



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

Danúbia Batista Martins

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

São José do Rio Preto
2018

Danúbia Batista Martins

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

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera

Coorientador: Prof. Dr. Valmir Fadel

São José do Rio Preto
2018

Danúbia Batista Martins

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto
26 de novembro de 2018

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

Capítulo 1

1.1 - Introdução

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

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

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

1.2 - Fundamentação Teórica

Peptídeos bioativos

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

Caracterização físico-química

Tamanho da sequência

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

Carga líquida

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

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

Hidrofobicidade

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

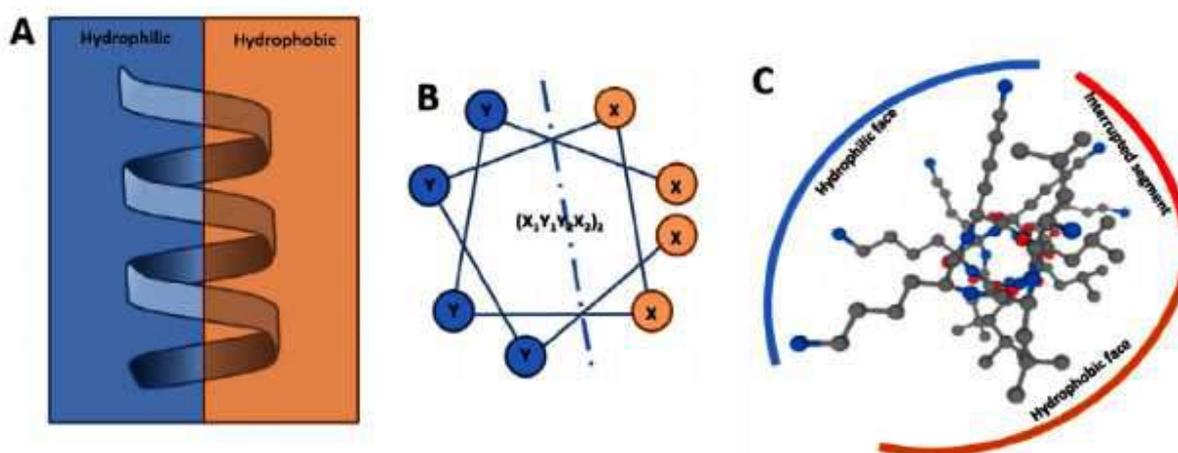
A hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$) pode ser obtida pela média aritmética da hidrofobicidade intrínseca dos resíduos, de acordo com diferentes escalas. Uma delas, é a escala de consenso de Eisenberg e colaboradores (1984). Nesta escala a $\langle H \rangle$ é relacionada a cada resíduo, com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

Anfipaticidade

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

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

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



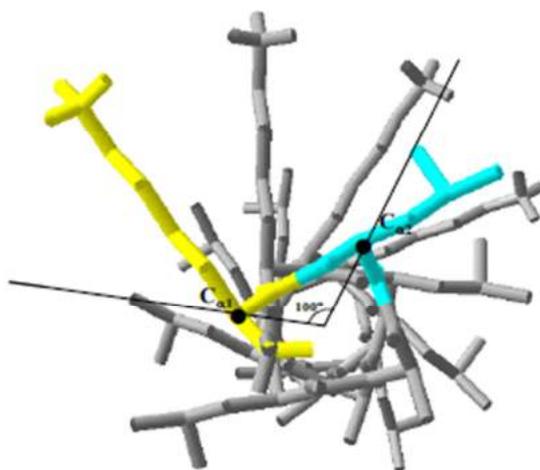
Fonte: Adaptado de Khara, et al. (2017).

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

Momento Hidrofóbico

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

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

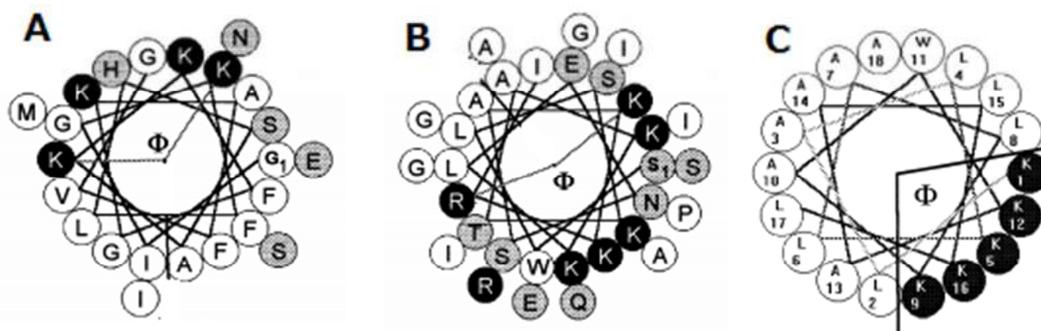


Fonte: Costa (2006)

Ângulo polar (Φ)

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

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



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

Estrutura secundária

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

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

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

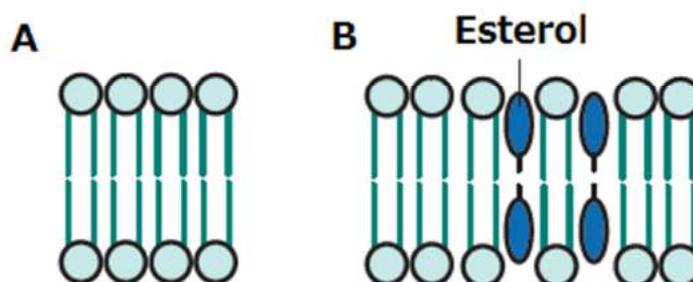
Características e Influência das Membranas Biológicas na Interação com Peptídeos

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

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

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

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

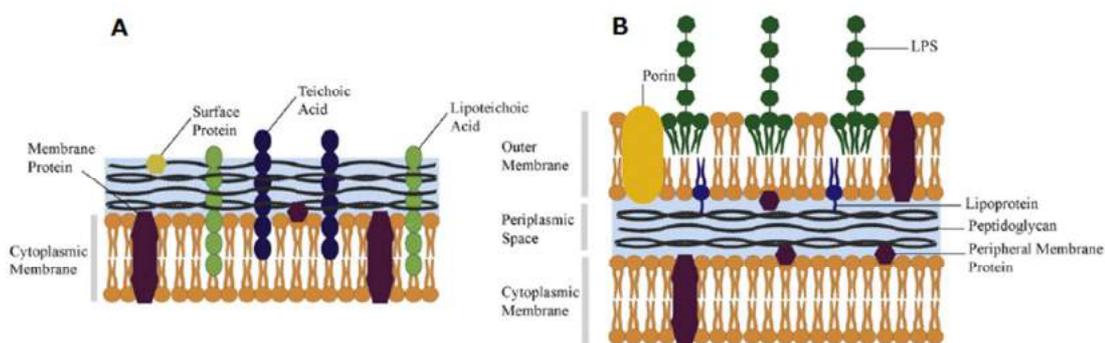


Fonte: Adaptado de Holthuis e Menon (2014).

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

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

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



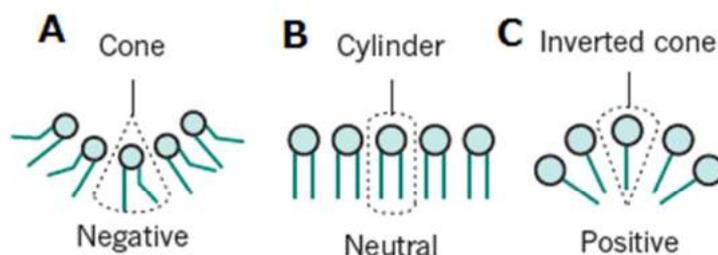
Fonte: Adaptado de Epanand, et al. (2016).

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

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

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

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



Fonte: Adaptado de Holthuis e Menon (2014).

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

Mecanismos de ação

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

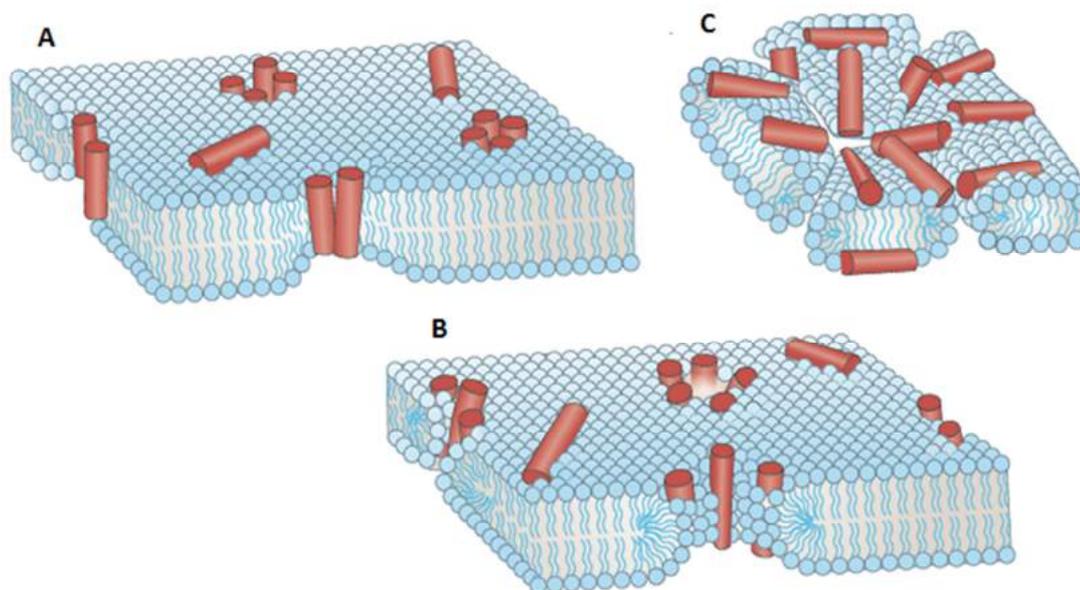
variações na curvatura, modificações eletrostáticas, perturbações locais e formação de poros ou defeitos, resultando em um rearranjo tanto do peptídeo como dos fosfolipídios (Fjell, et al., 2012).

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Os Peptídeos-Modelo deste Estudo

Jelleínas

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

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

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

Fonte: Fontana et al. (2004).

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

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

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

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

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

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

O desenho desses análogos considerou basicamente duas premissas:

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

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

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

Protonectinas

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

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

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

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

*Wang, et al. (2013)

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

1.3 - Objetivos

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

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

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

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

Capítulo 5 – CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

Capítulo 6

6.1 - Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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