

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 09/03/2020.

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

C744s Conceição, Milena Barbosa da
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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

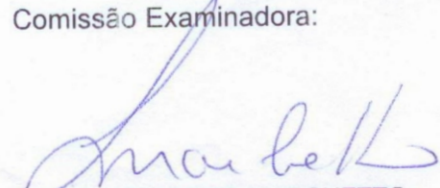
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos"

AUTORA: MILENA BARBOSA DA CONCEIÇÃO

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

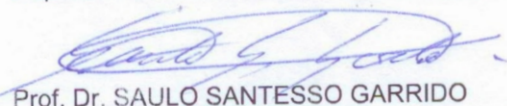
COORIENTADOR: EDSON CRUSCA JUNIOR

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



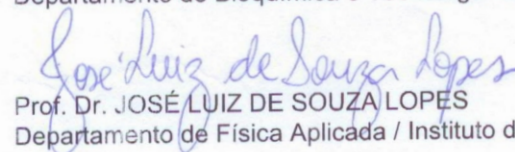
Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

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

Vínculo: 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

européia 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

1º 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 topoisomerasas 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).
- 46^a 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).
- 1^o 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).
- 11^o 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 peptídeos 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 <i>Pandinus imperator</i>	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 <i>helical wheel</i> do peptídeo P3 obtido através da predição estrutural pelo servidor <i>HeliQuest</i> (http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py).	44
Figura 11 - <i>Helical wheel</i> dos peptídeos análogos de P3 obtidos através da predição estrutural pelo servidor <i>HeliQuest</i>	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 30°C.	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 30°C.	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 30°C.....	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 °C. 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 °C. 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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a), 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (c). A identificação por cor de cada peptídeo é P3 (preto), L2K (vermelho), I5K (verde), N7K (azul escuro), I9K (azul claro) e L13K (rosa)..... 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 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	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-fluorenilmetiloxycarbonila

HOBt - *N*-hidroxibenzotriazol

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

LC/ESI-MS - Cromatografia Líquida de Fase Reversa acoplada a Espectrometro de Massas com Ionização 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 Sódio

SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

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 – Ensaio 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).

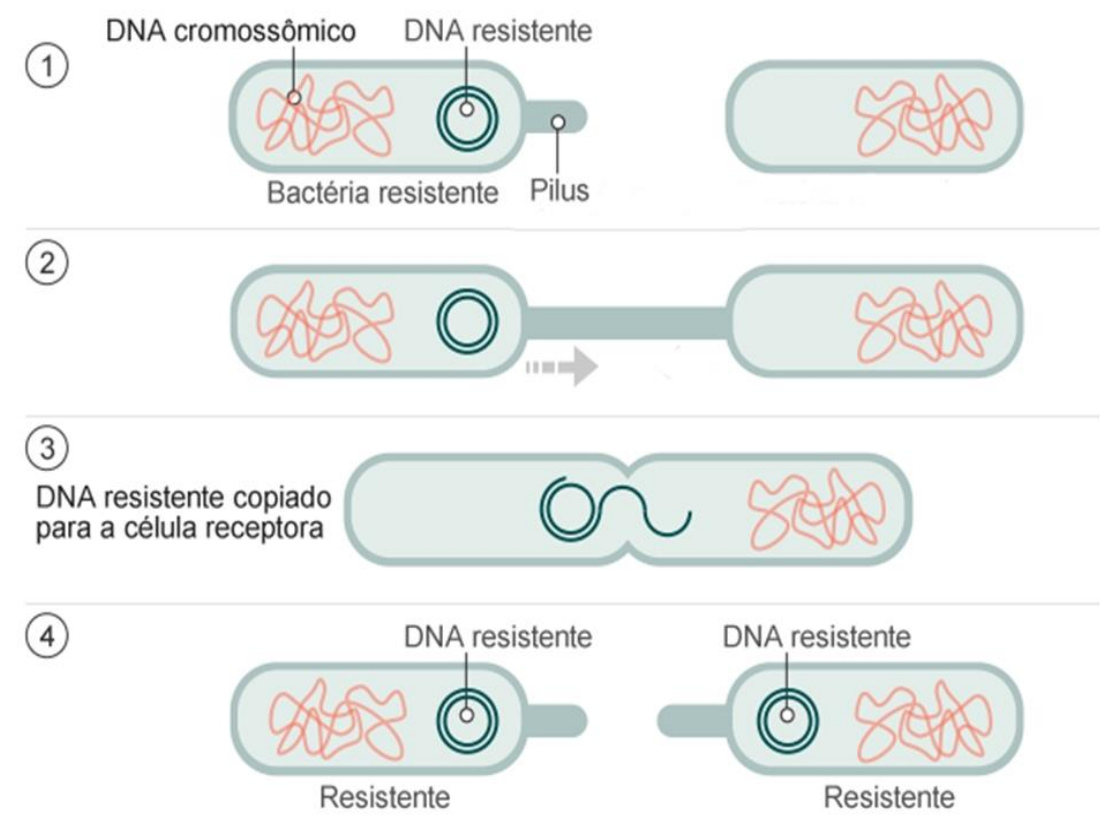
A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno que está relacionado à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antibióticos e pode ocorrer de duas principais formas:

- 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	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente à carbapenema
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente à carbapenema
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente à carbapenema, produtoras de ESBL ¹
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente à vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Resistente à claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i>	Resistente às fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Resistentes às fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente à cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sem sensibilidade à penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente à ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	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).

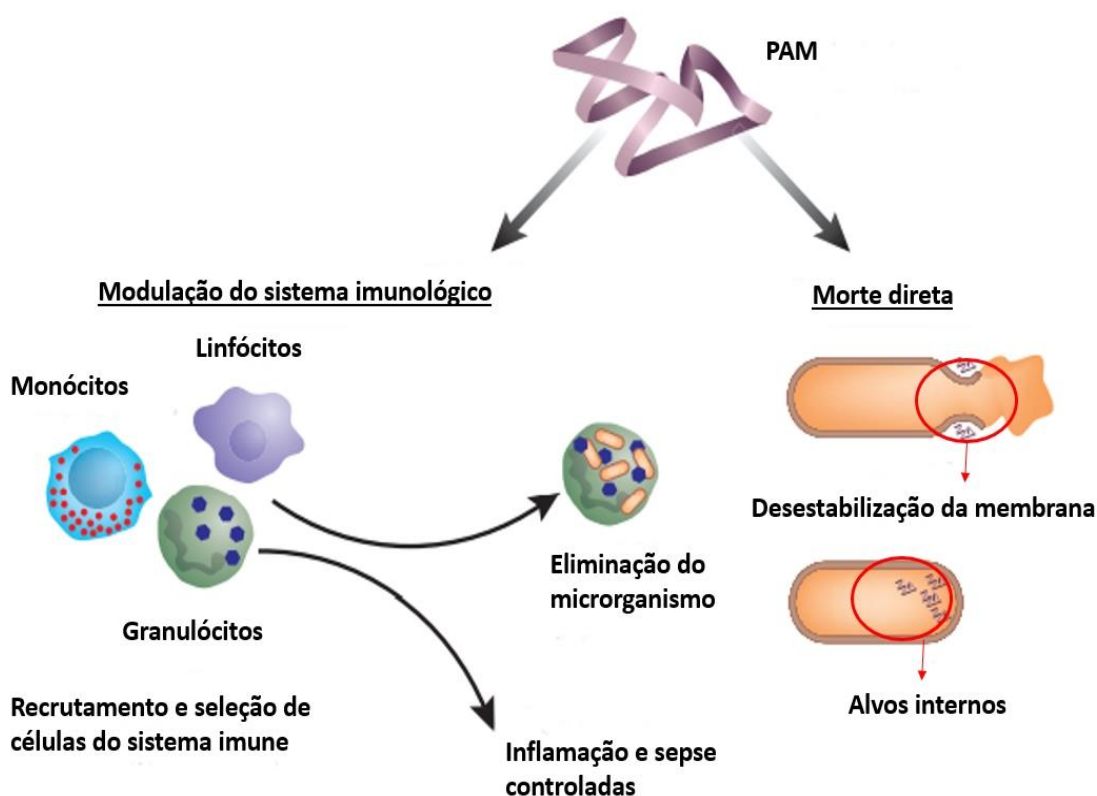
Existem também pesquisas ligadas ao desenvolvimento de novas moléculas para o controle de doenças provocadas por microrganismos patogênicos. Entre essas moléculas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser citados como uma alternativa promissora, pois atuam principalmente por meio de mecanismos nos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

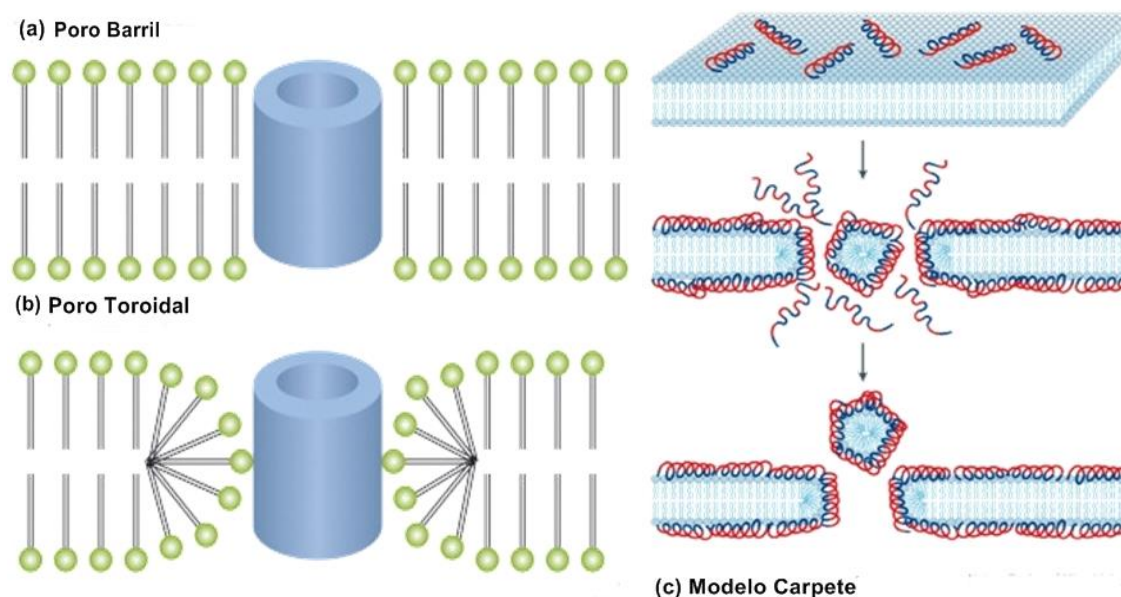
Os PAMs interagem com a membrana plasmática de células bacterianas causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica e ocasionando lise celular, diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos convencionais, que são relativamente mais lentos, pois atuam normalmente em alvos intracelulares. (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 conseqüentemente 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 ($\text{CIM} = 4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) 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).



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 parede 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).

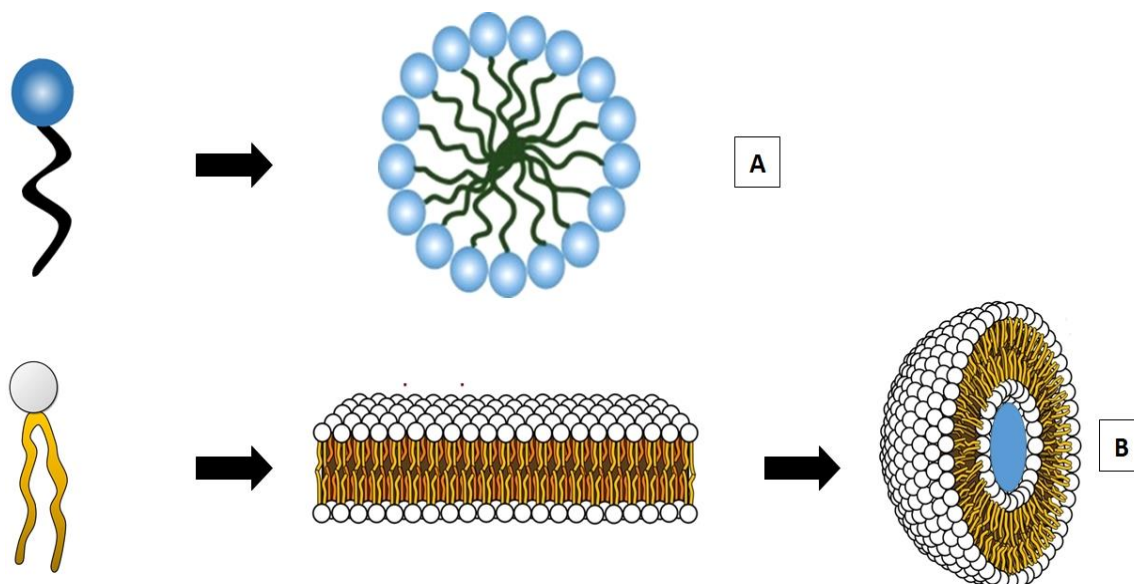
Micelas são agregados esféricos formados por moléculas anfifílicas que se associam espontaneamente em solução aquosa, conforme sua concentração micelar crítica (CMC) (Figura 6-A).

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 concêntricamente ao redor de um compartimento aquoso (BATISTA et al., 2007; LUCKEY, 2014). Também nesta

estruturção, 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)

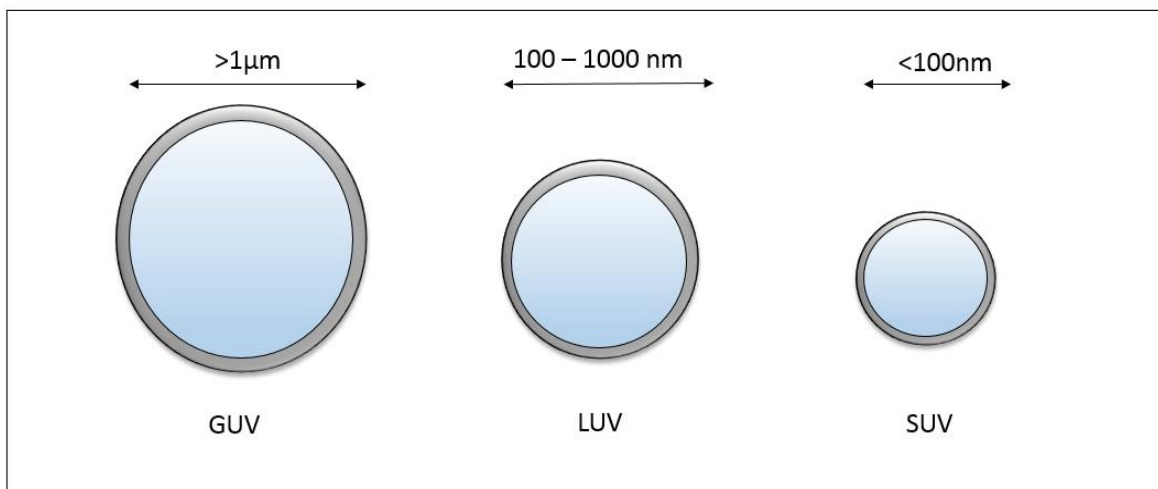
As vesículas são muito utilizadas para mimetizar a composição lipídica da membrana plasmática das células e também como sistemas transportadores de fármacos. Essas vesículas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho (Figura 7), sendo intituladas SUVs, LUVs e GUVs (VAN SWAAY, 2013).

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.



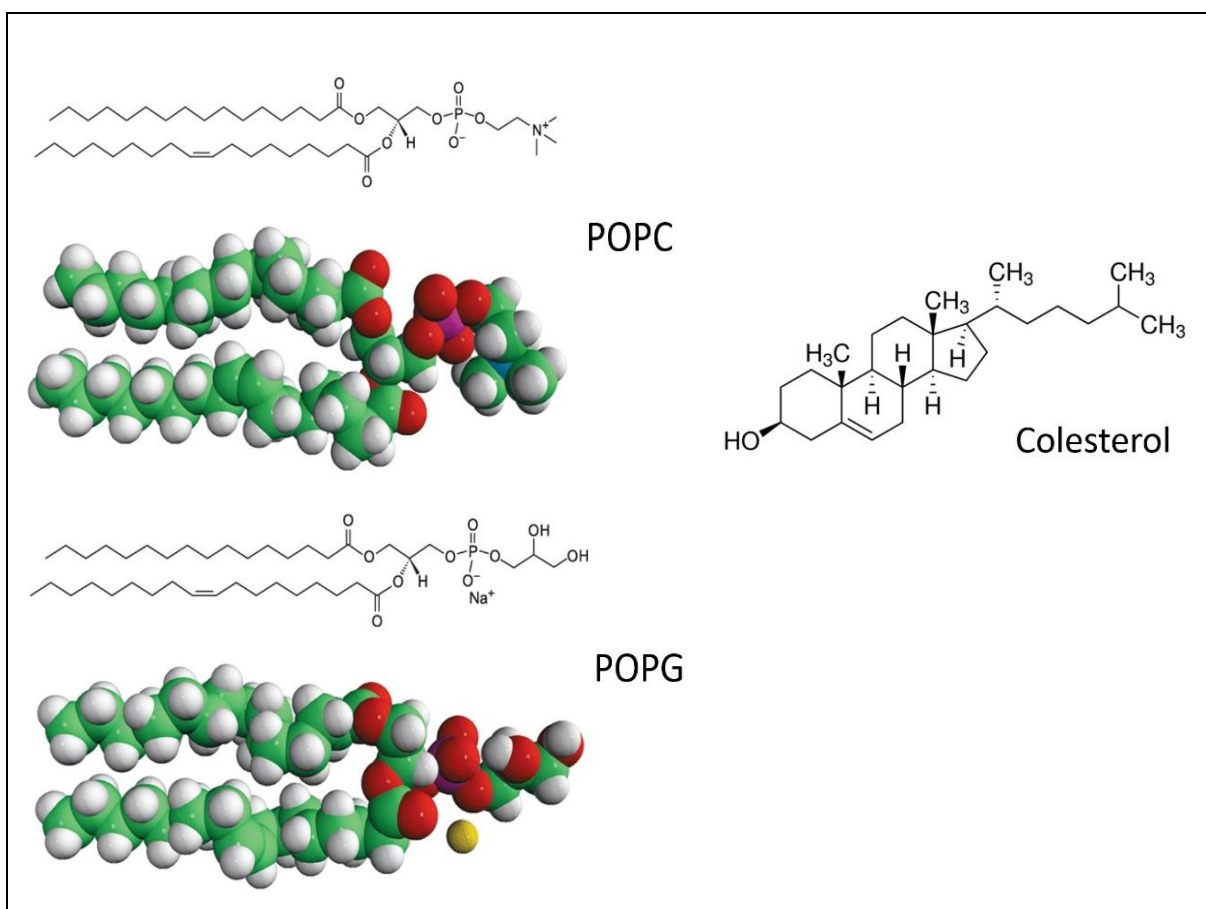
Fonte: Elaborado pela autora.

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 zwitteriônicos (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.

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 um 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 descritos 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 π 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 amyloid β 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.