Milena Barbosa da Conceição

Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Coorientador: Dr. Edson Crusca Jr.

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Conceição, Milena Barbosa da
C744s Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos / Milena Barbosa da Conceição. – Araraquara : [s.n.], 2018
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Reinaldo Marchetto
Coorientador: Edson Crusca Jr.

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 2. Biofísica. 3. Dicroísmo circular. 4. Espectroscopia de fluorescência. 5. Peptídeos-Síntese. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos"

AUTORA: MILENA BARBOSA DA CONCEIÇÃO
ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO
COORIENTADOR: EDSON CRUSCA JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DE SOUZA LOPES
Departamento de Física Aplicada / Instituto de Física - USP - São Paulo

Araraquara, 09 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Milena Barbosa da Conceição

Nome em citações bibliográficas: CONCEIÇÃO, M. B.;

Endereço profissional: Instituto de Química - UNESP – Araraquara. R. Francisco Degni, 55. Bairro Quitandinha – Araraquara 14800-060, SP – Brasil. Telefone: (16) 3301-9822

Endereço eletrônico: milenabarbosa.uni@gmail.com e milenabarbosa.biotec@gmail.com.

Formação acadêmica/titulação

2016 - Atual

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Coorientador: Dr. Edson Crusca Jr. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2009 - 2011

Graduação em Química – Bacharelado

Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* (Unisalesiano), Lins, São Paulo, Brasil. Título: Determinação dos teores de cobre das cachaças artesanais produzidas na região de Lins-SP. Orientador: Profª Terezinha Fiala Modesto.

Atuação profissional

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP
2016 – 2017

Vinculo: Representante discente. Enquadramento Funcional: Congregação.

2016 - 2018 Vínculo: Aluno, Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado, Carga horária: 50 h/s.

JBS S/A – Novos Negócios

2013 - 2015

Vínculo: Colaboradora. Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Jr - JBS S/A (Divisão de Biodiesel). Lins, SP. Carga horária: 48 h/s.

Projetos

2016 – 2018

Título: Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos.

Descrição: O peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 foi isolado do veneno do escorpião africano *Pandinus imperator.* Este peptídeo foi caracterizado como apresentando ótima atividade contra bactérias Gram-positivas, especialmente VRE-S13 *in vitro* e fungos. Entretanto, este peptídeo também apresenta potencial hemolítico. Neste contexto foram projetados cinco análogos da Pantinina-3, L2K, I5K, N7K, I9K e L13K, onde foi estudado a relação da estrutura molecular com a atividade biológica destes peptídeos, objetivando a obtenção de uma molécula com potencial atividade terapêutica.

Situação: Em andamento

Natureza: Pesquisa

Integrantes: Milena Barbosa da Conceição – Integrante, Edson Crusca Jr. – Integrante, Reinaldo Marchetto – Coordenador.

2009 - 2011

Título: Determinação dos teores de cobre das cachaças artesanais produzidas na região de Lins-SP.

Descrição: Nos produtores artesanais de cachaça a destilação ocorre em alambiques de cobre, promovendo a contaminação do produto. Existem normas que determinam faixas de segurança para a presença do íon cobre nestas bebidas. A legislação

europeia estabelece um limite de 2 mg/L enquanto o Brasil é mais tolerante com a presença desse íon, já que permite até 5 mg/L em aguardente de cana. Neste contexto, existe uma grande importância no controle da concentração do cobre, principalmente porque existem pessoas que possuem um distúrbio geneticamente determinado do metabolismo do cobre, onde o organismo perde a capacidade de eliminar este íon naturalmente. Este distúrbio é popularmente conhecido como Doença de Wilson. Sendo assim, foram realizadas análises para a determinação dos teores de cobre nas cachaças artesanais produzidas na região de Lins/SP.

Situação: Concluído

Natureza: Pesquisa

Integrantes: Milena Barbosa da Conceição – Integrante, Ana Carolina Zanotti de Lima – Integrante, Natália Rosalina Delalibera Cardoso – Integrante, Terezinha Fiala Modesto – Coordenadora.

Prêmios e títulos

2017

1° Lugar entre os trabalhos apresentados na forma de painel no VII Congresso Farmacêutico da UNESP, com o trabalho intitulado Estrutura e função da proteína GhoT de Salmonella entérica: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Integrantes: CARRIJO, R. S., ROCHA, C. A., **CONCEIÇÃO, M. B**., SANCHES, B. C. P., AZEVEDO, T. B., BARBOSA, L. C. B.

Produções

1. Resumos publicados em anais de eventos (completo)

CONCEIÇÃO, M. B., LIMA, A. C. Z., CARDOSO, N. R. D., MODESTO, T. F. Discussão da Influência dos Teores de Cobre nas Cachaças Artesanais para a Saúde Humana e para a Cachaça Propriamente Dita. Em: III Encontro Científico e Simpósio de Educação do Unisalesiano, 2011, Lins (SP).

2. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

CONCEIÇÃO, M. B., MARCHETTO, R., CRUSCA, E. Biophysics Studies of the Antimicrobial Pantinin-3 and Analogues. Em: XLII Congress of the Brazilian Biophysical Society (SBBf), 2017, Santos (SP).

CONCEIÇÃO, M. B., CARRIJO, R. S., MARCHETTO, R., CRUSCA, E. Structure-Function Relationship of Antimicrobial Synthetic Peptides Analogs of Pantinin-3. Em: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2017, Águas de Lindóia (SP).

CARRIJO, R. S., ROCHA, C. A., **CONCEIÇÃO, M. B**., SANCHES, B. C. P., AZEVEDO, T. B., BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de Salmonella entérica: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. Em: VII Congresso Farmacêutico da UNESP e III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara (SP).

AZEVEDO, T. B., SANCHES, B. C. P., **CONCEIÇÃO, M. B**., ZOTTIS, A., MARCHETTO, R. Study of Computacional Mutations to Increase ParD Antitoxin Affinity. Em: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2017, Águas de Lindóia (SP).

CARRIJO, R. S., **CONCEIÇÃO, M. B**., ROCHA, C. A., CRUSCA, E., MARCHETTO, R., BARBOSA, L. C. B. Structure and Possible Function of Salmonella enteric GhoT protein. Em: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2017, Águas de Lindóia (SP).

3. Outras produções bibliográficas

CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A.; **CONCEICAO, M. B**.; SANCHES, B. C. P.; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 38 Supl. 1, agosto, 2017 (Resumo).

SANCHES, B. C. P.; CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A.; AZEVEDO, T. B.; **CONCEICAO, M. B.**; MARCHETTO, R. Internalização de peptídeos inibidores de topoisomerases em

lipossomas de ramnolipídios. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 38 Supl. 1, agosto, 2017 (Resumo).

Participação em eventos científicos:

- XLII Congress of the Brazilian Biophysical Society (SBBf), 2017, Santos (SP).

- 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2017, Águas de Lindóia (SP).

- II Feira Internacional da Unesp e Road Show, 2017, São Paulo (SP).

- 1º Escola de Modelagem Molecular da Unesp Araraquara, 2017, Araraquara (SP).

- Workshop de caracterização de macromoléculas com foco em estabilidade estrutural e afinidade de interações, com uso de nanoDSF e termoforese em microescala, Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), 2016, Campinas (SP).

- IV Four Biotec: Quatro Dias pela Biotecnologia, 2016, (UFSCar) São Carlos (SP).

- VI Simpósio de Tecnologia em Alimentos, 2012, (FATEC) Marília (SP).

- III Encontro Científico e Simpósio de Educação do Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium,* 2011, Lins (SP).

- 11º Conecte – Congresso de Educação, Ciência e Tecnologia, 2010, Lins (SP).

- II Encontro Científico e II Simpósio de Educação do Unisalesiano, 2009, Lins (SP).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Cristina e Marcelo, com todo o meu amor e gratidão, por me guiarem sempre pelo caminho correto e sempre apostarem nas minhas mais malucas empreitadas.

Ao meu amor, Luno, por estar comigo todos estes anos comemorando as conquistas e também segurando as pontas firmemente nos momentos difíceis.

Ao meu irmão, Ítalo, por sempre estar presente no dia a dia da família quando eu não pude estar.

Por último, mas não menos importante, ao Bartô, que foi fonte de renovação de energias e companheiro nas batalhas do dia a dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim ao longo da vida, pois todo o sacrifício e dedicação possibilitaram que eu conquistasse mais essa etapa da caminhada.

Aos meus amigos, Thaís, Rodolfo, Beatriz, Lierge, Camila e Tiago, por tornarem essa jornada muito mais feliz e contribuírem para minimizar a magnitude das dificuldades enfrentadas.

Em especial à minha amiga Thaís, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos cafés no meio da tarde e pelas longas conversas de mesa de bar, que me ajudaram tanto a colocar os pensamentos em seus devidos lugares.

Ao meu querido orientador, Reinaldo Marchetto, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela paciência, pela amizade, por todos os esforços que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto e por todos os ensinamentos oferecidos nesses dois anos.

Ao meu coorientador, Edson Crusca Jr., por toda a ajuda com o projeto, por ter me direcionado com os experimentos e o tratamento dos dados, pelas correções dos resumos e por todo o conhecimento passado.

Aos meus colegas de trabalho, Aline, Greg, Caio, Carol, Léo, Jesseleine, Bianca e Sara, que tornaram o dia a dia da pesquisa mais agradável.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, por toda a estrutura disponível aos alunos, que facilitou o processo de obtenção dos dados necessários.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, que ajudaram prontamente com as informações necessárias acerca dos prazos e burocracias.

À equipe da biblioteca, pela ajuda com as referências e com os muitos empréstimos de livros.

Aos funcionários do Instituto, em especial o Albertinho, por ter tornado os dias mais felizes.

À Capes pelo apoio financeiro concedido.

Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente!

"Martin Luther King"

A persistência é o caminho do êxito!

"Charles Chaplin"

RESUMO

O peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 (P3) possui 13 resíduos e é derivado do veneno do escorpião africano *Pandinus imperator.* Ele apresenta alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, principalmente *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE-S13) *in vitro*. Entretanto, este peptídeo também possui atividade hemolítica. Neste contexto, foram desenhados e sintetizados cinco análogos de P3 a partir de substituições pontuais de resíduos específicos por um resíduo de lisina, os quais foram denominados L2K, I5K, N7K, I9K e L13K. O objetivo da criação destes análogos foi estudar a relação de estrutura e atividade do peptídeo P3, a fim de investigar o efeito da modificação de suas características biofísicas em sua atividade biológica. Para isso, os peptídeos foram sintetizados por meio da técnica de síntese em fase sólida (SPFS), purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (CLAE-FR) e identificados por espectrometria de massas (SM). Os peptídeo purificados foram testados quanto à sua atividade biológica e foi verificado que o análogo L2K apresentou atividade somente para a bactéria Gram-negativa testada, o análogo N7K mostrou ser mais ativo que P3 tanto para Gram-positivas quanto para Gram-negativas e os outros análogos não apresentaram atividade antimicrobiana. Foi avaliada também a atividade hemolítica dos peptídeos, e foi verificado que o único análogo que apresentou atividade contra eritrócitos foi N7K. A hidrofobicidade dos peptídeos foi analisada por meio do tempo de retenção obtido por CLAE-FR e foi verificado que o peptídeo P3 se mostrou mais hidrofóbico que todos os análogos criados. Dentre os análogos, N7K foi o que apresentou maior tempo de retenção seguido de L2K que mostrou ter hidrofobicidade intermediária. Foram estudados quanto a capacidade de adotar estrutura secundária regular utilizando a técnica da espectroscopia de dicroísmo circular (DC) frente a miméticos de membrana e foi verificado que P3 e N7K, foram os que mais adotaram estrutura em α-hélice na presença de miméticos de membrana tanto de bactérias quanto de eucariotos. Com o objetivo de verificar a capacidade dos peptídeos em atuarem nas membranas, foram realizados estudos utilizando a técnica da espectroscopia de fluorescência em experimentos conduzidos na ausência e na presença de miméticos de membranas e foi verificado que P3 e N7K demonstraram maior interação e capacidade de permeabilização de miméticos de membrana tanto de bactérias quanto de eucariotos. Todos os outros análogos mostraram maior interação e permeabilização de miméticos de membrana de bactérias, porém em níveis diferentes, sendo que L2K foi o mais ativo. Concluiu-se então que, por meio de substituições pontuais, foi possível alterar algumas propriedades do peptídeo P3, bem como sua atividade biológica.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, miméticos de membrana, peptídeos de membrana.

ABSTRACT

The antimicrobial peptide Pantinin-3 (P3) has 13 residues and is derived from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator***.** It has high antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, mainly vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE-S13) *in vitro*. However, this peptide also has hemolytic activity. In this context, five P3 analogs were designed and synthesized from point substitutions of specific residues by a lysine residue, which were named L2K, I5K, N7K, I9K and L13K. The objective of the creation of these analogues was to study the structure and activity relationship of the P3 peptide in order to investigate the effect of the modification of its biophysical characteristics on its biological activity. For this, the peptides were synthesized using the solid-phase peptide synthesis technique (SPPS), purified by high performance liquid chromatography on a reverse phase column (HPLC-RF) and identified by mass spectrometry (MS). The purified peptides were tested for their biological activity and it was found that the L2K analog showed activity only for the Gram-negative bacteria tested, the N7K analog showed to be more active than P3 for both Gram-positive and Gram-negative and the others did not present antimicrobial activity. The hemolytic activity of the peptides was also evaluated, and it was verified that the only analog that showed activity against erythrocytes was N7K. The hydrophobicity of the peptides was analyzed by the retention time obtained by HPLC-RF and it was verified that the peptide P3 proved to be more hydrophobic than all analogues created. Among the analogues, N7K showed the highest retention time followed by L2K which showed intermediate hydrophobicity. It was studied the ability to adopt regular secondary structure using the circular dichroism (CD) spectroscopy technique against membrane mimetics and it was verified that P3 and N7K were the ones that most adopted α-helix structure in the presence of membrane mimetics both bacteria and eukaryotes. In order to verify the ability of the peptides to act on the membranes, studies were carried out using the fluorescence spectroscopy technique in experiments conducted in the absence and presence of membrane mimetics, and it was verified that P3 and N7K demonstrated greater interaction and permeabilization capacity membrane mimetics of both bacteria and eukaryotes. All other analogues showed higher interaction and permeabilization of bacterial membrane mimetics, however at different levels, with L2K being the most active of these. It was then concluded that, by means of point substitutions, it was possible to alter some properties of the P3 peptide, as well as its biological activity.

Keywords: Antimicrobial peptides, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, membrane mimetics, membrane peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transferência de genes de resistência através de plasmídeos de uma bactéria para outra. 21

Figura 2 - Formas de atuação dos PAMs. 23

Figura 3 – Modelos representativos para os mecanismos de ação dos PAMs. 26

Figura 4 - Escorpião africano *Pandinus imperator.* 27

Figura 5 - Estrutura primária do peptídeo Pantinina-3 (P3). 27

Figura 6 - Miméticos de membrana: micela (A) e vesícula (B). 29

Figura 7 - Classificação das vesículas por tamanho..... 30

Figura 8 - Estrutura molecular de lipídios comumente utilizados para mimetizar membranas. 31

Figura 9 - Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc.....35

Figura 10 - Modelo de *helical wheel* do peptídeo P3 obtido através da predição estrutural pelo servidor *HeliQuest* (*http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py).*. 44

Figura 11 - *Helical wheel* dos peptídeos análogos de P3 obtidos através da predição estrutural pelo servidor HeliQuest.*.....* 46

Figura 12 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **Pantinina 3** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.....47

Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo L2K antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm. 48

Figura 14 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo I5K antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm. 48

Figura 15 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo N7K antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm 49

Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo I9K antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com gradiente linear de 5 – 30% em 40 min e 30 – 60% em 55 min. de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm. 49

Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **L13K** antes (A) e após (B) purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 5 – 30% em 40 min e 30 – 60% em 55 min. de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.....50

Figura 18 - Atividade hemolítica de P3 e seus análogos em diferentes concentrações frente a eritrócitos humanos. A identificação dos peptídeos é dada por P3 (preto), L2K (vermelho), N7K (azul) e L13K (rosa). Os análogos I5K e I9K não aparecem no gráfico, pois a capacidade hemolítica de ambos foi de 0%.....53

Figura 19 - Hidrofobicidade comparativa dos peptídeos sintetizados, analisadas pela diferença do tempo de retenção em CLAE-FR. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. 55

Figura 20 - Espectros de CD das principais estruturas secundárias de proteínas.....58

Figura 21 - Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), a concentração de 60 µmol.L^{-1} em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1}, a 30ºC. 59

Figura 22 – Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), 60 µmol.L^{-1}, na presença de micelas de (a) SDS 25 mmol.L^{-1} e (b) HPS 15 mmol.L^{-1}, a 30ºC. 60

Figura 23 - Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), 60 µmol.L^{-1}, na presença de LUVs de **(a)** POPC/POPG (3:1) e **(b)** POPC/Colesterol (3:1), a 30ºC.....62

Figura 24 - Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (λ_{emis}) de P3 e análogos em solução aquosa, SDS (25 mmol.L^{-1}) e HPS (15 mmol.L^{-1}), a 30 ºC. A linha pontilhada indica o valor máximo obtido para o peptídeo P3 para cada condição experimental. A identificação por cores das barras refere-se à solução aquosa (preto), SDS (vermelho) e HPS (verde).....66

Figura 25 - Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (λ_{emis}) de P3 e análogos em solução aquosa, e LUVs de PC/PG (3:1) e PC/Col. (3:1), a 30 ºC. A linha pontilhada indica o valor máximo obtido para o peptídeo P3 para cada condição experimental. A identificação por cores das barras refere-se à solução aquosa (verde), PC/PG (vermelho) e PC/Col. (azul). 68

Figura 26 - Perfil de liberação de carboxifluoresceína através da permeabilização de LUVs contendo POPC/POPG (3:1) pelos peptídeos P3 e análogos, nas concentrações de 2,5 µmol.L^{-1} (a), 5 µmol.L^{-1}(b) e 10 µmol.L^{-1} (c). A identificação por cor de cada peptídeo é: P3 (preto), L2K (vermelho), I5K (verde), N7K (azul escuro), I9K (azul claro) e L13K (rosa).....69

Figura 27 - Perfil de liberação de carboxifluoresceína através da permeabilização de LUVs contendo PC/Col. (3:1) pelos peptídeos P3 e análogos) nas concentrações de 2,5 μmol.L^{-1} (a), 5 μmol.L^{-1}(b) e 10 μmol.L^{-1} (c). A identificação por cor de cada peptídeo é P3 (preto), L2K (vermelho), I5K (verde), N7K (azul escuro), I9K (azul claro) e L13K (rosa). 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de urgência no desenvolvimento de novos fármacos para bactérias resistentes a antibióticos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2017. 22

Tabela 2 – Estrutura primária do peptídeo P3 e de seus análogos sintéticos. 45

Tabela 3 - Relação massa/carga (m/z) teórico e obtido de cada peptídeo sintetizado. 51

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) de P3 e seus análogos contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli,* em $\mu mol.L^{-1}$. 52

Tabela 5 - Comparação da hidrofobicidade calculada, hidrofobicidade obtida pelo tempo de retenção em análise de CLAE-FR e carga líquida de cada peptídeo. A hidrofobicidade calculada e a carga líquida de cada peptídeo foram obtidas através do servidor HeliQuest. 56

Tabela 6 - Valores obtidos dos comprimentos de onda de maior emissão de fluorescência para cada peptídeo em diferentes condições, a partir dos espectros de emissão de fluorescência (dados não mostrados). 65

LISTA DE CÓDIGOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. Aminoácidos:

A - Alanina
C - Cisteína
D – Ácido aspártico
E – Ácido glutâmico
F - Fenilalanina
G - Glicina
H - Histidina
I - Isoleucina
K - Lisina
L - Leucina
M - Metionina
N - Asparagina
P - Prolina
Q - Glutamina
R - Arginina
S - Serina
T - Treonina
V - Valina
W - Triptofano
Y - Tirosina

2. Outras:

ACN - Acetonitrila
Boc - *t*-Butiloxicarbonila
CD - Dicroísmo Circular
CF - Carboxifluoresceína
CIM - Concentração inibitória mínima
CLAE-FR - Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa
DCM - Diclorometano

DIC - Diisopropilcarbodiimida

DMF - Dimetilformamida

Fmoc - 9-fluorenilmetiloxicarbonila

HOBt - *N*-hidroxibenzotriazol

HPS - N-hexadecil-N,N-dimetil-propanosulfonato

LC/ESI-MS - Cromatografia Liquida de Fase Reversa acoplada a Espectrometro de Massas com Ionizacao por Eletrospray (Liquid Chromatography coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry)

LUV - *Large unilamellar vesicles*, vesículas unilamelares grandes

MLV - *Multilamellar vesicles*, Vesículas multilamelares

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

POPC - 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina

POPG - 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilglicerol

SDS - Docecil Sulfato de Sodio

SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Solida

TFA - Ácido trifluoracético

TIS - Triisopropilsilano

UFLC - Ultra-Fast Liquid Chromatography – (Cromatografia Líquida Ultra Rápida)

3. Símbolos

α - alfa

β - beta

Φ - phi

Ψ - psi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1 - Resistência microbiana aos antibióticos 20
1.2 - Peptídeos antimicrobianos 22
1.3 - Pantinina 3 26
1.4 - Miméticos de membranas 28
2. OBJETIVOS 32
3. MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 - Síntese e purificação dos peptídeos 33
3.2 - Atividade Biológica 36
3.2.1 - Atividade antibacteriana 36
3.2.2 – Atividade hemolítica 37
3.3 – Ensaios de hidrofobicidade comparativa 38
3.4 - Preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) 38
3.5 - Espectroscopia de dicroísmo circular 39
3.6 - Estudos de fluorescência 40
3.7 - Estudos de permeabilização de vesículas 42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
4.1 – Estratégia de desenho dos peptídeos 44
4.2 – Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos 46
4.3 - Atividade biológica 51
4.3.1 – Atividade antibacteriana 52
4.3.2 – Atividade hemolítica 53
4.4 - Análise da hidrofobicidade dos peptídeos 54
4.5 – Dicroísmo Circular 58
4.6 – Estudos de Espectroscopia de Fluorescência 65
4.7 - Estudos de permeabilização de vesículas 68
5. CONCLUSÕES 73
REFERÊNCIAS 74

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Resistência microbiana aos antibióticos

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana, que é marcada historicamente por grandes epidemias (ANES et al.,2015). Atualmente, o mundo encontra-se na era pós antibiótica, onde o número de aprovações de novos medicamentos antimicrobianos teve uma redução de 90% nos últimos 30 anos, de acordo com a *Food and Drugs Administration* (FDA) dos Estados Unidos (LUEPKE et al., 2017).

O uso indiscriminado de medicamentos antibióticos promoveu a seleção e propagação de resistência pelos microrganismos, tornando ineficazes várias classes de compostos antimicrobianos. Este fato constitui um dos maiores desafios na história da medicina e da infectologia e o resultado disto é uma era de epidemias em ascensão, já que os pacientes estão morrendo de infecções bacterianas que já foram tratáveis um dia (O'NEILL, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno que está relacionado à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antibióticos e pode ocorrer de duas principais formas:

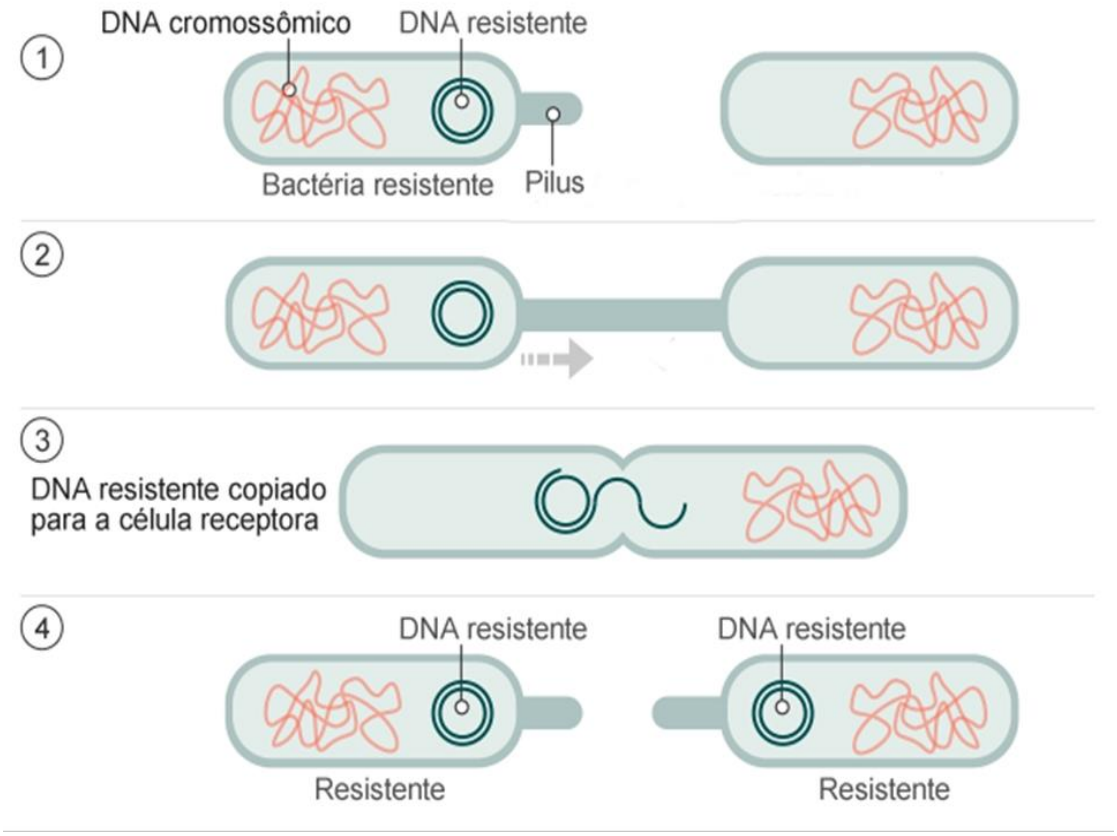
1 - Resistência intrínseca ou inata, sendo esta dependente de características da própria bactéria (KHAMENEH et al., 2016);

2 - Resistência adquirida, que pode resultar da aquisição de genes de resistência pela bactéria ou da mutação do DNA cromossômico. Pode ocorrer também a combinação de ambos os fatores (KHAMENEH et al., 2016).

Genes reguladores que controlam a resistência a diferentes fármacos e formação de biofilme também desempenham importantes funções na resistência bacteriana (KHAMENEH et al., 2016). A Figura 1 mostra o mecanismo de transferência de genes de resistência entre bactérias.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) publicou uma lista de agentes patogênicos que adquiriram resistência a antibióticos, classificando-os em níveis de urgência (Tabela 1). Segundo a OMS e a Organização das Nações Unidas (ONU), estas bactérias devem ter prioridade nas pesquisas por novos medicamentos.

Figura 1 - Transferência de genes de resistência através de plasmídeos de uma bactéria para outra.



Fonte: Adaptado de http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/11/151119_alerta_antibioticos_tg

Bactérias resistentes aos antibióticos prolongam o tempo de internação dos pacientes, aumentando os custos e elevando o índice de mortalidade. Esta problemática também é presente no Brasil, com destaque para as cepas de *Enterococos* resistentes à vancomicina e *Estafilococos* resistentes à meticilina; (DABUL; CAMARGO, 2014).

Estes fatos expressam a urgência do desenvolvimento de novos fármacos e alternativas para tentar contornar o desenvolvimento de resistência. Contudo mesmo que a perspectiva pareça desalentadora deve-se lembrar que o surgimento dos antibióticos trouxe conforto e segurança para a vida das pessoas e que vale a pena dar continuidade à busca de novos medicamentos.

Tabela 1- Classificação de urgência no desenvolvimento de novos fármacos para bactérias resistentes a antibióticos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2017.

Prioridade	Microrganismo	Resistência
Crítica	*Acinetobacter baumannii*	Resistente à carbapenema
	Pseudomonas aeruginosa	Resistente à carbapenema
	Enterobacteriaceae	Resistente à carbapenema, produtoras de ESBL[1]
Alta	*Enterococcus faecium*	Resistente à vancomicina
	Staphylococcus aureus	Resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina
	Helicobacter pylori	Resistente à claritromicina
	Campylobacter spp.	Resistente às fluoroquinolonas
	Salmonellae	Resistentes às fluoroquinolonas
	Neisseria gonorrhoeae	Resistente à cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas
Média	*Streptococcus pneumoniae*	Sem sensibilidade à penicilina
	Haemophilus influenzae	Resistente à ampicilina
	Shigella spp.	Resistente às fluoroquinolonas

[1] Beta-Lactamase de Espectro Estendido

Fonte: Adaptado de: http://www.who.int/en/

1.2 - Peptídeos antimicrobianos

São grandes os esforços relacionados ao desenvolvimento de alternativas para tentar contornar o problema da resistência antimicrobiana. Existem estudos que empregam desde compostos naturais até o uso da nanotecnologia para a criação de sistemas carreadores de fármacos, com o objetivo de tentar melhorar a ação dos antibióticos existentes (KHAMENEH et al., 2016).

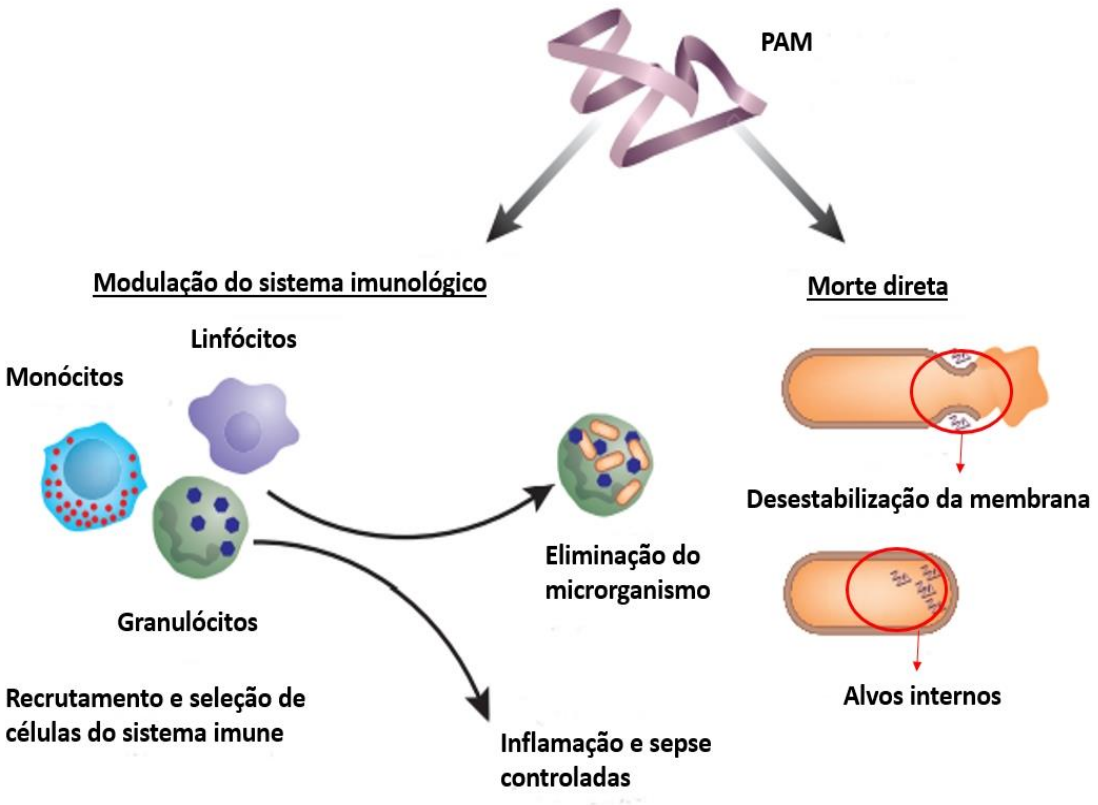
Existem também pesquisas ligadas ao desenvolvimento de novas moléculas para o controle de doenças provocadas por microrganismos patogênicos. Entre essas moléculas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser citados como uma alternativa promissora, pois atuam principalmente por meio de mecanismos nos quais

os microrganismos dificilmente desenvolvem resistência (FEDDERS et al., 2010; KAWAGUCHI et al., 2010; MARIA-NETO et al., 2015).

De maneira geral, os PAMs são estruturas peptídicas constituídas de cadeias relativamente curtas, entre 12 a 50 resíduos de aminoácidos, constituintes da resposta de defesa inata de muitas formas de vida, podendo ser encontrados em microrganismos, plantas, insetos e animais (BATONI et al., 2016; HARRISON et al., 2016).

Normalmente possuem a capacidade de matar o agente patógeno diretamente, promovendo a desestabilização de sua membrana plasmática e consequentemente o vazamento do conteúdo intracelular. Em alguns casos, também podem ativar o sistema imunológico do hospedeiro provocando a eliminação do microrganismo (Figura 2) (HANCOCK; SAHL, 2006).

Figura 2 - Formas de atuação dos PAMs.



Fonte: Modificado de HANCOCK; SAHL, 2006.

Os PAMs apresentam um amplo espectro de ação, pois além de combater microrganismos, também podem apresentar atividade contra células cancerígenas, protozoários, fungos e vírus envelopados. Esta ampla gama de atividade faz com que os estudos com PAMs sejam cada vez maiores, sendo aplicados em diferentes áreas das ciências biológicas e da saúde (ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005; GORDON et al., 2005).

Os PAMs mais comuns encontrados na natureza são aqueles que apresentam atividade na membrana plasmática dos microrganismos e geralmente apresentam certas características habituais tais como:

- Serem carregados positivamente, devido à presença de resíduos de aminoácidos básicos, como arginina e lisina (POWERS; HANCOCK, 2003; GORDON et al., 2005; BROWN; HANCOCK, 2006);
- Possuírem tendência de estruturação em α-hélice anfipática em ambientes hidrofóbicos, sendo que alguns apresentam essa capacidade também em solução (POWERS; HANCOCK, 2003; BROWN; HANCOCK, 2006);
- Apresentarem cerca de 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (POWERS; HANCOCK, 2003; BROWN; HANCOCK, 2006);

Vários estudos sugerem que a atividade biológica dos PAMs depende principalmente de suas propriedades físico-químicas e estruturais. A carga catiônica se mostra essencial para promover interações eletrostáticas com membranas carregadas negativamente de bactérias, enquanto que os resíduos hidrofóbicos ajudam na inserção subsequente no núcleo hidrofóbico das membranas e vazamento do conteúdo intracelular, ocasionando a eventual morte do microrganismo (YEAMAN; YOUNT, 2003; FINDLAY et al., 2010; PUSHPANATHAN et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

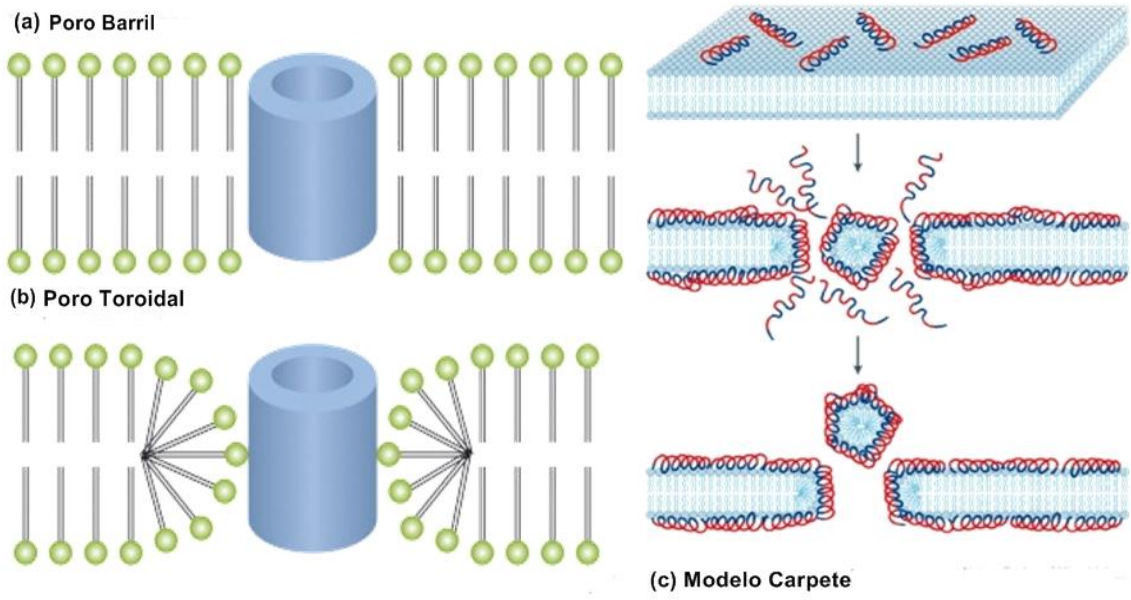
Os PAMs interagem com a membrana plasmática de células bacterianas causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica e ocasionando lise celular, diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos convencionais, que são relativamente mais lentos, pois atuam normalmente em alvos intracelulares. (YEAMAN; YOUNT, 2003; FEDDERS et al., 2010; FINDLAY et al., 2010; MARIA-NETO et al., 2015).

Alguns mecanismos de ação têm sido propostos, para tentar explicar o processo de perturbação e desestabilização das membranas (Figura 3). A princípio estes peptídeos carregados positivamente são atraídos e interagem eletrostaticamente com as membranas bacterianas, originariamente aniônicas, onde sofrem mudanças conformacionais, adotando uma estrutura em α-hélice anfipática. Nesta etapa os peptídeos tem o eixo da hélice orientado paralelamente à bicamada (YEAMAN; YOUNT, 2003; ANDERSSON et al., 2016; SUN et al., 2016). Posteriormente, estes peptídeos podem promover a perturbação da membrana, que pode ocorrer por meio de um dos três modelos conhecidos:

- Modelo Poro Barril: Este modelo sugere que os peptídeos se acumulam na superfície externa da membrana até atingir uma concentração específica. Ao atingir esta concentração os peptídeos estruturados se orientam perpendicularmente em relação à membrana, se associando de tal forma que promovem a abertura de poros e consequentemente o vazamento do conteúdo citoplasmático. Neste modelo a face apolar da α-hélice interage diretamente com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, enquanto que a face polar fica voltada para o interior do poro, em contato com o citoplasma (Figura 3a) (HUANG, 2000).
- Modelo Poro Toroidal:. Este modelo sugere que os peptídeos estruturados se acumulam na membrana e se reorientam, da mesma forma que ocorre no mecanismo anterior, porém a diferença é que neste modelo os peptídeos estruturados em α-hélice interagem com as cabeças polares da bicamada lipídica (Figura 3b) (MATSUZAKI, 1999).
- Modelo Carpete: Este mecanismo foi proposto pela primeira vez para descrever o modo de ação do peptídeo dermaseptina e seus análogos (POUNY et al., 1992). De acordo com esse modelo os peptídeos se acumulam na superfície da membrana alvo, cobrindo-a como se fosse um carpete. Quando esse acúmulo de peptídeos atinge uma alta concentração ocorre a formação de agregados micelares e a permeabilização da membrana, muito similar com a ação de um detergente (Figura 3c) (SHAI, 1999).

Verifica-se que a concentração crítica necessária para promover a formação de poros ou micelização da membrana é fortemente dependente da composição lipídica e das características físicas da membrana (SHAI, 1999).

Figura 3 – Modelos representativos para os mecanismos de ação dos PAMs.



Fonte: Modificado de BROGDEN, K. A., 2005; JANG et al., 2008.

1.3 - Pantinina 3

Em 2013, Zeng e colaboradores extraíram e isolaram três PAMs do veneno do escorpião africano *Pandinus imperator* (Figura 4) e os nomearam Pantinina-1 (P1), Pantinina-2 (P2) e Pantinina-3 (P3) (ZENG et al., 2013).

Estes peptídeos apresentam entre 13 e 14 resíduos de aminoácidos, são catiônicos e possuem a propensão em adotar a conformação de α-hélice anfipática em ambientes hidrofóbicos. Apresentam ótima atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos a concentrações muito baixas, exercendo, contudo, atividade lítica contra eritrócitos. O peptídeo P3 destaca-se dos demais por apresentar respostas ótimas (CIM = 4 μmol.L^{-1}) contra cepas da bactéria *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE S13) *in vitro*. Por este motivo este peptídeo mostra ser um bom candidato para estudos de relação estrutura /atividade.

Neste contexto, alterações na estrutura de P3 visando a redução da sua atividade hemolítica e manutenção da atividade antimicrobiana, poderia se elevar o índice terapêutico da molécula, tornando-a um fármaco em potencial.

Figura 4 - Escorpião africano *Pandinus imperator.*



Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pandinus_imperator_2009_G1.jpg

.

A estrutura primária do peptídeo P3 (Figura 5) é caracterizada pela presença de um resíduo de lisina, localizada na posição 10 da sequência, ausência de aminoácidos ácidos e extremidade C-terminal na forma de amida, classificando-o como um peptídeo catiônico. Caracteriza-se ainda por conter cerca de 50% de seus resíduos de aminoácidos, hidrofóbicos. Além disso, destaca-se a presença de um resíduo de triptofano na posição 6 da sequência, o que possibilita a realização de estudos espectroscópicos utilizando a fluorescência intrínseca deste resíduo.

Figura 5 - Estrutura primária do peptídeo Pantinina-3 (P3).

H_2N - F L S T I W N G I K S L L - $CONH_2$

Desta forma, o peptídeo Pantinina 3, foi a estrutura escolhida como base para os estudos desenvolvidos neste trabalho, incluindo uma avaliação do grau de

estruturação e o processo de interação deste peptídeo e seus análogos, na presença de diferentes composições lipídicas que mimetizam membranas biológicas.

.

1.4 - Miméticos de membranas

Sabe-se que a composição lipídica das membranas tem influência direta no modo de ação dos PAMs (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Contudo, existe grande dificuldade em estudar o processo de interação desses PAMs diretamente na membrana plasmática das células. Isso pelo fato das membranas biológicas possuírem vários componentes além de sua composição lipídica, o que dificulta os estudos de interação de forma específica (GLUKHOV et al., 2005; GLUKHOV et al., 2008; LUNA-RAMÍREZ et al., 2014). No caso das bactérias, além de sua membrana plasmática, existe também a presença da parece celular, que também dificulta o estudo dessas interações (PAPO; SHAI, 2003; HE et al., 2014; LORENZÓN, 2015). Dessa forma, um método geralmente utilizado é mimetizar as composições lipídicas existentes nas membranas plasmáticas a fim de facilitar os estudos de interação peptídeo/lipídio.

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de miméticos de membrana (vesículas e micelas) que possibilitaram estudar, além da composição lipídica, a influência da carga presente nestas membranas, respectivamente (Figura 6).

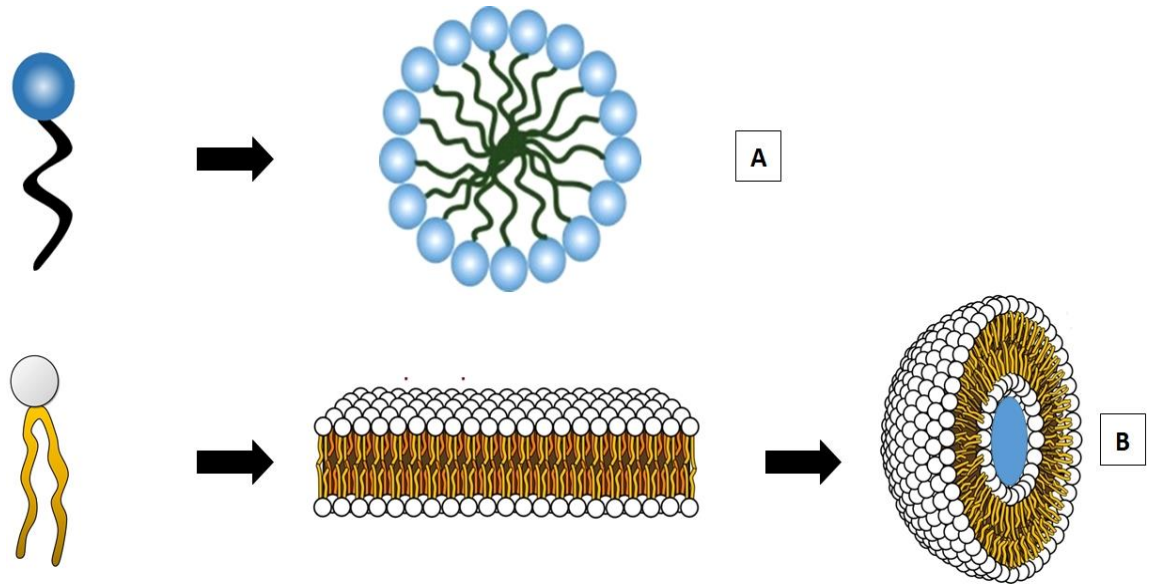
Micelas são agregados esféricos formados por moléculas anfifílicas que se associam espontaneamente em solução aquosa, conforme sua concentração micelar crítica (CMC) (Figura 6-A).

Estas moléculas anfifílicas tendem a se organizar de forma que as cadeias carbônicas apolares ficam voltadas para o centro da micela, em contato umas com as outras, e as cabeças polares ficam voltadas para fora, em contato com a água. Neste tipo de agregado não há praticamente nenhuma água no interior hidrofóbico (LUCKEY, 2014). As micelas possibilitam o estudo da influência de cargas nas interações entre os peptídeos e os lipídios.

Outro tipo de agregado lipídico que pode ser formado é a bicamada (Figura 6-B). Neste caso existe a formação de lipossomas, que são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente ao redor de um compartimento aquoso (BATISTA et al., 2007; LUCKEY, 2014). Também nesta

estruturação, as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios encontram-se completamente isoladas das moléculas de água (VERLY, 2010).

Figura 6 - Miméticos de membrana: micela (A) e vesícula (B).

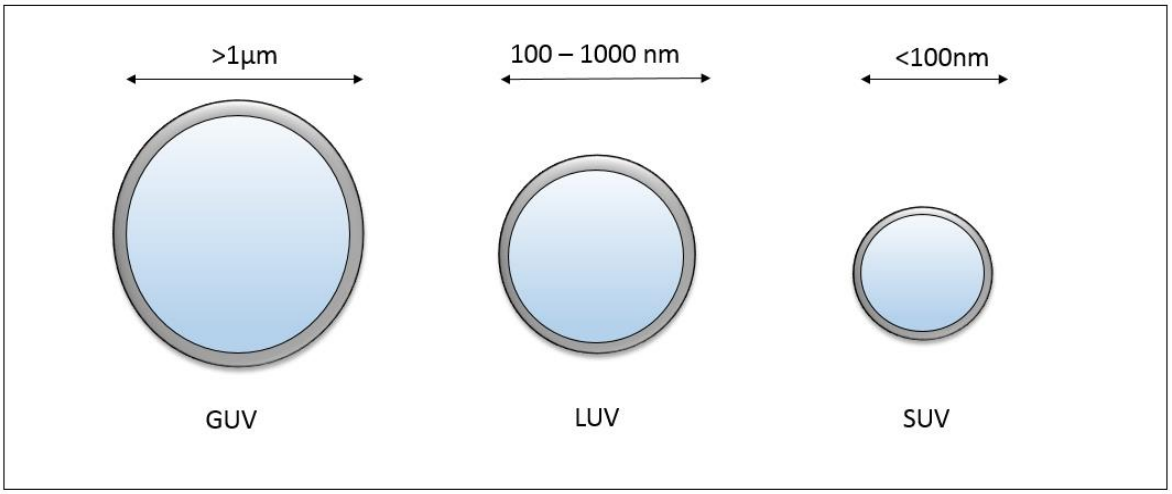


Fonte: Modificado de (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg)

As vesículas são muito utilizadas para mimetizar a composição lipídica da membrana plasmática das células e também como sistemas transportadores de fármacos. Essas vesículas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho (Figura 7), sendo intituladas SUVs, LUVs e GUVs (VAN SWAAY, 2013).

SUVs: (vesículas unilamelares pequenas – diâmetro entre 10 e 100 nm);
LUVs: (vesículas unilamelares grandes – diâmetro entre 100 e 1000 nm);
GUVs: (vesículas unilamelares gigantes – diâmetro superior a 1 μm);

Figura 7 - Classificação das vesículas por tamanho.



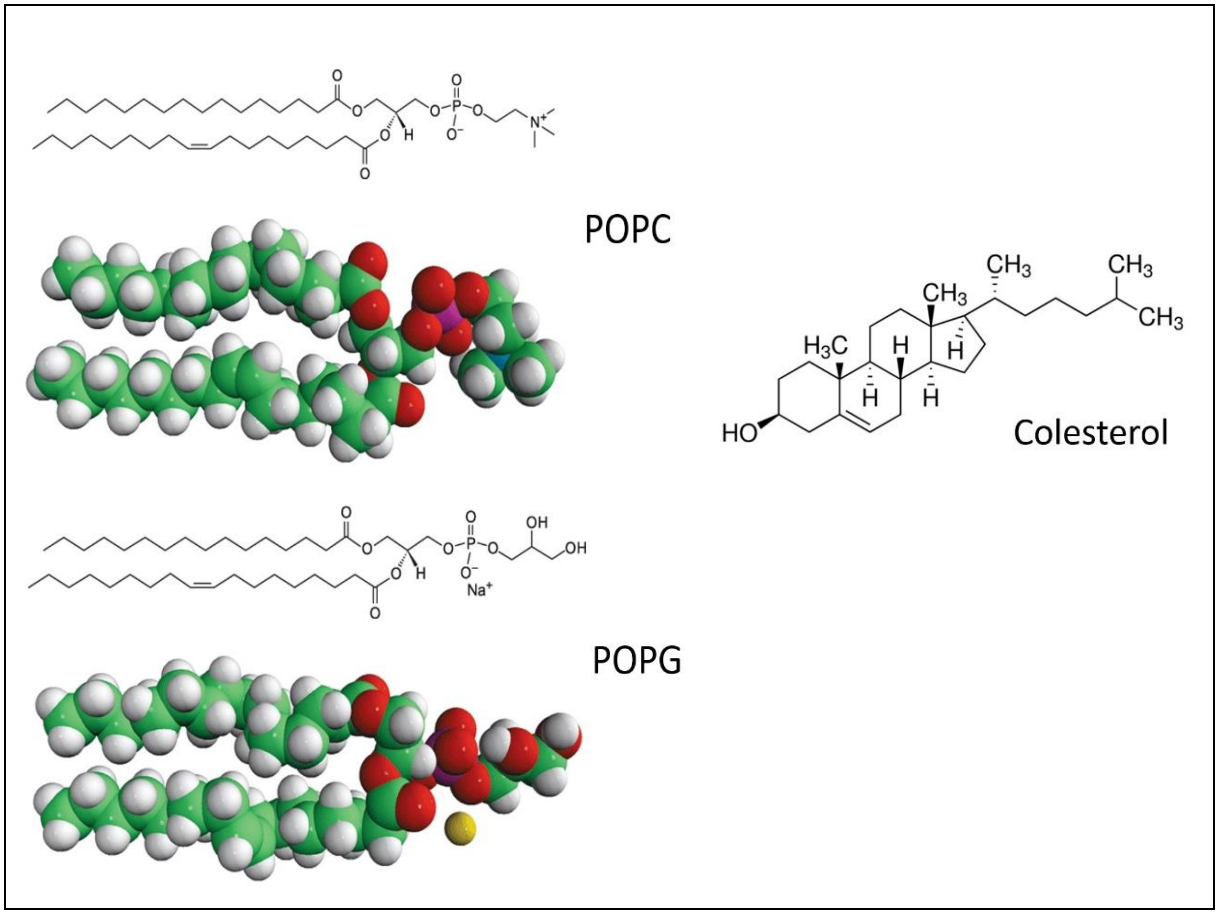
Fonte: Elaborado pela autora.

Os fosfolipídios são diferenciados pelo comprimento, saturação da cadeia lipídica e pela presença ou ausência de carga nas cabeças polares. Essas características permitem elaborar composições diferenciadas de lipídios encontrados nas membranas biológicas, possibilitando a formação de vesículas com propriedades diversas. A figura 8 mostra alguns lipídios que normalmente são utilizados como miméticos de membrana para os estudos de estrutura e função de peptídeos antimicrobianos.

Uma das maiores diferenças entre bactérias e células eucarióticas está relacionada à composição lipídica da membrana plasmática. Enquanto os eucariotos possuem uma maior quantidade de fosfolipídios zwiteriônicos (dipolares) na superfície externa da membrana, as células procarióticas apresentam grande quantidade de fosfolipídios carregados negativamente (SHAI, 1999; SUN et al., 2016). Dessa forma os PAMs catiônicos demonstram uma maior interação com este tipo de membrana (SHAI, 1999; SUN et al., 2016).

Assim sendo, a confecção de miméticos de membrana a partir de diferentes composições lipídicas pode contribuir com informações sobre a seletividade e os mecanismos de ação dos PAMs.

Figura 8 - Estrutura molecular de lipídios comumente utilizados para mimetizar membranas.



Fonte: Avanti Polar Lipids e Sigma Aldrich.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral obter informações estruturais e de atividade do peptídeo Pantinina-3 e seus análogos (L2K, I5K, N7K, I9K e L13K), em ambientes que mimetizam membranas biológicas, bem como estudar a atividade hemolítica e antimicrobiana dos análogos sintéticos a fim de contribuir para o entendimento de seus mecanismos de ação.

Especificamente:

1- Síntese química, pela metodologia da fase sólida, do peptídeo Pantinina-3 e seus análogos, denominados L2K, I5K, N7K, I9K e L13K.
2- Avaliação da atividade antimicrobiana pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias representantes de Gram-positivas e Gram-negativas;
3- Determinação da atividade hemolítica frente à eritrócitos humanos;
4- Estudos de hidrofobicidade utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FR);
5- Avaliação da capacidade de adotar estrutura secundária regular utilizando a técnica da espectroscopia de Dicroísmo Circular;
6- Estudos de interação entre peptídeos e miméticos de membrana utilizando a técnica da espectroscopia de fluorescência;
7- Avaliação da capacidade de permeabilização de vesículas de diferentes composições lipídicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Síntese e purificação dos peptídeos

De maneira simplificada, a síntese química de peptídeos, pode ser explicada como a formação química e repetida de ligações amida com a finalidade de conectar as funções amina e carboxílica de α-aminoácidos adjacentes (MARCHETTO, 2006). É assim denominada porque utiliza um reagente químico para ativar o grupo carboxílico de um α-aminoácido, que sofre o ataque nucleofílico do grupo α-amino de outro α-aminoácido, resultando na formação da ligação peptídica entre eles. Neste caso, os grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica devem estar previamente protegidos ou bloqueados.

A síntese pode ocorrer tanto em solução (síntese clássica) como na presença de um suporte polimérico, sendo esta, portanto, denominada síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Esta última, criada nos anos 60, tem como base o fato do grupo carboxílico do aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica, se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese (MERRIFIELD, 1963). Desta forma, o crescimento da cadeia peptídica ocorre no sentido do aminoácido C-terminal para o N-terminal. A remoção do excesso de reagentes e produtos secundários de cada etapa da síntese é realizada por filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Este fato influencia favoravelmente a síntese e proporciona excelentes rendimentos, além de minimizar as perdas por manipulação e permitir a automatização de todo o processo sintético.

Os análogos L2K, I5K, N7K, I9K e L13K, utilizados neste trabalho, foram projetados a partir da molécula modelo Pantinina-3 (P3) isolada do veneno do escorpião africano *Pandinus imperator* (ZENG et al., 2013) e foram sintetizados pela metodologia da fase sólida (AMBLARD et al., 2006). O protocolo utilizado foi aquele que emprega o grupamento base-lábil Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) como protetor dos α-amino grupos, e derivados t-butilicos para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000). Neste sentido, os grupos funcionais das cadeias laterais dos Fmoc-aminoácidos utilizados,

estavam protegidos com os seguintes grupos: *t*-butila (*t*-Bu) para Serina e Treonina; *t*-butiloxicarbonila (*t*-Boc) para Triptofano e Lisina; tritila (trt) para Asparagina.

O suporte polimérico utilizado para a síntese de todos peptídeos, foi uma resina Rink-amida (MBHA) com grau de substituição de 0,52 mmol/g e os agentes de condensação (ativação) foram DIC (N,N' diisopropilcarbodiimida) e HOBt (hidroxibenzotriazol).

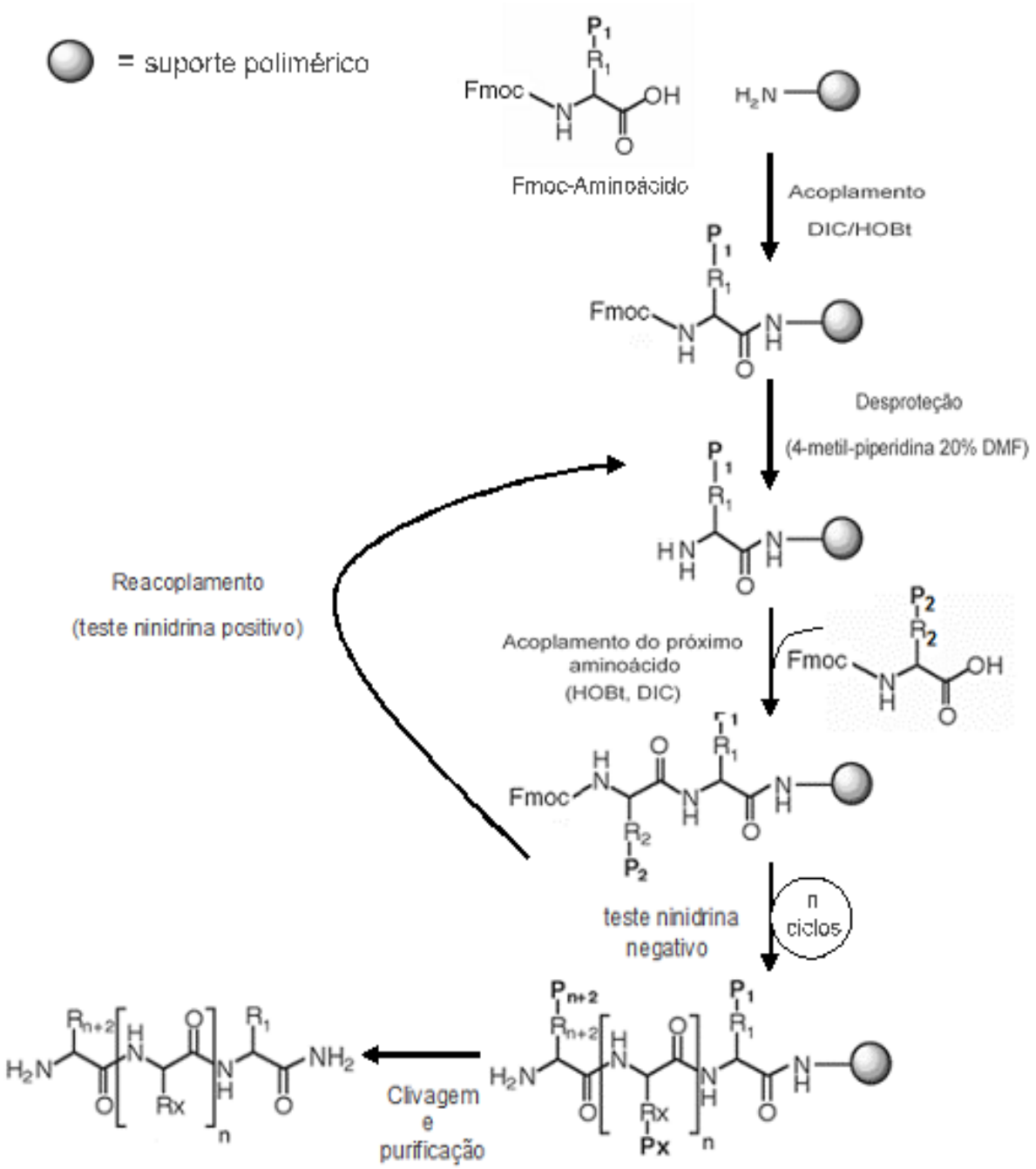
Para o acoplamento (condensação) de cada aminoácido, empregou-se um excesso molar de 3 equivalentes para os Fmoc-aminoácidos e 3 equivalentes para os agentes de condensação, em relação à escala de síntese, em DMF:DCM (1:1), por aproximadamente 2 horas. A desproteção dos grupos α-amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF.

O monitoramento das etapas de acoplamento foi realizado pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970), e quando positivo (acoplamentos incompletos), o processo era repetido com 50% dos reagentes.

Ao final da síntese, cada peptídeo foi clivado da respectiva resina, pelo tratamento com uma solução ácida contendo 95% de TFA (ácido trifluoracético), 2,5% de água deionizada e 2,5% de TIS (triisopropilsilano) na relação de 1 mL a cada 100 mg de resina, a temperatura ambiente sob agitação moderada por 2 horas. Nesta etapa, além da clivagem, ocorre também a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Figura 9).

Os peptídeos, após clivagem, foram precipitados com éter etílico gelado e lavados 3 vezes com o mesmo solvente para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. Após a separação do sobrenadante, o material obtido (peptídeo + resina) foi ressuspendido em uma solução de ácido acético 15%, centrifugado e filtrado em funil de placa porosa, sendo esta etapa repetida até a completa extração do peptídeo da resina. Ao final do processo as soluções de extração, foram liofilizadas, obtendo-se ao final, produtos floculosos e brancos, denominados peptídeos brutos (não purificados). A identificação dos peptídeos foi realizada a partir da análise do material bruto obtido, utilizando um sistema LC/MS constituído por UFLC Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL empregando o modo de ionização por *eletrospray* (ESI-MS positivo).

Figura 9 - Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc.



Fonte: Elaborado pela autora

A purificação dos peptídeos brutos foi realizada empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-FR), no modo semi-preparativo utilizando uma coluna Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) e como fase móvel, solução A (H_2O/TFA 0,045%) e solução B (ACN/TFA 0,036%) com um gradiente linear de 0,33% de solução B por minuto, sob fluxo de 3 mL/min e a eluição dos peptídeos foi monitorada por um detector de UV nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm. A caracterização e a determinação do teor de pureza das frações obtidas foram realizadas por CLAE-FR em modo analítico através de um cromatógrafo UFLC Shimadzu utilizando como fase móvel as mesmas soluções A e B e uma coluna Júpiter Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å) aplicando um gradiente de 5 a 95% da solução B em 30 minutos sob fluxo de 0,6 mL/min, monitorando a eluição com um detector de UV nos comprimentos de onda de 220 e 280 nm.

3.2 - Atividade Biológica

3.2.1 - Atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana, visando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos sintetizados, foram empregadas as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cepas eram mantidas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foram repicadas em CMH e incubadas a 37°C por 24 horas.

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir desta cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se as cepas no meio de cultura estéril até atingirem turbidez (leituras a 620 nm) equivalente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0x10^8$ UFC/mL). Em seguida foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0x10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

A avaliação da atividade bacteriana e consequentemente a determinação de CIM (menor concentração em que não há crescimento detectável do microrganismo) foi realizada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita na norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (JORGENSEN et al., 2007), com modificações.

A quantificação dos peptídeos foi realizada utilizando a técnica de absorção no UV a partir do comprimento de onda de absorção do triptofano (280 nm). Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de meio de cultura (Mueller Hinton) e em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções de cada peptídeo e realizada a diluição seriada (128 a 2 µmol.L^{-1}) a partir da concentração inicial de cada amostra. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos microrganismos previamente padronizados em cada poço das microplacas. Como controle positivo foi empregado o fármaco ampicilina (50 µg/mL). Também foram realizados o controle negativo do meio de cultura e o controle de crescimento bacteriano. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 ºC por 24 horas. Em seguida foi feita a leitura espectrofotométrica a 595 nm em um leitor de microplaca Epoch da Biotek Instruments. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.2 – Atividade hemolítica

Uma forma de avaliar a toxicidade do peptídeo é analisar a capacidade de promover a lise em eritrócitos. Para a realização deste estudo, os eritrócitos (obtidos de amostras sanguíneas de doadores voluntários) foram separados do plasma por centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos e ressuspendidos em tampão Tris.HCl 0,01 mol.L^{-1}, pH 7,4 contendo 0,15 mol.L^{-1} de NaCl por três ciclos consecutivos. Uma suspensão celular a 1% em tampão (v/v) e uma solução 128 µmol.L^{-1} dos peptídeos foram preparadas no mesmo tampão. Diluições seriadas da solução dos peptídeos foram usadas para determinar a porcentagem hemolítica de cada peptídeo e o volume final em cada tubo foi de 200 µL (100 µL da solução diluída do peptídeo e 100 µL da suspensão celular).

As amostras foram incubadas à 37ºC por 60 minutos e centrifugadas a 3.000 rpm por 2 minutos. Alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidas para microplacas de 96 poços e analisadas em um leitor de microplacas Epoch (Biotek Instruments) ajustado para realizar a leitura da placa a 540 nm. O resultado da atividade hemolítica do peptídeo foi expresso em porcentagem (Equação 1). Como referências de hemólise total e ausência de hemólise, soluções a 1% de eritrócitos foram analisadas na presença e na ausência de Triton X-100 a 1% (v/v), respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Tampão}})}{(A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tampão}})} \times 100 \qquad \textbf{Equação 1}$$

Nesta equação, “A” representa a absorbância obtida nas leituras das microplacas e “Triton” e “Tampão” representam as leituras obtidas nos controles positivos e negativos, respectivamente.

3.3 – Ensaios de hidrofobicidade comparativa

A hidrofobicidade comparativa entre os peptídeos sintetizados foi determinada por meio da análise do tempo de retenção de cada um, obtido por CLAE-FR. Para isso, todos os peptídeos foram solubilizados em água deionizada a concentração final de 50 $\mu mol.L^{-1}$. As análises foram realizadas em modo analítico, empregando como fase móvel duas soluções, solução A (H_2O/TFA 0,045%) e solução B (ACN/TFA 0,036%) em um cromatógrafo UFLC Shimadzu empregando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um gradiente linear de 5 a 95% de solução B em 30 minutos sob fluxo de 0,6 mL/min e detecção a 220 e 280 nm, a temperatura ambiente.

3.4 - Preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Os filmes lipídicos compostos por POPC/POPG (3:1) e POPC /Col (3:1) foram preparados através da pesagem dos respectivos lipídios em um tubo de vidro e solubilizados utilizando uma solução de clorofórmio/metanol (4:1). Em seguida o solvente foi evaporado em atmosfera de N_2 para que houvesse a formação de um filme fino nas paredes do tubo. Este filme foi deixado sob vácuo por 12 horas para a evaporação completa dos solventes. Posteriormente este filme foi hidratado com tampão fosfato 10 $mmol.L^{-1}$ ou com uma solução de carboxifluoresceína na concentração de 80 $mmol.L^{-1}$ em tampão fosfato 10 $mmol.L^{-1}$. Para a obtenção das vesículas unilamelares grandes (LUVs), as vesículas multilamelares formadas (MLVs) no processo, foram submetidas a um processo de 6 ciclos de congelamento, descongelamento e ultrasonicação, e posteriormente à um processo de extrusão utilizando um filtro de policarbonato com poros de 100 nm. Foram realizados 30 ciclos de extrusão para homogeneização do tamanho das vesículas. A carboxifluoresceína

não incorporada às vesículas (quando presente) foi removida através de filtração em gel utilizando uma coluna Sephadex G-50 estabilizada com tampão fosfato, pH 7,2.

3.5 - Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular se baseia na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais. A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções perpendiculares entre si, com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase (π/2). Com isso, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal. Devido a isso, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou à esquerda, conforme a diferença de fase for + π/2 ou - π/2.

Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada.

Em peptídeos e proteínas existem duas ligações cuja rotação é permitida: C_{α}-NH, cujo ângulo de rotação é Φ (Phi) e C_{α}-CO, cujo ângulo de rotação é Ψ (Psi). Os ângulos específicos Φ e Ψ são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias, α-hélice, folha-β e estrutura randômica (MICSONAI et al., 2015).

As principais estruturas secundárias regulares, α-hélice e folha-β, bem como a presença de estruturas secundárias desordenadas, podem ser identificadas por meio de medidas de CD na região do UV, de 190 à 250 nm.

Estruturas secundárias do tipo α-hélice apresentam três bandas características, com transição n-π* que resulta em uma banda negativa com absorção entre 220-222 nm, transição π-π* paralela, resultando em outra banda negativa com absorção entre 207- 209 nm e π-π* perpendicular que forma uma banda positiva com absorção entre 195-200 nm. Estruturas secundárias do tipo folha-β apresentam duas bandas espectrais, uma positiva com transição π-π* e absorção em 196 nm e uma banda negativa com transição n-π* absorção em 218 nm. Espectros de estruturas desordenadas apresentam a formação de uma banda negativa, com transição π-π* absorvendo em 200 nm. Assim, de acordo com a conformação estrutural adquirida pelas proteínas é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas

devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos (WHITMORE; WALLACE, 2008).

A fim de investigar a estrutura secundária dos peptídeos e suas alterações quando em ambientes hidrofóbicos, foram realizados estudos de dicroísmo circular com P3 e seus análogos à uma concentração de 60 $\mu mol.L^{-1}$ na presença e na ausência de micelas (SDS - 25 $mmol.L^{-1}$ e HPS - 15 $mmol.L^{-1}$) e vesículas (POPC/POPG (3:1) e POPC/Col. (3:1)). Os estudos na ausência dos miméticos de membrana foram realizados utilizando tampão fosfato 10 $mmol.L^{-1}$, pH 7,0. Para a realização das leituras foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm e 6 varreduras por espectro. Para todos os experimentos o tempo de integração foi de 1 s por ponto e a leitura foi feita a cada 0,1 nm. Os experimentos foram realizados a temperatura de 30 ºC, controlada por um sistema Peltier, e o equipamento utilizado foi um espectropolarímetro Jasco J-815. Os espectros foram obtidos em millidegrees e convertidos para elipticidade molar [θ] (deg cm^2 $dmol^{-1}$), através da equação 2.

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{10.c.n.d} \qquad \textbf{Equação 2}$$

Nesta equação, θ é a elipticidade observada, d é o caminho óptico em cm, c é a concentração em mol /L e n é o número de resíduos de aminoácidos da sequência peptídica.

3.6 - Estudos de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das principais técnicas aplicadas em estudos com proteínas e peptídeos, mais especificamente em análises estruturais, conformacionais e de interações com outros tipos de estruturas moleculares. Isto se deve à sensibilidade da técnica e da favorável escala de tempo do fenômeno da fluorescência. Essa técnica baseia-se na propriedade de certos grupos químicos, denominados cromóforos, de absorver e emitir radiação eletromagnética (CAIRES, 2014).

A fluorescência de peptídeos e proteínas deve-se a presença de fluoróforos naturais, mais especificamente os resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (W) e tirosina (Y), que absorvem luz na faixa espectral de ultravioleta. A fenilalanina (F) também apresenta fluorescência, mas possui um rendimento quântico muito baixo e, por isso, sua emissão é raramente observada. Os espectros de emissão de proteínas e peptídeos são sensíveis à interação com substratos, reações de associação e desnaturação. Geralmente são excitados a 280 nm, devido à absorção dos resíduos de triptofano e tirosina, entretanto, a emissão de cada um dos aminoácidos ocorre em comprimentos de onda diferenciados, como por exemplo, 303-305 nm para o resíduo de Tyr e 345-360 nm para o resíduo de Trp. Pequenas variações nestes valores máximos podem ser observadas em razão da variação das propriedades de transmissão dos componentes ópticos dos diferentes instrumentos empregados na análise (CAIRES, 2014).

O ambiente que envolve os fluoróforos está diretamente relacionado com a frequência de emissão dos mesmos. Alteração no meio seja por variações na polaridade, proximidade de moléculas específicas, processos de interações moleculares, incluindo agregações e associações com membranas, podem alterar a energia do estado excitado e, consequentemente, a frequência de emissão. Neste caso, variações no λ_{max} de emissão, na intensidade de fluorescência, no rendimento quântico, entre outros, podem ser utilizadas na avaliação de propriedades estruturais e de processos de interação das moléculas peptídicas.

Para analisar o grau de interação dos peptídeos com miméticos de membrana, foram realizados experimentos envolvendo medidas de fluorescência intrínseca do resíduo de triptofano, presente em cada sequência peptídica, na presença e na ausência dos miméticos.

Este experimento foi realizado a partir de uma solução aquosa de cada peptídeo a 10 $\mu mol.L^{-1}$ na presença e ausência de vesículas de POPC/POPG (3:1) e POPC/Col. (3:1) (100 $\mu mol.L^{-1}$) e micelas (SDS - 25 $mmol.L^{-1}$ e HPS - 15 $mmol.L^{-1}$).

Os dados de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian, em cubeta de quartzo sob temperatura controlada de 30 ºC. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm e a emissão de fluorescência foi registrada na faixa de 300 a 500 nm.

As análises dos dados foram realizadas utilizando os comprimentos de onda de maior emissão de fluorescência ($\lambda_{máx}$) como parâmetro de comparação da interação dos peptídeos com as membranas (LACKOWICZ, 2006; SUN et al., 2016).

3.7 - Estudos de permeabilização de vesículas

Vários estudos apontam que a afinidade de um PAM por uma membrana biológica é fortemente dependente da composição lipídica desta membrana (SHAI, 1999). Uma das técnicas utilizadas para se avaliar esta dependência e consequentemente a atividade de um PAM, é a análise da liberação de carboxifluoresceína internalizada em miméticos de membrana. Esta técnica se baseia na permeabilização e rompimento de vesículas unilamelares (LUVs) com composições que mimetizam membranas biológicas (POPC/POPG e POPC/Col), liberando ao meio a carboxifluoresceina inicialmente encapsulada, a qual emite fluorescência, que pode ser monitorada utilizando um espectrofluorímetro.

A capacidade dos peptídeos sintetizados em permeabilizar vesículas foi avaliada utilizando medidas de intensidade de fluorescência, utilizando um espectrofluorímetro Cary Eclipse VARIAN. a partir da liberação de carboxifluoresceína (fluoróforo) encapsulada nestas vesículas.

A emissão de fluorescência foi registrada em função do tempo, e o tempo de coleta dos dados foi de 10 minutos. O comprimento de onda de excitação foi de 494 nm e o de emissão foi de 520 nm. Devido à instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi usada no mesmo dia em que foi preparada. O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição de Triton x-100 em 9 minutos de monitoramento, que causou a dissolução total das vesículas e liberação da carboxifluoresceína. Os peptídeos foram analisados nas concentrações de 10 µmol/L, 5 µmol/L e 2,5 µmol/L e sua ação foi monitorada no intervalo de 1 à 9 minutos. A porcentagem de liberação da carboxifluoresceína pôde ser calculada utilizando a equação 3:

$$Permeabilização\ (\%) = \frac{I_f - I_0}{I_{máx} - I_0} . 100 \qquad \textbf{Equação 3}$$

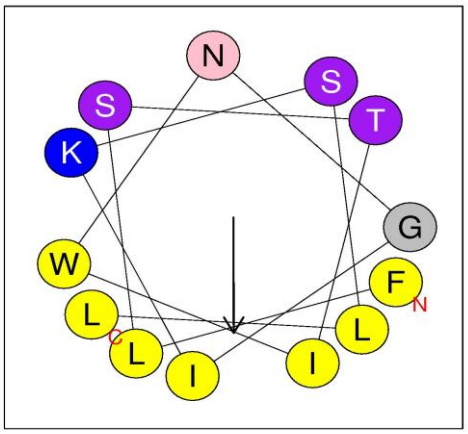
Onde I_0 é a intensidade de fluorescência inicial, correspondente às vesículas intactas, I_f é a intensidade de fluorescência final e I_{max} é a intensidade máxima de fluorescência, correspondente à 100% de permeabilização obtida após a adição de Triton x-100.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Estratégia de desenho dos peptídeos

O peptídeo P3 (Figura 5), como já descrito, é um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro demonstrando atividade em escalas micromolares contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (ZENG et al., 2013). A análise de sua sequência indica que ele apresenta a propensão em adotar uma estrutura helicoidal de caráter anfipático (Figura 10), característico de peptídeos antimicrobianos que atuam na membrana plasmática das células (CHEN et al., 2007; HARRISON et al., 2014; HUANG et al., 2014; HARRISON et al., 2016; SUN et al., 2016).

Figura 10 - Modelo de *helical wheel* do peptídeo P3 obtido através da predição estrutural pelo servidor *HeliQuest* (*http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py*). A codificação de cores indica as características dos aminoácidos: hidrofóbicos (amarelo), polar sem carga (rosa e roxo), aminoácidos especiais (cinza).



Fonte: Zeng et al., 2013.

Nos estudos realizados neste trabalho, P3 foi o peptídeo modelo para o desenho de cinco análogos, os quais foram obtidos por substituições sistemáticas de resíduos específicos da sequência de P3, por um resíduo do aminoácido lisina (Tabela 2). A inserção deste aminoácido visa não só a obtenção de peptídeos menos hidrofóbicos, mas também a introdução de uma carga positiva, especialmente na face hidrofóbica da hélice de P3, a fim de modificar suas propriedades estruturais e estudar os efeitos causados pela presença de resíduos carregados positivamente na atividade

biológica deste peptídeo. A representação *helical wheel* do peptídeo P3 possibilitou uma melhor visualização da distribuição dos aminoácidos e foi utilizada para o desenho dos análogos de P3. Neste sentido, resíduos de aminoácidos presentes nas posições 2, 5, 7, 9 e 13 de P3 foram substituídos por lisina (K) e os análogos obtidos foram denominados L2K, I5K, N7K, I9K e L13K (Tabela 2).

Tabela 2 – Estrutura primária do peptídeo P3 e de seus análogos sintéticos.

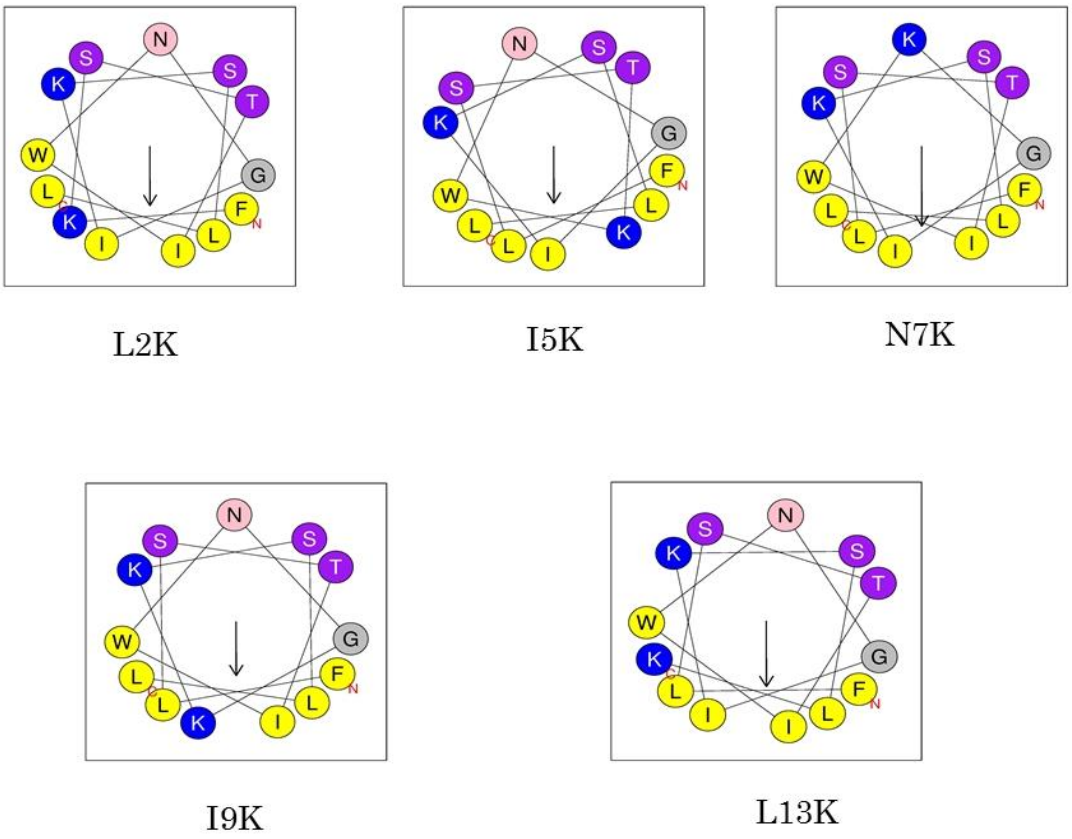
Peptídeo	Sequência
	2 5 7 9 13
P3	H_2N - F L S T I W N G I K S L L - $CONH_2$
L2K	H_2N - F **K** S T I W N G I K S L L - $CONH_2$
I5K	H_2N - F L S T **K** W N G I K S L L - $CONH_2$
N7K	H_2N - F L S T I W **K** G I K S L L - $CONH_2$
I9K	H_2N - F L S T I W N G **K** K S L L - $CONH_2$
L13K	H_2N - F L S T I W N G I K S L **K** - $CONH_2$

Fonte: Elaborado pela autora.

Os análogos L2K e L13K foram desenhados substituindo um resíduo de leucina (L), um aminoácido hidrofóbico, das posições 2 e 13 de P3 por um resíduo de lisina, respectivamente. I5K e I9K foram desenhados seguindo a mesma vertente, tendo a substituição de um resíduo de Isoleucina (I), igualmente hidrofóbico, nas posições 5 e 9 pelo resíduo de lisina. Já o análogo N7K foi criado pela substituição do resíduo de Asparagina (N), um aminoácido hidrofílico, porém não carregado, pelo resíduo de lisina, carregado positivamente, na posição 7.

A *helical-wheel* dos peptídeos análogos indica uma característica de formação de uma hélice anfipática (Figura 11), assim como observado para P3.

Figura 11 - *Helical wheel* dos peptídeos análogos de P3 obtidos através da predição estrutural pelo servidor HeliQuest. A codificação de cores indica as características dos aminoácidos: hidrofóbicos (amarelo), polar sem carga (rosa e roxo), aminoácidos especiais (cinza).



Fonte: Servidor HeliQuest *(http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py)*.

4.2 – Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos

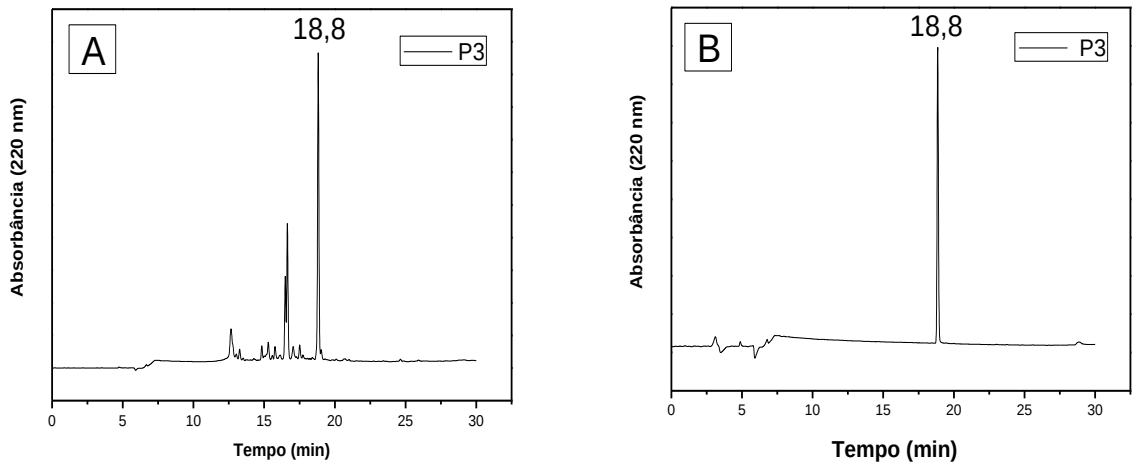
Após o desenho da estrutura primária dos peptídeos análogos de P3, estes foram sintetizados manualmente pela metodologia da fase sólida de acordo com o protocolo padrão da estratégia Fmoc/tBu, seguindo as etapas descritas em Materiais e Métodos. Todos foram sintetizados utilizando como suporte, uma RinK amida resina, para que ao final, resultassem peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal, após a clivagem final, como em P3.

Ao final, todos análogos, assim como P3, foram clivados da resina, precipitados, extraídos e liofilizados, como descrito.

Após as etapas de síntese, clivagem e liofilização, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água

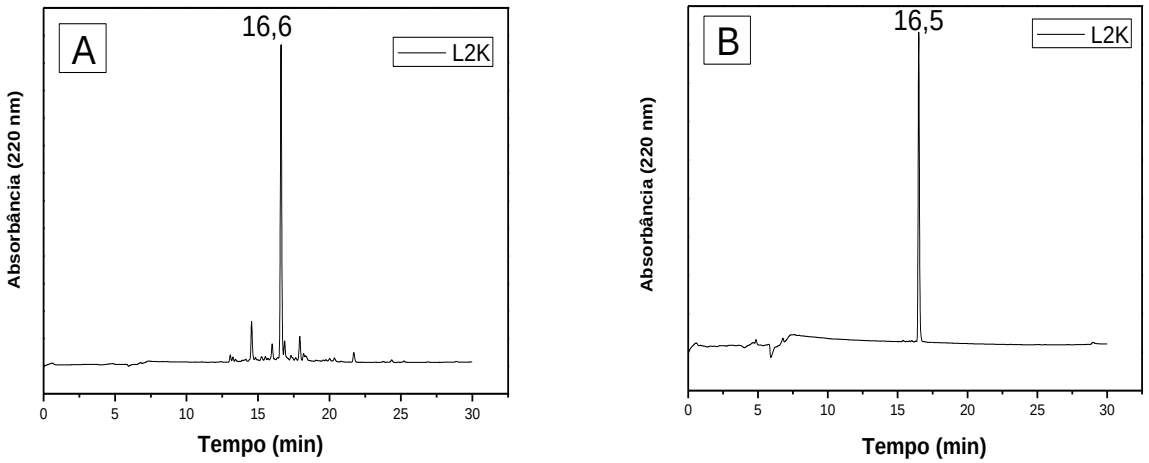
ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE-FR, como descrito em Materiais e Métodos. De acordo com os resultados encontrados a partir desta análise, obteve-se o tempo de retenção e a porcentagem de solvente para cada peptídeo, assim foram definidas as condições relativas e as concentrações de solvente para cada purificação em escala semi-preparativa. As frações provenientes do processo de purificação foram submetidas novamente a análises por CLAE-FR em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado. Posteriormente foram analisados por CLAE-FR em modo analítico para confirmação da pureza, que se situaram acima de 95% Os perfis cromatográficos de cada peptídeo sintetizado, antes e após purificação, estão representados de forma comparativa, nas Figuras 12 a 17.

Figura 12 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **Pantinina 3** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



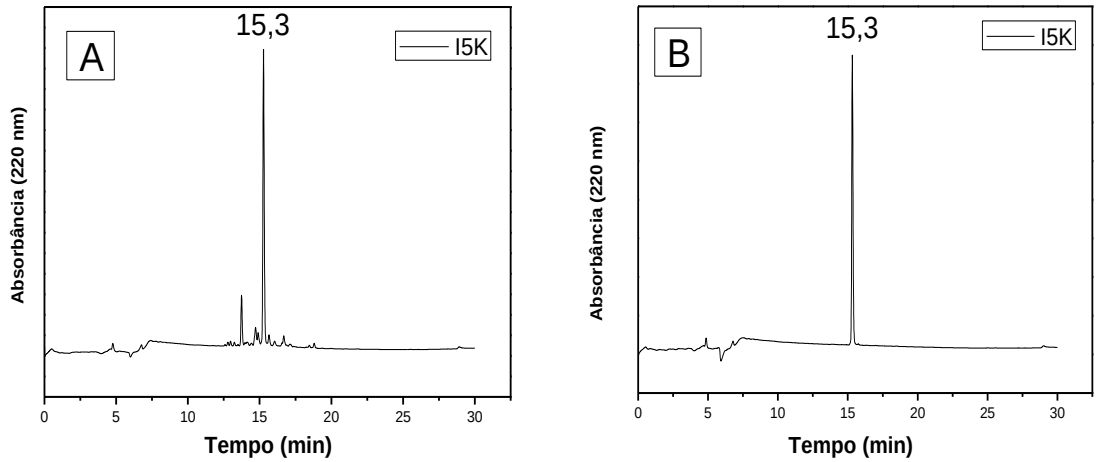
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **L2K** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



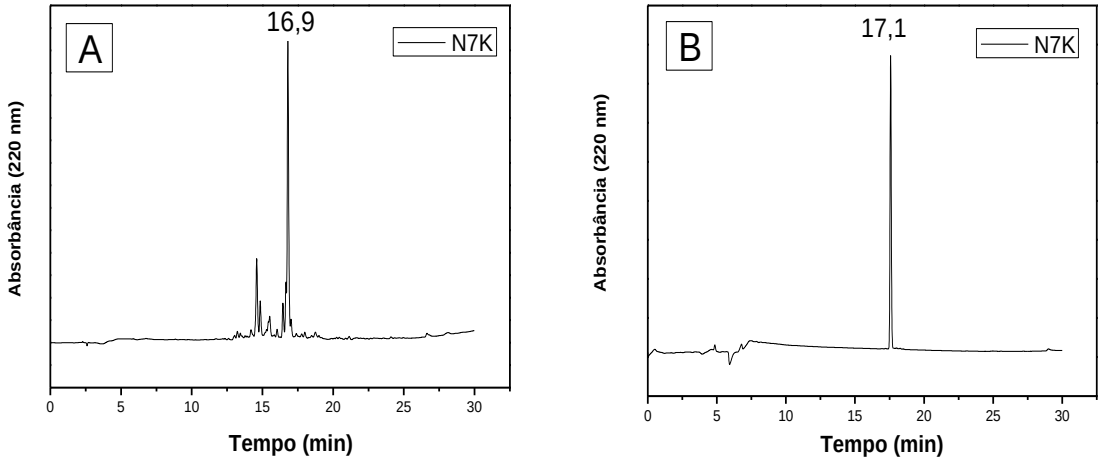
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **I5K** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



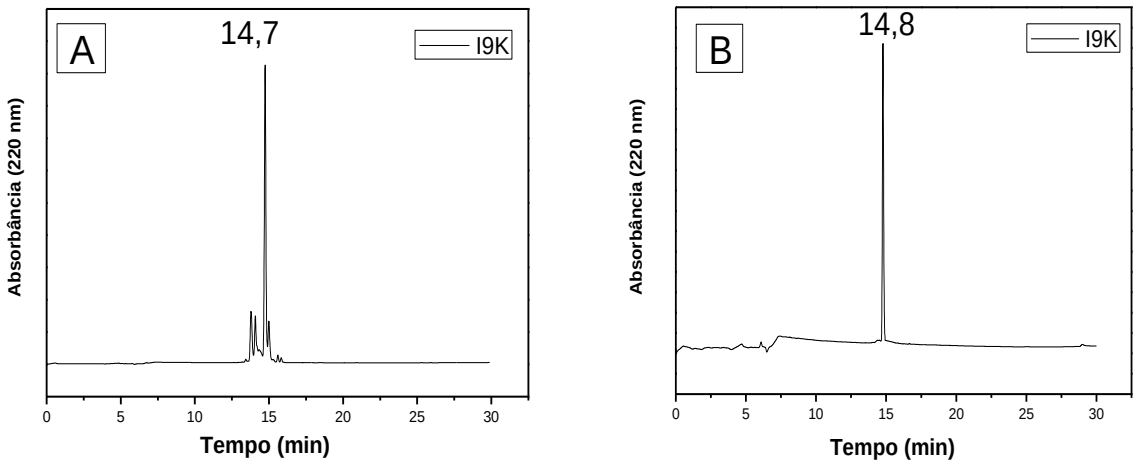
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **N7K** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30 – 60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 120 minutos, fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm



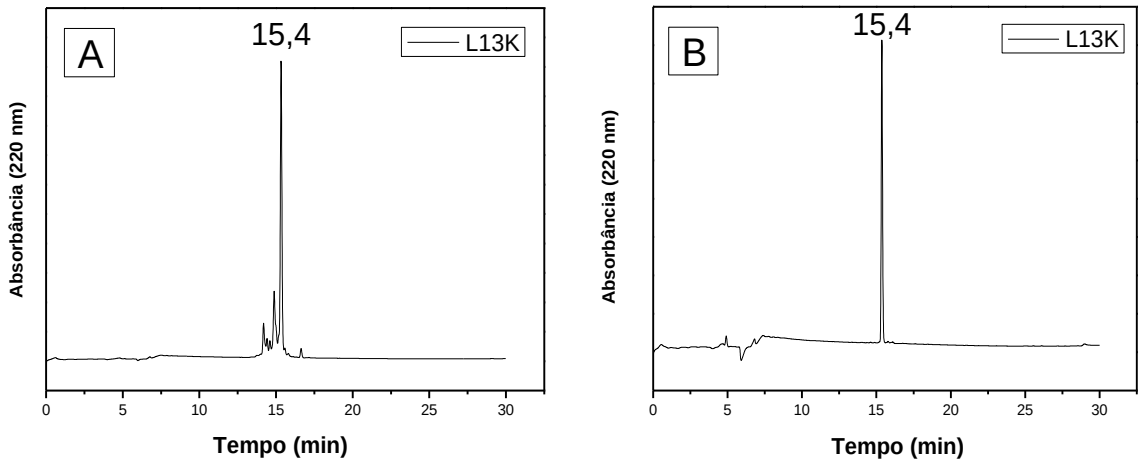
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **I9K** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com gradiente linear de 5 – 30% em 40 min e 30 – 60% em 55 min. de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **L13K** antes **(A)** e após **(B)** purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 5 – 30% em 40 min e 30 – 60% em 55 min. de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Pode-se observar que os perfis cromatográficos dos peptídeos purificados apresentaram um único pico em relação aos perfis cromatográficos dos peptídeos brutos. O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos purificados foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto, e a pureza relativa demonstra que os métodos utilizados foram adequados.

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: $(M + H)^+$], estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. O conjunto de resultados permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequencias desejadas, confirmando a eficiência dos processos de síntese.

A quantidade obtida de material puro foi suficiente para a realização de todos os experimentos.

Tabela 3 - Relação massa/carga (m/z) teórico e obtido de cada peptídeo sintetizado.

Peptídeo	Massa molecular (g/mol)	ES+	*ES m/z teórico (g/mol)*	*ES m/z observado (g/mol)*
P3	1489,86	+1	1491,0	1491,0
		+2	746,0	746,3
L2K	1504,87	+1	1506,0	1506,0
		+2	753,5	753,9
I5K	1504,87	+1	1506,0	1507,8
		+2	753,5	754,2
N7K	1503,91	+1	1505,0	1505,1
		+2	753,0	753,4
I9K	1504,87	+1	1506,0	1506,0
		+2	753,5	753,9
L13K	1504,87	+1	1506,0	1506,8
		+2	753,5	754,2

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 - Atividade biológica

Os peptídeos purificados foram inicialmente testados quanto a sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra duas cepas de bactérias, uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma Gram-negativa (*Escherichia coli*). Esta análise de atividade biológica fornece informações acerca do nível de seletividade e interação dos peptídeos com as membranas biológicas das bactérias, servindo como o passo inicial para melhor entender seus mecanismos de ação.

Posteriormente os mesmos foram testados contra eritrócitos humanos para avaliar sua atividade hemolítica, que foi usada como parâmetro de toxicidade dos peptídeos.

É importante destacar que a composição lipídica pode ser diferente de uma célula para outra, principalmente quando comparamos células bacterianas com hemácias, e mesmo quando se compara duas bactérias diferentes.

4.3.1 – Atividade antibacteriana

O peptídeo P3 foi caracterizado como apresentando boa atividade contra bactérias Gram-positivas e pouca atividade contra Gram-negativas (ZENG et al., 2013). Em nossos estudos utilizamos a concentração inibitória mínima (CIM) como parâmetro para avaliar a atividade antimicrobiana de P3 e seus análogos e estes resultados podem ser visualizados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) de P3 e seus análogos contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli,* em *µmol.L*$^{-1}$.

Bactéria	**Cepa**	**CIM (µmol.L^{-1})**					
		P3	**L2K**	**I5K**	**N7K**	**I9k**	**L13K**
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	8/16	>128	>128	4	>128	>128
Escherichia coli	ATCC 25922	128	64	>128	16	>128	>128

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados de atividade antimicrobiana mostraram que o análogo N7K possui alta atividade tanto contra Gram-positivas quanto contra Gram-negativas, apresentando maior potencial antimicrobiano que o peptídeo nativo P3.

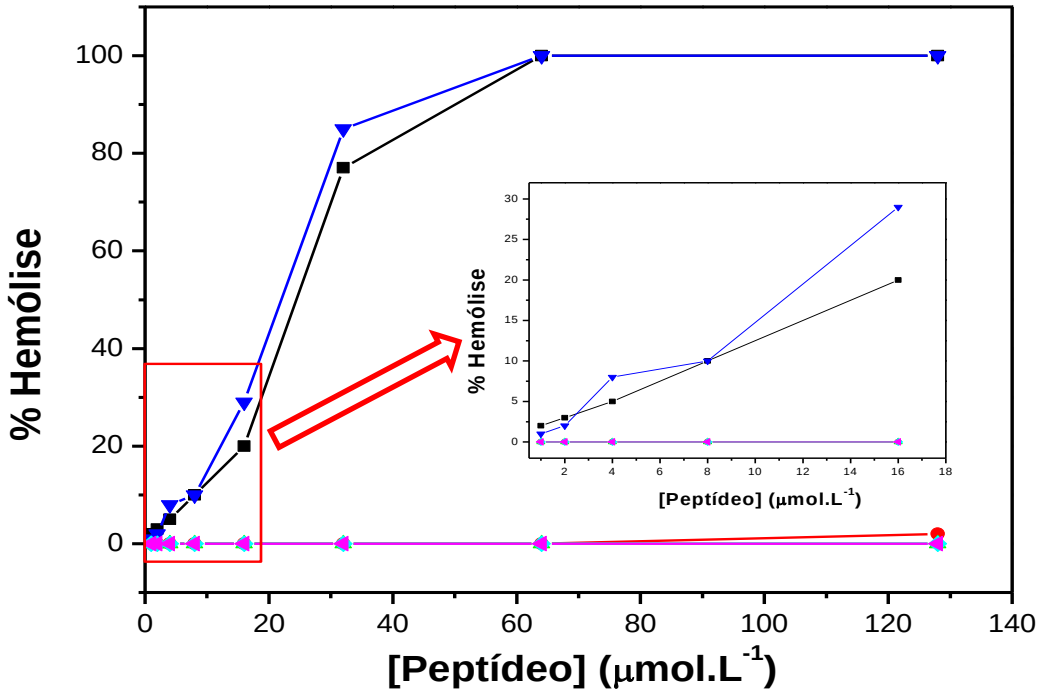
O aumento da carga positiva de P3 na posição 7 para a criação do análogo N7K contribuiu para o aumento da atividade antimicrobiana deste análogo. Contudo, apesar de todos os análogos terem sido desenhados considerando o mesmo aumento da carga, foram obtidos resultados diferentes na atividade antimicrobiana em relação ao peptídeo nativo. Observa-se, por exemplo, que a substituição de um resíduo hidrofóbico (Leu) na extremidade N-terminal (posição 2) da sequência de P3 pela Lisina (L2K) fez com que este peptídeo apresentasse atividade contra um tipo de bactéria Gram-negativa, o que não é observado para P3. Isto mostra que através de mudanças pontuais é possível tornar o peptídeo seletivo a somente uma família de bactéria (L2K), aumentar sua capacidade antimicrobiana (N7K) ou simplesmente fazer

com que ele perca totalmente sua atividade, como observado para os análogos L2K, I5K, I9K e L13K, para *Staphylococcus aureus*.

4.3.2 – Atividade hemolítica

A toxicidade dos peptídeos foi avaliada através do potencial hemolítico por meio de estudos de interação entre peptídeos e eritrócitos humanos. A finalidade deste estudo foi estimar o potencial terapêutico dos peptídeos e os resultados obtidos são mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Atividade hemolítica de P3 e seus análogos em diferentes concentrações frente a eritrócitos humanos. A identificação dos peptídeos é dada por P3 (preto), L2K (vermelho), N7K (azul) e L13K (rosa). Os análogos I5K e I9K não aparecem no gráfico, pois a capacidade hemolítica de ambos foi de 0%.



Fonte: Elaborado pela autora.

Estes resultados mostram que os peptídeos N7K e P3 podem causar hemólise de forma dose-dependente. Verifica-se que o análogo N7K apresenta capacidade hemolítica ligeiramente superior ao peptídeo nativo P3, causando 84% de hemólise na concentração de 32 μmol.L^{-1}, enquanto P3 causa 77% nesta mesma concentração.

Ambos causam 100% de rompimento dos eritrócitos na concentração de 64 μmol.L^{-1} mostrando possuir uma capacidade hemolítica elevada, apesar de seu alto potencial antimicrobiano. Por outro lado, na CIM, a ação de N7K resulta em menos de 10% de atividade hemolítica, que é aceitável nas margens de segurança.

É interessante observar que os análogos L2K, I5K, I9K e L13K não apresentaram nenhuma atividade hemolítica até nas maiores doses testadas (128 μmol.L^{-1}). Estes resultados indicam que adicionar uma carga positiva na face hidrofóbica da hélice do peptídeo P3 teoricamente diminuiu sua anfipacidade e este efeito promove a redução de sua capacidade hemolítica até o ponto de torná-la inexistente. Por outro lado, o aumento da carga para +2 na face hidrofílica do peptídeo P3 (análogo N7K), promoveu um ligeiro aumento em sua atividade, tanto hemolítica quanto antimicrobiana. Embora os outros peptídeos análogos também possuam carga +2, fica evidente que a substituição de um resíduo hidrofóbico da face hidrofóbica da molécula, independentemente da posição, resulta em uma redução significativa da capacidade hemolítica destes análogos, o que torna possível relacionar a hidrofobicidade das moléculas com sua capacidade hemolítica.

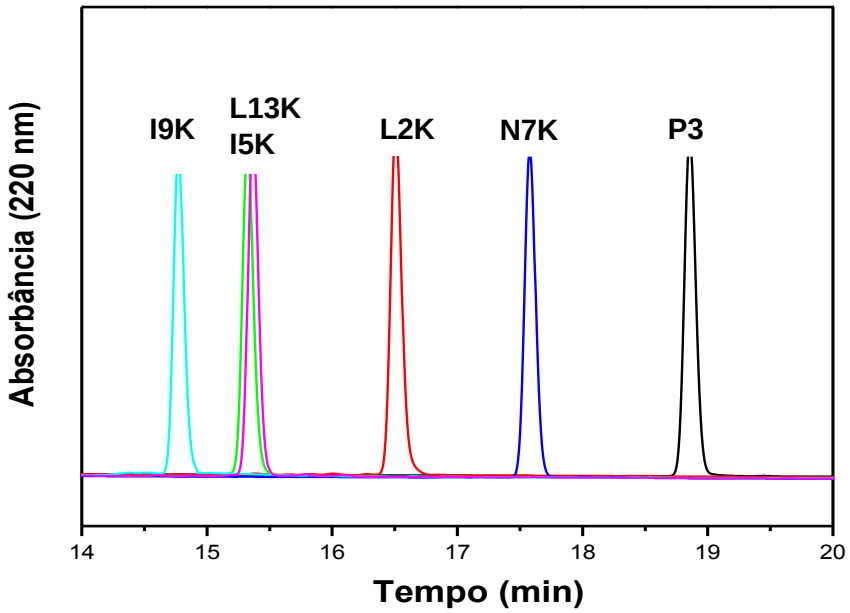
Neste contexto, ao observar o comportamento do análogo L2K, é possível evidenciar que a substituição de um resíduo hidrofóbico na posição 2 da extremidade N-terminal (Leu) por uma carga positiva, elevando a carga efetiva para +2 nesta extremidade, além de promover uma seletividade na atividade antimicrobiana do peptídeo P3, também o tornou não hemolítico, demonstrando a importância desta extremidade para a atividade biológica de P3.

4.4 - Análise da hidrofobicidade dos peptídeos

A determinação do tempo de retenção de um peptídeo, a partir de análises cromatográficas em fase reversa, é um bom método para medidas de sua hidrofobicidade, uma vez que os valores de tempo de retenção são sensíveis ao seu estado conformacional e das interações com o ambiente hidrofóbico da matrix contida na coluna em fase reversa (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2007). A face apolar de um peptídeo antimicrobiano helicoidal e anfipático representa o domínio principal de ligação entre o peptídeo e a matrix da coluna de fase reversa (ZHOU et al., 1990; CHEN et al., 2007).

Neste sentido, o cromatograma apresentado na Figura 19 demonstra que, nas mesmas condições de análise (temperatura, concentração de amostra, solventes e método) o peptídeo P3 apresentou maior grau de hidrofobicidade, ficando evidente que as substituições realizadas promoveram uma diminuição na hidrofobicidade em todos os análogos. Em uma escala comparativa de menor para maior hidrofobicidade, o peptídeo I9K mostrou ser o menos hidrofóbico dentre os peptídeos analisados seguido dos peptídeos I5K e L13K os quais possuem hidrofobicidades relativamente similares. L2K apresentou hidrofobicidade intermediária quando comparado com os outros análogos e N7K foi o aquele com maior hidrofobicidade. Estes resultados demonstram que alterações pontuais realizadas na estrutura primária de P3 promoveram a modulação da hidrofobicidade de forma específica, embora tenha sido realizada apenas uma alteração pontual.

Figura 19 - Hidrofobicidade comparativa dos peptídeos sintetizados, analisadas pela diferença do tempo de retenção em CLAE-FR. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 ml/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando se compara a hidrofobicidade predita (via servidor HeliQuest) para cada peptídeo e aquela obtida por experimentos de CLAE-FR (Tabela 5), pode-se observar que a sequência de hidrofobicidade, obtida por CLAE-FR, praticamente

segue aquela prevista por cálculos teóricos, que emprega parâmetros hidrofóbicos das cadeias laterais dos aminoácidos a partir da partição de N-acetil-amino ácidos amida, em uma mistura octanol/água (FAUCHERE; PLISKA, 1983).

Tabela 5 - Comparação da hidrofobicidade calculada, hidrofobicidade obtida pelo tempo de retenção em análise de CLAE-FR e carga líquida de cada peptídeo. A hidrofobicidade calculada e a carga líquida de cada peptídeo foram obtidas através do servidor HeliQuest.

Peptídeo	Sequência	[a]H	[b]T_r	[c]Z
P3	H_2N - F L S T I W N G I K S L L - $CONH_2$	0,872	18,8	+1
L2K	H_2N - F **K** S T I W N G I K S L L - $CONH_2$	0,665	16,5	+2
I5K	H_2N - F L S T**K**W N G I K S L L - $CONH_2$	0,657	15,3	+2
N7K	H_2N - F L S T I W **K** G I K S L L - $CONH_2$	0,842	17,6	+2
I9K	H_2N - F L S T I W N G **K** K S L L - $CONH_2$	0,657	14,8	+2
L13K	H_2N - F L S T I W N G I K S L **K** - $CONH_2$	0,665	15,4	+2

[a]Hidrofobicidade calculada. [b]Tempo de retenção (min) obtido por CLAE-FR (Figura 19).
[c]Carga líquida das cadeias laterais dos resíduos em pH 7,4.
* A carga líquida obtida por cálculos do servidor HeliQuest não leva em consideração a carga positiva presente na extremidade N-terminal das sequências peptídicas.

Considerando o peptídeo P3 como parâmetro comparativo, uma diminuição na hidrofobicidade do peptídeo N7K era esperada, com a substituição do resíduo de Asparagina por um resíduo mais hidrofílico como a Lisina, resultado confirmado pelos ensaios de CLAE-FR.

Em relação aos peptídeos L2K, L13K, I5K e I9K, os ensaios de CLAE-FR sinalizam para uma menor hidrofobicidade para os peptídeos resultantes da substituição do resíduo de Isoleucina (I5K e I9K). Neste caso, o fato da Isoleucina ser considerada um aminoácido mais hidrofóbico, comparado a Leucina, quando substituído por Lisina, resulta em uma molécula com menor índice de hidrofobicidade (Tabela 5). De fato, a substituição de um aminoácido como a Isoleucina, que exerce uma maior contribuição na hidrofobicidade global de P3, resultou em análogos peptídicos com menores tempos de retenção (T_r) nas análises de CLAE-FR (Tabela 5).

Por outro lado, análogos contendo substituições de um mesmo tipo de aminoácido e, portanto, com os mesmos parâmetros teóricos de hidrofobicidade (mesmos valores de H), resultaram em cromatogramas com T_r variáveis. Neste caso, a posição do aminoácido substituído deve, muito provavelmente, estar influenciando na hidrofobicidade da molécula, detalhe não considerado nos cálculos teóricos do servidor HeliQuest. Este servidor, como já mencionado, considera a contribuição pontual da cadeia lateral de cada aminoácido, porém sem considerar a influência e a contribuição dos grupos dos aminoácidos vizinhos, o que gera resultados semelhantes, independentemente da posição da substituição promovida (Tabela 5).

Aparentemente, o fato do resíduo de Lisina de L13K estar menos inserido na face hidrofóbica da molécula (Figura 11), faz deste análogo menos hidrofóbico que L2K. O mesmo pode ser aplicado para I9K e I5K, apesar da diferença no tempo de retenção de ambos serem muito pequena e estar dentro dos limites de variações aceitáveis para uma análise cromatográfica.

Uma relação direta entre a hidrofobicidade e a atividade membranolítica dos peptídeos sintetizados pôde ser constatada. De fato, P3 e N7K, os dois peptídeos mais hidrofóbicos, apresentaram maiores atividades hemolíticas (Figura 18), evidenciando que a permeabilização de membranas fosfolipídicas zwiteriônicas está diretamente relacionada com o aumento da hidrofobicidade da molécula peptídica, implicando em um aumento da sua atividade hemolítica. Assim sendo, a hidrofobicidade pode ser um parâmetro de predição da atividade de determinado peptídeo sobre membranas neutras.

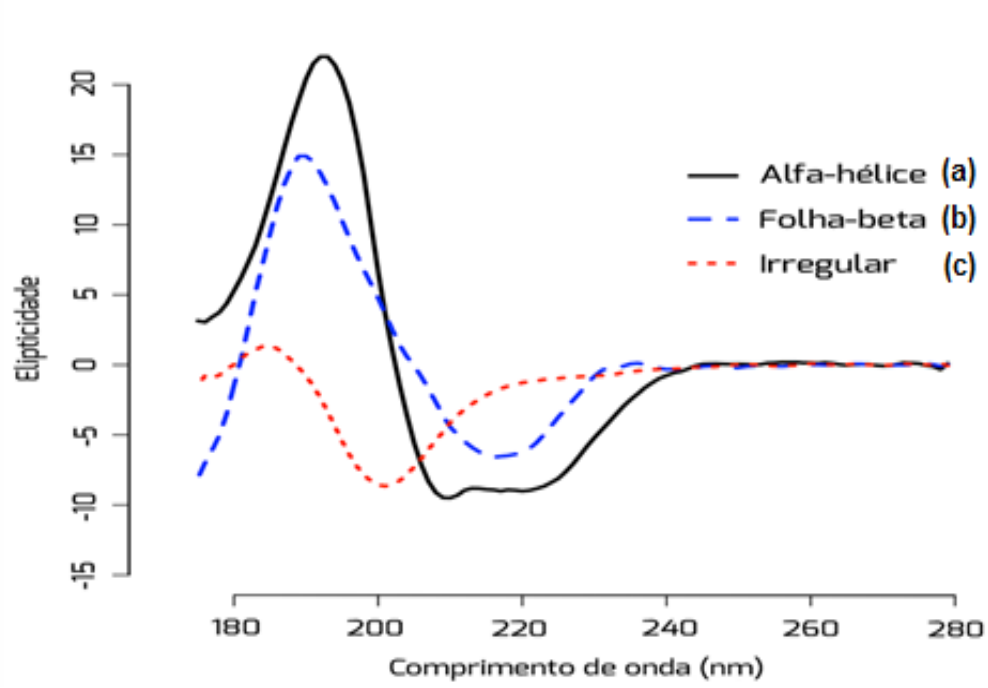
Em termos de atividade antimicrobiana, os peptídeos mais hidrofóbicos, novamente foram os mais ativos, especialmente N7K. Neste análogo, diferentemente dos demais, a inserção do resíduo de lisina foi feita fora da face hidrofóbica, promovendo um aumento da carga positiva sem, contudo, alterar a face apolar da molécula. Com isso, a interação eletrostática de N7K com a membrana bacteriana negativa é favorecida, acumulando-se na sua superfície, momento em que a face apolar, inalterada, passa a interagir diretamente com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, favorecendo a permeabilização da membrana e consequentemente a morte celular.

4.5 – Dicroísmo Circular

Os resultados das análises de dicroísmo circular (CD) correspondem às únicas informações sobre estrutura secundária para os peptídeos sintetizados e foram utilizados, na tentativa de uma correlação com a atividade antimicrobiana determinada para os mesmos.

As análises foram realizadas conforme descrito na metodologia. Utilizou-se como referência para a análise, espectros representados na Figura 20, que representam as diferentes formas espectrais, referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas. A curva (a) representa o espectro característico de estrutura tipo alfa-hélice, apresentando duas bandas negativas, uma em torno de 208 nm e outra em torno de 222 nm e, uma banda positiva em torno de 198 nm. A curva (b) representa o espectro característico de estrutura tipo folha-β e apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno de 218 nm. Já a curva (c) representa o espectro característico de estrutura desordenada, apresentando uma banda negativa com mínimo em torno de 200 nm.

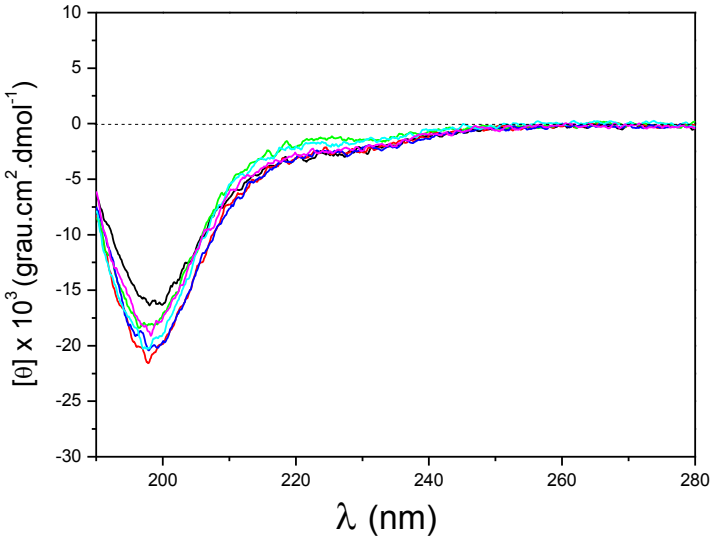
Figura 20 - Espectros de CD das principais estruturas secundárias de proteínas



Fonte: Verli (2014)

Inicialmente, os espectros foram traçados na presença de tampão fosfato, para uma avaliação da estrutura adotada, sem a influência de qualquer agente que, reconhecidamente possa induzir uma estruturação. Neste caso, os espectros obtidos foram típicos de estruturas desordenadas, caracterizados pela banda negativa visualizada, em valores próximos a 200 nm, para todos os peptídeos (Figura 21), mostrando diferentes graus de desordem.

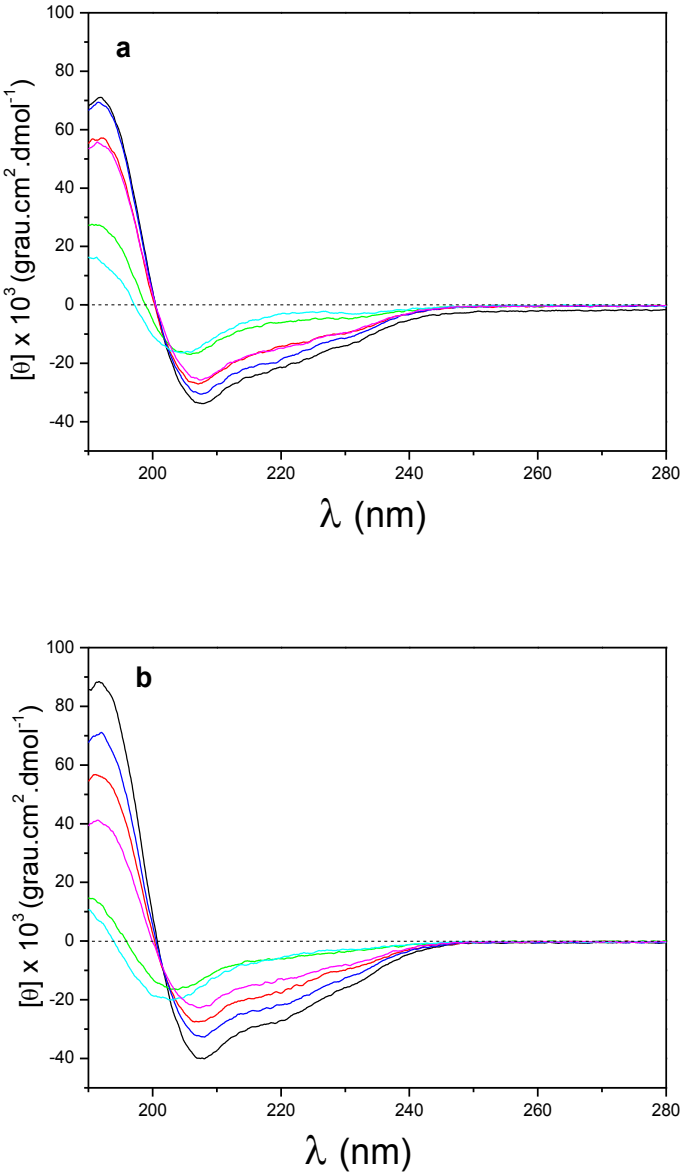
Figura 21 - Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), a concentração de 60 µmol.L^{-1} em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1}, a 30ºC.



Fonte: Elaborado pela autora.

Já na presença das micelas de SDS (Figura 22a) e HPS (Figura 22b), os peptídeos P3, L2K, N7K e L13K adquiriram uma estruturação α-helicoidal definida, identificada pela presença de bandas negativas nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm e uma banda positiva em 190 nm. Os peptídeos I5K e I9K apresentaram bandas de intensidade muito baixa nestes mesmos comprimentos de onda, sugerindo que os dois peptídeos adotaram pouca estruturação, permanecendo em estruturação desordenada, caracterizada pela banda negativa visualizada, em valores próximos a 200 nm,

Figura 22 – Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), 60 μmol.L^{-1}, na presença de micelas de **(a)** SDS 25 mmol.L^{-1} e **(b)** HPS 15 mmol.L^{-1}, a 30ºC.



Fonte: Elaborado pela autora.

O uso de micelas na caracterização estrutural de um peptídeo, empregando CD, é bem interessante, pois estas são dimensionalmente pequenas, reduzindo assim os efeitos de espalhamento de luz (LOFFREDO et al., 2017).

Contudo, pelo fato de micelas representarem uma composição lipídica mais simples comparada às membranas biológicas, decidiu-se por dar continuidade aos

estudos de CD dos peptídeos em um meio contendo vesículas, com composições lipídicas específicas, a fim de mimetizar uma bicamada lipídica e permitir uma maior aproximação de uma membrana.

Deste modo, LUVs constituídas de POPC/POPG (3:1) carregados negativamente foram projetadas para mimetizar a camada externa de membranas de procariotos, enquanto LUVs formadas de POPC/Col. (3:1) (zwiteriônica) foram construídas para mimetizar a composição lipídica da membrana plasmática de eucariotos (LOFFREDO et al., 2017).

Para os espectros traçados na presença deste tipo de mimético de membrana, observou-se que, no caso de vesículas de POPC/POPG, os peptídeos que mais se estruturaram em α-hélice foram P3 e N7K, de maneira semelhante ao observado no caso de micelas. Seguindo a mesma ordem de análise, L2K e L13K apresentaram uma estruturação parcial, na presença de vesículas de POPC/POPG, e os análogos I5K e I9K, praticamente mantiverem a estrutura desordenada observada em solução (Figura 23a). Por outro lado, na presença de vesículas POPC/Col, os únicos que resultaram em estruturas em hélice definida foram P3 e N7K. Os demais análogos mantiveram as estruturas desordenadas observadas quando em solução tamponada (Figura 23b). Ademais, maior estruturação de P3 e N7K, foi observada na presença de vesículas de POPC/POPG.

A capacidade de N7K, em se estruturar similarmente a P3, independentemente do meio (Figuras 22 e 23), pode estar relacionada com a invariabilidade da anfipacidade da hélice prevista, após a substituição do resíduo de asparagina por lisina, na posição 7 da sequência de P3. Semelhantemente, a substituição de resíduos hidrofóbicos da face apolar da hélice de P3, reduziu sua anfipacidade, o que resultou na baixa estruturação dos demais análogos.

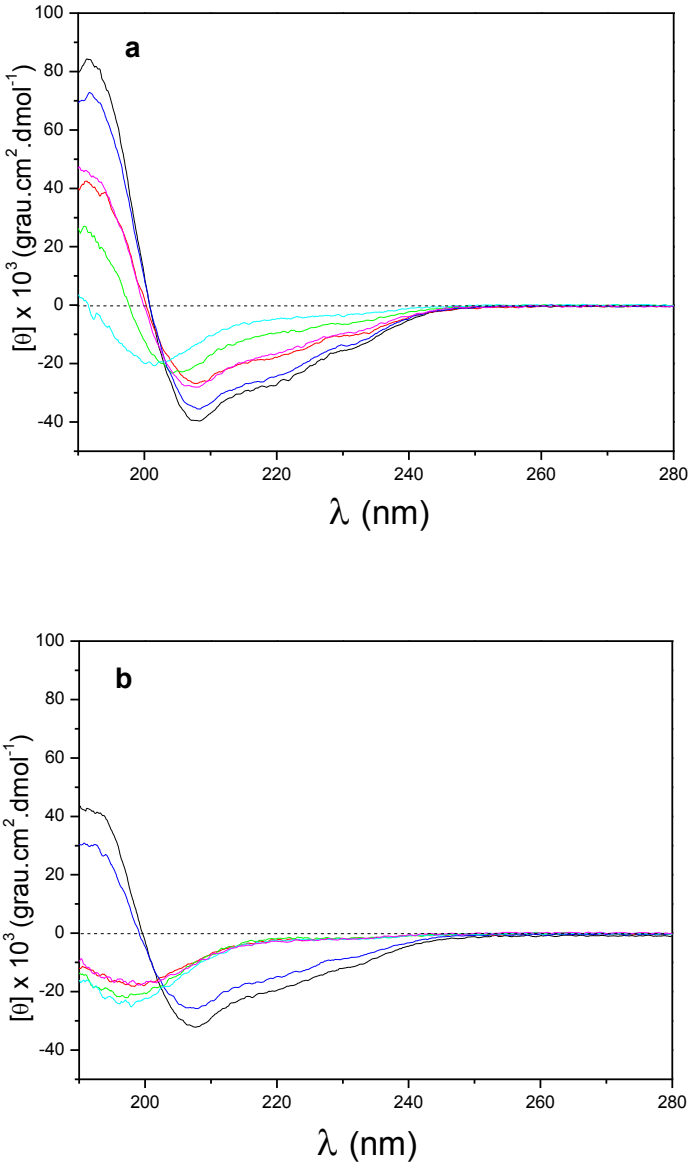
A substituição dos resíduos de isoleucina nas posições 5 e 9 (I5K e I9K), provocaram maior perda da capacidade de estruturação, o que pode ser atribuída a quebra de anfipacidade da molécula, já que ambos resíduos situavam-se no centro da face hidrofóbica da hélice anfipática, proposta para P3 (Figura 10), evidenciando a importância desses resíduos para as interações hidrofóbicas iniciais, responsáveis pelo início da estruturação no ambiente lipídico (SUN et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Uma relação direta entre a capacidade de estruturação e a hidrofobicidade dos peptídeos também pôde ser observada. De fato, P3 e N7K, peptídeos com maiores

hidrofobicidades (Figura 19 e Tabela 5) foram os que adotaram estruturação mais definidas, em meio contendo micelas ou vesículas.

A influência da hidrofobicidade na estruturação de peptídeos já havia sido verificada em estudos anteriores, onde foi demonstrado que resíduos hidrofóbicos possuem a tendência de se associarem entre si para diminuírem o seu contato com a água (DILL et al., 1995; HUANG et al., 2011; HUANG et al., 2014).

Figura 23 - Espectros de CD dos peptídeos P3 (linha preta), L2K (linha vermelha), I5K (linha verde), N7K (linha azul escuro), I9K (linha azul claro) e L13K (linha rosa), 60 µmol.L^{-1}, na presença de LUVs de **(a)** POPC/POPG (3:1) e **(b)** POPC/Colesterol (3:1), a 30ºC.



Fonte: Elaborado pela autora.

Outra observação que emerge deste estudo é a sensibilidade dos peptídeos à carga e à composição das membranas modelos. A presença de colesterol e a ausência de carga global nas vesículas POPC/Col promoveram uma redução significativa na capacidade de estruturação dos mesmos, sugerindo que as interações iniciais, como é o caso das interações eletrostáticas, oferece uma contribuição importante no processo de estruturação dos peptídeos, em meio hidrofóbico. Ademais, o colesterol atua aumentando a rigidez da membrana, dificultando as interações membrana-peptídeo (GLUKHOV et al., 2005; MATSUZAKI, 2009; LOFFREDO et al., 2017).

Anteriormente, uma correlação entre hidrofobicidade e atividade biológica dos peptídeos já havia sido destacada (item 4.4), de tal forma que peptídeos caracteristicamente hidrofóbicos, apresentaram maiores atividades hemolítica e antimicrobiana. Considerando que a estruturação dos peptídeos, em meio de miméticos de membrana, também é dependente da hidrofobicidade da molécula peptídica, é possível creditar a atividade biológica dos peptídeos à capacidade de estruturação dos mesmos neste meio.

P3 e N7K, os peptídeos mais hidrofóbicos, com maior capacidade de estruturação em meio contendo LUVs de POPC/Col, foram também os peptídeos de maior atividade hemolítica. A membrana das hemácias, igualmente zwiteriônica, pode estar exercendo o mesmo tipo de efeito observado com as LUVs de POPC/Col, na estruturação de P3 e N7K. Ao interagirem com a membrana das hemácias, possivelmente por interações tipo ligações de hidrogênio, os peptídeos passam a se estruturar em hélice de forma a expor a face hidrofóbica destas moléculas, ao núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, permeabilizando-a.

O mesmo tipo de raciocínio pode ser adotado para correlacionar a capacidade de estruturação e a atividade antimicrobiana. Ambos, P3 e N7K, apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e L2K e N7K para *Escherichia coli*, sempre em maior grau de atividade para N7K.

Diferentemente dos demais análogos, a carga positiva inserida em N7K, ocorreu sem alteração da face hidrofóbica da molécula. O aumento da carga efetiva da molécula certamente favoreceu sua capacidade de interação com a bicamada lipídica da membrana bacteriana, essencialmente negativa. A interação com a membrana, deve ter resultado na estruturação do peptídeo, como observado para o mimético de membrana POPC/POPG, momento em que a face apolar, passa a

interagir diretamente com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, favorecendo a permeabilização da membrana e consequentemente a morte celular. Provavelmente P3, deve atuar pelo mesmo mecanismo, porém com uma interação menos intensa com a membrana, especialmente devido à sua carga efetiva.

Da mesma forma, o análogo L2K, apresentou seletividade na atividade antimicrobiana e nenhuma atividade hemolítica e adotou estrutura secundária somente na presença das LUVs de POPC/POPG que mimetizaram células procarióticas, apesar de o grau de α-hélice deste análogo ter sido inferior aos peptídeos P3 e N7K. A ausência de estruturação em meio contendo POPC/Col, explica a ausência de atividade hemolítica e novamente é um forte indicio da relação direta estrutura-atividade. Da mesma forma, a inserção de uma carga positiva próximo à extremidade N-terminal e posicionada na face hidrofóbica do peptídeo, deve ter sido responsável pela menor interação inicial com a membrana, reduzindo sua estruturação e consequentemente a interação do peptídeo com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, resultando em menor permeabilização da membrana.

Por outro lado, o análogo L13K apresentou basicamente o mesmo comportamento estrutural observado para L2K, porém não demonstrou qualquer atividade, seja hemolítica ou antimicrobiana. A falta de estrutura regular observada em um meio que simula as membranas de hemácias (POPC/Col) justifica a ausência de atividade hemolítica, assim como observado para L2K. Porém, L13K foi desenhado pela substituição de uma Leucina por uma Lisina, na face hidrofóbica de P3, o que se esperaria menor estruturação e consequentemente menor atividade antimicrobiana, a exemplo de L2K. Porém, a diferença entre estes análogos é a posição de inserção da carga positiva, na extremidade N-terminal para L2K e C-terminal para L13K. Uma explicação para as diferenças de atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a maior densidade de carga positiva presente na extremidade N-terminal de L2K, gerada pela presença da lisina e do grupamento amino terminal do peptídeo, o que não acontece em L13K. Esta densidade de carga positiva deve promover uma maior interação com a membrana do microrganismo, o que deve facilitar a interação da face hidrofóbica com o núcleo hidrofóbico da membrana, mesmo tendo esta face, sofrido alterações pela presença da lisina. Neste caso, para L13K, a alteração na face hidrofóbica deve ter prevalecido sobre a influência da carga no processo de interação inicial.

4.6 – Estudos de Espectroscopia de Fluorescência

Para tentar entender como funciona a dinâmica de interação dos peptídeos com as membranas biológicas, foram construídas composições lipídicas que mimetizaram a carga e a hidrofobicidade destas membranas. Utilizando a técnica da espectroscopia de fluorescência foi possível relacionar a influência das modificações realizadas no peptídeo P3 com a capacidade de interação de cada análogo criado.

Para isso, foram realizadas medidas da intensidade de fluorescência intrínseca do resíduo de triptofano, presente na posição 6 de cada sequência peptídica, na presença e na ausência de miméticos de membrana.

O valores obtidos referentes ao comprimento de onda de maior emissão de fluorescência ($\lambda_{máx}$) para os peptídeos nas diferentes condições, bem como a representação visual desses valores, podem ser observados na Tabela 6 e Figuras 24 e 25, respectivamente.

Tabela 6 - Valores obtidos dos comprimentos de onda de maior emissão de fluorescência para cada peptídeo em diferentes condições, a partir dos espectros de emissão de fluorescência (dados não mostrados).

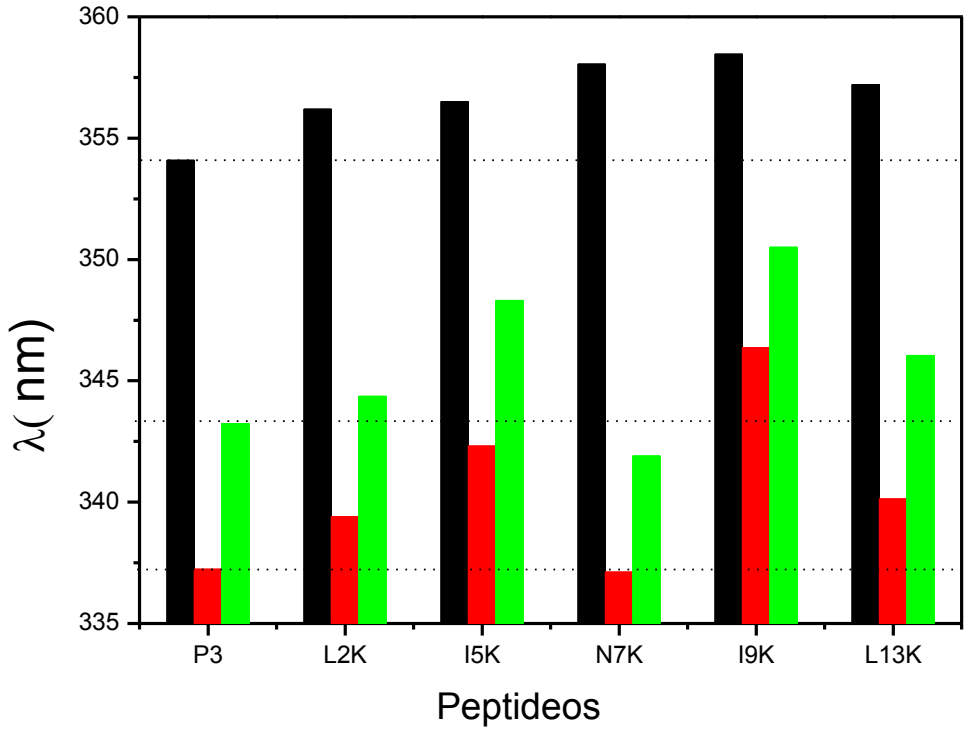
Peptídeo	λ_{emis} (nm)[a]				
	Solução	SDS	HPS	POPC/POPG	POPC/Col.
P3	354	337	343	334	345
L2K	356	339	344	339	356
I5K	356	342	348	349	357
N7K	358	337	342	334	348
I9K	358	346	350	352	357
L13K	357	340	346	342	356

[a]Valores de comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência (λ_{emis});. A concentração dos peptídeos foi de 10 $\mu mol.L^{-1}$, na ausência ou presença de miméticos de membrana. As concentrações lipídicas utilizadas foram 25 $mmol.L^{-1}$ (SDS), 15 $mmol.L^{-1}$ (HPS), 100 $\mu mol.L^{-1}$ (POPC/POPG 3:1) e 100 $\mu mol.L^{-1}$ (POPC/Col. 3:1), a 30ºC.

Por meio dos valores de λmáx é possível observar mudanças na polaridade do meio em que o triptofano se encontra, sendo um método comumente utilizado para analisar sua inserção na membrana (SHAI, 1999; GLUKHOV et al., 2005; GLUKHOV et al, 2008; HUANG et al., 2014; SUN et al., 2016). O deslocamento do comprimento de onda de maior emissão de fluorescência para valores menores (*blue shift*) indica que o triptofano presente nas sequências peptídicas está se inserindo em um sistema apolar (LACKOWICZ, 2006).

Ao comparar os valores de $\lambda_{máx}$ obtidos para os peptídeos em tampão fosfato e na presença de micelas (Figura 24), constata-se um fenômeno *blue shift* desses valores, o que evidencia uma interação com as micelas.

Figura 24 - Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (λ_{emis}) de P3 e análogos em solução aquosa, SDS (25 mmol.L-1) e HPS (15 mmol.L^{-1}), a 30 ºC. A linha pontilhada indica o valor máximo obtido para o peptídeo P3 para cada condição experimental. A identificação por cores das barras refere-se à solução aquosa (preto), SDS (vermelho) e HPS (verde).



Fonte: Elaborado pela autora.

Apesar de a estruturação dos peptídeos ter se mostrado semelhante na presença dos dois tipos de micelas, SDS e HPS, verifica-se uma inserção mais profunda do triptofano no núcleo hidrofóbico de micelas aniônicas de SDS. Neste caso observa-se que os peptídeos P3 e N7K são os que apresentam maiores interações, com *blue shift* de 17 nm para P3 e 20 nm para N7K, seguido dos análogos Leu substituídos L2K e L13K, com *blue shift* de 17 nm. Os análogos Ile substituídos, I5K e I9K, foram os que apresentaram menor grau de interação com as micelas, quando comparados com os outros análogos, apresentando valores de *blue shift* de 14 e 12 nm, respectivamente. Estes resultados demonstram que todos os peptídeos interagiram com as micelas, mesmo que tenham apresentado graus de interação diferentes.

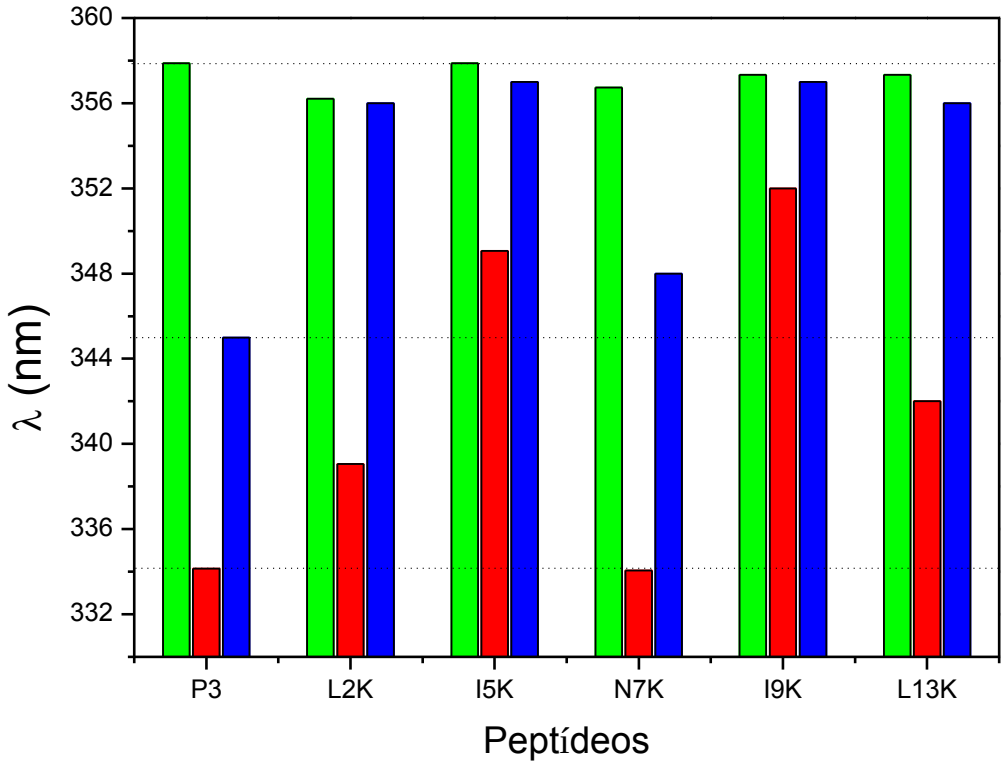
Analisando-se a capacidade de interação dos peptídeos com as vesículas (Figura 25) observa-se que os peptídeos novamente apresentaram maior interação com as membranas contendo POPG carregado negativamente. Neste caso a ordem de interação foi a mesma obtida para as análises com micelas, onde os peptídeos P3 e N7K foram os que indicaram maior interação com as membranas (*blue shift* de 23 e 22 nm, respectivamente). Com níveis de interação inferiores, encontramos os análogos L2K e L13K, apresentando *blue shift* de 17 e 15 nm, respectivamente. Novamente os análogos I5K e I9K foram os que apresentaram menor interação (*blue shift* de 8 e 6 nm, respectivamente).

No caso de interação peptídica com um sistema lipídico POPC/Col., verifica-se que o peptídeo P3 e seu análogo N7K foram os únicos que apresentaram Δλ negativo significativos (*blue shifts* de 13 e 8 nm, respectivamente). Nenhum dos outros análogos apresentou valores de *blue shift* significativo, indicando que não houve interação com este tipo de composição lipídica.

Assim, observa-se que de modo geral o triptofano dos peptídeos se insere mais profundamente em membranas carregadas negativamente, tanto em micelas quanto vesículas (Figuras 24 e 25), porém em graus diferentes de inserção. Pode-se dizer que o grau de inserção de cada peptídeo nas vesículas de POPC/POPG, por exemplo, seja norteado por contribuições das cargas (peptídeo/lipídio) através de interações eletrostáticas, da hidrofobicidade e também pelo grau de estruturação de cada peptídeo.

As interações existentes entre os peptídeos e as vesículas de POPC/Col. mostram ter grande contribuição do grau de estruturação dos peptídeos, uma vez que somente P3 e N7K demonstraram interagir com este tipo de sistema lipídico.

Figura 25 - Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (λ_{emis}) de P3 e análogos em solução aquosa, e LUVs de POPC/POPG (3:1) e POPC/Col. (3:1), a 30 ºC. A linha pontilhada indica o valor máximo obtido para o peptídeo P3 para cada condição experimental. A identificação por cores das barras refere-se à solução aquosa (verde), POPC/POPG (vermelho) e POPC/Col. (azul).



Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 - Estudos de permeabilização de vesículas

Para obter mais informações que possibilitem melhor associação entre as características estruturais dos peptídeos e o processo de interação com membranas e consequentemente a atividade biológica, foram realizados estudos de permeabilização utilizando vesículas de POPC/POPG e POPC/Col. contendo carboxifluoresceína (CF) encapsulada, molécula que emite fluorescência a 520 nm,

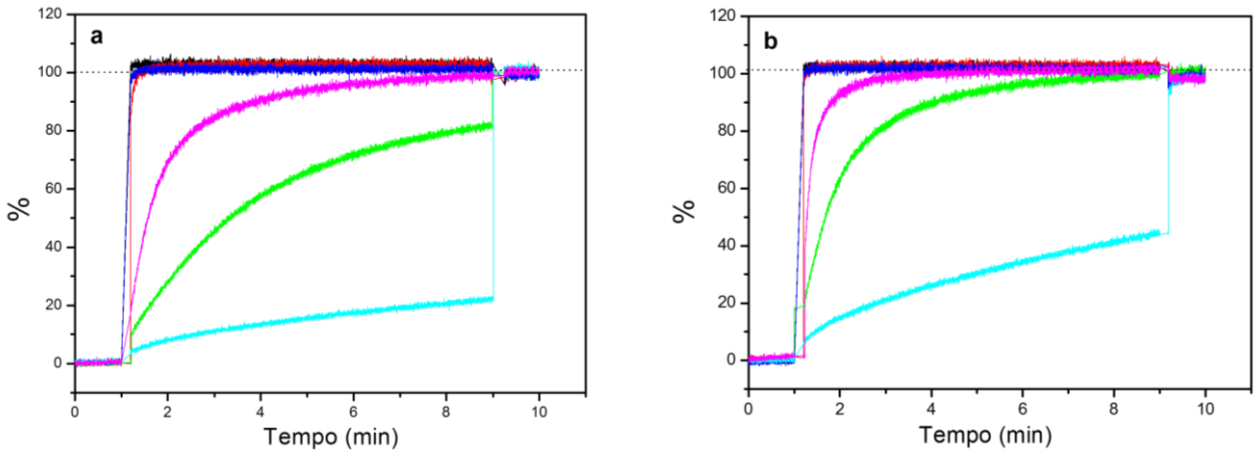
(quando excitada a 494 nm), sendo esta, usado para avaliar a porcentagem de permeabilização das membranas (CHEN; KNUTSON, 1988).

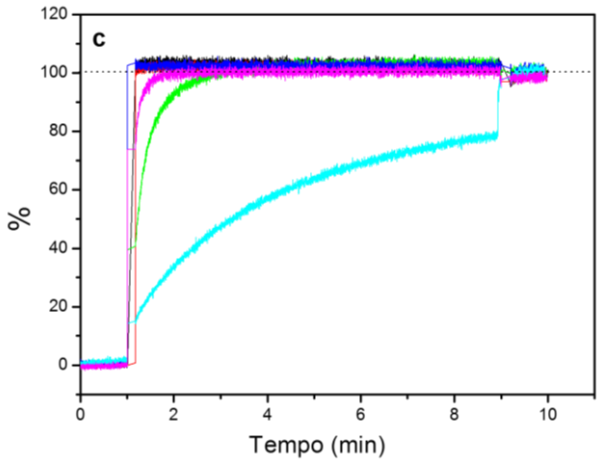
O princípio da técnica se baseia no fato de que CF quando encapsulada nas vesículas, não emite fluorescência perceptível. Porém, quando a membrana da vesícula é permeabilizada por um peptídeo, a CF é liberada ao meio, podendo assim, sofrer excitação, passando então a emitir fluorescência, que pode ser inclusive quantificada (CHEN; KNUTSON, 1988).

Basicamente este é um processo cinético, onde o tempo de 10 minutos, foi padronizado para a coleta dos dados de fluorescência, neste experimento.

O perfil de liberação de carboxifluoresceína resultante da permeabilização de LUVs contendo POPC/POPG (3:1) e POPC/Col. (3:1) provocada pelos diferentes peptídeos em diferentes concentrações pode ser visualizado nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

Figura 26 - Perfil de liberação de carboxifluoresceína através da permeabilização de LUVs contendo POPC/POPG (3:1) pelos peptídeos P3 e análogos, nas concentrações de 2,5 $\mu mol.L^{-1}$ **(a)**, 5 $\mu mol.L^{-1}$**(b)** e 10 $\mu mol.L^{-1}$ **(c)**. A identificação por cor de cada peptídeo é: P3 (preto), L2K (vermelho), I5K (verde), N7K (azul escuro), I9K (azul claro) e L13K (rosa).





Fonte: Elaborado pela autora.

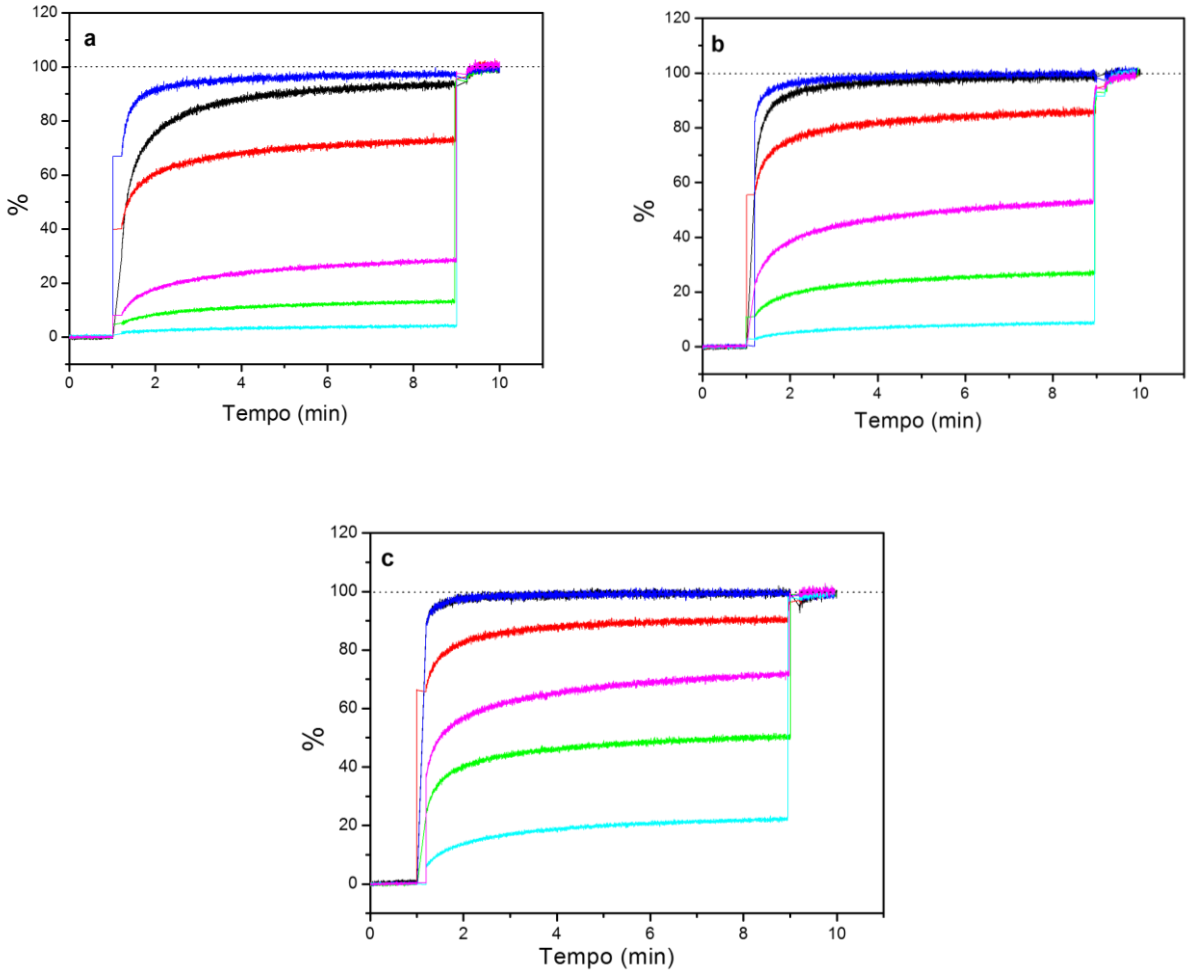
Observa-se que o comportamento de permeabilização é variável entre os peptídeos. Na presença das LUVs de POPC/POPG (Figura 26) os peptídeos P3, N7K e L2K mostraram uma alta porcentagem de permeabilização da bicamada lipídica, promovendo 100% de liberação da CF em todas as concentrações peptídicas testadas. Contudo, verificou-se um comportamento diferente para os análogos I5K, I9K e L13K. Estes análogos demonstraram uma dependência da concentração em permeabilizar as LUVs. Comparativamente, L13K demonstra maior capacidade de permeabilização, seguido por I5K e I9K. O análogo I9K foi o que apresentou menor taxa de rompimento desta vesícula, apresentando uma variação em torno de 60% da menor para a maior concentração, sendo o que apresentou menor capacidade de interação. Nessa ordem, observa-se uma taxa maior de permeabilização para os peptídeos I5K e L13K, ambos atingindo o máximo de 100% de rompimento na concentração de 10 $\mu mol.L^{-1}$.

Para as LUVs de POPC/Col. (Figura 27) também se observou diferenças na capacidade de permeabilização dos peptídeos. O peptídeo N7K, como observado para as LUVs de POPC/POPG, mostrou uma alta capacidade de permeabilização, promovendo 100% de rompimento das membranas independentemente da concentração utilizada, de forma que mostrou ter mais atividade frente à este tipo de membrana.

O peptídeo nativo P3 também demonstrou ser bastante ativo para estas membranas, também atingindo 100% de permeabilização na concentração de 2,5 $\mu mol.L^{-1}$ (Figura 27). Os demais análogos promoveram diferentes porcentagens de

rompimento da membrana, tendo maior percentual de permeabilização em maiores concentrações, sem, contudo, romper 100% das LUVs nas concentrações testadas. Dentre esses, observa-se que o análogo L2K foi o mais ativo, atingindo o máximo de 90 % de permeabilização na concentração de 10 μmol.L^{-1}. Subsequentemente, observa-se uma diminuição da capacidade de permeabilização dos peptídeos na ordem de L13K>I5K>I9K.

Figura 27 - Perfil de liberação de carboxifluoresceína através da permeabilização de LUVs contendo POPC/Col. (3:1) pelos peptídeos P3 e análogos) nas concentrações de 2,5 μmol.L^{-1} **(a)**, 5 μmol.L^{-1}**(b)** e 10 μmol.L^{-1} **(c)**. A identificação por cor de cada peptídeo é P3 (preto), L2K (vermelho), I5K (verde), N7K (azul escuro), I9K (azul claro) e L13K (rosa).



Fonte: Elaborado pela autora.

Alguns estudos sugerem que existe uma relação entre a concentração peptídica, a liberação de CF e o mecanismo de ação. Sugere-se que o aumento gradual da permeabilização com o aumento da concentração peptídica está relacionado ao mecanismo de formação de poros. Em contrapartida, variações mínimas na porcentagem de permeabilização com o aumento da concentração correspondem ao mecanismo carpete, ou micelização da membrana (RUSSELL et al., 2010; LORENZÓN, 2015).

Os estudos de interação e permeabilização mostraram que os peptídeos inserem-se nos dois tipos de LUVs de maneiras diferentes, uma vez que o grau de estruturação, a disposição dos resíduos e a hidrofobicidade são diferentes.

Mais especificamente, observam-se que os peptídeos P3 e N7K foram os que mais se destacaram quanto à capacidade de adotar estrutura secundária e a capacidade de interagirem e permeabilizarem ambas as composições de LUVs. Contudo, percebe-se claramente que as modificações associadas à face apolar da hélice anfipática de P3 promoveram alterações significativas e de formas diferentes em sua atividade, hidrofobicidade e grau de estruturação.

Além disso, a diminuição ou perda da atividade biológica dos peptídeos L2K, I5K, L13K e I9K não contradiz os dados de permeabilização, uma vez que a atividade dos peptídeos antimicrobianos está relacionada à desestruturação da membrana plasmática, e em células biológicas encontram-se estruturas complexas, como proteínas de membrana, lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos, que podem interagir com os peptídeos dificultando ou impedindo sua interação com a membrana plasmática (PAPO; SHAI, 2003; HE et al., 2014; LORENZÓN, 2015).

5. CONCLUSÕES

A análise global dos resultados biológicos sugere que a substituição de um resíduo hidrofóbico da extremidade N-terminal do peptídeo P3 por uma lisina carregada positivamente, promove certo grau de seletividade na atividade biológica deste peptídeo.

Por outro lado, a substituição pontual de resíduos hidrofóbicos (leucina e isoleucina) por uma lisina, no segmento C-terminal de P3, fez com que o peptídeo perdesse sua atividade. Além disso, a substituição de um resíduo hidrofílico, fora da face hidrofóbica, por uma resíduo contendo carga positiva, aumentou a atividade antimicrobiana e hemolítica de P3.

Foi revelado também que não é possível relacionar um único parâmetro à atividade biológica dos peptídeos, pois nenhum dos fatores estudados conseguiu explicar isoladamente o comportamento dos peptídeos. Entretanto, os resultados também mostraram que os peptídeos P3 e N7K, que apresentaram maior hidrofobicidade e maior capacidade de estruturação foram os mais ativos biologicamente. Estes peptídeos também apresentaram maior interação e capacidade de permeabilização de miméticos de membrana.

Por meio de substituições pontuais foi possível promover alterações em algumas propriedades do peptídeo P3, de tal forma que é possível concluir que, os estudos semelhantes aos descrito neste trabalho, envolvendo a relação estrutura/atividade de um peptídeo antimicrobiano, possibilita, o desenvolvimento de novas moléculas com potencial atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates,** v. 26, p. 43-57, 2016.

ANES, J.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. **Frontiers in microbiology,** v. 6, 2015.

BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BATONI, G.; MAISETTA, G.; ESIN, S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1858, n. 5, p. 1044-1060, 2016.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews. Microbiology,** v. 3, n. 3, p. 238, 2005.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current opinion in immunology,** v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.

CAIRES, A. C. Síntese, estrutura e atividade de peptídeos derivados de ParD, o antídoto do módulo toxina-antitoxina ParDE. 2014.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2000. xv, 346 p.

CHEN, R. F.; KNUTSON, J. R. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. **Analytical biochemistry,** v. 172, n. 1, p. 61-77, 1988.

CHEN, Y.; GUARNIERI, M. T.; VASIL, A. I.; VASIL, M. L.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α-helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial agents and chemotherapy,** v. 51, n. 4, p. 1398-1406, 2007.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of α-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry,** v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005.

DABUL, A. N. G.; CAMARGO, I. L. B. D. C. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. **Epidemiology & Infection,** v. 142, n. 3, p. 479-483, 2014.

DILL, K. A.; BROMBERG, S.; YUE, K.; CHAN, H. S.; FTEBIG, K. M.; YEE, D. P.; THOMAS, P. D. Principles of protein folding—a perspective from simple exact models. **Protein science,** v. 4, n. 4, p. 561-602, 1995.

FAUCHERE, J.-L.; PLISKA, V. Hydrophobic parameters pi of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. **Eur. J. Med. Chem,** v. 18, n. 3, p. 369-375, 1983.

FEDDERS, H.; PODSCHUN, R.; LEIPPE, M. The antimicrobial peptide Ci-MAM-A24 is highly active against multidrug-resistant and anaerobic bacteria pathogenic for humans. **International journal of antimicrobial agents,** v. 36, n. 3, p. 264-266, 2010.

FINDLAY, B.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. **Antimicrobial agents and chemotherapy,** v. 54, n. 10, p. 4049-4058, 2010.

GLUKHOV, E.; BURROWS, L. L.; DEBER, C. M. Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: the two thresholds. **Biopolymers,** v. 89, n. 5, p. 360-371, 2008.

GLUKHOV, E.; STARK, M.; BURROWS, L. L.; DEBER, C. M. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **Journal of Biological Chemistry,** v. 280, n. 40, p. 33960-33967, 2005.

GORDON, Y. J.; ROMANOWSKI, E. G.; MCDERMOTT, A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. **Current eye research,** v. 30, n. 7, p. 505-515, 2005.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology,** v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.

HARRISON, P. L.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; MILLER, K.; STRONG, P. N. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon,** v. 88, p. 115-137, 2014.

HARRISON, P. L.; ABDEL-RAHMAN, M. A.; STRONG, P. N.; TAWFIK, M. M.; MILLER, K. Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of Scorpio maurus palmatus. **Toxicon,** v. 117, p. 30-36, 2016.

HE, J.; KRAUSON, A. J.; WIMLEY, W. C. Toward the de novo design of antimicrobial peptides: Lack of correlation between peptide permeabilization of lipid vesicles and antimicrobial, cytolytic, or cytotoxic activity in living cells. **Peptide Science,** v. 102, n. 1, p. 1-6, 2014.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry,** v. 39, n. 29, p. 8347-8352, 2000.

HUANG, Y.-B.; WANG, X.-F.; WANG, H.-Y.; LIU, Y.; CHEN, Y. Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. **Molecular cancer therapeutics**, p. molcanther. 0811.2010, 2011.

HUANG, Y.; HE, L.; LI, G.; ZHAI, N.; JIANG, H.; CHEN, Y. Role of helicity of α-helical antimicrobial peptides to improve specificity. **Protein & cell,** v. 5, n. 8, p. 631-642, 2014.

JANG, H. et al. New structures help the modeling of toxic amyloidß ion channels. **Trends in biochemical sciences**, v. 33, n. 2, p. 91-100, 2008.

JORGENSEN, J. H.; HINDLER, J. F.; RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. **Clinical infectious diseases,** v. 44, n. 2, p. 280-286, 2007.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.; BOSSINGER, C.; COOK, P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry,** v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KAWAGUCHI, A.; SUZUKI, T.; KIMURA, T.; SAKAI, N.; AYABE, T.; SAWA, H.; HASEGAWA, H. Functional analysis of an α-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 398, n. 4, p. 778-784, 2010.

KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; BAZZAZ, B. S. F. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial pathogenesis,** v. 95, p. 32-42, 2016.

LACKOWICZ, J. Principle of Fluorescence Spectroscopy, 2006. **Springer Science and Business Media, LLC, New York. ISBN,** v. 13, p. 978-970, 2006.

LOFFREDO, M. R.; GHOSH, A.; HARMOUCHE, N.; CASCIARO, B.; LUCA, V.; BORTOLOTTI, A.; CAPPIELLO, F.; STELLA, L.; BHUNIA, A.; BECHINGER, B.; MANGONI, M. L. Membrane perturbing activities and structural properties of the frog-skin derived peptide Esculentin-1a(1-21)NH2 and its Diastereomer Esc(1-21)-1c: Correlation with their antipseudomonal and cytotoxic activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1859, n. 12, p. 2327-2339, 2017.

LORENZÓN, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2**. 2015. 116f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

LUCKEY, M. **Membrane structural biology:** with biochemical and biophysical foundations. Cambridge University Press, 2014. 332 p.

LUEPKE, K. H.; SUDA, K. J.; BOUCHER, H.; RUSSO, R. L.; BONNEY, M. W.; HUNT, T. D.; MOHR, J. F. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.

LUNA-RAMÍREZ, K.; SANI, M.-A.; SILVA-SANCHEZ, J.; JIMÉNEZ-VARGAS, J. M.; REYNA-FLORES, F.; WINKEL, K. D.; WRIGHT, C. E.; POSSANI, L. D.; SEPAROVIC, F. Membrane interactions and biological activity of antimicrobial peptides from Australian scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1838, n. 9, p. 2140-2148, 2014.

MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de inibição da atividade da DNA girase**. 2006. 511 f. Tese (Livre-Docência). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MARIA-NETO, S.; DE ALMEIDA, K. C.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1848, n. 11, p. 3078-3088, 2015.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1462, n. 1, p. 1-10, 1999.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society,** v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y.-H.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 112, n. 24, p. E3095-E3103, 2015.

O'NEILL, J. **Review on antimicrobial resistance:** tackling a crisis for the health and wealth of nations**.** 2014. Disponível em: http://amr-review.org/.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides,** v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.

POUNY, Y.; RAPAPORT, D.; MOR, A.; NICOLAS, P.; SHAI, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry,** v. 31, n. 49, p. 12416-12423, 1992.

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides,** v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003.

PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International journal of peptides,** v. 2013, 2013.

RUSSELL, A. L.; KENNEDY, A. M.; SPUCHES, A. M.; VENUGOPAL, D.; BHONSLE, J. B.; HICKS, R. P. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chemistry and physics of lipids,** v. 163, n. 6, p. 488-497, 2010.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1462, n. 1, p. 55-70, 1999.

SUN, J.; XIA, Y.; LI, D.; DU, Q.; LIANG, D. Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,** v. 1838, n. 12, p. 2985-2993, 2014.

SUN, S.; ZHAO, G.; HUANG, Y.; CAI, M.; SHAN, Y.; WANG, H.; CHEN, Y. Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy. **Scientific reports,** v. 6, p. 29145, 2016.

VAN SWAAY, D. Microfluidic methods for forming liposomes. **Lab on a Chip,** v. 13, n. 5, p. 752-767, 2013.

VERLY, R. M. **Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos**. 2010. 182 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers,** v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological reviews,** v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **nature,** v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZENG, X.-C.; ZHOU, L.; SHI, W.; LUO, X.; ZHANG, L.; NIE, Y.; WANG, J.; WU, S.; CAO, B.; CAO, H. Three new antimicrobial peptides from the scorpion Pandinus imperator. **Peptides,** v. 45, p. 28-34, 2013.

ZHANG, S.-K.; SONG, J.-W.; GONG, F.; LI, S.-B.; CHANG, H.-Y.; XIE, H.-M.; GAO, H.-W.; TAN, Y.-X.; JI, S.-P. Design of an α-helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. **Scientific reports,** v. 6, 2016.

ZHANG, Y.; ALGBURI, A.; WANG, N.; KHOLODOVYCH, V.; OH, D. O.; CHIKINDAS, M.; UHRICH, K. E. Self-assembled cationic amphiphiles as antimicrobial peptides mimics: Role of hydrophobicity, linkage type, and assembly state. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 13, n. 2, p. 343-352, 2017.

ZHOU, N.; MANT, C.; HODGES, R. Effect of preferred binding domains on peptide retention behavior in reversed-phase chromatography: amphipathic alpha-helices. **Peptide research,** v. 3, n. 1, p. 8-20, 1990.