



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

Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

**Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de
membranas modelo**

São José do Rio Preto
2020

Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo

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

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto
2020

M618i

Miasaki, Kenneth Massaharu da Fonseca

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo / Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki. -- São José do Rio Preto, 2020

97 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: João Ruggiero Neto

Coorientadora: Dayane dos Santos Alvares

1. Biologia Molecular. 2. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 3. Modelos biológicos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Kenneth Massaharu da Fonseca Miasaki

Impacto de peptídeos biologicamente ativos no empacotamento lipídico de membranas modelo

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

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

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

São José do Rio Preto
24 de Março de 2020

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: I) Ilustração da sequência e características dos peptídeos L1A e acL1A. -, +, A e P representam resíduos ácidos, básicos, apolares e polares, respectivamente. II) Representação da projeção helicoidal (Helix wheel projection) do peptídeo L1A para ilustrar as propriedades de alfa-hélice.....	21
Figura 2: Regiões espectrais e cromóforos contribuintes em proteínas.	25
Figura 3: Espectro de CD com curvas características de cada estrutura secundária.	26
Figura 4: Partícula e íons atraídos formando uma camada dupla.....	28
Figura 5: Diagrama de Jablonski: descrição da maioria dos mecanismos de relaxação de estados excitados de moléculas.	30
Figura 6: Espectros de absorção (acima) e emissão (abaixo) dos aminoácidos fluorescentes triptofano (TRP), tirosina (TYR) e fenilalanina (PHE) em água pH 7,0.....	31
Figura 7: Espectro de emissão de uma amostra contendo triptofano e tirosina, onde o comprimento de excitação foi fixado em 275 nm (azul) e em 295 nm (vermelho).	33
Figura 8: Monocamada lipídica.....	33
Figura 9: Placa de Wilhelmy utilizada para medir a tensão superficial.	35
Figura 10: Cuba de Langmuir.....	36
Figura 11: (A) Desenho esquemático de uma isoterma de Langmuir e as diferentes possíveis fases (G, gasosa; LE, líquido-expandida; LC, líquido-condensada e S, sólida) que podem ocorrer durante uma compressão. (B) Compressibilidade e módulo de compressibilidade em função da área por molécula.	37
Figura 12: Isoterma de compressão π -A de DPPC puro em água em diferentes temperaturas (20, 24, 28 e 32 °C).	38
Figura 13: Cuba caseira de área constante.	40
Figura 14: Diagrama de um microscópio de epifluorescência.	41
Figura 15: Estrutura molecular dos lipídios POPE (A) e DOPG (B) e do marcador fluorescente Texas-Red PE (C).	42
Figura 16: Acima: Extrusor Avanti acoplado a duas seringas. Abaixo: Componentes do extrusor.	44
Figura 17: Figura ilustrativa demonstrando o aumento na pressão de superfície após a injeção de peptídeos na subfase.	51
Figura 18: Cuba caseira de área constante com janela óptica.	51
Figura 19: Espectros representativos de dicroísmo circular de 10 μ M de L1A (A) e acL1A (B) em solução salina e na presença de concentração crescente de LUVs de 3POPE/1DOPG em 150 mM NaF pH 7,4 e T= 20 °C.....	52
Figura 20: (A) Fração de estrutura alfa-hélice (f_H) dos peptídeos em função da concentração de lipídios ([L]) para soluções com 10 μ M de L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em contato com vesículas compostas de 3POPE/1DOPG. (B) Isotermas de adsorção obtidas por CD titulando concentração crescente de LUVs [L] de 3POPE/1DOPG em 10 μ M de L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em 150 mM NaF pH 7,4. As linhas contínuas representam o ajuste utilizando a Eq. 9. Os erros foram obtidos a partir de três medidas e representam os máximos e mínimos desviados a partir da média.	54
Figura 21: À esquerda: Gráfico de barras representando a mudança do potencial zeta das vesículas de 3POPE/1DOPG (branco) induzido pelos peptídeos L1A (preto) e acL1A (cinza). À direita: Gráficos representativos da distribuição de tamanho de LUVs de 3POPE/1DOPG na ausência (A) e na presença de L1A (B) e acL1A (C) obtida por DLS. As cores diferentes	

representam repetições dos experimentos. [L] = 40 μ M, [P]= 2 μ M. Estes experimentos foram realizados em 15 mM NaCl.	56
Figura 22: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência do Triptofano dos peptídeos puros (A) L1A e (B) acL1A, e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG, (C) L1A/LUVs e (D) acL1A/LUVs na presença de concentração crescente de acrilamida. [L] = 500 μ M e [P] = 5 μ M.	58
Figura 23: Gráficos representativos de Stern-Volmer de L1A (símbolos quadrados) e acL1A (símbolos redondos) da fluorescência do Triptofano suprimida pela acrilamida em solução salina (símbolos fechados) e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG (símbolos abertos). [L] = 500 μ M e [P] = 5 μ M.	59
Figura 24: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE puro e POPE co-espalhado com concentração crescente de (A) L1A ou (B) acL1A. (C) Isotermas de compressão de POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (linha vermelha) ou acL1A (linha azul). (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C). Subfase: 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.	62
Figura 25: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas de POPE puro (primeira fileira) e co-espalhado com 7,2 mol% L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μ m.	64
Figura 26: Comparação entre a área teórica ocupada pelos peptídeos (círculos abertos) com a área de clusters induzidos pelo L1A (círculos pretos) ou acL1A (círculos cinzas) co-espalhados com POPE em função da concentração de peptídeos. A área ocupada pelos peptídeos foi calculada através das imagens de MF de POPE na presença de peptídeos na pressão de 15 mN/m a 20 °C.	65
Figura 27: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 10 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A).	65
Figura 28: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira fileira) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol % de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μ m.	66
Figura 29: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A).	67
Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μ m.	68
Figura 31: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de DOPG puro (preto) e DOPG co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas mostradas em (A).	69
Figura 32: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por DOPG puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou	

acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm.	70
Figura 33: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e 3POPE/1DOPG co-espalhado com concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 20 °C (C) Comparação do efeito de 7,2 mol% de peptídeo. (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C).	71
Figura 34: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira) e das misturas ternárias 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas, para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm.	72
Figura 35: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e co-espalhada com concentrações crescentes de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 10 °C. (C) Variação da pressão de colapso do peptídeo em função da fração de peptídeo co-espalhado com a mistura lipídica. (D) Área em excesso da área molecular média em função da pressão de superfície para $P/L=0,072$	73
Figura 36: Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas de 3POPE/1DOPG na ausência (preto) e na presença de concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B), em 150 mM NaCl pH 7,4, 10 °C calculado a partir das isotermas mostradas na Figura 35 (A) e (B), respectivamente.	74
Figura 37: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm.	75
Figura 38: Porcentagem da área dos domínios líquido-condensados (LC) em função da pressão de superfície (π) calculada a partir das imagens obtidas por MF.	75
Figura 39: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG (preto) e 3POPE/1DOPG co-espalhados com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas mostradas em (A).	76
Figura 40: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 µm.	77
Figura 41: Inserção dos peptídeos L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em monocamadas lipídicas compostas por POPE (A), DOPG (B) e 3POPE/1DOPG (C) em 150 mM NaCl, pH 7,4, 20 °C. Máxima variação da pressão de superfície $\Delta\pi$ em função da pressão inicial π_{inicial} . As linhas contínuas representam o ajuste linear e os desvios padrão foram obtidos a partir de no mínimo três medidas.	79
Figura 42: Variação induzida na pressão de superfície inicial de 30 mN/m (A) obtida dos experimentos de inserção (Figura 41) e variação de área relativa $\Delta A/A_0$ (B) para os peptídeos L1A (preto) e acL1A (cinza) em monocamadas de POPE, DOPG e 3POPE/1DOPG obtida a partir das isotermas representadas nas figuras 24, 31 e 33.	80

Figura 43: (A) Variação temporal da pressão de superfície (linha azul) da monocamada de 3POPE/1DOPG induzida pela inserção de acL1A na pressão inicial de 30 mN/m e da área escura (linha preta). A seta indica injeção de peptídeo na subfase de 150 mM NaCl, pH 7,4. (B) Imagens representativas de microscopia de fluorescência da monocamada de 3POPE/1DOPG sem inserção de peptídeo (controle, acima), e para a monocamada após ($t=1000s$) a injeção de acL1A na subfase (abaixo). Escala igual a 50 μm . (C) Porcentagem média de área escura (\pm desvios padrão) observada em monocamadas formadas por POPE puro e mistura lipídica 3POPE/1DOPG na ausência (controle) e na presença de L1A ou acL1A a pressão de superfície inicial de 30 mN/m. Todas as medidas foram repetidas no mínimo três vezes para cada condição. 81

Figura 44: Isotermas de compressão dos peptídeos puros L1A (linha contínua) e acL1A (linha tracejada) em subfase composta por NaCl 150 mM, pH 7,4 a 20 °C..... 94

Figura 45: Termogramas de aquecimento de 3POPE/1DOPG na ausência de peptídeos e na presença de L1A ou acL1A na razão L/P = 15 adquiridas na taxa de 0,5 °C/min. 95

Figura 46: Porcentagem de área ocupada por 1,9 nmol de peptídeos (L1A a acL1A, linha preta e cinza, respectivamente) durante a compressão de filmes de peptídeos puros publicados em (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018). Esse número de moléculas de peptídeos corresponde a 7,2 mol% de peptídeos quando co-espalhados com lipídios na interface 97

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Diferentes composições lipídicas dependendo da espécie de bactéria..... 19

Tabela II: Características dos peptídeos L1A e acL1A. 21

Tabela III: Mudanças do diâmetro hidrodinâmico (D_H) e variação relativa do potencial zeta ($\Delta\zeta/\zeta_0$) das vesículas devido à presença dos peptídeos na razão L/P=20. 56

Tabela IV: Parâmetros de supressão e desvios da emissão de fluorescência do triptofano à ligação do peptídeo onde (a): K_{SV} é a constante de Stern-Volmer; (b): ***KVSVLKVSVb*** é a razão da constante de Stern-Volmer em vesículas (***KVSVL***) e em solução salina (***KVSVb***); (c): $\Delta\lambda$ é o “blue-shift”. 59

Tabela V: Pressão de máxima inserção (PMI) obtida a partir dos experimentos de inserção (Figura 41). 79

Tabela VI: Parâmetros termodinâmicos das MLVs de 3POPE/1DOPG na ausência de peptídeos e na presença de L1A ou acL1A. ^(a) Parâmetros para duas transições de fase simétricas indicadas por setas na Figura 45 de DSC. 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – *Atomic Force Microscopy* - Microscopia de Força Atômica
 BAM – *Brewster Angle Microscopy* - Microscopia de Ângulo de Brewster
 CCD - *Charge-Coupled Device* - Dispositivo de carga acoplada
 CD – *Circular Dichroism* – Dicroísmo Circular
 CMC – Concentração Micelar Crítica
 DSC – *Differential Scanning Calorimetry* – Calorimetria Diferencial de Varredura
 DLS – *Dynamic Light Scattering* – Espalhamento Dinâmico de Luz
 EXC – espectro de excitação
 Phe - Fenilalanina

PE – Fosfatidiletanolamina
 PG – Fosfatidilglicerol
 G – Gás (Fase)
 HPLC - *High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência
 LUVs – *Large Unilamellar Vesicles* – Vesículas Unilamelares Grandes
 LC – Líquido-condensada (Fase)
 LE – Líquido-expandida (Fase)
 MF – Microscopia de Fluorescência
 MLVs – *Multilamellar Vesicles* – Vesículas Multilamelares
 NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
 PAMs – Peptídeos antimicrobianos
 acL1A – Peptídeo sintético acL1A (ac-IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂)
 L1A – Peptídeo sintético L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂)
 PMI – Pressão máxima de inserção
 Tyr – Tirosina
 Trp – Triptofano
 TFE – Trifluoroetanol
 POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
 POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
 POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol
 Texas-Red - 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
 DOPG – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol
 DPPC – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
 DPPG – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius
 C – Coulomb
 u – massa molecular
 <H> - hidrofobicidade média
 nm – nanômetros
 D_H – diâmetro hidrodinâmico
 D – coeficiente de difusão translacional
 m²/s – metros quadrados por segundo
 k_B – constante de Boltzmann
 T – temperatura
 η – viscosidade
 mV – milivolts
 ζ – (potencial) zeta
 μ – mobilidade eletroforética
 η – viscosidade do meio
 ε_r – constante dielétrica da água
 ε₀ – permissividade do vácuo
 f(κR') – função de Henry
 κ – inverso do comprimento de Debye
 R' - raio médio das partículas
 mN/m – mili Newton por metro

γ_0 – tensão superficial original da subfase líquida pura
 γ_f – tensão superficial após adição de surfactante abaixo da CMC
 w - espessura da placa de Wilhelmy
 d - largura da placa de Wilhelmy
 F - força resultante que age na placa de Wilhelmy
 γ – tensão superficial
 F_{grav} – força gravitacional que age na placa de Wilhelmy
 F_{emp} – força ascendente que age na placa decorrente do empuxo
 θ – ângulo de contato da subfase com a placa de Wilhelmy
 A – área da cuba
 C_s – compressibilidade do filme
 C_s^{-1} – módulo de compressibilidade
 $\Delta\pi$ - variação de pressão de superfície induzida pelos peptídeos adsorvidos na interface
 C_p - concentração de peptídeos na subfase
 C_{sat} - concentração de saturação de peptídeos
 μM – micromolar
 Γ_{max} – concentração em excesso de peptídeo na superfície
 \ln - logaritmo natural
 R – constante universal dos gases perfeitos
 \AA^2 – angstrom ao quadrado
 $\text{M}\Omega\text{cm}$ – mega ohm centímetro
 A' – absorbância em 279 nm
 l – caminho óptico
 c' – concentração da amostra
 ε – coeficiente de absorvidade molar
 NaCl – cloreto de sódio
 NaF – fluoreto de sódio
 μm – micrometro
 nm/min – nanômetros por minuto
 θ' – elipticidade observada
 Θ – elipticidade molar por resíduo
 $\text{grau.cm}^2/\text{dmol}$ – grau centímetros quadrados por decimol
 c – concentração peptídica
 N_r – número de resíduos de aminoácidos
 Θ_{obs} – elipticidade molar média observada em 222 nm
 Θ_C – elipticidade molar de random coil
 Θ_H – elipticidade molar de um peptídeo totalmente em estrutura alfa-hélice
 f_H – fração de estrutura alfa-hélice
 x – número de grupos CO não ligados por ligação de hidrogênio em um peptídeo carboxilado
 K_p - constante de partição molar
 L ou $[L]$ – concentração de lipídeos
 Θ_{max} – elipticidade molar máxima em 222 nm
 γ' – volume lipídico molar
 I_0 - intensidade de fluorescência inicial
 I - intensidade de fluorescência observada
 K_{SV} – constante de Stern-Volmer
 $[Q]$ – concentração de acrilamida
 mL – mililitros
 cm^2 – centímetros quadrados
 mm/min – milímetros por minuto

A_{ideal} – área ideal
 A_i – área molecular média do componente i
 X_i – fração molar do componente i
 A_{real} – área real
 A_{iL} – área molecular média considerando o número de moléculas de lipídeos
 n_L – número de moléculas de lipídeos espalhados
 n_p – número de moléculas de peptídeos espalhados
 A_{ex} – área em excesso
 A_{12} – área molecular média da mistura
 x_1 – fração molar do componente 1
 x_2 - fração molar do componente 2
 A_1 – área molecular do componente 1 para dada pressão de superfície
 A_2 – área molecular do componente 2 para dada pressão de superfície
 δ – derivada parcial
 π_i – pressão de superfície inicial desejada
 π_f – pressão de superfície no equilíbrio
min – minutos
 Θ_{222} – elipticidade molar em 222 nm
 Θ_{208} – elipticidade molar em 208 nm
P ou [P] – concentração de peptídeos
 M^{-1} – inverso de molar
d.nm – diâmetro em nanômetros
 $\Delta\gamma/\gamma_0$ – variação relativa do potencial zeta
 f_{PG} – fração de lipídeos PG
 z_p – carga líquida do peptídeo
 KV_{SV}^l – constante de Stern-Volmer em vesículas
 KV_{SV}^b – constante de Stern-Volmer em solução salina
 $\Delta\lambda$ – blue-shift
 T_m – temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina
 π_{col} – pressão de superfície de colapso
 $\Delta A/A_0$ – variação de área relativa
 ΔA – variação de área
 A_0 – área em 30 mN/m
 $\Delta\pi_{30}$ – variação induzida na pressão de superfície inicial de 30 mN/m
 ΔC_p – variação de capacidade calorífica
 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ – kilo Joule multiplicado por um sobre mol Kelvin
 ΔH – variação de entalpia
 kJ/mol – kilo Joule por mol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO	24
1.2 METODOLOGIA TEÓRICA	25
1.2.1 EXPERIMENTOS COM VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVS)	25
1.2.1.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	25
1.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética	27
1.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência	29
1.2.2 EXPERIMENTOS COM MONOCAMADAS	33
1.2.2.1 Área variável	35
1.2.2.2 Área constante	38
1.2.2.3 Domínios	40
1.2.2.4 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 MATERIAIS	42
2.2 MÉTODOS	43
2.2.1 EXPERIMENTOS COM VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVS)	43
2.2.1.1 Soluções de peptídeos	43
2.2.1.2 Preparação de LUVs	43
2.2.1.3 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	44
2.2.1.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética	45
2.2.1.5 Supressão da intensidade de fluorescência do triptofano por acrilamida	46
2.2.2 EXPERIMENTOS COM MONOCAMADAS	47
2.2.2.1 Isotermas de compressão	47
2.2.2.1.1 Concentração de lipídios	47
2.2.2.1.2 Análise das isotermas	47
2.2.2.1.3 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)	49
2.2.2.2 Adsorção do peptídeo em monocamadas lipídicas	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 ANÁLISE DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DOS PEPTÍDEOS L1A E SEU ANÁLOGO ACETILADO QUANDO ADSORVIDO NA SUPERFÍCIE DE LUVS CONTENDO 3PE/IPG E MEDIDAS DE AFINIDADE POR EXPERIMENTOS DE ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.	52
3.2 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS PEPTÍDEOS L1A E aCL1A COM LUVS: MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA E DE DIÂMETRO DAS LUVS OBTIDAS POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ, RESPECTIVAMENTE.	55
3.3 SUPRESSÃO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO POR ACRILAMIDA MONITORADA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	57
3.4 IMPACTO DOS PEPTÍDEOS L1A E aCL1A EM MONOCAMADAS LIPÍDICAS.	60
3.4.1 EFEITOS DOS PEPTÍDEOS NA MORFOLOGIA DOS DOMÍNIOS DE MONOCAMADAS LIPÍDICAS	60

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela II: Características dos peptídeos L1A e acL1A.

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

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

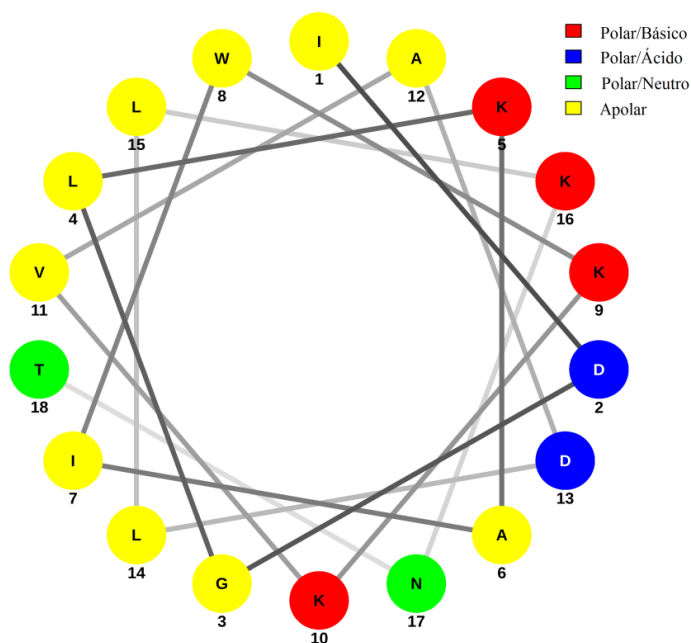
Figura 1: I) Ilustração da sequência e características dos peptídeos L1A e acL1A. -, +, A e P representam resíduos ácidos, básicos, apolares e polares, respectivamente. II) Representação da projeção helicoidal (Helix wheel projection) do peptídeo L1A para ilustrar as propriedades de alfa-hélice.

L1A

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

acL1A

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



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

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

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

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

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

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

1.1 Objetivo

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

1.2 Metodologia Teórica

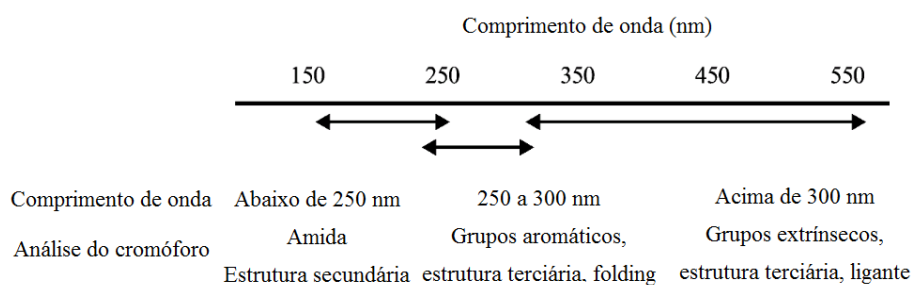
1.2.1 Experimentos com vesículas unilamelares grandes (LUVs)

1.2.1.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

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

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

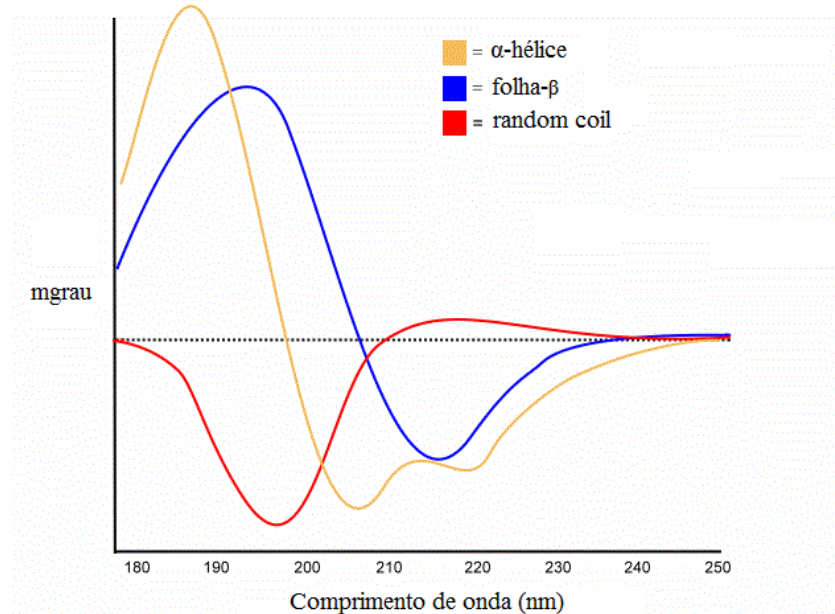
Figura 2: Regiões espectrais e cromóforos contribuintes em proteínas.



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

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

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



Fonte: Adaptado de www.proteinchemist.com.

1.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética

É possível determinar o tamanho médio das partículas em solução. Isso é feito utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Esse experimento consiste em incidir “luz” numa amostra contendo as partículas investigadas em solução. Essas partículas tendem a se mover difusamente de acordo com o movimento Browniano, ou seja, colidem constantemente com as moléculas do solvente, resultando em um movimento aleatório. Estas colisões fazem com que uma quantidade de energia seja transferida, o que induz ao movimento das partículas. Essa transferência de energia é, de certa forma, constante, e tem maior impacto em partículas menores, fazendo com que elas se movam mais rápido do que partículas maiores. Alguns parâmetros influenciam a velocidade das partículas nesse meio como: temperatura, viscosidade e, claro, tamanho. A relação entre esses parâmetros é dada pela relação de Stokes-Einstein (Eq. 1) onde o diâmetro hidrodinâmico (D_H) das partículas é relacionado pelo coeficiente de difusão translacional D , dado em m^2/s :

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

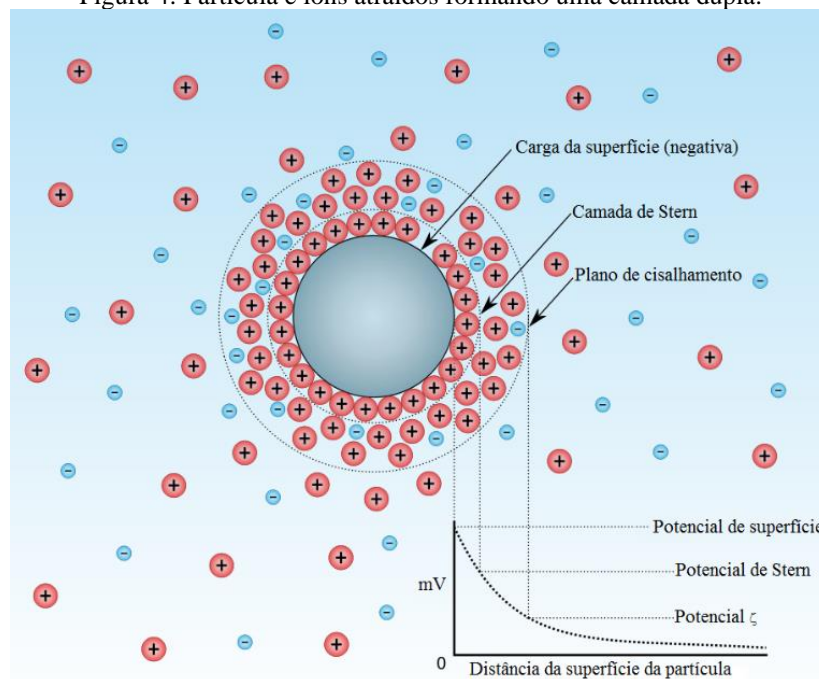
(Eq. 1)

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

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

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

Figura 4: Partícula e íons atraídos formando uma camada dupla.



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

O potencial zeta é calculado pela mobilidade eletroforética das partículas em solução que estão sob um campo elétrico definido por eletrodos de cargas opostas. As partículas em solução encontram resistência devido à viscosidade do meio, e assim que alcançam o equilíbrio, atingem uma velocidade constante. No equipamento utilizado, é possível calcular por velocimetria Doppler a laser a mobilidade eletroforética, já que a velocidade da partícula está

relacionada com a flutuação da intensidade da luz espalhada. O potencial zeta pode ser estimado para amostras com partículas com tamanhos entre 5 nm e 10 µm (DOMINGUES et al., 2008).

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

$$\zeta = \mu \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \frac{1}{f(\kappa R')} \quad (\text{Eq. 2})$$

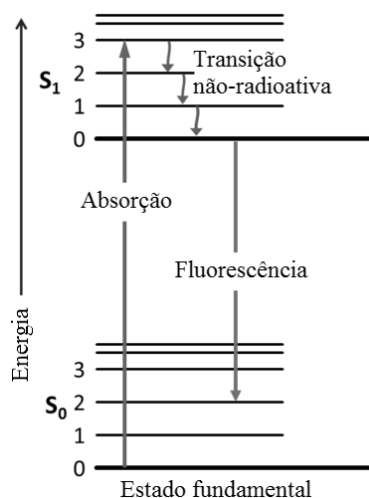
onde μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio, ε_r é a constante dielétrica da água, ε_0 é a permissividade do vácuo e $f(\kappa R')$ é a função de Henry, onde κ e R' são o inverso do comprimento de Debye e o raio médio das vesículas, respectivamente.

1.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência

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

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

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



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

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

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

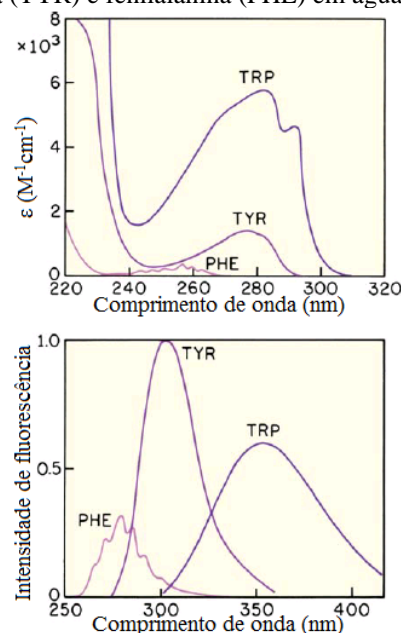
Para medir o espectro de excitação, o monocromador da emissão se mantém constante, enquanto o monocromador da excitação varia seu comprimento de onda. Geralmente o espectro de excitação é semelhante ao espectro de absorção descrito acima, já que a intensidade de fluorescência é proporcional à absorção.

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

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

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

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



Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2013).

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

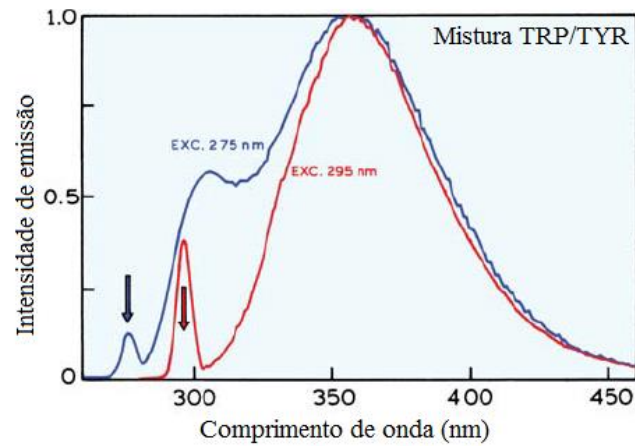
de ser suprimida por algumas moléculas como acrilamida, iodeto, e grupos dissulfeto próximos (LAKOWICZ, 2013).

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

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

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

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

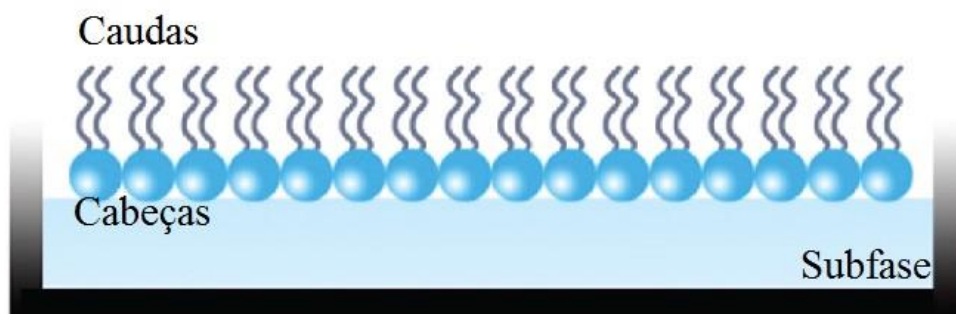


Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2013).

1.2.2 Experimentos com monocamadas

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

Figura 8: Monocamada lipídica



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

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

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

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_f \quad (\text{Eq. 3})$$

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

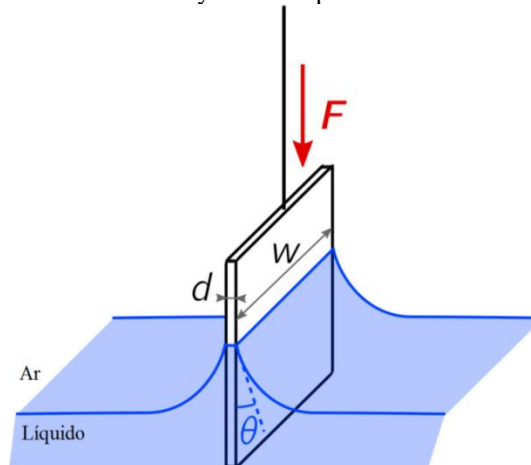
A medição da tensão superficial pode ser feita de diversas maneiras, porém, deve-se escolher com cuidado a técnica dependendo do sistema investigado. No presente trabalho foi utilizado o método Wilhelmy para a medição da tensão superficial. Esse método consiste em mergulhar parcialmente uma placa (que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

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

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

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

Figura 9: Placa de Wilhelmy utilizada para medir a tensão superficial.



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

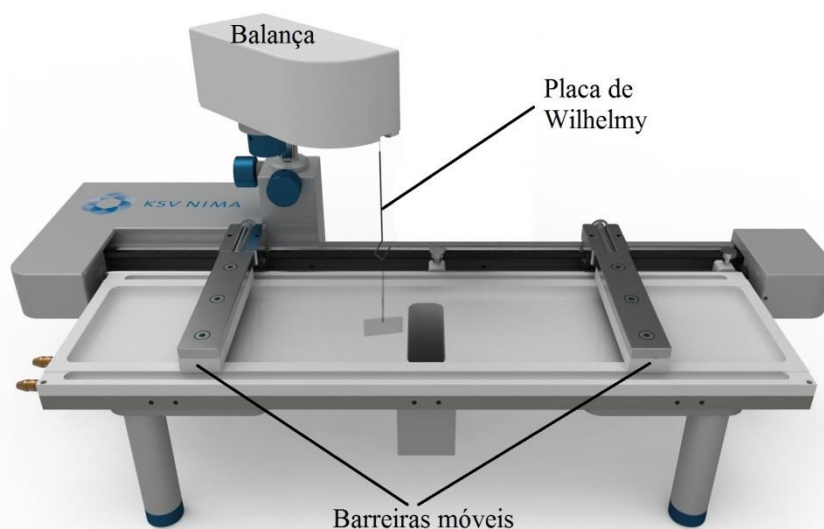
No presente trabalho foram utilizadas monocamadas de duas formas: em que a área é variável e em que a área é constante.

1.2.2.1 Área variável

O primeiro caso é investigado utilizando uma cuba de Langmuir (Figura 10). Essa cuba possui barreiras móveis que se situam na interface água-ar controladas de acordo com as condições experimentais. Após espalhar lipídios diretamente na interface, essas barreiras percorrem a superfície, diminuindo a área em que essas moléculas estão situadas fazendo com que essas moléculas se aproximem entre si e conseqüentemente aumentam as interações entre

elas. Esse filme formado na interface é conhecido como monocamada de Langmuir: filme com espessura de uma molécula diluída em material orgânico insolúvel espalhado na interface água-ar de uma cuba de Langmuir ou cuba de Langmuir-Blodgett. Pode-se também espalhar peptídeos ou lipídios e peptídeos previamente misturados.

Figura 10: Cuba de Langmuir.

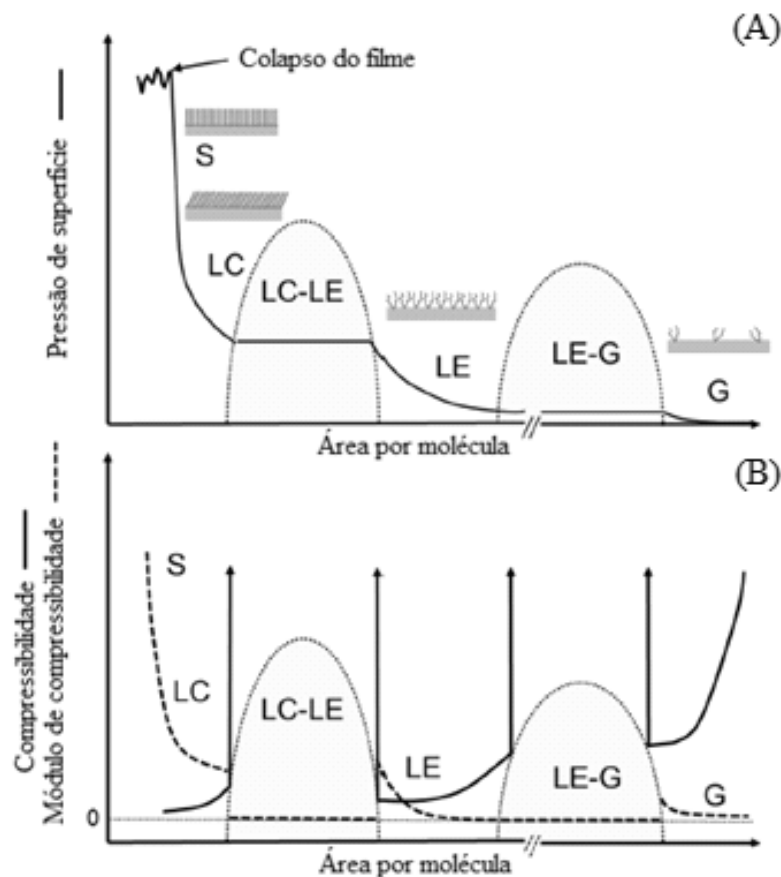


Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Creative Commons.

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

As diferentes fases que o filme pode assumir são: fase gasosa (G), fase líquido-expandida (LE), fase líquido-condensada (LC) e fase sólida (S) (Figura 11, (A)). Cada fase é definida pela extensão das interações das moléculas da monocamada, sendo estas, por exemplo, interações eletrostáticas repulsivas entre as cabeças polares, ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e as moléculas de água, interações de van der Waals entre as cadeias acíclicas etc.

Figura 11: (A) Desenho esquemático de uma isoterma de Langmuir e as diferentes possíveis fases (G, gasosa; LE, líquido-expandida; LC, líquido-condensada e S, sólida) que podem ocorrer durante uma compressão. (B) Compressibilidade e módulo de compressibilidade em função da área por molécula.

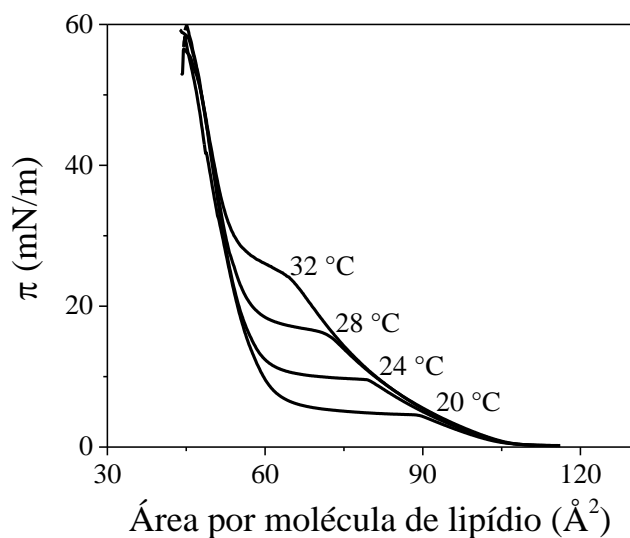


Fonte: Adaptado de (BLUME, 2018).

Decorrida a compressão, a compressibilidade do filme (C_s) diminui devido a um aumento na densidade (Figura 11 (B)). Também é possível obter o módulo de compressibilidade (C_s^{-1}), que será abordado posteriormente (Eq. 14). Usualmente, é possível observar mudanças de fase do filme lipídico numa isoterma, porém isso vai depender do tipo de lipídio ou da mistura de lipídios que compõem o filme lipídico, a presença de peptídeos, e condições de subfase como força iônica, pH e temperatura como exemplificado na Figura 12. Na fase gasosa, usualmente em pressões abaixo de 0,5 mN/m, as moléculas estão muito espaçadas, levando a uma fraca interação entre elas, podendo ser altamente compressíveis. Na transição da fase gasosa para a líquido-expandida (do ponto de vista experimental, sua existência ainda é questionada) (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2010), é observado o valor da área por molécula em que a pressão começa a aumentar a partir de 0 mN/m (*lift-off*). Nesta fase a compressibilidade ainda é alta, porém, ocorre um aumento nas interações entre as cadeias acíclicas e as cabeças polares. Na transição de fase LE-LC, é observada uma diminuição na inclinação da curva e dependendo do caso, um platô. Ao passar de fase fluida de baixa densidade para a fase condensada de mais alta densidade, pode ocorrer o rearranjo das

moléculas formando agregados chamados de domínios, que podem ser visualizados através de diversas técnicas experimentais como microscopia de fluorescência (MF), microscopia de ângulo de Brewster (*Brewster angle microscopy*, BAM) e microscopia de força atômica (*Atomic force microscopy*, AFM) (BLUME, 2018). A discussão a respeito da formação destes domínios será abordada em detalhes posteriormente. Na fase líquido-condensada a compressibilidade se torna mais baixa e as interações entre as cadeias acíclicas, agora, relativamente mais ordenadas, aumentam. A última fase que os lipídios podem se encontrar na interface é a sólida. Neste caso, as moléculas se aderem através de forças de van der Waals entre as cadeias acíclicas, ligações de hidrogênio entre as cabeças polares e a subfase e forças estéricas. Além disso, as moléculas estão altamente ordenadas e sua compressibilidade é a mais baixa de todas as fases. Se a compressão continuar, é possível ocorrer o colapso do filme, onde o ordenamento molecular é destruído e a monocamada pode se deformar, romper ou perder material para a subfase (indicado com uma seta na Figura 11) (BAOUKINA et al., 2008; LEE, 2008; SAAD et al., 2009). Nesse ponto é possível obter a menor área por molécula (GENNIS, 1989).

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

1.2.2.2 Área constante

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

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

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

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

A atividade interfacial de peptídeos é descrita como a habilidade de uma molécula se ligar a uma membrana, particionar numa interface água-ar e alterar a organização e empacotamento dos lipídios (RATHINAKUMAR; WALKENHORST; WIMLEY, 2009; RATHINAKUMAR; WIMLEY, 2008) e depende de suas propriedades físico-químicas e de um balanço entre as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os peptídeos, moléculas de água e lipídios. Essas monocamadas em que moléculas adsorvidas induzem a uma mudança na

tensão superficial são chamadas de monocamadas de Gibbs, diferente das monocamadas espalhadas descritas anteriormente, as monocamadas de Langmuir. Estudos anteriores confirmaram que transições de fase do tipo LE-LC podem ocorrer em monocamadas de Gibbs contendo lipídios (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2010), e assim, levando a possibilidade da formação de domínios, passíveis de serem visualizados por microscopia, por exemplo.

Figura 13: Cuba caseira de área constante.



Fonte: elaborado pelo autor

1.2.2.3 Domínios

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

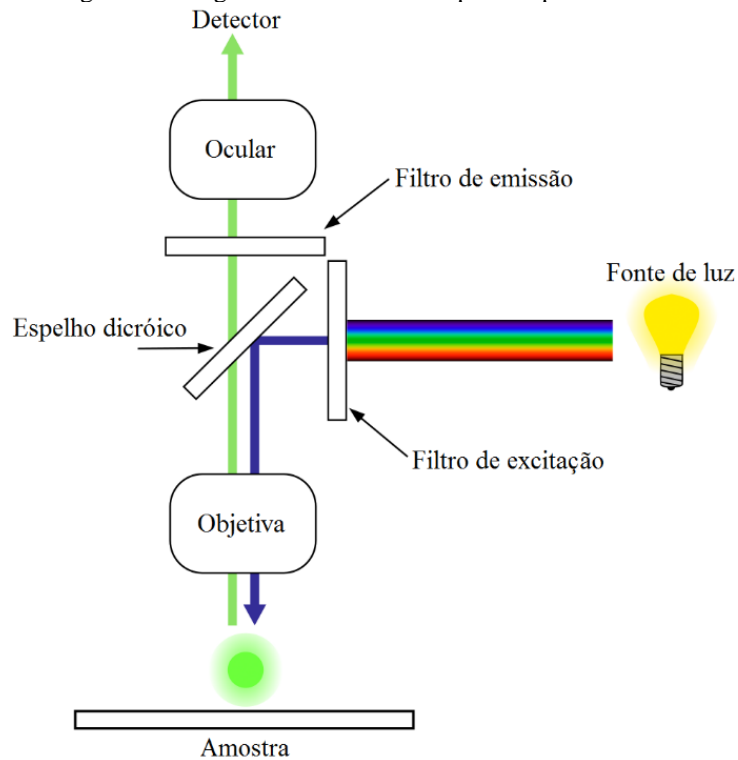
A formação dos domínios é determinada pelas interações intermoleculares entre os próprios lipídios e outros fatores como as condições iônicas, temperatura, pH e outros componentes que compõem a monocamada como peptídeos e impurezas.

1.2.2.4 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)

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

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

Figura 14: Diagrama de um microscópio de epifluorescência.



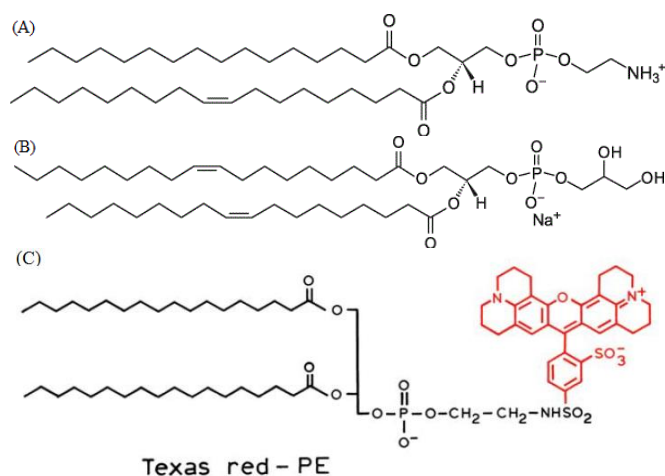
Fonte: Adaptado de www.wikipedia.com, Wikimedia Commons

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os lipídios utilizados foram 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DOPG) adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA). O lipídio com marcador fluorescente Texas-Red, 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (TR-DHPE) foi adquirido de Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). A estrutura molecular dos lipídios e do marcador fluorescente é mostrada na Figura 15. Os peptídeos L1A (IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂) e acL1A (L1A com acetilação no N-terminal) foram adquiridos da Genscript (Piscataway, NJ, USA) com grau de pureza RP-HPLC > 98.5%. Clorofórmio e metanol com grau de pureza HPLC, fluoreto de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Hesse, Germany). Cloreto de sódio, hidróxido de sódio e acrilamida da Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes possuíam grau analítico. Água ultrapura (resistividade ~18 MΩcm) filtrada num sistema Milli-Q da Millipore/Merck (Burlington, MA, USA) foi utilizada no preparo de soluções e em todos os experimentos.

Figura 15: Estrutura molecular dos lipídios POPE (A) e DOPG (B) e do marcador fluorescente Texas-Red PE (C).



Fonte: (A) e (B): Adaptado de www.avantilipids.com. (C): Adaptado de (LAKOWICZ, 2013)

2.2 Métodos

2.2.1 Experimentos com vesículas unilamelares grandes (LUVs)

2.2.1.1 Soluções de peptídeos

Os peptídeos foram dissolvidos em metanol para experimentos de compressão de monocamadas (DENNISON et al., 2009) e em água para todos os outros experimentos para uma concentração final de ~500 μM . Os peptídeos utilizados possuem um resíduo de triptofano em sua sequência de aminoácidos. Por ser uma molécula fluorescente, é possível utilizar dessa característica para a obtenção de diversos parâmetros, entre eles, a concentração da solução de peptídeos. Utilizando um espectrofotômetro, é possível obter a absorbância da amostra, e assim, com o uso da lei de Beer-Lambert (Eq. 5) obtém-se a concentração da solução de peptídeos:

$$A' = lc'\epsilon \quad (\text{Eq. 5})$$

onde A' é a absorbância em 279 nm, l é o caminho óptico em cm, c' é a concentração da amostra em M, e $\epsilon = 5570 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HINZ; GALLA, 2005) é o coeficiente de absorvidade molar. Os espectros de UV da solução de peptídeo foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 3 BIO (Palo Alto, CA, USA).

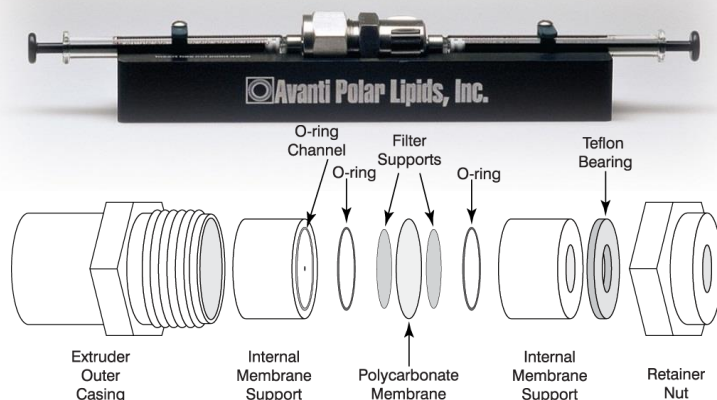
2.2.1.2 Preparação de LUVs

Para obtenção de LUVs, que possuem entre 50 a 500 nm de diâmetro, as soluções de lipídios em clorofórmio/metanol 2/1 (v/v) na proporção e concentração desejadas foram dissolvidas em um tubo de vidro com fundo arredondado. O solvente orgânico foi evaporado sob fluxo constante de N_2 de modo que os lipídios formaram um “filme” fino no fundo do tubo. O solvente remanescente foi, então, retirado sob vácuo por três horas. O próximo passo consistiu em hidratar o filme lipídico (a ~10 °C acima da temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina da solução de lipídios) com solução salina contendo 150 mM de NaCl para experimentos de supressão de fluorescência do triptofano por acrilamida, 150 mM NaF para experimentos de CD e 15 mM NaCl para experimentos de potencial zeta e DLS (a concentração de 15 mM NaCl foi utilizada para evitar danificação dos eletrodos das cubetas de potencial

zeta). Depois, a solução foi agitada em um agitador vórtex por três minutos dando origem às vesículas multilamelares (MLVs).

Essa solução foi submetida ao processo de extrusão utilizando um extrusor “Mini-Extruder” da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) (Figura 16) através de membrana dupla de policarbonato (Whatman Nuclepore Track-Etch Membrane, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, US). Foram feitas 8 e 11 extrusões por membranas de 0,4 e 0,1 μm , respectivamente. O tamanho médio das vesículas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando ZetaSizer Nano NS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) para cada preparação de LUVs. Apenas vesículas “frescas” foram utilizadas.

Figura 16: Acima: Extrusor Avanti acoplado a duas seringas. Abaixo: Componentes do extrusor.



Fonte: www.avantilipids.com

2.2.1.3 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD foram obtidos para os peptídeos na concentração de 10 μM em solução salina (150 mM NaF, pH 7.4) titulada com concentração de LUVs crescentes até 1,3 mM. Os espectros foram coletados por um espectropolarímetro Jasco J-815 (JASCO International Co. Ltd, Tokyo, Japan) acoplado a um sistema Peltier para controle da temperatura. Esses experimentos foram feitos a 20 $^{\circ}\text{C}$, utilizando de 10 a 15 acumulações para cada condição, a uma velocidade de varredura de 50 nm/min, de 260 a 190 nm com resolução de 0,1 nm, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 mm.

A elipticidade observada em cada medida θ' (mgra), após a correção de linha de base e de diluição, foi convertida em elipticidade molar por resíduo Θ (grau.cm²/dmol) seguindo a seguinte relação:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{lcN_r} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde l é o caminho óptico em cm, c é a concentração peptídica em mM, e $N_r=18$ é o número de resíduos de aminoácidos do peptídeo.

A elipticidade molar média observada em 222 nm (θ_{obs}), que corresponde a banda característica de alfa-hélice, foi convertida em fração de alfa hélice f_H utilizando (LUO; BALDWIN, 1997):

$$f_H = \frac{\theta_{obs} - \theta_C}{\theta_H - \theta_C} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde θ_H é a elipticidade molar de um peptídeo totalmente em hélice,

$$\theta_H = (-44000 + 250T)(1 - x/N_r) \quad (\text{Eq. 8})$$

$\theta_C = 1500 \text{ grau cm}^2/\text{dmol}$ é a elipticidade molar de *random coil*, $x = 3$ é o número de grupos CO não ligados por ligação de hidrogênio em um peptídeo carboxilado e $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Também foi calculada a constante de partição molar K_p utilizando a equação abaixo, que serviu para ajustar os gráficos da elipticidade molar normalizada pela elipticidade molar na ausência de vesículas (θ_{obs}/θ_0) em 222 nm em função da concentração de lipídios (L) da monocamada externa, ou seja, metade da concentração de lipídios ($L/2$) (SANTOS; PRIETO; CASTANHO, 2003):

$$\frac{\theta_{obs}}{\theta_0} = 1 + \left(\frac{\theta_{max}}{\theta_0} - 1 \right) \frac{K_p \gamma' L}{1 + K_p \gamma' L} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde θ_{max} é a elipticidade molar máxima em 222 nm e $\gamma' = 0,75 \text{ dm}^3/\text{mol}$ (MARSH, 2013; STAUFFER et al., 2008) é o volume lipídico molar.

2.2.1.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética

As medidas de potencial zeta (ζ) e tamanho médio/diâmetro hidrodinâmico (D_H) de LUVs por mobilidade eletroforética e espalhamento dinâmico de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), respectivamente, foram realizadas utilizando o equipamento ZetaSizer Nano NS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK). Os experimentos de potencial zeta foram feitos utilizando uma célula capilar descartável (DTS1060C) com eletrodos de ouro, enquanto

que as medidas de tamanho foram feitas utilizando cubetas de poliestireno de secção reta quadrada de lado 12 mm (DTS0012). Todos os experimentos foram feitos a 20 °C.

Esses experimentos foram feitos a 15 mM NaCl pH 7,4. Para todas as medidas foi utilizada a concentração de 40 µM de vesículas, na ausência e na presença de 2 µM de peptídeos.

2.2.1.5 Supressão da intensidade de fluorescência do triptofano por acrilamida

Os espectros de supressão de fluorescência foram coletados por um espectrofluorímetro PC1-ISS (ISS, Champaign, IL, USA) a 20 °C utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Os espectros de emissão foram coletados de 315 a 450 nm com comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm, já que ambos os peptídeos possuem um triptofano em sua sequência. As fendas de excitação e emissão utilizadas possuíam largura de 2 mm, e filtros foram utilizados dependendo da intensidade da fluorescência. Também foram utilizados polarizadores cruzados com 90° e 0° na excitação e emissão, respectivamente, a fim de diminuir o espalhamento.

Foi utilizada acrilamida para titular a solução de peptídeo em 150 mM NaCl e pH 7,4, na ausência e presença de suspensão de 500 µM de LUVs de 3POPE/1DOPG. A concentração de acrilamida nessas soluções variou de 0 a 60 mM e a razão lipídio/peptídeo foi de 100. Os espectros obtidos a partir das soluções contendo peptídeos e LUVs foram subtraídos dos espectros obtidos apenas a partir de soluções de LUVs como “branco”. As soluções foram constantemente agitadas utilizando um agitador magnético.

Primeiramente, os dados obtidos foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer para supressão colisional:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Eq. 10})$$

onde I_0 e I são as intensidades de fluorescência medidas manualmente com o cursor no pico de intensidade máxima, na ausência e na presença de acrilamida, respectivamente. K_{SV} é a constante de Stern-Volmer para o processo de supressão colisional e $[Q]$ é a concentração de acrilamida. Assim, um gráfico de I_0/I em função de $[Q]$ (gráfico de Stern-Volmer) deve fornecer uma reta com uma inclinação K_{SV} . Uma característica de apenas um tipo de supressão ocorrendo no sistema é um gráfico linear. Quanto maior o valor da constante de Stern-Volmer, maior a supressão da fluorescência, indicando que o fluoróforo está mais disponível para ser suprimido.

2.2.2 Experimentos com monocamadas

2.2.2.1 Isotermas de compressão

Isotermas de compressão de monocamadas de lipídio e misturas lipídio/peptídeo foram obtidas utilizando uma cuba de Langmuir de Teflon com volume de subfase de 176 mL e área de superfície de 243 cm² (Modelo KN 2002, KSV NIMA/Biolin Scientific, Helsinki, Finland) contendo solução salina. A pressão de superfície (π) foi obtida utilizando uma placa de platina pelo método de Wilhelmy. A pressão e a área total da monocamada foram continuamente registradas utilizando uma unidade de interface KSV minitrough controlada por um computador. O sensor de pressão foi calibrado usando a pressão de superfície da água ultrapura (~72 mN/m) e do ar (0 mN/m) como ponto de referência. Todas essas isotermas foram realizadas dentro de uma caixa de acrílico para garantir um ambiente livre de partículas provenientes do ar passíveis de contaminar a interface e alterar as medidas. Os lipídios ou as misturas lipídio/peptídeo foram espalhados diretamente na superfície na quantidade desejada utilizando microseringas Hamilton (Reno, NV, USA). Além disso, as compressões foram iniciadas dez minutos depois de espalhar os lipídios ou a mistura a fim de garantir completa evaporação do solvente orgânico. A taxa de compressão utilizada para todos esses experimentos foi de 7 mm/min. As áreas moleculares médias foram altamente reprodutíveis com desvios padrão menores do que 3% obtidos para no mínimo 3 medidas para cada condição.

2.2.2.1.1 Concentração de lipídios

Os fosfolipídios utilizados foram dissolvidos em clorofórmio/metanol na proporção 2/1 (v/v) para uma concentração de 1 mM. A concentração dessas soluções foi determinada pelas suas isotermas de compressão em comparação com os dados obtidos da literatura.

2.2.2.1.2 Análise das isotermas

Investigando a miscibilidade dos componentes da monocamada pode-se inferir sobre as interações entre eles. Os componentes podem ser miscíveis, parcialmente miscíveis ou imiscíveis (DYNAROWICZ-ŁĄTKA; KITA, 1999). Uma monocamada mista apresenta um comportamento não-ideal causado por interações moleculares significativas quando suas

propriedades ou funções simples não dependem linearmente da composição da monocamada, indicando um desvio da idealidade (COSTIN; BARNES, 1975). A interpretação da existência das interações entre os componentes na interface é baseada em relação simples de aditividade, comparando a área ideal e a área real da mistura. O cálculo da área ideal é feito abaixo:

$$A_{ideal} = \sum A_i X_i \quad (\text{Eq. 11})$$

onde X_i é a fração molar do componente i (lipídio 1 e/ou lipídio 2 ou peptídeo) na mistura investigada. A_i é a área molecular média do componente i em uma determinada pressão de superfície para seu filme puro.

Para todas as compressões realizadas neste trabalho, a área por molécula média descrita nas isotermas leva em conta apenas o número de moléculas de lipídios espalhadas, desconsiderando, para as misturas lipídios/peptídeos, o número de moléculas de peptídeos. Assim, para estes casos, a área real (considerando que todas as moléculas de peptídeo estão na interface), foi recalculada:

$$A_{real} = A_{iL} \times \frac{n_l}{(n_l + n_p)} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde A_{iL} é a área molecular média considerando o número de moléculas de lipídios, n_l é o número de moléculas de lipídios espalhadas e n_p é o número de moléculas de peptídeos espalhados.

Uma dependência linear da área média por molécula em uma dada pressão com a fração molar de um componente da monocamada indica miscibilidade ideal de moléculas não interagentes ou completa imiscibilidade dos componentes (GAINES, 1966; RUIZ; VILCHEZ, 1991). Em geral, desvios positivos da idealidade, no entanto, indicam que as moléculas interagem menos intensamente quando comparado às interações que ocorrem em filmes de cada componente puro. Desvios negativos indicam interações fortes, que são consideradas maiores que as observadas em filmes de cada componente (PHILLIPS; GRAHAM; HAUSER, 1975).

Também é possível avaliar essas interações utilizando o cálculo da área em excesso (A_{ex}), calculado das isotermas comparando a área molecular média da mistura, A_{12} , com a área ideal de uma mistura (ALI et al., 1994):

$$A_{ex} = A_{12} - (A_1X_1 + A_2X_2)$$

(Eq. 13)

Onde X_1 e X_2 são as frações molares do componente 1 (lipídio ou mistura de lipídios) e do componente 2 (peptídeo), respectivamente, e A_1 e A_2 são as áreas moleculares médias correspondentes para uma dada pressão de superfície. Para esses cálculos, a área molecular média foi recalculada considerando o número total de moléculas na interface (peptídeos e lipídios).

Para algumas condições o comportamento elástico do filme também foi investigado através do módulo de compressibilidade, C_s^{-1} (ALI, S; BROCKMAN; BROWN, 1991).

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T$$

(Eq. 14)

onde A é a área por molécula, e a derivada corresponde a inclinação da curva em uma pressão de superfície particular π . O módulo de compressibilidade, inverso da compressibilidade C_s , é calculado a partir das isotermas de pressão de superfície em função da área ($\pi - A$). É possível determinar, utilizando essa variável, regiões de transição de fase e diferentes fases nas isotermas. Analisando a Figura 11, um desenho esquemático, é possível observar para C_s e C_s^{-1} descontinuidades nas regiões de transição de fase, em que C_s tende a infinito e C_s^{-1} tende a zero (BLUME, 2018). Porém, em casos reais, a região LC-LE não possui inclinação zero, mas um número finito, e o início da transição de fase não é tão abrupto como mostrado.

2.2.2.1.3 Visualização de monocamadas por microscopia de fluorescência (MF)

Para os experimentos de compressão visualizados por MF, foi utilizada uma cuba de Langmuir de Teflon com volume de subfase de 109 mL e área de superfície de 243 cm² (Modelo KN 3003, KSV NIMA/Biolin Scientific, Helsinki, Finland). Esta cuba possui um orifício no seu centro em que há uma lamínula, atuando como uma janela para ser montada acima da objetiva de um microscópio. Utilizou-se um microscópio de fluorescência invertido Olympus (Modelo IX-71, Shinjuku, Tokyo, Japan) equipado com filtros fluorescentes e uma câmera CCD para a visualização das monocamadas. Para estes experimentos, foi utilizada junto com a solução a ser espalhada na interface uma pequena fração (0,1 mol%) de lipídio com sonda fluorescente Texas-Red que particiona na fase lipídica fluida. Este marcador é excluído da fase

condensada, fazendo com que os domínios líquido-condensados (LC) ou agregados/clusters fiquem negros e visíveis na transição de fase.

Toda a análise da área ocupada pelos domínios foi realizada utilizando o software de processamento de imagens Fiji/ImageJ (NIH free ImageJ).

2.2.2.2 Adsorção do peptídeo em monocamadas lipídicas

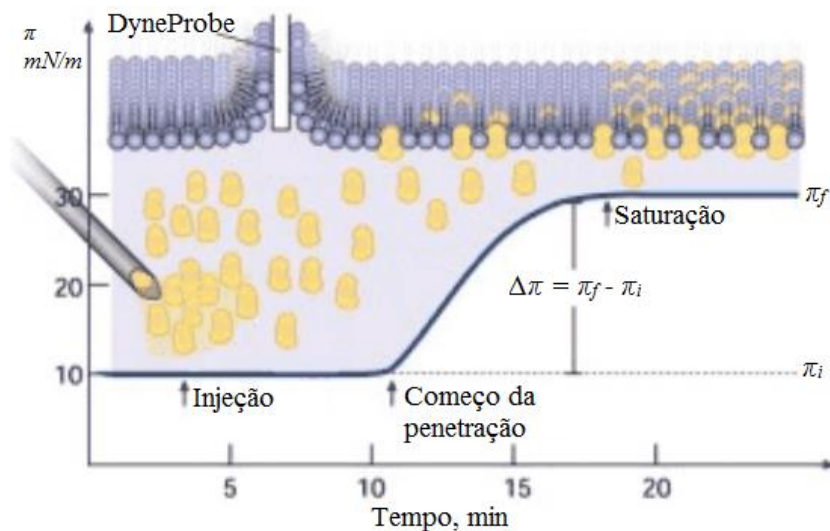
Experimentos de adsorção de peptídeos em monocamadas lipídicas foram realizados em uma cuba caseira circular de Teflon (

Figura 13) com volume de subfase de 4,5 mL e área de superfície de 7 cm². Essa cuba foi montada sobre um agitador magnético a fim de acelerar a difusão do soluto adicionado. A pressão de superfície foi registrada com uma microbalança DeltaPi (Kibron, Helsinki, Finland) equipada com uma haste de uma liga metálica inerte que serve como placa de Wilhelmy (DyneProbe).

Lipídios foram espalhados na interface 150 mM NaCl-ar até atingir um valor de pressão de superfície desejado (π_i). Após aproximadamente dez minutos de espera para o solvente orgânico evaporar, foi injetada na subfase uma alíquota de peptídeo utilizando uma seringa Hamilton, de modo que a concentração de peptídeo na subfase fosse 1,25 μ M. Essa concentração corresponde à mínima concentração em que o peptídeo tem máxima atividade de superfície (ALVARES;WILKE;RUGGIERO NETO, 2018). A variação da pressão de superfície induzida pelos peptídeos foi monitorada pelo tempo até atingir o equilíbrio (π_f).

Para cada pressão de superfície inicial π_i , ocorre uma variação da pressão de superfície induzida pelos peptídeos $\Delta\pi = \pi_f - \pi_i$ (Figura 17), de forma que, aumentando gradativamente a pressão inicial, eventualmente não há mais variação da pressão induzida pelos peptídeos ($\Delta\pi = 0$). Fazendo o gráfico $\Delta\pi$ por π_i é possível obter a pressão máxima de inserção (PMI) que corresponde à pressão de superfície limite acima da qual não há mais inserção de peptídeo na monocamada lipídica. Todos os experimentos foram realizados a aproximadamente 20 °C.

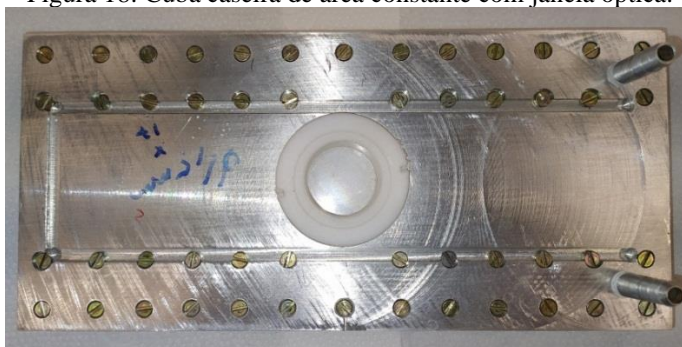
Figura 17: Figura ilustrativa demonstrando o aumento na pressão de superfície após a injeção de peptídeos na subfase.



Fonte: Adaptado de www.kibron.com

Também foi utilizada uma cuba caseira de área constante de volume de 1 mL com janela óptica montada no microscópio (Figura 18) a fim de observar a possível formação de domínios induzida pela incorporação de peptídeos no filme lipídico. Nestes experimentos, entretanto, não foi utilizado agitador magnético de forma que a adsorção foi feita em condições de equilíbrio: a solução de peptídeos se difundiu espontaneamente. Isso também é feito de forma que a monocamada visualizada permaneça estável e possibilite sua visualização sem ruídos. A visualização das monocamadas começou depois da pressão de superfície inicial atingir o equilíbrio. Após esperar o solvente da solução de lipídios evaporar, deu-se início à medição da pressão de superfície e, após aproximadamente dois minutos, foi inserida a solução de peptídeos na subfase e então foi feita a visualização até que a pressão de superfície atingida permanecesse constante.

Figura 18: Cubo caseira de área constante com janela óptica.



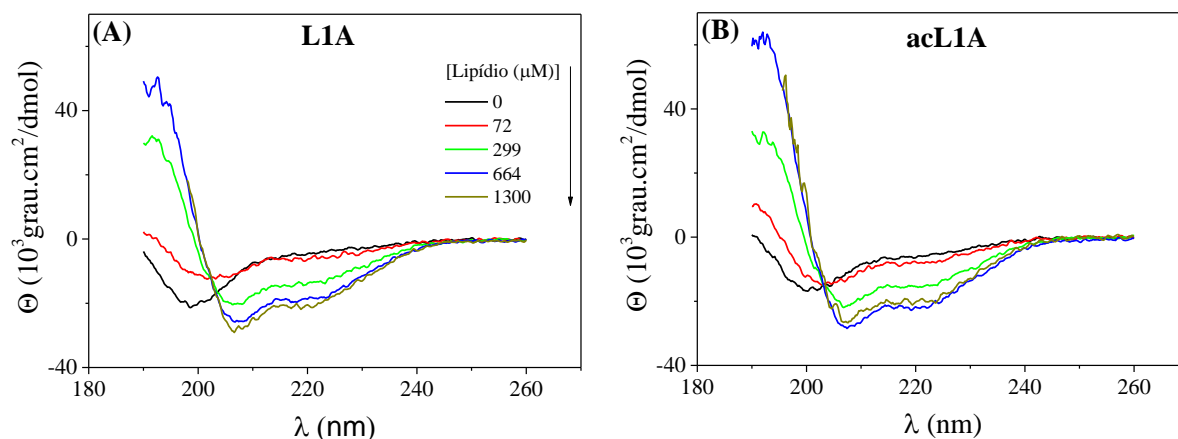
Fonte: elaborado pelo autor

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise da mudança conformacional dos peptídeos L1A e seu análogo acetilado quando adsorvido na superfície de LUVs contendo 3PE/1PG e medidas de afinidade por experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular.

Peptídeos antimicrobianos em solução, em geral, não têm estruturas secundárias em condições fisiológicas. Porém, ao particionarem em bicamadas, interagem com os lipídios podendo assumir estrutura secundária que geralmente é alfa-hélice. Essa estruturação pode ter papel importante no modo como o peptídeo irá atuar nessas membranas como já evidenciado para outro peptídeo antimicrobiano (LUONG et al., 2017). Dessa forma, a estrutura secundária foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular na ausência e na presença de concentrações crescentes de LUVs de 3POPE/1DOPG como mostrado na Figura 19.

Figura 19: Espectros representativos de dicroísmo circular de 10 μM de L1A (A) e acL1A (B) em solução salina e na presença de concentração crescente de LUVs de 3POPE/1DOPG em 150 mM NaF pH 7,4 e T= 20 °C.



Fonte: elaborado pelo autor

Os espectros apresentados na Figura 19 mostraram que, quando em solução, os peptídeos possuem um espectro característico de estrutura aleatória/desestruturada (*random coil*), com uma banda negativa em torno de 195 nm. Conforme ocorre a titulação de suspensão de LUVs, mudanças nos espectros ocorrem decorrentes da mudança conformacional dos peptídeos em solução, cujos espectros assumem um perfil característico de estrutura alfa-hélice

(Figura 19), com duas bandas negativas em torno de 208 e 222 nm, e uma banda positiva em torno de 193 nm (CORRÊA; RAMOS, 2009; FASMAN, Gerald D., 1996; GREENFIELD, 2009).

É importante notar, no entanto, que, para um espectro característico de uma molécula que assume inteiramente uma estrutura alfa hélice, as duas bandas negativas têm a mesma magnitude, ou seja, $\Theta_{222}/\Theta_{208} \approx 1$. Esta razão pode servir como um parâmetro para investigar as interações entre diferentes alfa-hélices, ou seja, quando esse valor é igual a um, pode-se concluir que há estruturas como “*coiled-coil*” (alfa-hélices enroladas como uma corda) (LAU; TANEJA; HODGES, 1984). Para os dois peptídeos isso não ocorre, pois a banda negativa em 208 nm é mais intensa que a banda negativa em 222 nm, e a razão $\Theta_{222}/\Theta_{208} \approx 0,8$, sugerindo que até a maior razão lipídio/peptídeo (L/P = 130), os peptídeos estão em forma monomérica nas vesículas (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018; MATSUZAKI et al., 1994).

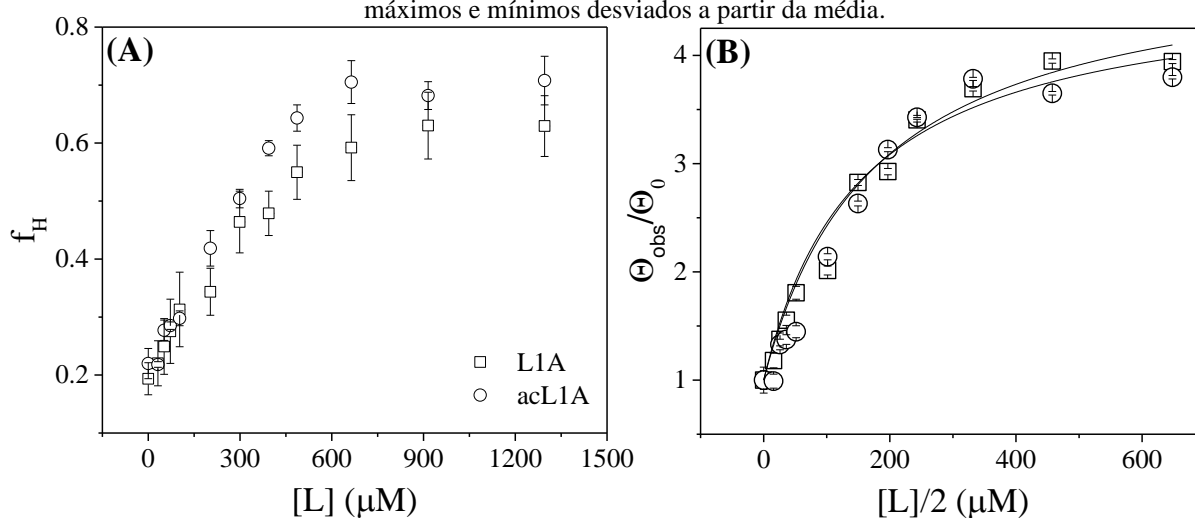
É possível notar na Figura 19, que existe um comprimento de onda específico em que a absorvância total da amostra não sofre alteração conforme titulação de vesículas. Esse ponto é conhecido como ponto isodicroico (BRASLAVSKY, 2007), indicando que o experimento foi feito em condições de equilíbrio, e que existem apenas duas espécies em solução: livres e ligadas (ALVARES; CABRERA; RUGGIERO NETO, 2016). Ou seja, a presença deste ponto, neste caso, mostra que há apenas duas conformações possíveis para os peptídeos assumirem, *random coil*, em solução, ou alfa-hélice, ligados nas membranas. Calculando a porcentagem de alfa-hélice utilizando a equação Eq. 7 é possível observar o aumento de conteúdo helicoidal dos peptídeos na presença de concentrações crescentes de LUVs e que o peptídeo acetilado possui conteúdo helicoidal ligeiramente maior do que o L1A, como mostrado na Figura 20 (A).

As propriedades da alfa-hélice podem influenciar o quão profunda é a inserção desses peptídeos em membranas, que pode, então, levar a atividade antimicrobiana. Mecanismos de ação como poros toroidais, barris, carpete entre outros, ocorrem de forma conjunta, ou seja, várias dessas moléculas interagem entre si para agir na membrana (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Os resultados anteriores mostram que, para estes peptídeos, o mecanismo de ação envolve a adsorção desses peptídeos em forma de monômeros de alfa-hélice. O mecanismo pode ocorrer cooperativamente, porém, esses resultados sozinhos ainda não são o suficiente para responder como esses peptídeos adsorvem nas bicamadas e se é o suficiente para causar defeitos ou poros.

Considerando a variação da elipticidade em 222 nm com o aumento da concentração de lipídio da monocamada externa das vesículas (metade da concentração total) em relação à

elipticidade em solução é possível estimar, utilizando a Eq. 9 (pág. 45), a afinidade dos peptídeos pela membrana como mostrado na Figura 20 (B).

Figura 20: (A) Fração de estrutura alfa-hélice (f_H) dos peptídeos em função da concentração de lipídios ($[L]$) para soluções com 10 μM de L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em contato com vesículas compostas de 3POPE/1DOPG. (B) Isotermas de adsorção obtidas por CD titulando concentração crescente de LUVs $[L]$ de 3POPE/1DOPG em 10 μM de L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em 150 mM NaF pH 7,4. As linhas contínuas representam o ajuste utilizando a Eq. 9. Os erros foram obtidos a partir de três medidas e representam os máximos e mínimos desviados a partir da média.



Fonte: elaborado pelo autor

As afinidades dos peptídeos pelas LUVs estimadas das constantes de partição K_p obtidas das isotermas mostradas acima são similares, considerando o erro experimental (8 ± 1 e $9 \pm 2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para L1A e acL1A, respectivamente).

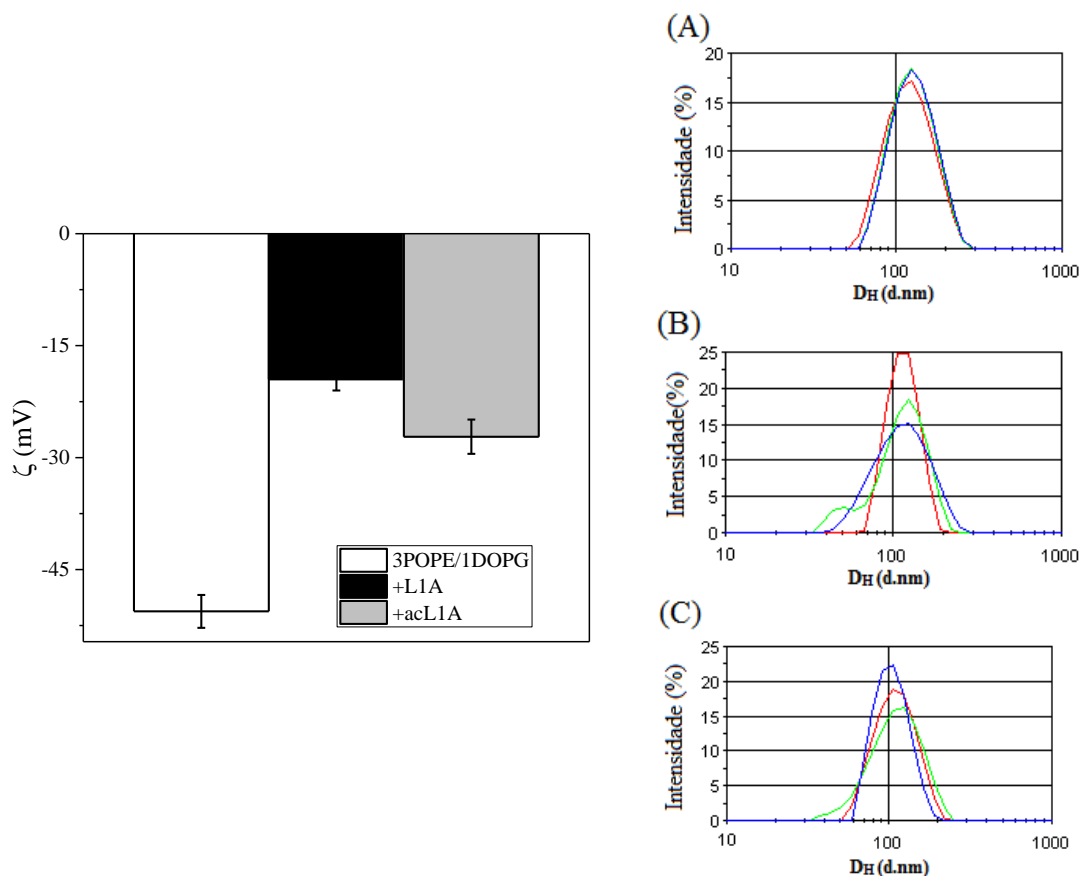
O fato de a afinidade possuir o mesmo valor para ambos os peptídeos, considerando o erro experimental, é de extrema relevância. Os peptídeos antimicrobianos são seletivos a membranas aniônicas e não a membranas zwitteriônicas, e, por isso, são candidatos a alternativas para antibióticos. A seletividade que é guiada eletrostaticamente não foi afetada pela redução da carga do peptídeo L1A devido à acetilação, e isso demonstra que, embora a interação seja modulada eletrostaticamente inicialmente, essa característica por si só não é um impeditivo para a afinidade dos peptídeos com carga menor.

3.2 Análise da interação dos peptídeos L1A e acL1A com LUVs: medidas de potencial zeta e de diâmetro das LUVs obtidas por mobilidade eletroforética e espalhamento dinâmico de luz, respectivamente.

A fim de verificar se a presença dos peptídeos L1A e acL1A afeta o tamanho e a densidade de cargas de LUVs compostas de 3POPE/1DOPG, foram realizados experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e de potencial zeta, respectivamente. O gráfico da distribuição de tamanho das LUVs se encontra na Figura 21, e as medidas obtidas se encontram na tabela III abaixo. Os resultados demonstraram que, para a razão lipídio/peptídeo utilizada e considerando o erro experimental, os diâmetros médios das vesículas na presença dos dois peptídeos foram iguais ao diâmetro médio na ausência de peptídeo, indicando que não houve agregação das vesículas.

Dessa forma, foi medido o potencial zeta das LUVs na ausência e na presença dos peptídeos L1A e acL1A (Figura 21). Foi observado que na presença de peptídeos, as vesículas tiveram seu potencial zeta menos negativo, ou seja, a carga dessas partículas foi parcialmente neutralizada pela adsorção dos peptídeos, com mais ênfase no L1A, que é mais positivo (+3) comparado com acL1A (+2).

Figura 21: À esquerda: Gráfico de barras representando a mudança do potencial zeta das vesículas de 3POPE/1DOPG (branco) induzido pelos peptídeos L1A (preto) e acL1A (cinza). À direita: Gráficos representativos da distribuição de tamanho de LUVs de 3POPE/1DOPG na ausência (A) e na presença de L1A (B) e acL1A (C) obtida por DLS. As cores diferentes representam repetições dos experimentos. [L] = 40 μ M, [P] = 2 μ M. Estes experimentos foram realizados em 15 mM NaCl.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela III: Mudanças do diâmetro hidrodinâmico (D_H) e variação relativa do potencial zeta ($\Delta\zeta/\zeta_0$) das vesículas devido à presença dos peptídeos na razão L/P=20.

Medida	3POPE/1DOPG	+ L1A	+ acL1A
D_H (nm)	127,0 \pm 3,4	132,9 \pm 6,7	124,4 \pm 1,9
$\Delta\zeta/\zeta_0$	-	0,61 \pm 0,04	0,46 \pm 0,05

Fonte: elaborado pelo autor

A variação relativa do potencial zeta ($\Delta\zeta/\zeta_0$, Tabela III) induzida pelos peptídeos é um parâmetro relacionado à carga da superfície da vesícula e depende da quantidade de lipídios carregados, da carga líquida dos peptídeos e da quantidade de peptídeos adsorvidos na membrana externa ($X_{\text{peptídeo}}$), da orientação e da profundidade da inserção dos peptídeos e das

propriedades da nuvem iônica. Dos valores de $\Delta\zeta/\zeta_0$ e assumindo que cada carga de peptídeo neutraliza a carga de um lipídio, foi estimado $X_{\text{peptídeo}}$ (FREIRE et al., 2011) $X_{\text{peptídeo}} = \frac{|\Delta\zeta| f_{PG}(L/P)}{|\zeta_0| z_p}$, onde a fração de PG, $f_{PG} = 25\%$, e z_p é a carga líquida do peptídeo.

Este valor encontrado foi praticamente o mesmo para ambos os peptídeos, valendo 0.51 ± 0.05 e 0.58 ± 0.06 para o L1A e o acL1A, respectivamente. Esses valores indicam que a maior neutralização de carga das vesículas induzida pelo L1A está relacionada com a carga líquida mais positiva desse peptídeo. Além disso, a carga positiva da região N-terminal do L1A ausente para o análogo acetilado interage com os grupos cabeça polar da bicamada lipídica, como proposto em (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

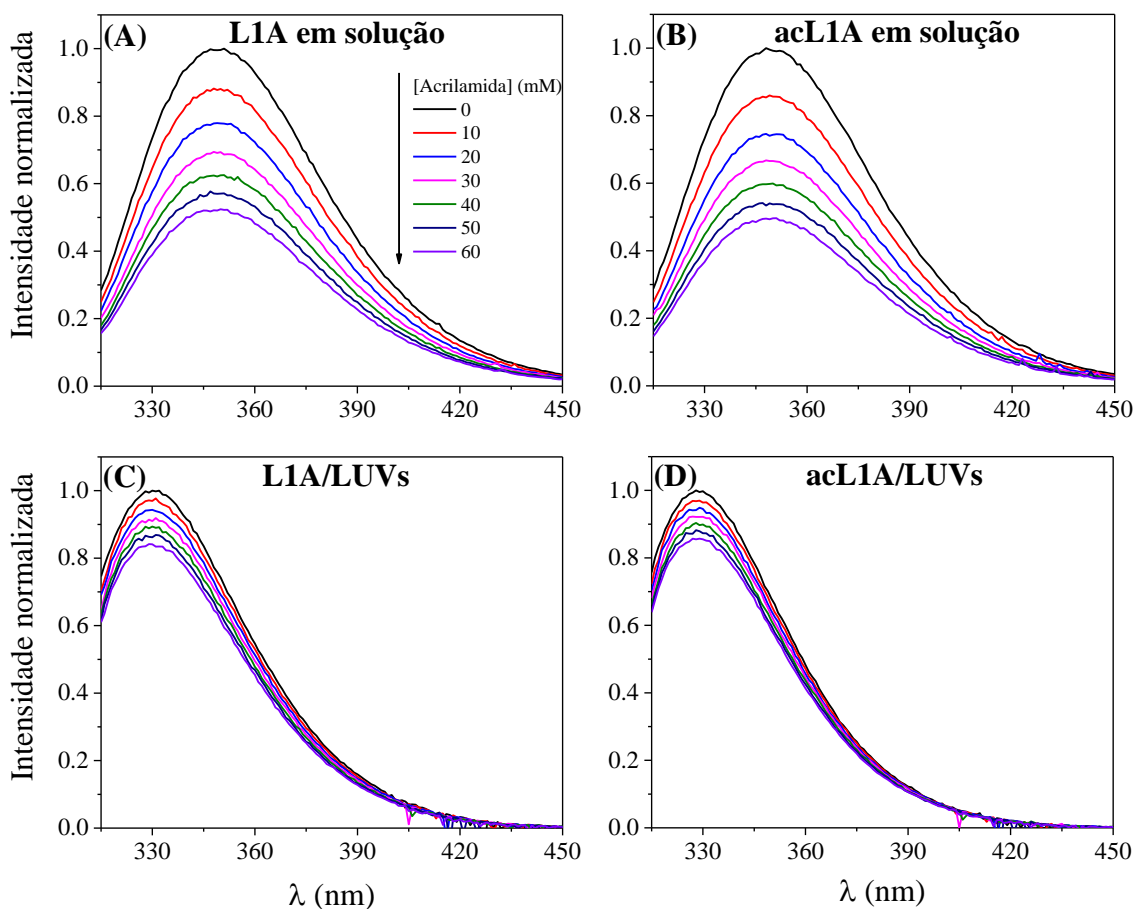
A mudança na carga das vesículas é uma evidência da adsorção desses peptídeos na bicamada, mas não é evidência se há inserção ou, ainda, se há impacto no empacotamento lipídico.

3.3 Supressão de emissão de fluorescência do triptofano por acrilamida monitorada por espectroscopia de fluorescência.

Estes experimentos foram realizados com o intuito de investigar a extensão de penetração dos peptídeos em LUVs de 3POPE/1DOPG.

A Figura 22 mostra a variação da intensidade de fluorescência normalizada do triptofano em função do comprimento de onda de emissão quando se titula acrilamida em soluções apenas de peptídeos (A e B) e em soluções de peptídeos com LUVs (C e D).

Figura 22: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência do Triptofano dos peptídeos puros (A) L1A e (B) acL1A, e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG, (C) L1A/LUVs e (D) acL1A/LUVs na presença de concentração crescente de acrilamida. [L] = 500 μ M e [P] = 5 μ M.

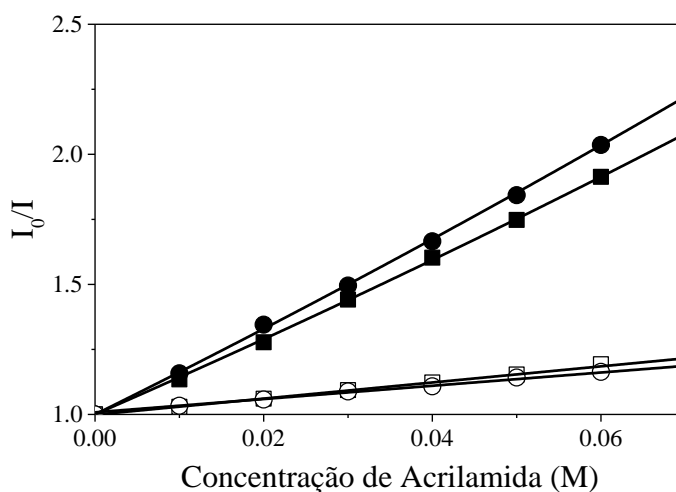


Fonte: elaborado pelo autor

Quando em solução, a intensidade de fluorescência do triptofano dos peptídeos decai conforme titulação de acrilamida (Figura 22 (A) e (B)), e é possível observar que o máximo de emissão é em torno de 350 nm. Isso é uma característica dos resíduos de triptofano estarem ligados por ligações de hidrogênio ou expostos à água. Quando na presença de LUVs (Figura 22 (C) e (D)), o pico de emissão máximo é deslocado para comprimentos de onda menores (*blue-shift*), em torno de 330 nm, sugerindo uma migração do fluoróforo para um ambiente mais apolar (Tabela IV). Ou seja, intensidades máximas de emissão do triptofano “deslocadas para o azul” indicam que os resíduos de triptofano estão majoritariamente inacessíveis à supressão pela acrilamida, enquanto que o “deslocamento para o vermelho” indica que os resíduos de triptofano estão tão acessíveis quanto se estivessem apenas em água (LAKOWICZ, 2013).

É possível notar também que na presença de LUVs a intensidade de fluorescência do triptofano decresce menos do que na ausência de LUVs quando acrilamida é adicionada. De maneira quantitativa, pode-se analisar o experimento através da variação da intensidade do pico de fluorescência na presença do supressor em função da concentração de acrilamida como mostrado na Figura 23 (gráfico de Stern-Volmer).

Figura 23: Gráficos representativos de Stern-Volmer de L1A (símbolos quadrados) e acL1A (símbolos redondos) da fluorescência do Triptofano suprimida pela acrilamida em solução salina (símbolos fechados) e na presença de LUVs de 3POPE/1DOPG (símbolos abertos). [L] = 500 μ M e [P] = 5 μ M.



Fonte: elaborado pelo autor

É possível notar uma diferença na inclinação da curva quando os peptídeos estão na ausência ou na presença de LUVs. A inclinação da curva que é a constante de Stern-Volmer (Eq. 10) indica que os peptídeos tiveram sua fluorescência mais suprimida na ausência de LUVs, levando a uma reta mais inclinada. Na presença de LUVs, entretanto, a reta possui uma inclinação menor.

Tabela IV: Parâmetros de supressão e desvios da emissão de fluorescência do triptofano à ligação do peptídeo onde (a): K_{SV} é a constante de Stern-Volmer; (b): $\frac{KV_{SV}^L}{KV_{SV}^b}$ é a razão da constante de Stern-Volmer em vesículas (KV_{SV}^L) e em solução salina (KV_{SV}^b); (c): $\Delta\lambda$ é o “blue-shift”.

Peptídeo	(a) K_{SV} (M^{-1})		(b) $\frac{KV_{SV}^L}{KV_{SV}^b}$	(c) $\Delta\lambda$ (nm)
	Solução salina	LUVs		
L1A	$14,1 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,7$	$0,22 \pm 0,04$	$19,3 \pm 0,2$
acL1A	$16,0 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,6$	$0,16 \pm 0,05$	$20,8 \pm 0,2$

Fonte: elaborado pelo autor

A constante de Stern-Volmer fornece o quão intensa é a supressão. A razão da constante de Stern-Volmer em vesículas e em solução salina dá a informação similar, porém, agora “normalizada”. Os dois peptídeos migraram para uma região menos acessível ao supressor de maneira similar.

Esses resultados indicam que a redução da carga no N-terminal não influenciou na afinidade pelas vesículas de 3POPE/1DOPG nem inserção do peptídeo como anteriormente evidenciado sistemas modelo compostos por 8POPC/2POPG (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

3.4 Impacto dos peptídeos L1A e acL1A em monocamadas lipídicas.

3.4.1 Efeitos dos peptídeos na morfologia dos domínios de monocamadas lipídicas

Utilizando monocamadas foi investigado como esses peptídeos podem alterar o ordenamento lipídico por meio de experimentos de compressão de filmes lipídicos e experimentos de inserção dos peptídeos em monocamadas lipídicas à área constante. Por compressões é possível avaliar o efeito do peptídeo incorporado na monocamada, enquanto que experimentos de inserção fornecem informações a respeito do primeiro contato do peptídeo com a membrana. Esses experimentos, diferentes dos anteriores, possuem a vantagem de avaliar interações específicas desses peptídeos com monocamadas apenas de POPE e DOPG podendo estimar qual a contribuição de cada interação quando os lipídios são misturados, 3POPE/1DOPG.

Em trabalhos anteriores foram realizadas compressões de filmes dos peptídeos L1A e acL1A puros (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018). Nessas compressões (Figura 44, pág. 94) foi observado que L1A e acL1A atingem, respectivamente, uma pressão de superfície de colapso de 21 e 26 mN/m para interfaces NaCl-ar ocupando uma área molecular de 225 \AA^2 sugerindo que os peptídeos formam alfa-hélice orientados perpendicularmente à interface. Estes valores de pressão de colapso indicam que ambos os peptídeos possuem atividade interfacial como também evidenciado para outros peptídeos antimicrobianos como Polybia-MP1 (ALVARES, et al., 2016), fragmentos 8-26 de Melitina (GEVOD; BIRDI, 1984) e também Bombolitina (MAGET-DANA, 1999).

A seguir, foram feitas as compressões das monocamadas de POPE e DOPG puros e da mistura 3POPE/1DOPG, e lipídios co-espalhados com L1A ou acL1A a diferentes

concentrações de peptídeos afim de estudar o impacto dessas moléculas nas monocamadas lipídicas. A concentração variável de peptídeos é feita para investigar se quaisquer efeitos provenientes da adição dos peptídeos são apenas devido à presença dessas moléculas ou se são dependentes da quantidade das mesmas.

A primeira composição lipídica investigada é POPE. Sua temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina é em torno de 25 °C. Dessa forma, foram feitas compressões nas temperaturas abaixo (20 e 10°C) e acima (30°C) da temperatura de transição de fase, respectivamente, para avaliar como a estabilidade e a formação dos domínios serão afetadas.

A segunda composição lipídica investigada é DOPG, cuja temperatura de transição de fase é -18 °C. Por isso, qualquer temperatura utilizada nas compressões estará acima da temperatura de transição e, por isso, foram feitas compressões a 20 °C para ser possível comparar com outras composições.

A mistura 3POPE/1DOPG, entretanto, possui temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina em torno de 15 °C (ver EPAND et al., 2009 e dados posteriores). Compressões foram realizadas nas mesmas temperaturas que o POPE.

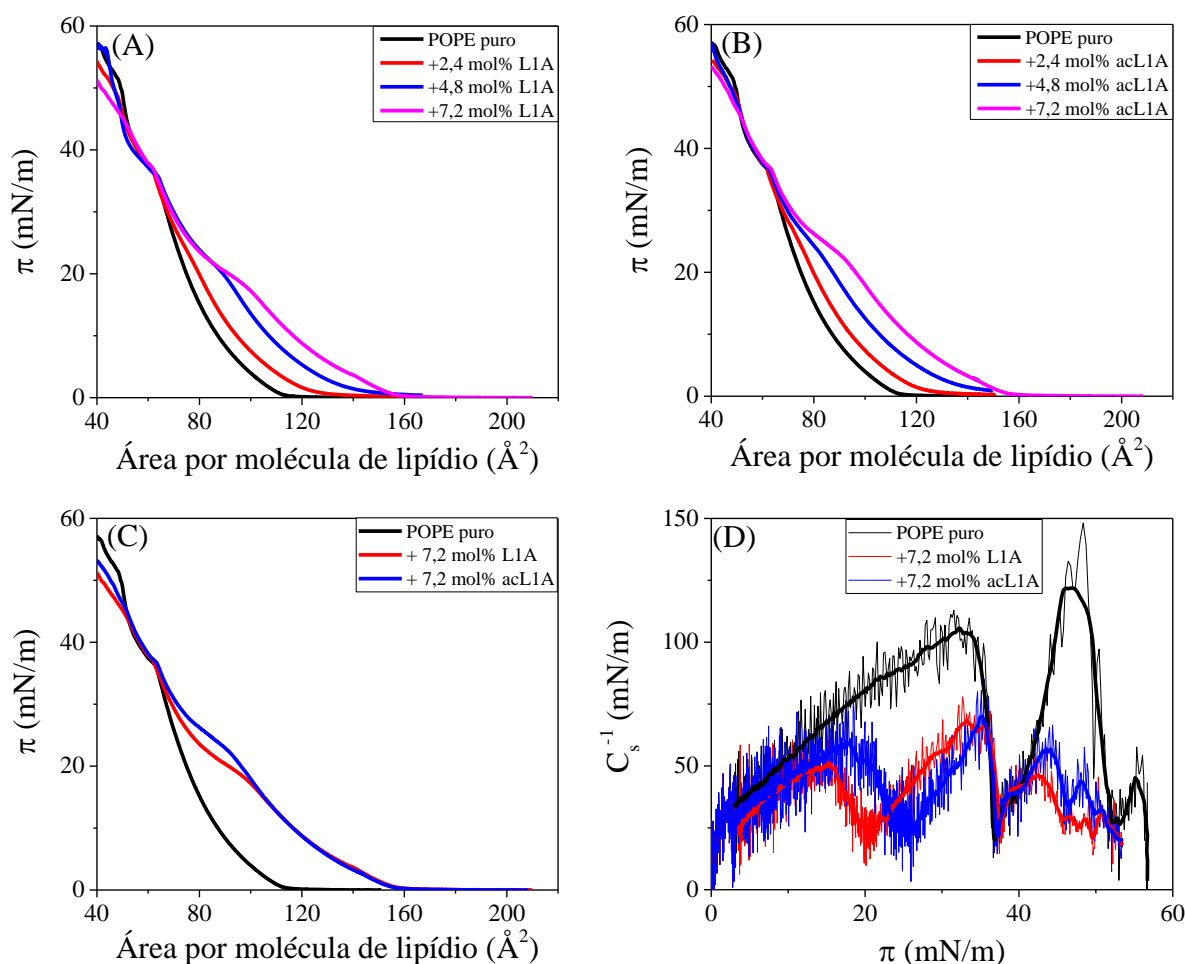
A quantidade de peptídeos espalhada é calculada com base na quantidade de lipídios espalhada, ou seja, 1 mol % de peptídeos espalhados equivale a 1 % em mols da quantidade de lipídios espalhada. É importante ressaltar que a área molecular nas isotermas corresponde à área por lipídio, não levando em conta a quantidade de peptídeos co-espalhada juntamente com os lipídios.

3.4.1.1 Monocamadas de POPE

3.4.1.1.1 POPE - Temperatura 20 °C

As isotermas de compressão e módulo de compressibilidade de POPE puro e co-espalhado com os peptídeos L1A ou acL1A se encontram na Figura 24.

Figura 24: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE puro e POPE co-espalhado com concentração crescente de (A) L1A ou (B) acL1A. (C) Isotermas de compressão de POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (linha vermelha) ou acL1A (linha azul). (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C). Subfase: 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.



Fonte: elaborado pelo autor

O perfil da isoterma de POPE puro acima mostra um comportamento típico da fase líquido-expandida (LE) até a pressão de ~ 36 mN/m e área molecular $\sim 63 \text{ \AA}^2$, onde há uma diminuição de inclinação até a pressão de ~ 43 mN/m e $\sim 52 \text{ \AA}^2$, sugerindo pequeno platô indicativo de transição líquido-expandido - líquido-condensado (LE-LC). Observa-se também

o colapso da monocamada na pressão de superfície em torno de 60 mN/m. Como estes experimentos foram feitos a 20 °C, temperatura menor do que a temperatura de transição para este lipídio ($T_m = 25$ °C), é esperado o surgimento de um platô de coexistência LE-LC (MOHWALD, 1990).

Ao co-espalhar POPE com os peptídeos, ocorre a expansão da monocamada para os dois casos, sendo que a expansão é dependente da concentração de peptídeo (Figura 24, (A) e (B)). Além disso, ao aumentar a quantidade de peptídeo co-espalhada, nota-se um platô cujo valor de pressão de superfície diminui conforme aumenta a quantidade de peptídeo, indicando que a interação peptídeo/peptídeo é mais favorável que peptídeo/PE o que torna desfavorável a permanência dos peptídeos na interface. Dessa forma, esse platô pode estar relacionado com a pressão de exclusão do peptídeo da interface.

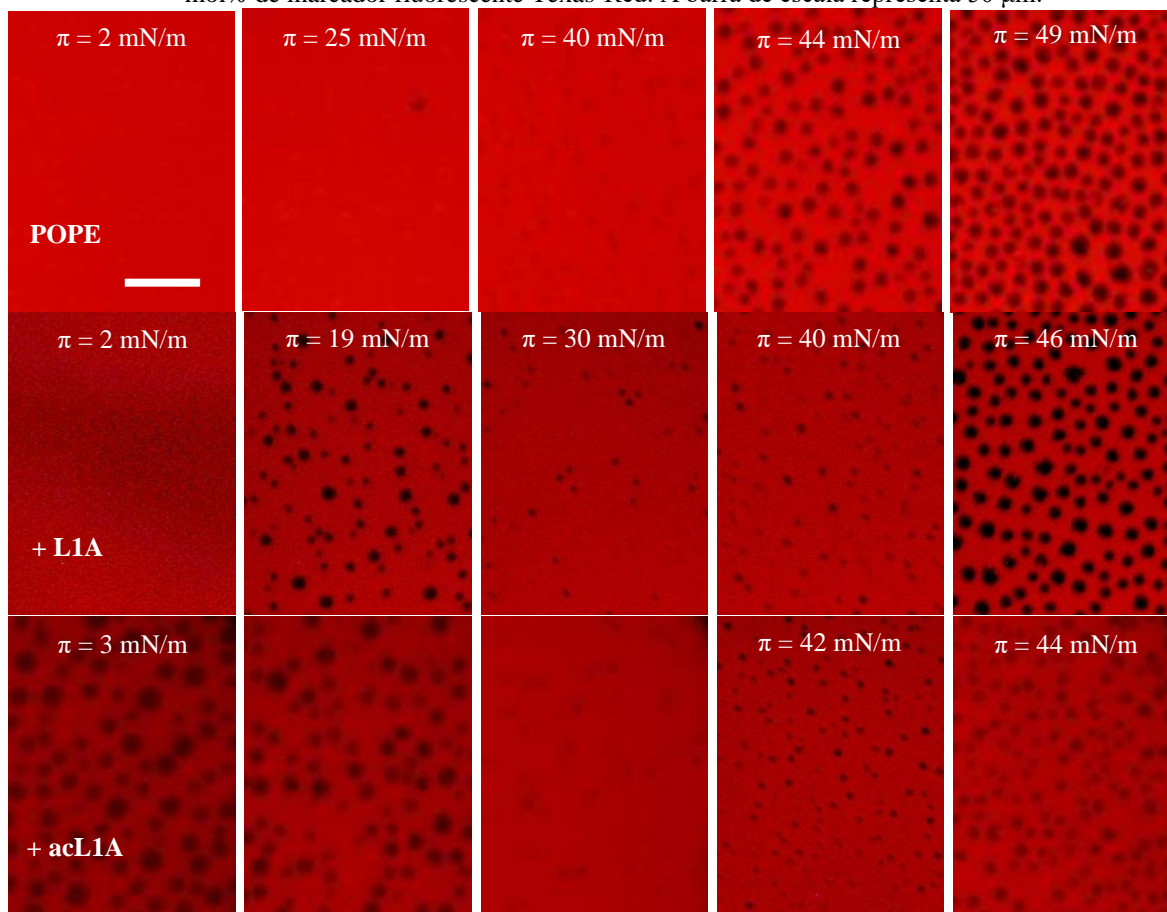
Para a maior concentração de peptídeo co-espalhada, 7,2 mol%, e na presença de L1A, nota-se um platô em torno de 21 mN/m, enquanto que na presença de acL1A esse platô está em torno de 26 mN/m (Figura 24, (C)). Esses valores de pressão de superfície são próximos, respectivamente, a pressão de colapso dos filmes de L1A e acL1A puros: 21 e 26 mN/m (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018), indicando que os peptídeos se encontram presentes na interface junto com os lipídios durante a fase LE, porém são excluídos da monocamada ao atingir sua pressão de colapso. A sobreposição das isotermas acima da pressão de exclusão dos peptídeos indica que os peptídeos foram excluídos da interface, de forma que há apenas a contribuição dos lipídios para o aumento da pressão de superfície.

A transição de fase LE-LC e os platôs formados após a adição de peptídeo podem ser analisados calculando o módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície a partir das isotermas de compressão (Eq. 14, pág. 49). De acordo com Davies e Rideal (DAVIES; RIDEAL, 1963) os valores de C_s^{-1} na faixa de 12,5 a 50 mN/m correspondem a fase LE e de 100 a 250 mN/m a fase LC. Um aumento em C_s^{-1} corresponde ao aumento da rigidez, ou seja, diminuição da compressibilidade da monocamada (VOLLHARDT; FAINERMAN, 2006). Analisando as curvas de módulo de compressibilidade mostradas na Figura 24 (D), notam-se três mínimos do módulo de compressibilidade na presença dos peptídeos: (i) na pressão de exclusão das moléculas de peptídeo da interface, (ii) na região de transição LE-LC e (iii) no colapso do filme.

Imagens de microscopia de fluorescência de filmes de POPE (Figura 25) registradas durante as compressões revelaram o aparecimento de pequenos domínios condensados amorfos, que crescem ligeiramente conforme a pressão de superfície aumenta, surgindo na pressão de

superfície correspondente àquela do platô de coexistência de fase LE-LC visto na Figura 24 (linha preta).

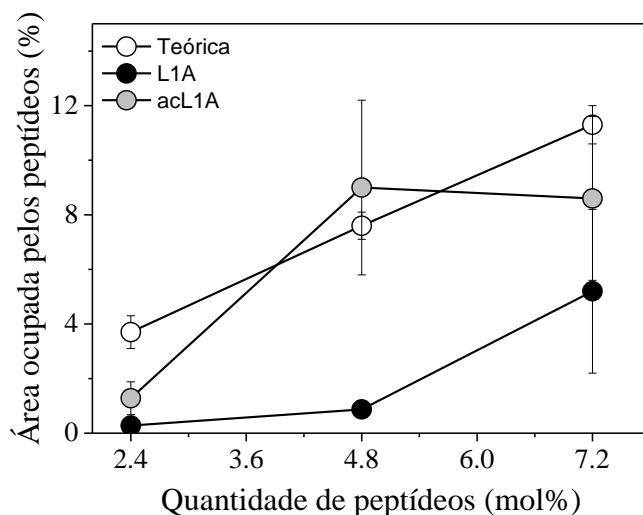
Figura 25: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas de POPE puro (primeira fileira) e co-espalhado com 7,2 mol% L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



Fonte: elaborado pelo autor

Ao co-espalhar lipídios com peptídeos, entretanto, e de forma mais evidente na presença de acL1A, observa-se formação de regiões escuras (clusters) distribuídas homogeneamente na fase LE que permanecem na interface até a exclusão do peptídeo da monocamada (21 mN/m para o L1A e 26 mN/m para o acL1A), e voltam a aparecer na pressão indicativa de transição de fase LE-LC do filme de POPE puro ($\sim 35 \text{ mN/m}$). Esses resultados indicam que POPE e L1A ou acL1A não são miscíveis, e, de forma mais evidente para acL1A, peptídeos se segregam do PE formando agregados com área similar a área que, teoricamente, os peptídeos deveriam ocupar (Figura 26, para detalhes do cálculo da área teórica ocupada pelos peptídeos ver Apêndice A)

Figura 26: Comparação entre a área teórica ocupada pelos peptídeos (círculos abertos) com a área de clusters induzidos pelo L1A (círculos pretos) ou acL1A (círculos cinzas) co-espalhados com POPE em função da concentração de peptídeos. A área ocupada pelos peptídeos foi calculada através das imagens de MF de POPE na presença de peptídeos na pressão de 15 mN/m a 20 °C.

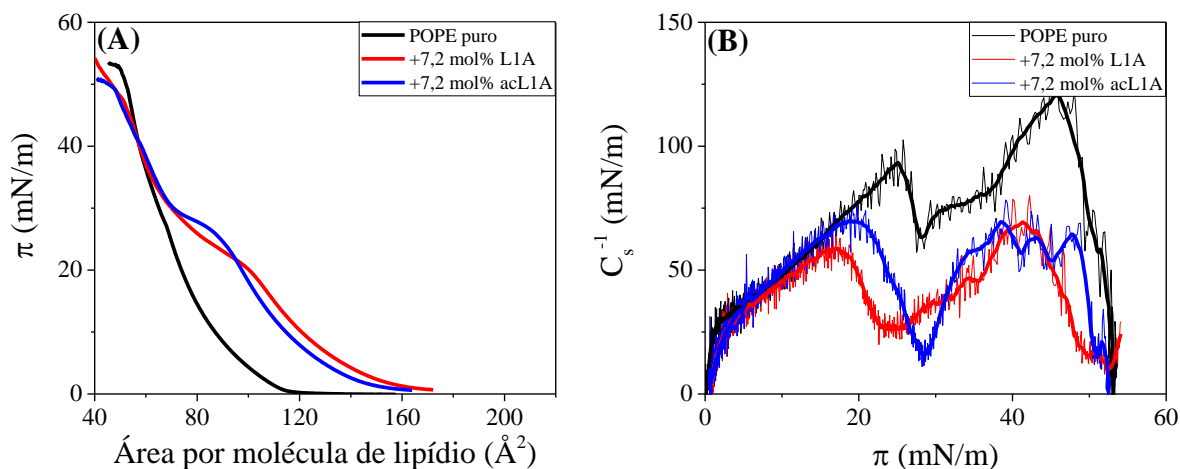


Fonte: elaborado pelo autor

3.4.1.1.2 POPE - Temperatura 10 °C

As isotermas de compressão e módulo de compressibilidade de POPE puro e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A ou acL1A se encontram na Figura 27.

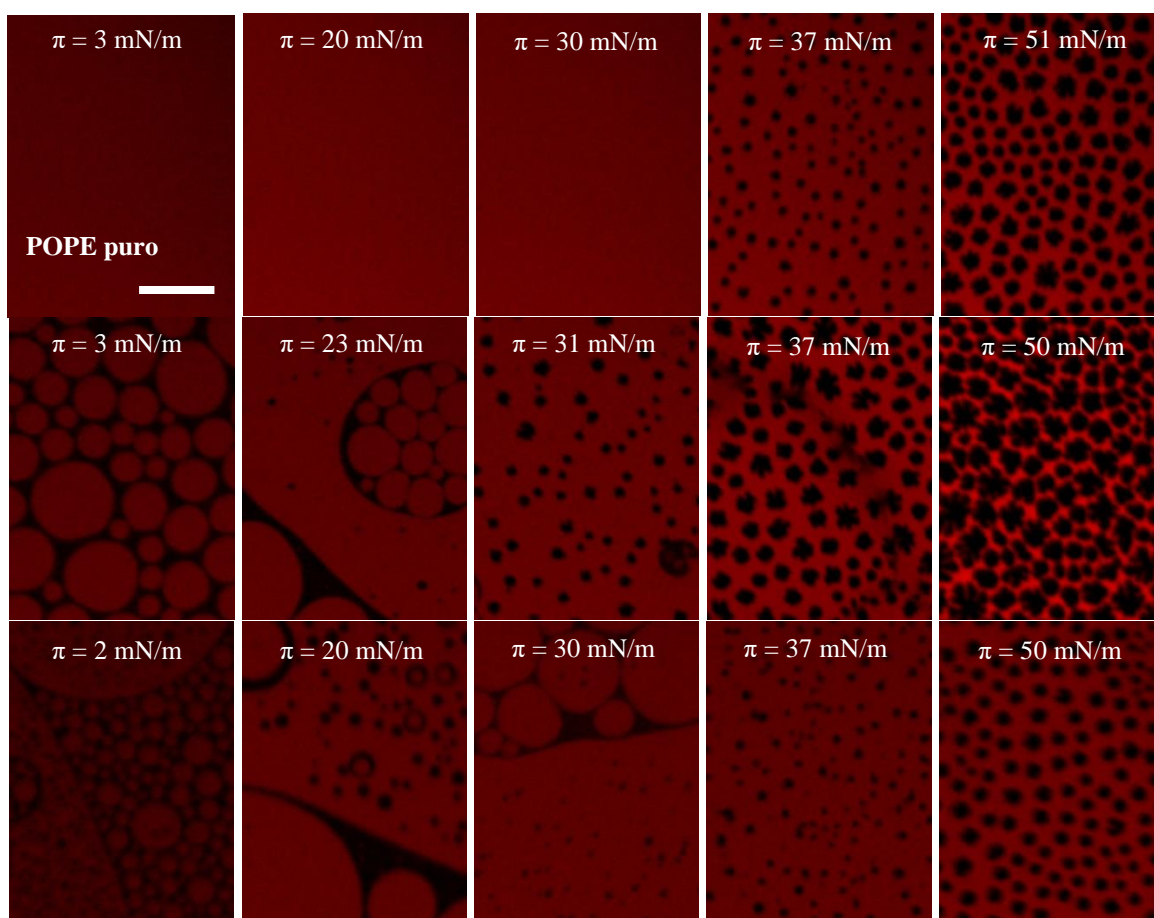
Figura 27: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 10 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A).



Fonte: elaborado pelo autor

Observa-se a partir da isoterma de compressão do POPE puro um comportamento típico da fase LE até o surgimento de uma pequena inflexão em torno de 30 mN/m, o que pode ser confirmado pelo gráfico do módulo de compressibilidade. Essa pressão é menor do que a pressão em que este mesmo comportamento é observado para a temperatura de 20 °C, característica esperada ao diminuir a temperatura: as pressões em que ocorrem as transições de fase diminuem. Ao co-espaldar peptídeos, é observado a partir das isotermas uma expansão do filme para áreas maiores e também inflexões que correspondem à pressão de exclusão dos peptídeos da interface. Nota-se de forma mais evidente a partir do gráfico do módulo de compressibilidade que essas pressões são próximas das pressões de colapso dos filmes compostos apenas por peptídeos, as quais valem 21 e 26 mN/m para o L1A e para o acL1A, respectivamente. As imagens dos filmes de POPE e POPE co-espaldados com peptídeos na concentração de 7,2 mol% obtidas a partir da visualização dos domínios por microscopia de fluorescência se encontram na Figura 28.

Figura 28: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira fileira) e co-espaldado com 7,2 mol% de L1A (segunda fileira) ou acL1A (terceira fileira) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol % de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



Fonte: elaborado pelo autor

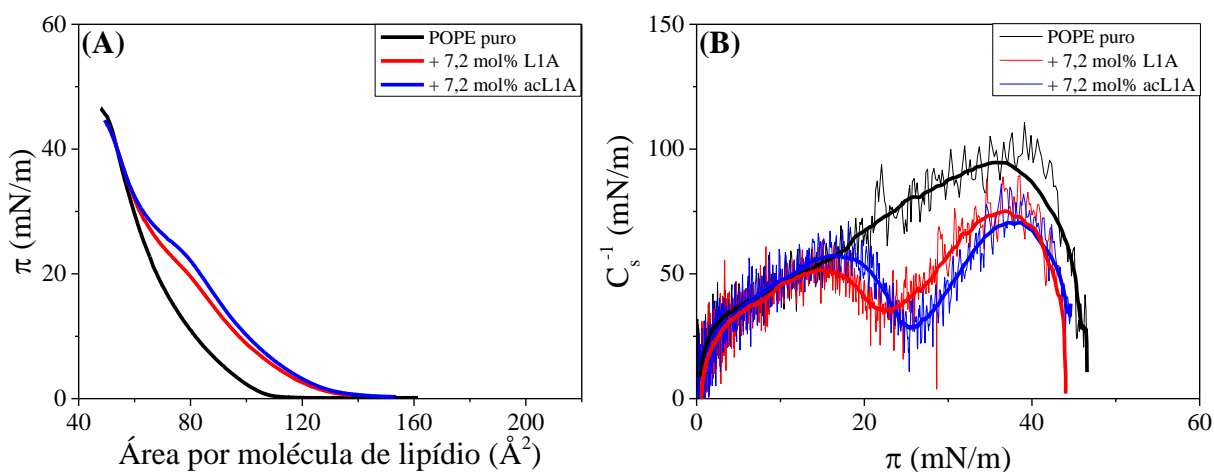
A partir das imagens de microscopia de fluorescência, nota-se a coexistência de agregados, fase gás e LE em pressões mais baixas para as condições com peptídeos co-espalhados em relação à condição em que apenas POPE foi espalhado. Com a compressão do filme, a região LE aumenta e a fase G juntamente com os agregados desaparece na pressão de exclusão de peptídeos. A coexistência entre G, LE e agregados parece corresponder ao ponto triplo da monocamada. No entanto, um estudo mais detalhado é preciso ser realizado para verificar essa afirmação.

De forma semelhante à condição em 20 °C, os resultados indicam que os peptídeos não se misturam com POPE formando uma região rica de peptídeo segregando PE.

3.4.1.1.3 POPE - Temperatura 30 °C

As isotermas de compressão e módulo de compressibilidade de POPE puro e co-espalhado com os peptídeos L1A ou acL1A se encontram na Figura 29.

Figura 29: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de POPE (preto) e POPE co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície calculado a partir das isotermas mostradas em (A).



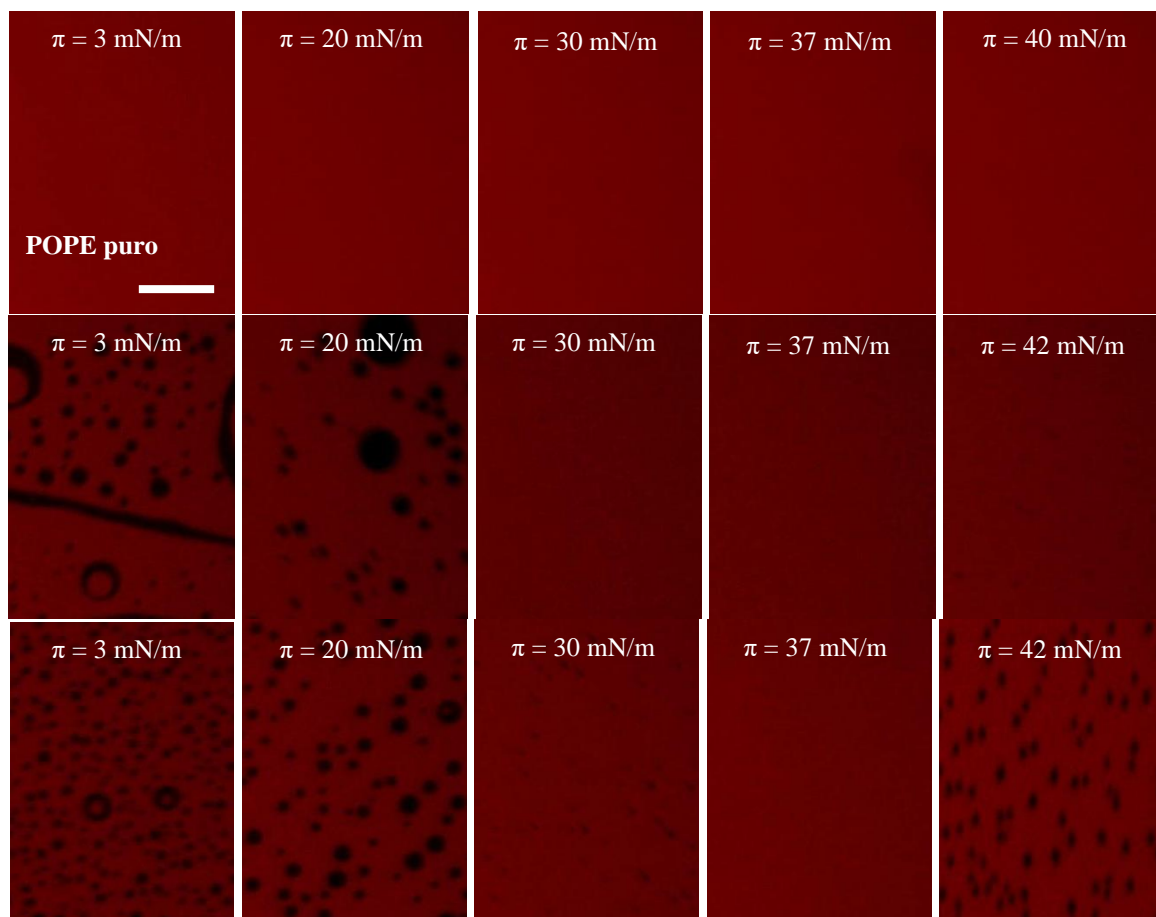
Fonte: elaborado pelo autor

A isoterma de compressão do POPE puro (Figura 29, (A), linha preta) mostra um comportamento típico da fase líquido-expandida até o colapso do filme, o que pode ser observado também pelo gráfico do módulo de compressibilidade (Figura 29, (B), linha preta), onde não é observada nenhuma variação na inclinação da curva até o colapso. Ao co-espalhar peptídeos, é possível notar, além da expansão do filme, uma inflexão nas isotermas, que possui

valor de pressão de superfície maior para o acL1A do que para o L1A. Isso é confirmado através do gráfico do módulo de compressibilidade onde nota-se um mínimo em pressões próximas as pressões de colapso dos filmes de peptídeos puros, 21 e 26 mN/m para o L1A e acL1A, respectivamente.

As imagens dos filmes de POPE e POPE co-espalhados com peptídeos na concentração de 7,2 mol% obtidas a partir da visualização dos domínios por microscopia de fluorescência se encontram na Figura 30.

Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por POPE puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



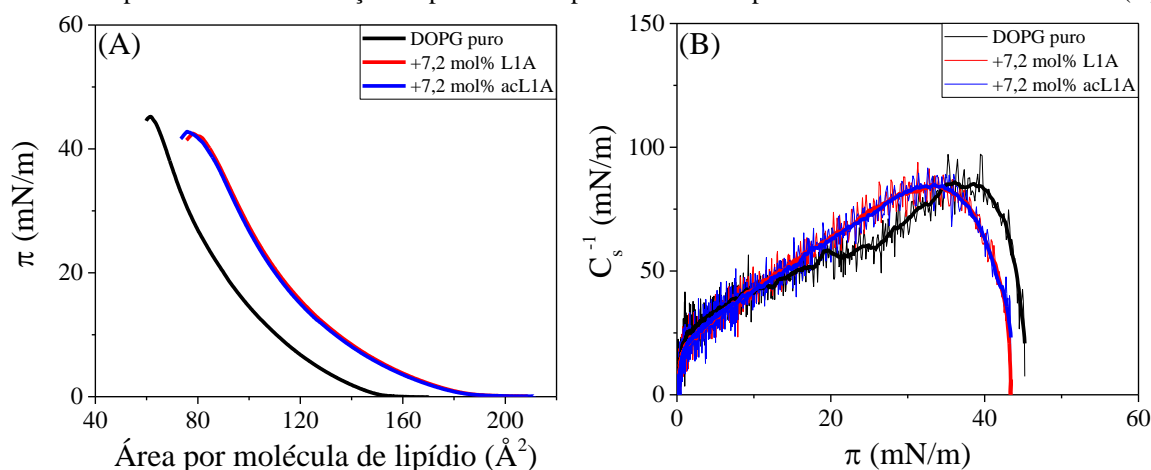
Fonte: elaborado pelo autor

Como esperado de um filme no estado expandido, não são observados domínios para a monocamada de POPE puro. Após adição de peptídeos, entretanto, nota-se algumas regiões escuras até pressões próximas das pressões de exclusão dos peptídeos. Além disso, é possível notar na pressão próxima à pressão de colapso do filme a formação de domínios amorfos, de maneira mais evidente para o peptídeo acetilado.

3.4.1.2 Monocamadas de DOPG

As isotermas de compressão e módulo de compressibilidade de DOPG puro e co-espalhado com os peptídeos L1A ou acL1A a 7,2 mol % se encontram na Figura 31:

Figura 31: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de DOPG puro (preto) e DOPG co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 20 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas mostradas em (A).



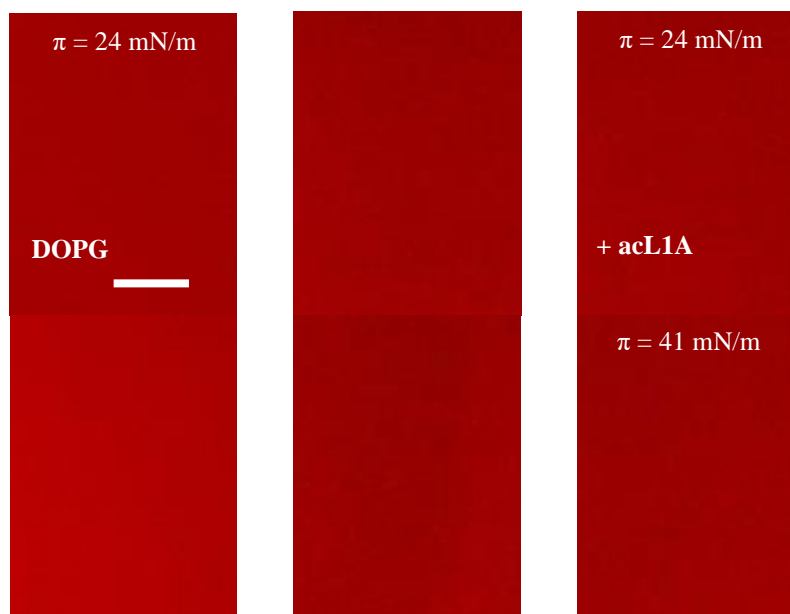
Fonte: elaborado pelo autor

O perfil da isoterma de DOPG demonstra apenas a fase LE (Figura 31, (A)). Isto é esperado, pois a temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina para o DOPG é -18 °C, bem abaixo da temperatura em que foi realizado o experimento, 20 °C.

Para a compressão da monocamada composta apenas por DOPG, nota-se o colapso do filme em pressão de superfície próxima de 45 mN/m e área molecular de aproximadamente 62 Å². Quando ambos os peptídeos são co-espalhados com DOPG, ocorre uma expansão da monocamada e uma diminuição da pressão de colapso do filme lipídico, em torno de 42 mN/m. Essa pressão é maior do que a pressão de colapso dos filmes de peptídeos puros, sugerindo forte interação entre os peptídeos e DOPG. Isso é confirmado pelas curvas de módulo de compressibilidade vs pressão de superfície (Figura 31, (B)), onde é possível observar apenas um aumento do módulo de compressibilidade até o colapso do filme.

Nas imagens obtidas por MF não foram observados domínios nas monocamadas de DOPG puro e na presença de peptídeos (Figura 32), o que está de acordo com a formação de um filme no estado expandido e a preferência destes peptídeos em particionar na fase LE, como já mostrado recentemente para estes peptídeos co-espalhados com DPPG (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

Figura 32: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas formadas por DOPG puro (primeira coluna) e co-espalhado com 7,2 mol% de L1A (segunda coluna) ou acL1A (terceira coluna) em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



Fonte: elaborado pelo autor

3.4.1.3 Monocamadas de 3POPE/1DOPG

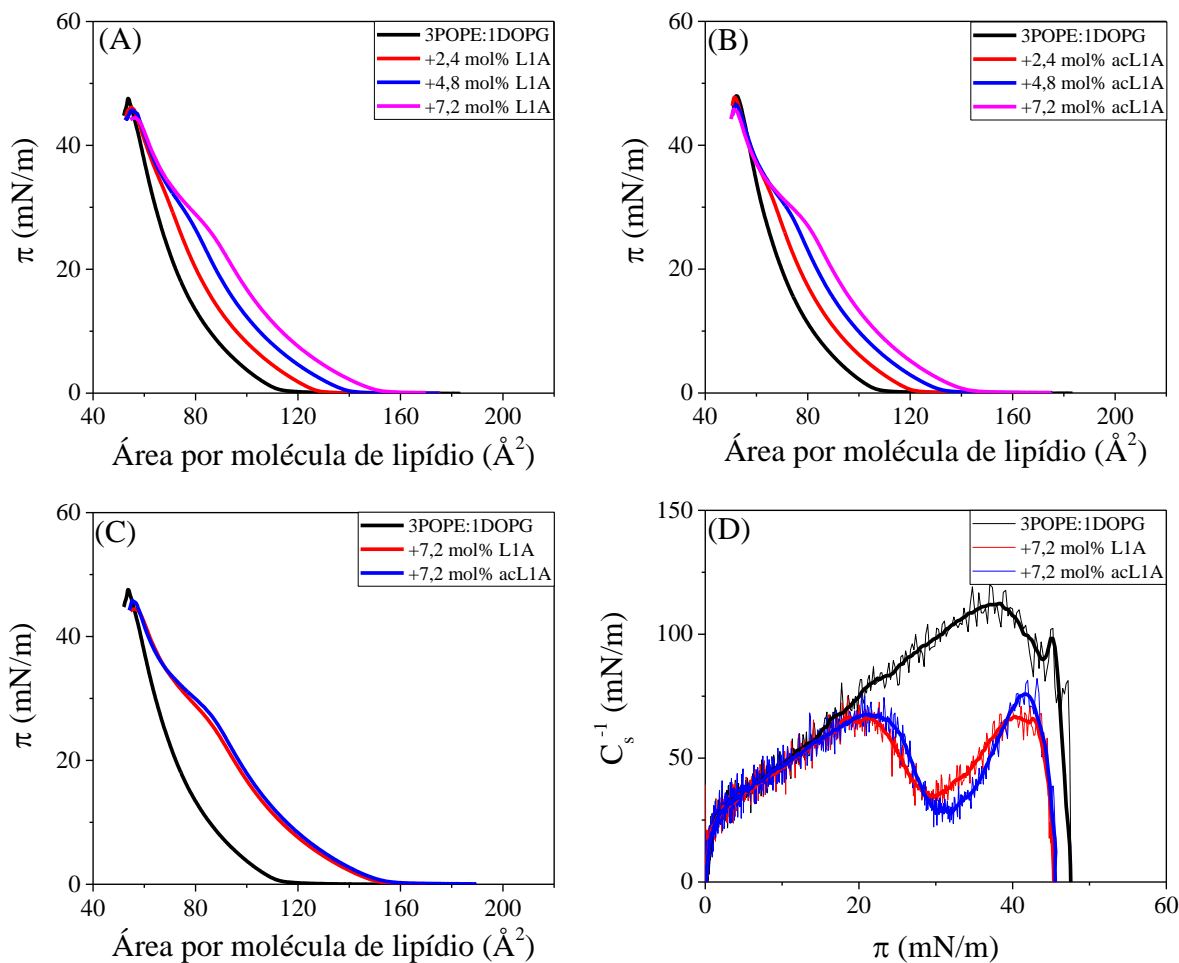
3.4.1.3.1 3POPE/1DOPG – Temperatura 20 °C

A isoterma apenas da mistura 3POPE/1DOPG (Figura 33 (A) e (B), linha preta) mostra um perfil característico de fase LE como evidenciado para POPE e DOPG em temperaturas acima da transição gel – líquido-cristalina.

Nas isotermas deste sistema ternário 3POPE/1DOPG/peptídeo (Figura 33 (A) e (B), linhas coloridas), nota-se, de forma semelhante às isotermas de compressão de POPE, uma inflexão que fica mais evidente e com pressão menor conforme o aumento da concentração de peptídeo. Para a maior concentração de L1A ou acL1A, 7,2 mol% (Figura 33, (C)), nota-se a exclusão dos peptídeos em pressão de superfície ~8 e 6 mN/m acima da pressão de superfície suportada pelo filme somente de L1A e acL1A, respectivamente. Observa-se também uma ligeira redução da pressão de colapso do filme. É possível notar de forma mais clara essas características através das curvas de módulo de compressibilidade (Figura 33, (D)), onde é observado um mínimo em torno de 29 e 32 mN/m para L1A e acL1A, respectivamente, e ainda após 42 mN/m, que corresponde à pressão de colapso do filme, em pressões menores que do

filme apenas da mistura. Esses resultados sugerem que as moléculas de peptídeos permanecem na interface, provavelmente interagindo com moléculas de DOPG.

Figura 33: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e 3POPE/1DOPG co-espalhado com concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 20 °C (C) Comparação do efeito de 7,2 mol% de peptídeo. (D) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície obtido a partir das isotermas de compressão mostradas em (C).



Fonte: elaborado pelo autor

Nas imagens dos filmes obtidas por MF não são observados domínios nas monocamadas dessa mistura mesmo quando co-espalhadas com 7,2 mol% de L1A ou acL1A (Figura 34).

Figura 34: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira) e das misturas ternárias 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 20 °C nas pressões de superfície indicadas, para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



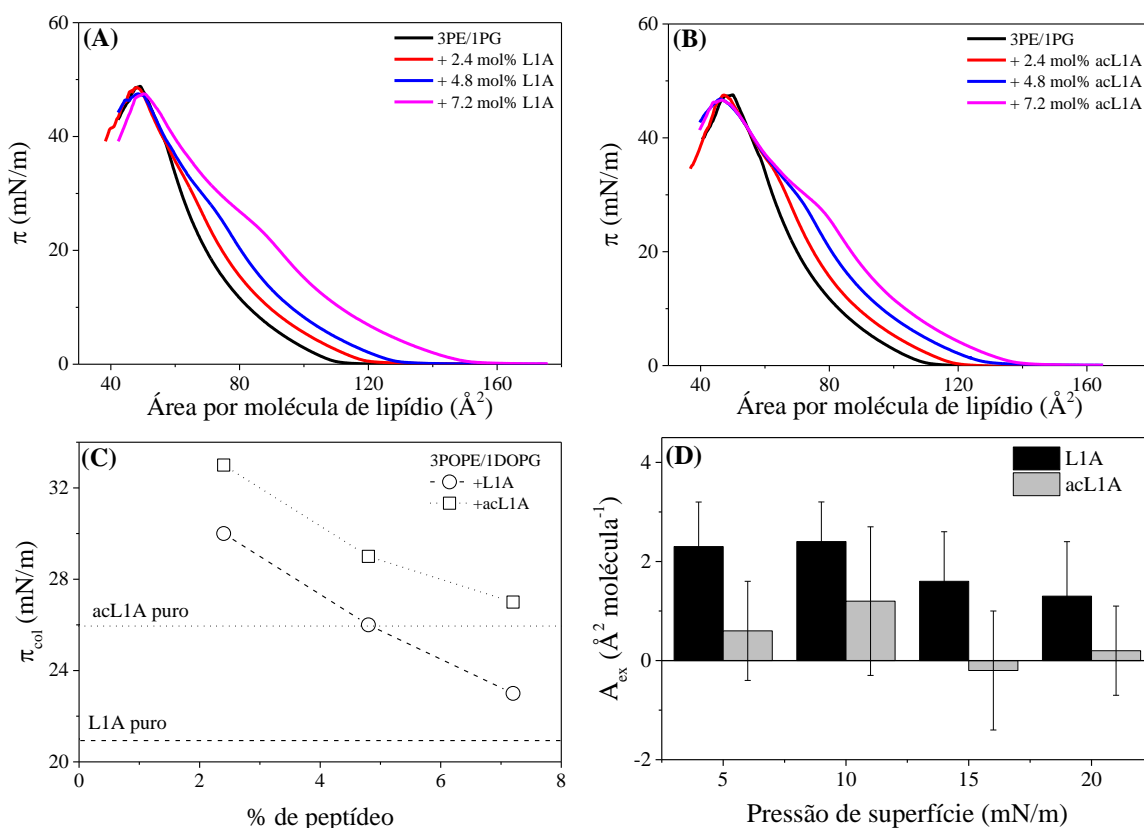
Fonte: elaborado pelo autor

3.4.1.3.2 3POPE/1DOPG – Temperatura 10 °C

Ao espalhar somente os lipídios na interface solução salina-ar a 10 °C, ocorre o surgimento de uma pequena inflexão em torno de 40 mN/m (Figura 35, (A) e (B) – linha preta) em que ocorre o surgimento de domínios LC (Figura 37, primeira fileira) antes não vista a 20 °C. Na presença de ambos os peptídeos (Figura 35, (A) e (B) – linhas coloridas), também aparecem uma segunda inflexão nas isotermas, onde seus inícios demarcam a pressão de exclusão dos peptídeos do filme lipídico, e seus valores diminuem com o aumento da concentração de peptídeo. Como mostrado na Figura 35 (C), as pressões de exclusão das moléculas de peptídeo da interface são maiores do que seus filmes de peptídeos puros indicando que as moléculas de peptídeos permanecem na interface, provavelmente, interagindo com

DOPG. Porém, quando na quantidade de 7,2 mol%, tanto o L1A quanto o acL1A possuem pressão de exclusão mais próxima a pressão de colapso do filme de peptídeo puro. Isso indica que parte das moléculas de peptídeos que não interage com DOPG é segregada em relação ao POPE sendo excluídas da interface. Essa observação está de acordo com o ligeiro ou nenhum desvio da área em excesso (Eq. 13, Figura 35 (D)).

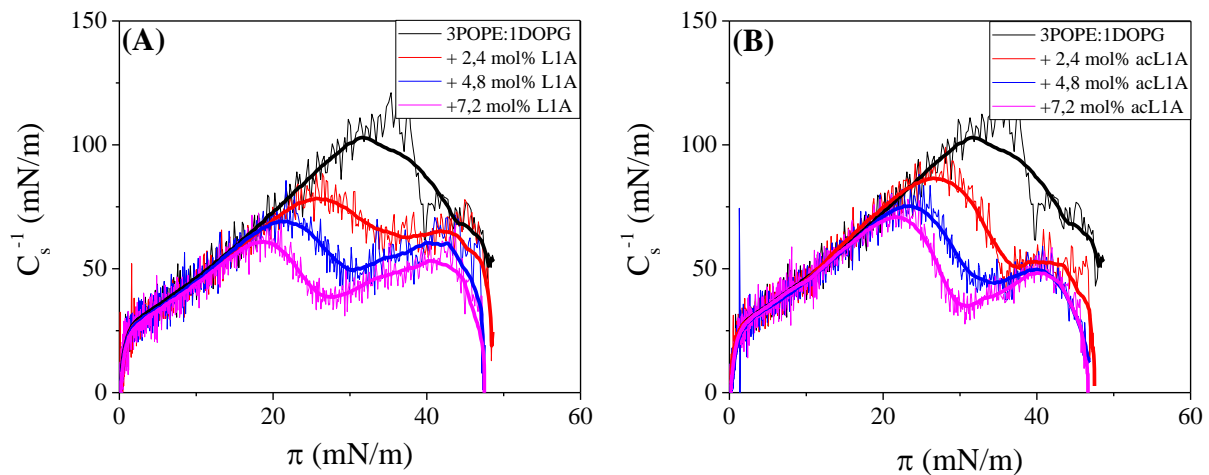
Figura 35: Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG e co-espalhada com concentrações crescentes de L1A (A) ou acL1A (B) na interface 150 mM NaCl-ar, pH 7,4 a 10 °C. (C) Variação da pressão de colapso do peptídeo em função da fração de peptídeo co-espalhado com a mistura lipídica. (D) Área em excesso da área molecular média em função da pressão de superfície para P/L=0,072.



Fonte: elaborado pelo autor

Analisando as curvas de C_s^{-1} vs π mostradas na Figura 36 pode ser claramente observado que o módulo de compressibilidade diminuiu na região em que os peptídeos foram excluídos do filme.

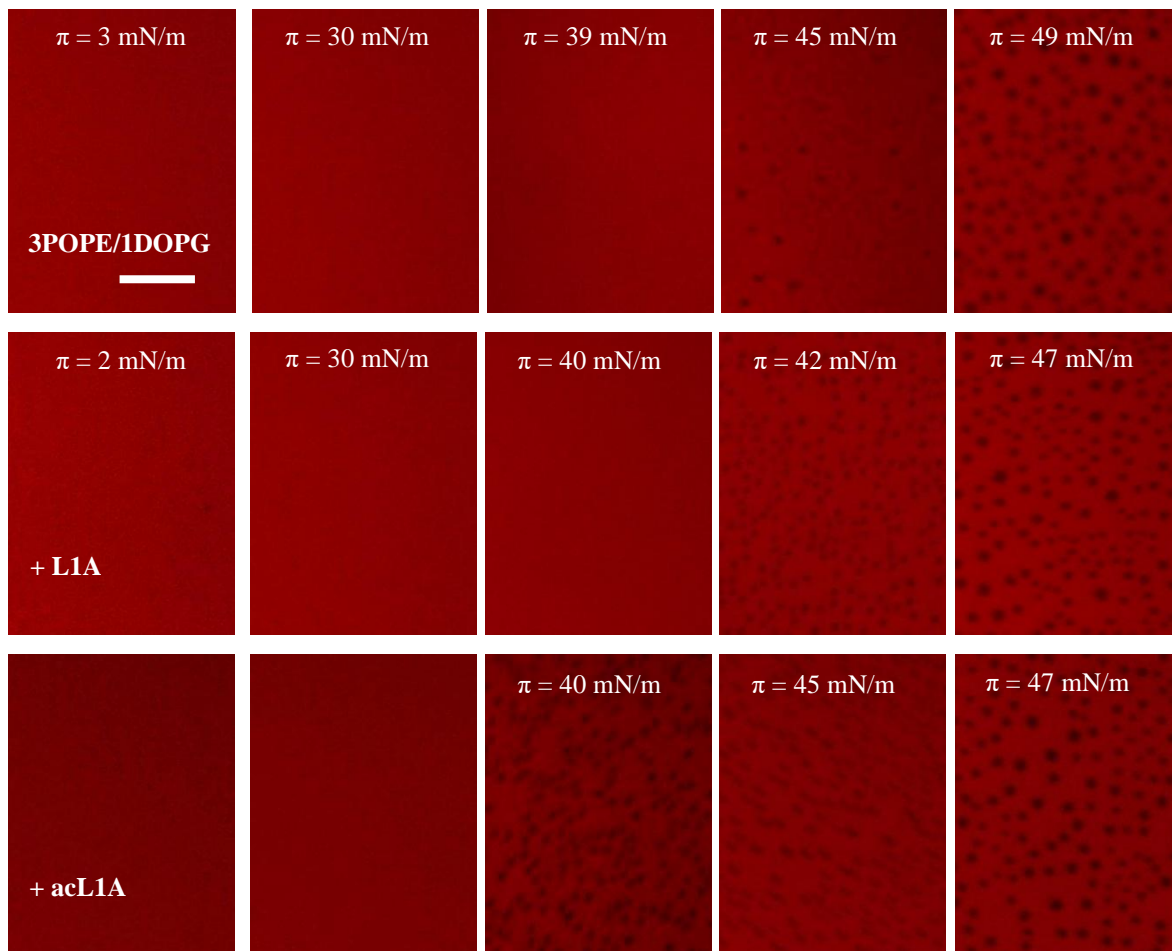
Figura 36: Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas de 3POPE/1DOPG na ausência (preto) e na presença de concentração crescente de L1A (A) ou acL1A (B), em 150 mM NaCl pH 7,4, 10 °C calculado a partir das isotermas mostradas na Figura 35 (A) e (B), respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor

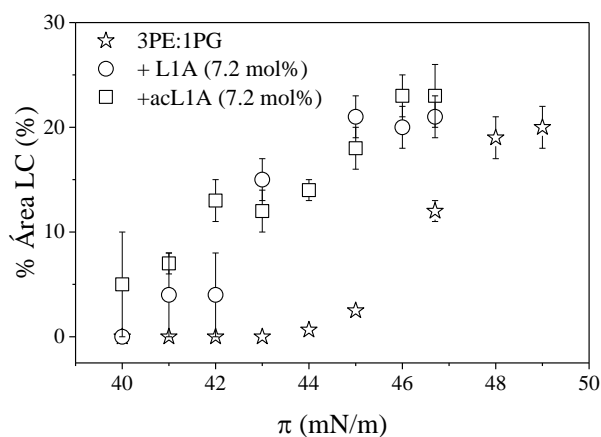
Nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência (Figura 37), foi observado para a mistura apenas de lipídios pequenos domínios amorfos a 45 mN/m ocupando, aproximadamente, 20% da área (Figura 38). Na presença de peptídeos, observa-se a formação de domínios a pressão de superfície ligeiramente menor do que o observado para a mistura lipídica, sugerindo a permanência das moléculas de peptídeos de maneira mais favorável na fase fluida na interface juntamente com DOPG e induzindo a formação da região densa que em pressões maiores que 44 mN/m possui área molecular ligeiramente maior do que na ausência de peptídeos. Considerando que os peptídeos interagem com DOPG, e não se misturam com POPE, os resultados indicam que os peptídeos induzem a formação de uma região rica em PE segregada de PG, diminuindo a transição de fase da mistura aproximando seu valor para os de monocamadas de POPE puro.

Figura 37: Imagens de microscopia de fluorescência (MF) de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 10 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 38: Porcentagem da área dos domínios líquido-condensados (LC) em função da pressão de superfície (π) calculada a partir das imagens obtidas por MF.

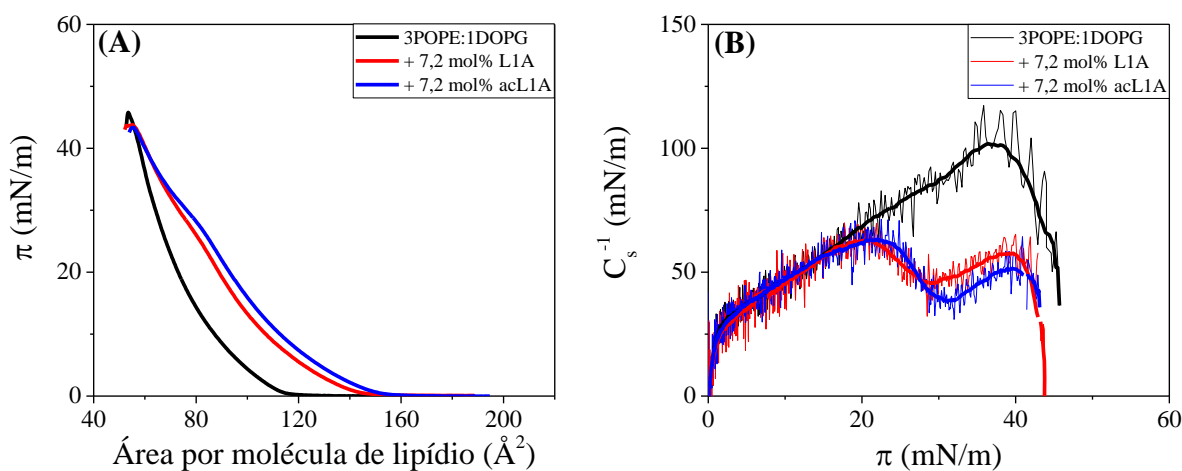


Fonte: elaborado pelo autor

3.4.1.3.3 3POPE/1DOPG – Temperatura 30 °C

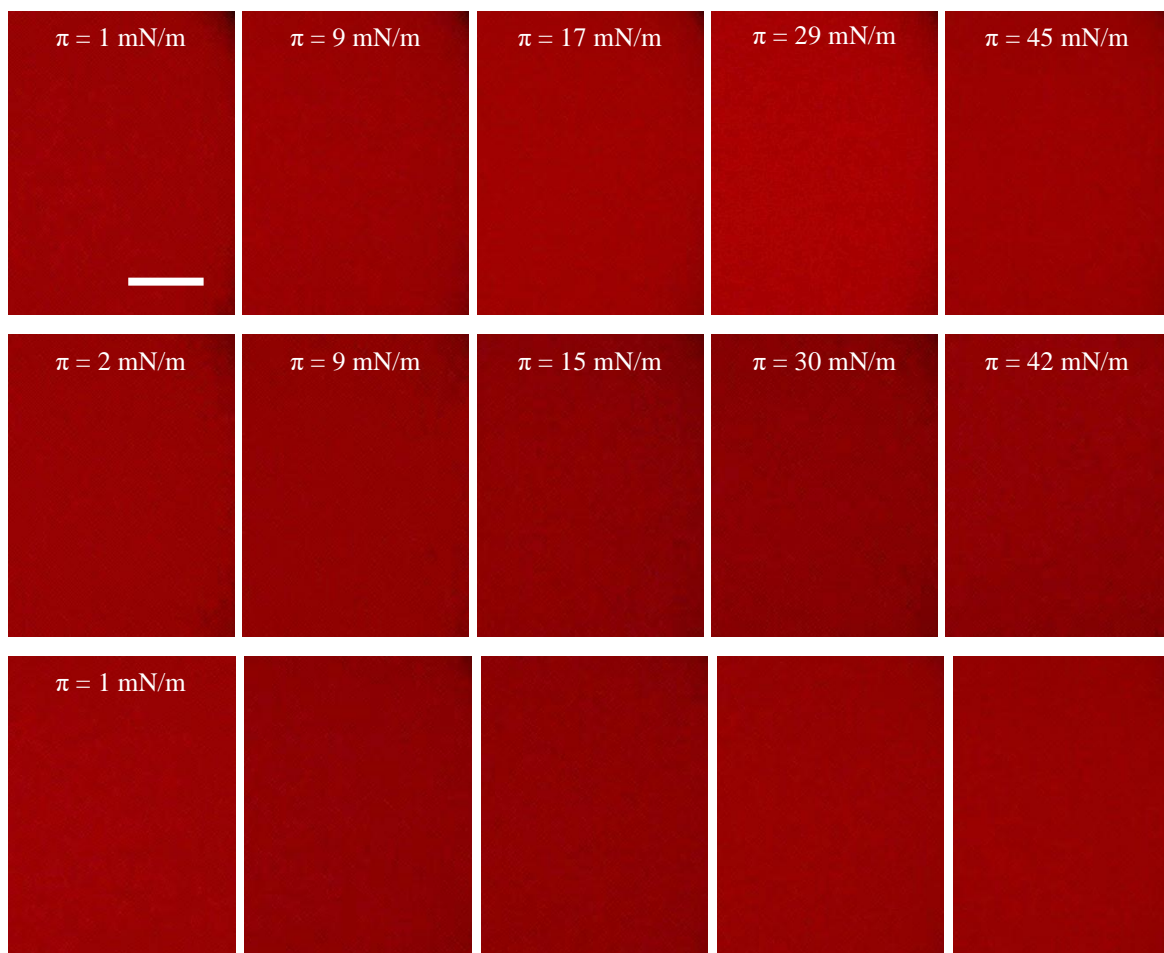
Na temperatura de 30 °C, a isoterma de compressão da mistura é característica da formação de uma monocamada líquido-expandida (Figura 39 (A)). Na presença de 7,2 mol% de L1A e acL1A observa-se uma ligeira inflexão em torno de 30 mN/m. Analisando as curvas de C_s^{-1} vs π (Figura 39 (B)) observa-se que o processo de exclusão do peptídeo da monocamada foi acompanhado pela diminuição do módulo de compressibilidade do filme. Analisando as imagens de fluorescência (Figura 40), em nenhuma condição foi observado domínios.

Figura 39: (A) Isotermas de compressão, π -A, de monocamadas de 3POPE/1DOPG (preto) e 3POPE/1DOPG co-espalhados com 7,2 mol% de L1A (vermelho) ou acL1A (azul) em 150 mM NaCl, pH 7,4 a 30 °C. (B) Módulo de compressibilidade em função da pressão de superfície para monocamadas mostradas em (A).



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 40: Imagens de microscopia de fluorescência de monocamadas mistas de 3POPE/1DOPG (primeira fileira), 3POPE/1DOPG/L1A (segunda fileira) e 3POPE/1DOPG/acL1A (terceira fileira) espalhadas em 150 mM NaCl, pH 7,4 e registradas durante a compressão a 30 °C nas pressões de superfície indicadas. Para as misturas de lipídio/peptídeo, $X_{\text{peptídeo}}=0,072$. A monocamada continha 0,1 mol% de marcador fluorescente Texas-Red. A barra de escala representa 50 μm .



Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados nas temperaturas investigadas sugerem que, para a mistura 3POPE/1DOPG a 10 °C, os peptídeos são capazes de induzir a segregação e a formação de uma fase LC, provavelmente, rica de POPE. Porém, nos experimentos de compressões de monocamadas os peptídeos são co-espalhados com os lipídios sendo “forçados” a estarem na interface. Neste sentido, investigamos a habilidade dos peptídeos em inserir em monocamadas em experimentos a área constante acompanhando a cinética de inserção por microscopia de fluorescência para averiguar se também é possível evidenciar o processo de segregação.

3.4.2 Inserção dos peptídeos L1A e acL1A em monocamadas à área constante visualizadas por microscopia de fluorescência.

Foram realizados experimentos de inserção dos peptídeos L1A e acL1A em monocamadas de POPE, DOPG e 3POPE/1DOPG à área constante e a diferentes pressões de superfície iniciais. Como mostrado na Figura 41, a variação da pressão de superfície $\Delta\pi = \pi_f - \pi_i$ observada após a adsorção do peptídeo na monocamada, diminui linearmente com o aumento da pressão inicial π_i . Através deste gráfico é possível determinar a pressão de superfície acima da qual não há mais inserção do peptídeo na monocamada, a pressão máxima de inserção (PMI), isto é, o valor de π_i em que $\Delta\pi = 0$ (MAGET-DANA, LELIEVRE, 1999). Esses valores são mostrados na Tabela V.

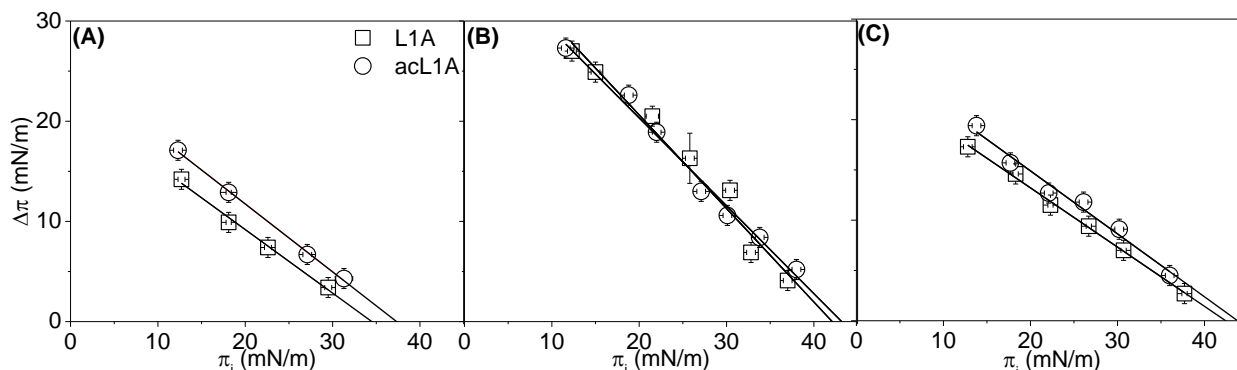
Para as monocamadas compostas apenas por POPE, os resultados mostram que o análogo acetilado, cuja PMI vale ~ 38 mN/m, se inseriu mais nesta monocamada comparado com o peptídeo L1A, que induziu uma variação menor de PMI ~ 35 mN/m.

A inserção de acL1A e L1A em monocamadas de DOPG e 3POPE/1DOPG, induziram valores de PMIs semelhantes.

Experimentos de área constante em que os peptídeos L1A e acL1A adsorveram numa interface 150 mM NaCl-ar foram realizados pelo grupo anteriormente (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018), demonstrando que esses peptídeos podem formar espontaneamente monocamadas de Gibbs. Os resultados demonstraram que esses dois peptídeos induzem uma pressão de superfície de 33 e 27 mN/m para o L1A e acL1A, respectivamente, indicando mais impacto no empacotamento lipídico em monocamadas de POPE induzido pelo peptídeo acetilado. Por outro lado, 25% de lipídio aniônico adicionado na mistura com POPE é capaz de induzir o mesmo efeito que o observado no sistema contendo apenas lipídio aniônico indicando forte contribuição eletrostática na interação peptídeo/lipídio.

O intervalo do valor de pressão de compactação de uma bicamada é em torno de 30~35 mN/m (DEMEL et al., 1975; MARSH, 1996). Isso indica que nesse sistema os peptídeos seriam capazes de desestabilizar a membrana.

Figura 41: Inserção dos peptídeos L1A (quadrados) e acL1A (círculos) em monocamadas lipídicas compostas por POPE (A), DOPG (B) e 3POPE/1DOPG (C) em 150 mM NaCl, pH 7,4, 20 °C. Máxima variação da pressão de superfície $\Delta\pi$ em função da pressão inicial π_i . As linhas contínuas representam o ajuste linear e os desvios padrão foram obtidos a partir de no mínimo três medidas.



Fonte: elaborado pelo autor

Tabela V: Pressão de máxima inserção (PMI) obtida a partir dos experimentos de inserção (Figura 41).

Lipídio	POPE	DOPG	3POPE/1DOPG
Peptídeo	PMI (mN/m)	PMI (mN/m)	PMI (mN/m)
L1A	35±1	42±1	42±1
acL1A	38±1	43±1	44±1

Fonte: elaborado pelo autor

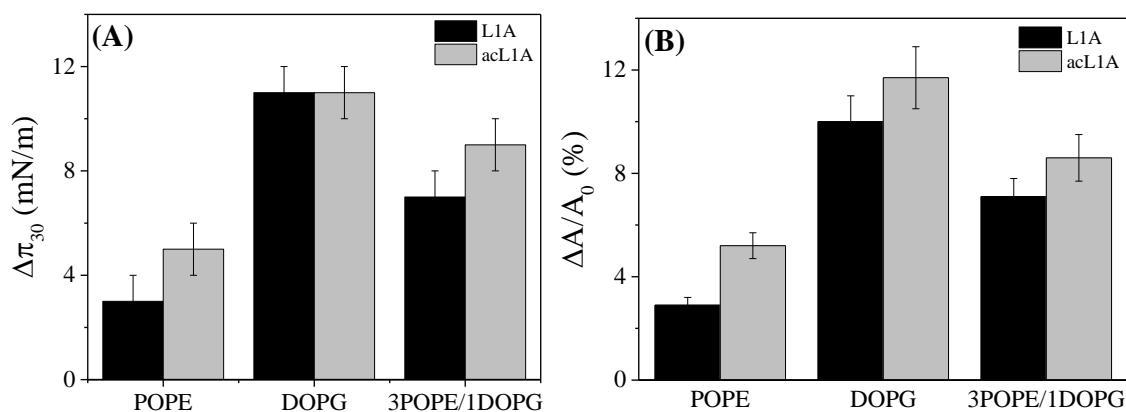
A fim de investigar se os peptídeos induzem segregação lipídica, a inserção dos peptídeos a pressão inicial de 30 mN/m (em que a compactação lipídica pode ser comparada à da bicamada) foi monitorada por microscopia de fluorescência. Nesses casos, a inserção dos peptídeos na monocamada induziu uma variação na pressão de superfície ($\Delta\pi_{30}$), de forma que para o peptídeo acetilado esta variação foi ligeiramente maior comparada com a variação induzida para o L1A para as monocamadas compostas por POPE e 3POPE/1DOPG. Esses valores estão mostrados na Figura 42 (A). Para as monocamadas compostas por DOPG essa variação induzida foi similar para ambos os peptídeos, porém, maior do que a variação induzida em monocamadas de apenas POPE, sugerindo maior inserção em monocamadas aniônicas como já evidenciado pelos valores de PMI.

A variação da pressão de superfície induzida pela inserção do peptídeo além de depender da quantidade de peptídeo inserida no filme também depende da rigidez da monocamada lipídica. Neste sentido, para comparar o efeito dos peptídeos nas diferentes monocamadas foi calculada a variação de área relativa ($\Delta A/A_0$) suportada pelas monocamadas lipídicas quando moléculas de peptídeos inserem no filme. Resumidamente, ao ocorrer a inserção do peptídeo

na monocamada, o mesmo pode induzir grande variação na pressão de superfície ou não. Porém deve ser analisado se, para dada variação de pressão de superfície no experimento de inserção, nesse mesmo intervalo de pressão de superfície no experimento de compressão qual a variação de área induzida pelo peptídeo. Essa variação ΔA é, então, dividida pelo valor da área em 30 mN/m, A_0 . Assim, é possível inferir sobre o empacotamento lipídico: se, por exemplo, o peptídeo induzir grande variação de pressão, mas pouca variação de área indica que o mesmo não perturbou a monocamada de forma considerável. Porém, se houver grande variação de área, isso indica que o impacto do peptídeo é considerável. Esses cálculos são feitos para comparar monocamadas com diferentes rigidezes.

As variações de área relativa $\Delta A/A_0$ foram obtidas através das isotermas mostradas nas figuras 24, 31 e 33 para POPE, DOPG e 3POPE/1DOPG, respectivamente, e são mostradas na Figura 42 (B). Como o módulo de compressibilidade das três composições estudadas tem aproximadamente os mesmos valores, é esperado que a variação de área esteja de acordo com a variação da pressão de superfície, indicando que os peptídeos induzem maior impacto em monocamadas contendo lipídio aniônico e que o acetilado se insere mais em monocamadas contendo PE.

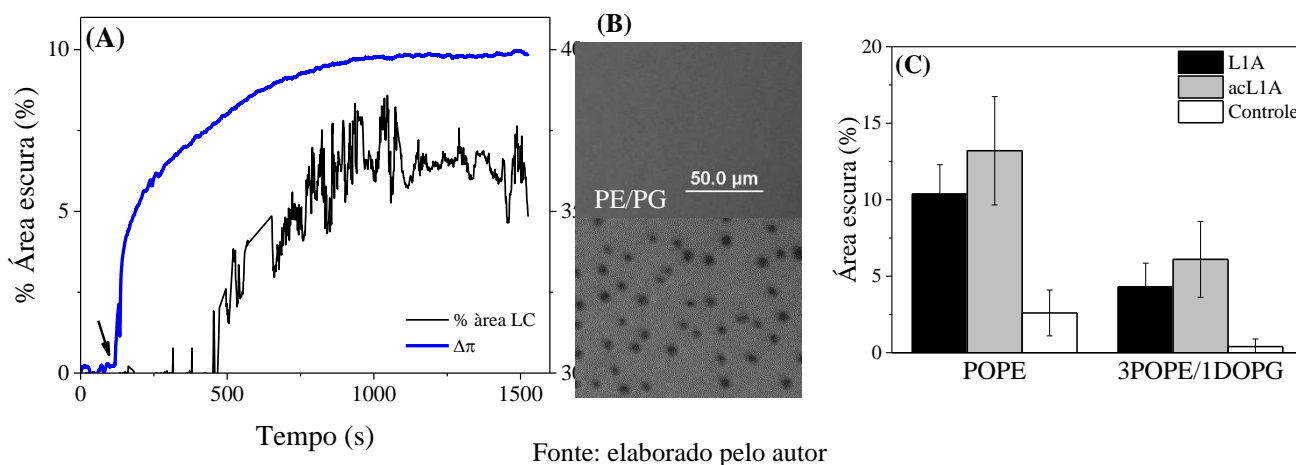
Figura 42: Variação induzida na pressão de superfície inicial de 30 mN/m (A) obtida dos experimentos de inserção (Figura 41) e variação de área relativa $\Delta A/A_0$ (B) para os peptídeos L1A (preto) e acL1A (cinza) em monocamadas de POPE, DOPG e 3POPE/1DOPG obtida a partir das isotermas representadas nas figuras 24, 31 e 33.



Fonte: elaborado pelo autor

A Figura 43 (A) mostra a cinética de variação da pressão após a adição do peptídeo na subfase indicada pela seta. Na presença de monocamadas de POPE e 3POPE/1DOPG a inserção do peptídeo induz a formação de domínios como mostrados na Figura 43 (B). Através das imagens e utilizando o software Fiji/ImageJ, foi possível quantificar a porcentagem da área negra (LC) ao longo do tempo como mostrado, de forma ilustrativa, na Figura 43 (A). Fazendo esta análise para os três sistemas (Figura 43 (C)), observamos que a inserção de peptídeos na monocamada induziu a formação de domínios de forma semelhante, e que não houve formação de domínios para monocamadas compostas por DOPG. É importante ressaltar que em todas as condições as monocamadas foram monitoradas sem a adição dos peptídeos na subfase a fim de averiguar se a formação de domínios foi induzida pelos peptídeos ou se era um processo que ocorreria quando o sistema atingisse o equilíbrio (controle).

Figura 43: (A) Variação temporal da pressão de superfície (linha azul) da monocamada de 3POPE/1DOPG induzida pela inserção de acL1A na pressão inicial de 30 mN/m e da área escura (linha preta). A seta indica injeção de peptídeo na subfase de 150 mM NaCl, pH 7,4. (B) Imagens representativas de microscopia de fluorescência da monocamada de 3POPE/1DOPG sem inserção de peptídeo (controle, acima), e para a monocamada após ($t=1000s$) a injeção de acL1A na subfase (abaixo). Escala igual a 50 μm . (C) Porcentagem média de área escura (\pm desvios padrão) observada em monocamadas formadas por POPE puro e mistura lipídica 3POPE/1DOPG na ausência (controle) e na presença de L1A ou acL1A a pressão de superfície inicial de 30 mN/m. Todas as medidas foram repetidas no mínimo três vezes para cada condição.



Os experimentos com monocamadas forneceram resultados interessantes para os peptídeos L1A e acL1A. O primeiro contato do peptídeo com a membrana pode ser avaliado utilizando experimentos de área constante, enquanto que o efeito da incorporação dos peptídeos na estrutura da membrana pode ser estudado por isotermas de compressão de monocamadas de peptídeos e lipídios co-espalhados.

No primeiro caso, os resultados demonstraram que os peptídeos são capazes de induzir um aumento na pressão de superfície de monocamadas compostas por POPE, DOPG e

3POPE/1DOPG, onde o efeito foi mais evidente para as monocamadas aniônicas e para o peptídeo acetilado em monocamadas de POPE, indicando que o peptídeo menos carregado foi capaz de se inserir mais em monocamadas de POPE comparado com L1A demonstrando que a interação peptídeo-lipídio não é apenas governada eletrostaticamente, como experimentos com vesículas mostraram anteriormente. Além disso, esses peptídeos foram capazes de induzir em monocamadas da mistura PE/PG pressão máxima de inserção maior do que em filmes de lipídios puros de PE e semelhantes à de filmes de PG. Os valores de PMI foram maiores do que a pressão lateral de bicamadas lipídicas, sugerindo uma perturbação considerável no empacotamento lipídico. Além disso, visualizações por MF demonstraram que o peptídeo acetilado foi capaz de induzir um aumento na porcentagem de área dos domínios em monocamadas compostas por POPE e pela mistura 3POPE/1DOPG.

Estudos anteriores (ALVARES; VIEGAS; RUGGIERO NETO, 2018) também demonstraram que os peptídeos L1A e acL1A induziram um aumento maior nas pressões de superfície de monocamadas aniônicas (DPPG e 8POPC/2POPG) em relação as zwitteriônicas (POPC e DPPC) e com o análogo acetilado tendo sido mais eficiente que o L1A, corroborando e complementando os resultados acima.

Os experimentos de compressão de lipídios co-espalhados com peptídeos fornecem outras informações, já que as moléculas de peptídeos são forçadas a particionar da monocamada ao espalhar a solução peptídeo/lipídio. As isotermas de compressão de filmes lipídicos apresentam comportamentos diferentes dependendo do empacotamento lipídico, que pode ser afetado pela incorporação dos peptídeos na monocamada. Para as monocamadas de POPE, foi observado que os peptídeos foram excluídos da interface assim que a pressão de superfície atingiu a pressão de colapso do filme de peptídeos puros, indicando que a interação peptídeo-lipídio foi fraca nesse caso. No entanto, na presença dos peptídeos, mais pronunciadamente para o acL1A, foi observada a formação de regiões densas mesmo em baixas pressões de superfície indicativo de imiscibilidade entre PE/acL1A. Para monocamadas de DOPG, entretanto, ocorre a expansão da monocamada e não é possível determinar pela isoterma uma pressão de exclusão dos peptídeos, já que a monocamada colapsa concomitantemente, sugerindo forte interação peptídeo-lipídio para este caso, provavelmente predominada eletrostaticamente. Para as monocamadas mistas compostas por 3POPE/1DOPG, foi possível observar que os peptídeos permaneceram na interface até pressões em torno de 7 mN/m acima da pressão de colapso dos filmes de peptídeos puros, indicando forte interação peptídeo-lipídio. Ou seja, nos casos em que há a presença de DOPG, os resultados demonstraram que esses peptídeos encontram um

ambiente mais favorável no seu entorno, permanecendo na interface até pressões de superfície altas, indicando a estabilização nessas interfaces para os dois peptídeos, de maneira mais evidente para o acetilado. Além disso, compressões realizadas abaixo da temperatura de transição da mistura 3POPE/1DOPG demonstraram que, até a concentração mais alta de peptídeo 7,2 mol %, parte dessas moléculas permanecem na interface até o colapso do filme ternário, indicando que esses peptídeos conseguem se incorporar na monocamada. Resultados indicando desvios da idealidade da área molecular e módulo de compressibilidade indicam que os esses peptídeos são capazes de desordenar o empacotamento lipídico de modo mais proeminente para o acL1A.

Todos esses resultados indicam que o peptídeo acetilado e com carga menor foi capaz de induzir a segregação de PE e PG induzindo a formação de domínios de modo mais eficaz do que o L1A, e a interação mais proeminente para os lipídios aniônicos sugere como um mecanismo adicional de ação a segregação lipídica.

4. Considerações finais

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

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

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

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

Referências

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

ALI, Shaukat et al. **Cholesterol's Interfacial Interactions with Galactosylceramides.** *Biochemistry*, v. 33, n° 10, p. 2900–2906, 1994. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00176a020.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CLIFTON, L. A. et al. **Design and use of model biomembranes to study biomolecular interactions using complementary surface-sensitive techniques.** *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 277, p. 102118, 2020. ISSN: 00018686, DOI: 10.1016/j.cis.2020.102118.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. **The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function.** *African Journal of Biochemistry Research*, v. 3, n° 5, p. 164–173, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

EEMAN, M.; DELEU, M. **From biological membranes to biomimetic model membranes.** *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, v. 18, n° 4, p. 719–736, 2009. ISSN: 1370-6233.

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

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

EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. M. **Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins).** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1768, n° 10, p. 2500–2509, 2007. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.05.023.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. **Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents.** *Molecular BioSystems*, v. 5, n° 6, p. 580–587, 2009. ISSN: 1742206X, DOI: 10.1039/b900278m.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARSH, D. **Lateral pressure in membranes.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, v. 1286, n° 3, p. 183–223, 1996. ISSN: 0304-4157.

- MARSH, D. **Handbook of lipid bilayers**. CRC press, 2013. ISBN: 1420088335.
- MATSUMOTO, K. et al. **Lipid domains in bacterial membranes**. *Molecular Microbiology*, v. 61, n° 5, p. 1110–1117, 2006. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x.
- MATSUZAKI, K. et al. **Orientational and Aggregational States of Magainin 2 in Phospholipid Bilayers**. *Biochemistry*, v. 33, n° 11, p. 3342–3349, 1994. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00177a027.
- MATSUZAKI, K. et al. **Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation**. *Biochemistry*, v. 35, n° 25, p. 8450–8456, 1996. ISSN: 00062960, DOI: 10.1021/bi960342a.
- MCELHANEY, R. N. **The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes**. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 30, p. 229–259, 1982.
- MOHWALD, H. **Phospholipid And Phospholipid-Protein Monolayers At The Air/Water Interface**. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 41, n° 1, p. 441–476, 1990. ISSN: 0066426X, DOI: 10.1146/annurev.physchem.41.1.441.
- MOL, A. R.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections**. *bioRxiv*, p. 416347, 2018. DOI: 10.1101/416347.
- MOURITSEN, O. G.; BAGATOLLI, L. A. **Life-as a matter of fat: lipids in a membrane biophysics perspective**. Springer, 2015. ISBN: 3319226142.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action**. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n° 9, p. 464–472, 2011. ISSN: 01677799, DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- NYMEYER, H.; ZHOU, H. X. **A method to determine dielectric constants in nonhomogeneous systems: Application to biological membranes**. *Biophysical Journal*, v. 94, n° 4, p. 1185–1193, 2008. ISSN: 15420086, DOI: 10.1529/biophysj.107.117770.
- PALLAS, N. R.; HARRISON, Y. **An Automated Drop Shape Apparatus and the Surface Tension of Pure Water**. *Colloids and Surfaces*, v. 43, n° 2, p. 169–194, 1990. DOI: 10.1016/0166-6622(90)80287-E.
- PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA, F. C. **Mechanism of Leakage of Phospholipid Vesicle Contents Induced by the Peptide GALA**. *Biochemistry*, v. 29, n° 37, p. 8720–8728, 1990. ISSN: 15204995, DOI: 10.1021/bi00489a031.
- PHILLIPS, M. C.; GRAHAM, D. E.; HAUSER, H. **Lateral compressibility and penetration into phospholipid monolayers and bilayer membranes**. *Nature*, v. 254, n° 5496, p. 154, 1975. ISSN: 1476-4687.

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

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

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

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

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

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

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

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

SENGUPTA, D. et al. **Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1778, n° 10, p. 2308–2317, 2008. ISSN: 00052736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.06.007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

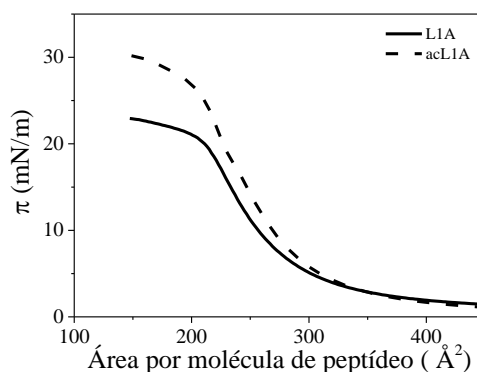
Apêndice A – Resultados complementares

Compressões de monocamadas de peptídeos puros

Para avaliar as propriedades interfaciais dos peptídeos L1A e acL1A, compressões de monocamadas compostas apenas desses peptídeos foram realizadas pelo grupo de pesquisa anteriormente (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018). As compressões foram realizadas em subfase composta por água e por 150 mM NaCl, porém, para o presente trabalho, a condição em sal é mais relevante (Figura 44). Nessa condição, as isotermas se deslocaram para áreas maiores e as pressões de colapso aumentaram comparadas com a condição em água. Como citado previamente na discussão, as pressões de colapso dessas monocamadas valem 21 e 26 mN/m para o L1A e acL1A, respectivamente, indicando que o peptídeo acetilado é capaz de formar monocamadas mais estáveis.

Um peptídeo com estrutura de alfa-hélice orientado perpendicularmente a interface ocuparia uma área de aproximadamente 180 \AA^2 . Por outro lado, a área teórica ocupada por uma alfa-hélice orientada paralela à interface pode ser estimada como $22,5 \text{ \AA}^2$ (diâmetro da hélice considerando a cadeira lateral (15 \AA^2) x comprimento por resíduo de aminoácido ($1,5 \text{ \AA}^2$)) multiplicado pelo número de resíduos (ALVARES, Dayane S. et al., 2016). Assim, para um segmento de 18 resíduos, esta área vale em torno de 400 \AA^2 . Ou seja, de acordo com as isotermas onde as pressões de colapso ocorrem em áreas em torno de 225 \AA^2 , isso sugere que ambos os peptídeos se orientam perpendicularmente à interface.

Figura 44: Isotermas de compressão dos peptídeos puros L1A (linha contínua) e acL1A (linha tracejada) em subfase composta por NaCl 150 mM, pH 7,4 a 20 °C.



Fonte: Adaptado de (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018).

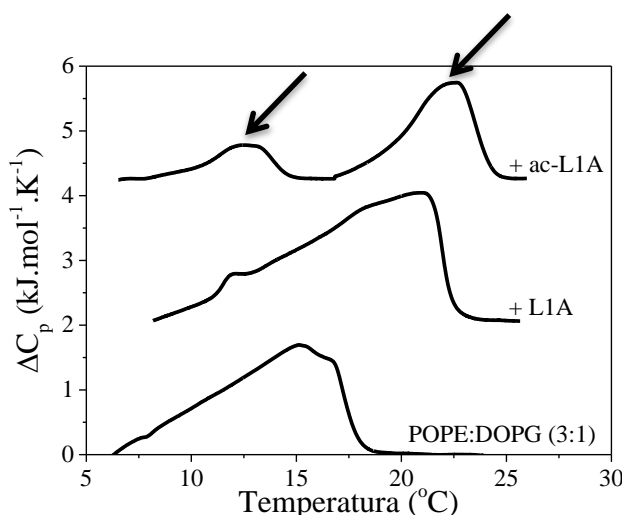
Impacto dos peptídeos L1A e acL1A no comportamento termotrópico de membranas lipídicas compostas de 3POPE/1DOPG analisado por calorimetria diferencial de varredura.

Os resultados obtidos pelo grupo com os peptídeos L1A e acL1A (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018; ZANIN et al., 2013; ZANIN et al., 2016) motivaram o estudo do sistema PE/PG mimético de bactérias Gram-negativas. Dessa forma, utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi avaliado o impacto dos peptídeos L1A e acL1A no comportamento termotrópico de membranas lipídicas compostas de 3POPE/1DOPG.

Os fosfolípidios POPE e DOPG que compõem a mistura lipídica investigada possuem temperatura de transição de fase gel-líquido-cristalina bem diferentes. Para o POPE, esse valor é 25 °C enquanto que para o DOPG é -18 °C. Desta forma, devido à proporção dos lípidios na mistura, sua temperatura de transição principal se situa em 15 °C (Erand et al, 2009).

Inicialmente foi analisada a miscibilidade da mistura, e em seguida como os peptídeos L1A e acL1A afetam o comportamento termotrópico das vesículas multilamelares compostas pela mistura lipídica. Assim, primeiro foi feito o experimento com soluções de MLVs da mistura 3POPE/1DOPG variando a temperatura de 6 a 30 °C, com incrementos de 0,5 °C por minuto. Usando os mesmos parâmetros experimentais, usou-se soluções de MLVs contendo L1A ou acL1A na fração molar L/P=15. Os termogramas obtidos encontram-se na Figura 45 abaixo.

Figura 45: Termogramas de aquecimento de 3POPE/1DOPG na ausência de peptídeos e na presença de L1A ou acL1A na razão L/P = 15 adquiridas na taxa de 0,5 °C/min.



Fonte: Adaptado de (ALVARES, 2011).

O aparecimento de um pico largo centrado em 15,0 °C nos termogramas das MLVs mostra que esta mistura não é totalmente miscível, pois uma mistura miscível apresentaria um pico

bem definido e delgado. Além disso, observa-se um ombro entre 16 e 17 °C. A área embaixo da curva nos fornece a entalpia, a qual sua variação fornece informação a respeito da localização dos peptídeos. Os valores das temperaturas de transição principal da mistura e das entalpias antes e após a adição dos peptídeos se encontram na Tabela VI abaixo:

Tabela VI: Parâmetros termodinâmicos das MLVs de 3POPE/1DOPG na ausência de peptídeos e na presença de L1A ou acL1A. ^(a) Parâmetros para duas transições de fase simétricas indicadas por setas na Figura 45 de DSC.

	MLVs puras	+ L1A	+ acL1A^a
T _m (°C)	15,0 ± 1,0	20,8 ± 1,0	12,6 ± 0,5 / 22,5 ± 0,5
ΔH (kJ/mol)	11,2 ± 1,1	15,3 ± 1,3	1,6 ± 0,8 / 5,2 ± 1,2

Fonte: Adaptado de (ALVARES, 2011).

A presença de L1A induziu um aumento na temperatura de transição principal de 15,0 para 20,8 °C, além de uma pequena flutuação em torno de 12 °C. Também é observado um aumento na entalpia de 11,2 para 15,3 kJ/mol. Na mesma proporção do análogo acetilado, nota-se no termograma a presença de dois picos bem definidos em 12,6 e 22,5 °C e entalpias valendo 1,6 e 5,2 kJ/mol, respectivamente.

Estes resultados sugerem que, na mesma proporção, ambos os peptídeos podem ter estabilizado a fase gel, e/ou podem estar se ligando, preferencialmente, ao lipídio aniônico PG e segregando-o do lipídio zwitteriônico PE. Essa segregação seria mais evidente para o peptídeo acetilado, devido à melhor definição dos picos após a adição do mesmo. Pode-se também inferir sobre a localização do peptídeo a partir da variação da entalpia. Um aumento da entalpia como visto após a adição de L1A indica que este peptídeo se encontra numa região mais polar, enquanto que uma diminuição da entalpia como visto após a adição do peptídeo acetilado indica que o mesmo se encontra numa região mais apolar (LOHNER et al., 1997; MCELHANEY, 1982). Isso é devido ao ganho ou perda de entropia associados às ligações desses peptídeos com moléculas de água. Além disso, o fato do peptídeo acetilado se encontrar numa região mais apolar, como as cadeias lipídicas, sugere maior perturbação do empacotamento lipídico.

Área teórica ocupada por peptídeos

A área ocupada por agregados ou domínios vistos por microscopia de fluorescência é mensurável pelo software de imagem Fiji/ImageJ. Para comparar com a área teórica ocupada por peptídeos, é feito o cálculo com base na isoterma de peptídeos puros. Levando em consideração a quantidade de moléculas de peptídeos espalhada, a área por molécula é convertida em área e, por conseguinte, em porcentagem de área da cuba.

Figura 46: Porcentagem de area ocupada por 1,9 nmol de peptídeos (L1A a acL1A, linha preta e cinza, respectivamente) durante a compressão de filmes de peptídeos puros publicados em (ALVARES; WILKE; RUGGIERO NETO, 2018). Esse número de moléculas de peptídeos corresponde a 7,2 mol% de peptídeos quando co-espalhados com lipídios na interface

