosylceramides**. *Biochemistry*, v. 33, nº 10, p. 2900–2906, 1994. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00176a020.

ALMEIDA, P. F.; LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. **Hydrogen-bond energetics drive helix formation in membrane interfaces**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1818, n° 2, p. 178–182, 2012. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.07.019.

ALVARES, D. S. **Estudo da formação de domínios em bicamadas lipídicas induzidos por peptídeos antimicrobianos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2011

ALVARES, D. S.; SANTOS CABRERA, M. P. DOS; RUGGIERO NETO, J. Strategies for exploring electrostatic and nonelectrostatic contributions to the interaction of helical antimicrobial peptides with model membranes. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. 1 ed.: Elsevier Inc., 2016. v. 24, 43–73 p. ISSN: 24519634, DOI: 10.1016/bs.abl.2016.05.001.

ALVARES, D.S.; VIEGAS, T.; RUGGIERO NETO, J. **The effect of pH on the lytic activity of a synthetic mastoparan-like peptide in anionic model membranes**. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 216, n^o August, p. 54–64, 2018. ISSN: 18732941, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.005.

ALVARES, D.S.; WILKE, N.; RUGGIERO NETO, J. **Effect of N-terminal acetylation on lytic activity and lipid-packing perturbation induced in model membranes by a mastoparan-like peptide**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1860, n° 3, p. 737–748, 2018. ISSN: 18792642, DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.12.018.

ALVARES, D. S. et al. The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1858, n° 2, p. 393–402, 2016. ISSN: 18792642, DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.12.010.

ALVARES, D. S; VIEGAS, T. G.; NETO, J. R. Lipid-packing perturbation of model membranes by pH-responsive antimicrobial peptides. *Biophysical Reviews*, p. 669–682, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0296-0.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Peptide Science*, v. 47, n° 6, p. 415–433, 1998. ISSN: 0006-3525.

BAOUKINA, S. et al. **The molecular mechanism of lipid monolayer collapse**. *PNAS*, v. 105, n° 31, p. 10803–10808, 2008.

BARNES, G.; GENTLE, I. Interfacial science: an introduction. Oxford university press, 2011. ISBN: 019957118X.

BECHINGER, B. **The SMART model: Soft membranes adapt and respond, also Transiently, in the presence of antimicrobial peptides**. *Journal of Peptide Science*, v. 21, n° 5, p. 346–355, 2015. ISSN: 10991387, DOI: 10.1002/psc.2729.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. **Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1758, n° 9, p. 1529–1539, 2006. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.07.001.

BLUME, A. **Lipids at the air–water interface**. *ChemTexts*, v. 4, n^o 1, 2018. ISBN: 0123456789, DOI: 10.1007/s40828-018-0058-z.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides : basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, p. 197–215, 2003.

BRASLAVSKY, S. E. **Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006)**. *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n° 3, p. 293–465, 2007. ISSN: 0033-4545, DOI: 10.1351/pac200779030293.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n° 3, p. 238–250, 2005. ISSN: 17401526, DOI: 10.1038/nrmicro1098.

BUENO, N. et al. Effect of the aspartic acid D2 on the affinity of Polybia - MP1 to anionic lipid vesicles. *European Biophysics Journal*, p. 121–130, 2014. DOI: 10.1007/s00249-014-0945-1.

CHAN, Y.-H. M.; BOXER, S. G. Model Membrane Systems and Their Applications State of the field. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, n^o 6, p. 581–587, 2007.

CHEN, R. F. **Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine**. *Analytical Letters*, v. 1, n° 1, p. 35–42, 1967. ISSN: 1532236X, DOI: 10.1080/00032716708051097.

CHEN, Y. et al. **Comparison of biophysical and biologic properties of α-helical enantiomeric antimicrobial peptides**. *Chemical biology & drug design*, v. 67, n° 2, p. 162– 173, 2006. ISSN: 1747-0277.

CLIFTON, L. A. et al. **Design and use of model biomembranes to study biomolecular interactions using complementary surface-sensitive techniques**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 277, p. 102118, 2020. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/j.cis.2020.102118. CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. **The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function**. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 3, n° 5, p. 164–173, 2009.

COSTIN, I. S.; BARNES, G. T. **Two-component monolayers. II. Surface pressure-area relations for the octadecanol-docosyl sulphate system**. *Journal of Colloid And Interface Science*, v. 51, n° 1, p. 106–121, 1975. ISSN: 00219797, DOI: 10.1016/0021-9797(75)90088-0.

DATHE, M. Structural features of helical antimicrobial peptides : their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1462, p. 71–87, 1999.

DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. Interfacial phenomena. Academic Press, 1961. ISBN: 978-0-12-206056-4

DEMEL, R. A. et al. **Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 406, n° 1, p. 97–107, 1975. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/0005-2736(75)90045-0.

DENNISON, S. R. et al. A study on the interactions of Aurein 2.5 with bacterial membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 68, n° 2, p. 225–230, 2009. ISSN: 09277765, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.10.007.

DOMINGUES, M. M. et al. What can light scattering spectroscopy do for membraneactive peptide studies? *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, v. 14, n° 4, p. 394–400, 2008. ISSN: 1075-2617.

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; KITA, K. **Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 79, n° 1, p. 1–17, 1999. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00064-5.

EEMAN, M.; DELEU, M. **From biological membranes to biomimetic model membranes**. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, v. 18, nº 4, p. 719–736, 2009. ISSN: 1370-6233.

EISENBERG, D. et al. **Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot**. *Journal of Molecular Biology*, v. 179, n° 1, p. 125–142, 1984. ISSN: 00222836, DOI: 10.1016/0022-2836(84)90309-7.

EPAND, R. F. et al. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n° 9, p. 3705–3714, 2009. ISSN: 00664804, DOI: 10.1128/AAC.00321-09.

EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. M. **Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins)**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1768, n° 10, p. 2500–2509, 2007. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.05.023. EPAND, R. M.; EPAND, R. F. **Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents**. *Molecular BioSystems*, v. 5, n^o 6, p. 580–587, 2009. ISSN: 1742206X, DOI: 10.1039/b900278m.

EPAND, R.; VOGEL, H. **Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1462, 1999.

FASMAN, G. D. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. In: FASMAN, G. D. (Org.). New York: Springer US, 1996. 738 p. ISBN: 9781441932495, DOI: 10.1007/978-1-4757-2508-7.

FINGER, S. et al. The efficacy of trivalent cyclic hexapeptides to induce lipid clustering in PG/PE membranes correlates with their antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1848, n° 11, p. 2998–3006, 2015. ISSN: 18792642, DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.09.012.

FJELL, C. D. et al. **Designing antimicrobial peptides: Form follows function**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n° 1, p. 37–51, 2012. ISSN: 14741784, DOI: 10.1038/nrd3591.

FOŠNARIČ, M.; IGLIČ, A.; MAY, S. **Influence of rigid inclusions on the bending** elasticity of a lipid membrane. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, v. 74, n° 5, p. 1–12, 2006. ISSN: 15393755, DOI: 10.1103/PhysRevE.74.051503.

FREIRE, J. M. et al. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *European Biophysics Journal*, v. 40, n° 4, p. 481–487, 2011. ISSN: 01757571, DOI: 10.1007/s00249-010-0661-4.

GAINES, G. L. **Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces**. Interscience Publishers, 1966.

GEVOD, V. S.; BIRDI, K. S. **Melittin and the 8–26 fragment. Differences in ionophoric properties as measured by monolayer method**. *Biophysical Journal*, v. 45, n° 6, p. 1079–1083, 1984. ISSN: 00063495, DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84255-1.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *ProQuest Dissertations and Theses*, v. 1, n^o 6, p. 2876–2890, 2009. ISBN: 9781267658555, ISSN: 0419-4217, DOI: 10.1038/nprot.2006.202

HAMILL, P. et al. **Novel anti-infectives: is host defence the answer?** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n° 6, p. 628–636, 2008. ISSN: 09581669, DOI: 10.1016/j.copbio.2008.10.006.

HANCOCK, R. E. W.; FALLA, T.; BROWN, M. Cationic Bactericidal Peptides. *Advances in Microbial Physiology*. v. 37, C, p. 135-175, 1995. ISBN: 0120277379.

HANEY, E. F. et al. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 163, n° 1, p. 82–93, 2010. ISSN: 00093084, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2009.09.002.

HINZ, A.; GALLA, H. J. **Viral membrane penetration: Lytic activity of a nodaviral fusion peptide**. *European Biophysics Journal*, v. 34, n° 4, p. 285–293, 2005. ISSN: 01757571, DOI: 10.1007/s00249-004-0450-z.

HUANG, H. W.; CHEN, F. Y.; LEE, M. T. **Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes**. *Physical Review Letters*, v. 92, n° 19, p. 1–4, 2004. ISSN: 00319007, DOI: 10.1103/PhysRevLett.92.198304.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. Academic press, 2015. ISBN: 0080923631. aa

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN: 1475730616.

LAU, S. Y. M.; TANEJA, A. K.; HODGES, R. S. Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded helical coiled-coils. *Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n° 21, p. 13253–13261, 1984. ISSN: 00219258.

LEE, K. Y. C. Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2008. DOI: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619.

LI, H.; ZHAO, T.; SUN, Z. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, v. 37, n° 1, p. 1–23, 2018. ISSN: 07930135, DOI: 10.1515/revac-2017-0012.

LOHNER, K. et al. **Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems**. *Biochemistry*, v. 36, n° 6, p. 1525–1531, 1997. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi961300p.

LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry*, v. 36, n° 27, p. 8413–8421, 1997. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi9707133.

LUONG, H. X. et al. **Antimicrobial activity and stability of stapled helices of polybia-MP1**. *Archives of Pharmacal Research*, v. 40, n° 12, p. 1414–1419, 2017. ISSN: 19763786, DOI: 10.1007/s12272-017-0963-5.

MAGET-DANA, REGINE, LELIEVRE, DOMINIQUE, B. A. Surface Active Properties of Amphiphilic Sequential Isopeptides : Comparison Between alpha-Helical and beta-Sheet Conformations Equilibrium Spreading Pressure of. *Biopolymers*, v. 49, p. 415–423, 1999.

MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1462, n° 1, p. 109–140, 1999. ISSN: 0005-2736, DOI: https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00203-5.

MARSH, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, v. 1286, n° 3, p. 183–223, 1996. ISSN: 0304-4157. MARSH, D. Handbook of lipid bilayers. CRC press, 2013. ISBN: 1420088335.

MATSUMOTO, K. et al. **Lipid domains in bacterial membranes**. *Molecular Microbiology*, v. 61, n° 5, p. 1110–1117, 2006. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x.

MATSUZAKI, K. et al. **Orientational and Aggregational States of Magainin 2 in Phospholipid Bilayers**. *Biochemistry*, v. 33, n° 11, p. 3342–3349, 1994. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00177a027.

MATSUZAKI, K. et al. **Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation**. *Biochemistry*, v. 35, n° 25, p. 8450–8456, 1996. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi960342a.

MCELHANEY, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 30, p. 229–259, 1982.

MOHWALD, H. **Phospholipid And Phospholipid-Protein Monolayers At The Air/Water Interface**. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 41, n° 1, p. 441–476, 1990. ISSN: 0066426X, DOI: 10.1146/annurev.physchem.41.1.441.

MOL, A. R.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections.** *bioRxiv*, p. 416347, 2018. DOI: 10.1101/416347.

MOURITSEN, O. G.; BAGATOLLI, L. A. Life-as a matter of fat: lipids in a membrane biophysics perspective. Springer, 2015. ISBN: 3319226142.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action**. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n° 9, p. 464–472, 2011. ISSN: 01677799, DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.

NYMEYER, H.; ZHOU, H. X. **A method to determine dielectric constants in nonhomogeneous systems: Application to biological membranes**. *Biophysical Journal*, v. 94, nº 4, p. 1185–1193, 2008. ISSN: 15420086, DOI: 10.1529/biophysj.107.117770.

PALLAS, N. R.; HARRISON, Y. An Automated Drop Shape Apparatus and the Surface Tension of Pure Water. *Colloids and Surfaces*, v. 43, n° 2, p. 169–194, 1990. DOI: 10.1016/0166-6622(90)80287-E.

PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA, F. C. Mechanism of Leakage of Phospholipid Vesicle Contents Induced by the Peptide GALA. *Biochemistry*, v. 29, n° 37, p. 8720–8728, 1990. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00489a031.

PHILLIPS, M. C.; GRAHAM, D. E.; HAUSER, H. Lateral compressibility and penetration into phospholipid monolayers and bilayer membranes. *Nature*, v. 254, n° 5496, p. 154, 1975. ISSN: 1476-4687.

POKORNY, A.; BIRKBECK, T. H.; ALMEIDA, P. F. F. Mechanism and kinetics of δ -lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, v. 41, n° 36, p. 11044–11056, 2002. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi020244r.

RATHINAKUMAR, R.; WALKENHORST, W. F.; WIMLEY, W. C. **Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n^o 22, p. 7609–7617, 2009. ISSN: 0002-7863.

RATHINAKUMAR, R.; WIMLEY, W. C. **Biomolecular engineering by combinatorial design and high-throughput screening: small, soluble peptides that permeabilize membranes**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n° 30, p. 9849–9858, 2008. ISSN: 0002-7863.

REBAUD, S.; MANITI, O.; GIRARD-EGROT, A. P. **Tethered bilayer lipid membranes** (**tBLMs**): Interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie*, v. 107, n° Part A, p. 135–142, 2014. ISSN: 61831638, DOI: 10.1016/j.biochi.2014.06.021.

RUIZ, M. J. G.; VILCHEZ, M. A. C. A study of the miscibility of bile components in mixed monolayers at the air-liquid interface I. Cholesterol, lecithin, and lithocholic acid. *Colloid and polymer science*, v. 269, n° 1, p. 77–84, 1991. ISSN: 0303-402X.

SAAD, S. M. I. et al. **Mixed DPPC / DPPG Monolayers at Very High Film Compression**. *Langmuir*, v. 25, n° 20, p. 10907–10912, 2009. DOI: 10.1021/la901250z.

SANTOS, N. C.; PRIETO, M.; CASTANHO, M. A. R. B. **Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1612, n° 2, p. 123–135, 2003. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00112-3.

SCHEINPFLUG, K. et al. Antimicrobial peptide cWFW kills by combining lipid phase separation with autolysis. *Nature Publishing Group*, n^o November 2016, p. 1–15, 2017. DOI: 10.1038/srep44332.

SENGUPTA, D. et al. **Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder**. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1778, nº 10, p. 2308–2317, 2008. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.06.007.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods in Enzymology*, v. 383, n° 1, p. 318–351, 2004. ISSN: 00766879, DOI: 10.1016/S0076-6879(04)83013-1.

STAUFFER, F. et al. **Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering**. *Molecular membrane biology*, v. 25, n° 2, p. 128–138, 2008. ISSN: 0968-7688.

STEFANIU, C.; BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. **Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 208, p. 197–213, 2014. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/j.cis.2014.02.013.

SZOKA, F. J.; PAPAHADJOPOULOS, D. **Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)**. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, p. 467–508, 1980.

VANOUNOU, S.; PAROLA, A. H.; FISHOV, I. **Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into different domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids**. *Molecular Microbiology*, v. 49, n° 4, p. 1067– 1079, 2003. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03614.x.

VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V. B. **Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 127, n° 2, p. 83–97, 2006. ISSN: 00018686.

VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V. B. Characterisation of phase transition in adsorbed monolayers at the air/water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 154, n° 1–2, p. 1–19, 2010. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/j.cis.2010.01.003.

WADE, D. et al. **All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n° June, p. 4761–4765, 1990.

WELTI, R.; GLASER, M. Lipid domains in model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 73, n° 1–2, p. 121–137, 1994. ISSN: 00093084, DOI: 10.1016/0009-3084(94)90178-3.

WIMLEY, W. C.; CREAMER, T. P.; WHITE, S. H. Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host - Guest pentapeptides. *Biochemistry*, v. 35, n° 16, p. 5109–5124, 1996. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi9600153.

ZANIN, L. M. P. et al. Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy. *European Biophysics Journal*, v. 42, n° 11–12, p. 819–831, 2013. ISSN: 01757571, DOI: 10.1007/s00249-013-0930-0.

ZANIN, L. P. M. et al. Effects of N-terminus modifications on the conformation and permeation activities of the synthetic peptide L1A. *Amino Acids*, v. 48, n° 6, p. 1433–1444, 2016. ISSN: 14382199, DOI: 10.1007/s00726-016-2196-1.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, v. 415, n° January, p. 389–395, 2002.