

**ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN**

**Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2.**

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

Orientador: Prof. Dr Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

L869e	<p>Lorenzón, Esteban Nicolás</p> <p>Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2. / Esteban Nicolás Lorenzón. – Araraquara : [s.n], 2015 116 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Eduardo Maffud Cilli</p> <p>1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 2. Dímeros. 3. Dicroísmo circular. 4. Peptídeos - síntese. 5. Mecanismo de ação (Bioquímica). I. Título.</p>
-------	---

ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN

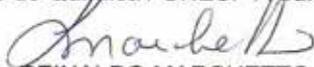
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2015.

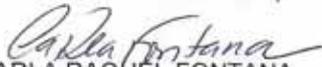
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



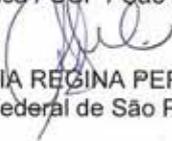
Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Profª. Drª. CARLA RAQUEL FONTANA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara



Profª. Drª. ILANA LOPES BARATELLA DA CUNHA CAMARGO  
Instituto de Física / USP / São Carlos



Profª. Drª. KÁTIA REGINA PEREZ  
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / São Paulo

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados pessoais**

**Nome:** Esteban Nicolás Lorenzón

**Nome em citações bibliográficas:** LORENZÓN, E. N.; Lorenzón, Esteban; Lorenzon, EN; LORENZON, E. N.; Esteban Nicolas Lorenzon; LORENZÓN, ESTEBAN NICOLÁS; LORENZÓN, ESTEBAN N; Esteban N. Lorenzón; LORENZÓN, ESTEBAN N.

**Endereço profissional:** Instituto de Química - UNESP – Araraquara. R. Francisco Degni, 55. Bairro Quitandinha – Araraquara 14800900, SP – Brasil. Telefone: 16 33019822

**Endereço eletrônico:** estebanlorenzón@hotmail.com e lorenzonesteban@yahoo.com.ar

### **Formação acadêmica/titulação**

**2011 Doutorado em Biotecnologia.** Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Efeitos da dimerização na Estrutura e Atividade Biológica dos Peptídeos Antimicrobianos Aureina 1.2 e Magainina 2. Orientador: Eduardo Maffud Cilli. Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**2009 - 2011 Mestrado em Biotecnologia** Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre duas cadeias peptídicas na atividade de peptídeos antimicrobianos. Orientador: Eduardo Maffud Cilli. Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

**1998 - 2004 Graduação em Biotecnología.** Facultad de Bioquímica e Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina. Título: Ciclizaciones de péptidos mediante puentes disulfuro y enlaces amida. Aplicación al diseño de antígenos. Orientador: Georgina Tonarelli. Palavras-chave: Síntese de peptídeos, ciclização, cromatografia, ELISA.

### **Atuação profissional**

#### **1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP**

**2014 - 2014** Vínculo: Bolsista Didático, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 8. Outras informações: Ditado de aulas práticas de Bioquímica para alunos (integral e noturno) do curso de Farmácia e Bioquímica.

**2014 - 2015** Vínculo: Representante Discente (T), Enquadramento funcional: Comissão Permanente de Pesquisa (CPP).

**2013 - 2015** Vínculo: Representante Discente (S), Enquadramento funcional: Comissão Permanente de Ensino (CPE).

**2012 - 2013** Vínculo: Representante Discente (T), Enquadramento funcional: Congregação.

**2011 - 2013** Vínculo: Representante Discente (T), Enquadramento funcional: Conselho de Pós-Graduação em Biotecnologia.

**2010 - 2010** Vínculo: Ensino, Enquadramento funcional: Estágio em Docência - Disciplina: Bioquímica, Carga horária: 8.

**2009 - Atual** Vínculo: Aluno, Enquadramento funcional: Aluno de Pós-Graduação, Carga horária: 50.

## **2. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP, Argentina.**

**2010 - 2011** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Pesquisador.

## **3. ERIOCHEM SA, Argentina.**

**2005 - 2009** Vínculo: Indústria, Enquadramento funcional: Pesquisador, Carga horária: 45.

### **Revisor de periódico**

**1. 2014 - Atual** **Advancement in Medicinal Plant Research**

**2. 2014 - Atual** **Revista Biociências (Taubaté)**

### **Áreas de atuação**

**1. Peptídeos**

**2. Desenvolvimento de formulações de medicamentos**

**3. Monitoramento de ensaios Pré-clínicos**

**4. Imunologia**

### **Projetos de pesquisa**

**2012 - Atual** NanoBionics (<http://www.nanobionics.pro.br/new/>)

**2012 - Atual** Peptídeos antimicrobianos: efeito da dimerização e produção de biomembranas de látex/peptídeos.

**2011 - Atual** Efeito da dimerização na estrutura e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos.

**2010 - 2011** Optimización de la inmunogenicidad de las proteínas gP5 y M y su utilización en el diagnóstico de la Arteritis Viral Equina.

**2009 - 2011** Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre duas cadeias peptídicas na atividade de peptídeos antimicrobianos.

**2002 - 2004** Ciclizaciones de péptidos mediante puentes disulfuro y enlaces amida. Aplicación al diseño de antígenos.

## **Idiomas**

**Inglês:** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Espanhol:** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Português:** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

## **Prêmios e títulos**

**2013** American Peptide Symposium Merit Travel Award., American Peptide Society (23rd American Peptide Symposium)

**2012** Honorable Mention by the Poster evaluation committee of the II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, LaFeBS.

## **Produção**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1- LORENZÓN, ESTEBAN N.; PICCOLI, JULIA P.; Cilli, Eduardo M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans. *Amino Acids* (Wien. Print), v. 46, p. 2627-2631, 2014.

2- ANDREANI, TATIANA ; SOUZA, ANA LUIZA R. DE ; KIILL, CHARLENE P. ; LORENZÓN, ESTEBAN N. ; FANGUEIRO, JOANA F. ; CALPENA, ANA CRISTINA ; CHAUD, MARCO V. ; GARCIA, MARIA L. ; GREMIÃO, MARIA PALMIRA D. ; SILVA, AMÉLIA M. ; SOUTO, ELIANA B. . Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (Print), v. 473, p. 627-635, 2014.

3- METZ, GERMÁN ERNESTO; LORENZÓN, ESTEBAN NICOLÁS; PANELI, CARLOS JAVIER; DÍAZ, SILVINA ; CILLI, EDUARDO MAFFUD ; ECHEVERRÍA, MARÍA GABRIELA . Development of a peptide ELISA for the diagnosis of Equine arteritis virus. *Journal of Virological Methods*, 2014.

4- LORENZÓN, E. N.; SANCHES, P. R. S.; Nogueira, L. G.; BAUAB, T. M.; CILLI, E. M. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. *Amino Acids*. 44 (6), 1521-1528, 2013.

5- DA SILVA, BRUNO ROCHA ; DE FREITAS, VICTOR ARAGÃO ABREU ; CARNEIRO, VICTOR ALVES ; ARRUDA, FRANCISCO VASSILIEPE SOUSA ; LORENZÓN, ESTEBAN NICOLÁS ; DE AGUIAR, ANDRÉA SILVIA WALTER ; CILLI, EDUARDO MAFFUD ; CAVADA, BENILDO SOUSA ; TEIXEIRA, EDSON HOLANDA . Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. *Peptides*. v. 42, p. 78-83, 2013.

6- VICENTE, Eduardo Festozo; BASSO, L. G. M.; CESPEDES, G.F.; LORENZON, E. N.; CASTRO, M. S.; GIANINNI, M. J. ; COSTA-FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Dynamics and Conformational Studies of TOAC Spin Labeled Analogues of Ctx(Ile21)-Ha Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Plos One*, v. 8, p. e60818, 2013.

7- LORENZON, E. N.; Cespedes, G. F.; Vicente, E. F.; Nogueira, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Effects of Dimerization on the Structure and Biological Activity of Antimicrobial Peptide Ctx-Ha. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 56, p. 3004-3010, 2012.

8- Cespedes, Ferreira; LORENZÓN, E. N.; VICENTE, Eduardo Festozo; GIANINNI, M. J.; FONTES, Wagner; CASTRO, Mariana S ; CILLI, E. M. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein and Peptide Letters*, v. 19, p. 596-603, 2012.

9- Santi, M. N, LORENZÓN, E. N., COSTABEL, F, Tonarelli, G. Ciclización de péptidos sintéticos a través de la formación lactamas y puentes disulfuro. Aplicación a diferentes modelos de interés biológico. *FABICIB-FACULTAD DE BIOQUIMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS*. , v.12, p.33 - 45, 2008.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)**

1. LORENZÓN, E. N., Nogueira, L.G., Bauab, T. M., CILLI, E. M. Structure and biological activity of Aurein 1.2 and dimeric analogues In: 32nd European Peptide Symposium., 2012, Athens.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. PICCOLI, J. P., SANTOS FILHO, N. A., LORENZON, E. N., FERNANDES, F. C., Bueno, P R, CILLI, E. M. Ferrocene-Peptides: a new approach for self-assembled monolayers In: 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia.

2. LORENZON, E. N., PICCOLI, J. P., RAMOS, M. A. S., BAUAB, T. M., CILLI, E. M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans In: 33rd European Peptide Symposium, 2014, Sofia.

3. Cilli, Eduardo M., LORENZÓN, E. N., RISKE, K. A. New Insights into the Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2. Isothermal Titration Calorimetry and Confocal Microscopy Studies In: 58th Annual Meeting - Biophysical Society., 2014, San Francisco, California..
4. Enoki, T. A., RISKE, K. A., PEREZ, K. R., LORENZON, E. N., CILLI, E. M., Lamy, T. M. The Interaction Between the Antimicrobial Peptide K-Hyal and Model Membranes: Distinct Action in Neutral or Negatively Charged Bilayers In: 58th Annual Meeting - Biophysical Society., 2014, San Francisco, California..
5. LORENZÓN, ESTEBAN N, Nogueira, L. G., Bauab, T. M., RISKE, K. A., CILLI, EDUARDO MAFFUD. Dimerization of AU 1.2. Effects in biological activity, structure and membrane mimetics interactions. In: 23rd American Peptide Symposium, 2013, Hawai'i.
6. MIRANDA, M. C. R., LORENZÓN, ESTEBAN N, HERCULANO, R. D., Cilli, Eduardo M. Evaluation of peptides release using natural rubber latex biomembrane as scaffold In: XII Brazilian MRS Meeting Program book (SBPMat) / Sociedade Brasileira de Materiais, 2013, Campos de Jordão.
7. Céspedes, G. F., NOBRE, T. M., OLIVEIRA JR, O., VICENTE, Eduardo Festozo, Sanches, P. R., LORENZÓN, E. N., BONG, D. C., CILLI, E. M. Synthesis and interaction with model membrane of Dengue virus serotype 2 In: 23rd American Peptide Symposium, 2013, Big Island of Hawai'i.
8. SILVA, B. R., CARNEIRO, V. A., CILLI, E. M., LORENZÓN, E. N., TEIXEIRA, E. H. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO ASP-[TRP6]-HY-A1 SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS In: IV Congresso Internacional de Odontologia, XVIII Congresso Cearense de Odontologia, 2012, Fortaleza.
9. Metz, G. E., LORENZÓN, E. N., Serena, M.S, Panei, C.J., Díaz, S., CILLI, E. M., Echeverria, M. G. DISEÑO DE UN ELISA CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ARTERITIS VIRAL EQUINA In: XIX REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA de la ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO, 2012, Ciudad Autónoma de Buenos Aire.
10. FREITAS, V. A. A., CILLI, E. M., LORENZÓN, E. N., CARNEIRO, V. A. EFEITO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LYS-[TRP6]-HY-A1 NO CRESCIMENTO PLANCTÔNICO DE STREPTOCOCCUS SOBRINUS. IV Congresso Internacional de Odontologia, 2012, Fortaleza.
11. LORENZÓN, E. N., Nogueira, L.G., Bauab, T. M., CILLI, E. M. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF AU 1.2 AND DIMERIC ANALOGUES In: II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress., 2012, Buzios.
12. Cespedes, G. F., Piccoli, J P, Nobre, T.M., Oliveira Jr., O.N., VICENTE, Eduardo Festozo, LORENZÓN, E. N., CILLI, E. M. Synthesis and Interaction with Model Membrane of Different Dengue Virus Serotypes In: II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, 2012, Buzios.

13. Enoki, T. A., Vequi-Suplicy, C. C., Marquezin, C. A., CILLI, E. M., LORENZÓN, E. N., Lamy, T. M. The Interaction Between antimicrobial Peptides and Model Membranes: A study With Intrinsic and Extrinsic Fluorescent Probes. In: II Latin American Federation of Biophysical Societies (LaFeBS) Congress/ XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, 2012, Buzios.
14. LORENZÓN, E. N., Vicente, E. F., CESPEDES, G.F., Nogueira, L.G., BAUAB, T. M., CILLI, E. M. Effects of Dimerization on Structure and Activity of the Antimicrobial Peptide Hylin-c. In: 22nd American Peptide Society Symposium, 2011, San Diego.
15. VICENTE, Eduardo Festozo, CESPEDES, G.F., LORENZÓN, ESTEBAN N, Costa-Filho, A. J., Cilli, Eduardo M. Fluorescent and CD Studies of a Synthetic Peptide of the N-Terminal Region of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (HSDHODH) In: 3rd South American Workshop and International Gregorio Weber Conference on New Trends in Advanced Fluorescence Microscopy, 2011, Buenos Aires.
16. LORENZÓN, E. N., CESPEDES, G.F., VICENTE, Eduardo Festozo, Castro, M., CILLI, E. M. New insights into the mechanism of action of the antimicrobial peptide Ctx-Ha. In: Third South American Workshop. New Trends in Advanced Fluorescence Microscopy Techniques., 2011, Buenos Aires.
17. Cespedes, G. F., Vicente, E. F., LORENZÓN, E. N., Sanches, P. R., CILLI, E. M. Synthesis and Interaction with Model Membrane of Different Dengue Virus Fusion Peptides In: XL Reunião Anual da SBBQ, 2011, Foz do Iguaçu.
18. Cespedes, G. F., VICENTE, Eduardo Festozo, LORENZÓN, E. N., Cilli, Eduardo M. Synthesis and interaction with model membrane of different Dengue Virus Serotypes In: 3rd South American Workshop and International Gregorio Weber Conference on New Trends in Advanced Fluorescence Microscopy, 2011, Buenos Aires.
19. Vicente, E. F., Céspedes, G. F., LORENZÓN, E. N., Costa-Filho, A. J., CILLI, E. M. Use Of Synthetic Peptides In The Study Of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (HsDHODH). Reunião XL Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2011, Foz do Iguaçu.
20. LORENZÓN, E. N., Céspedes, G. F., Vicente, E. F., Nogueira, L.G., BAUAB, T. M., CILLI, E. M. "Effect of dimerization on the structure and biological activity of an antimicrobial peptide" In: 3º Congresso Brasileiro de Biotecnología, 2010, Fortaleza.
21. LORENZÓN, E. N., Céspedes, G. F., VICENTE, Eduardo Festozo, Nogueira, L.G., Bauab, T. M., CILLI, E. M. Spacers Effect in the Antimicrobial Activity of Dimeric Forms of Hylin-c. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.
22. Sanches, P. R., Céspedes, G. F., Vicente, E. F., LORENZÓN, E. N., CILLI, E. M. Synthesis, Characterization, Membrane Mimetic Interaction and Antifungal Activity of Stycholisin II (11-30) Containing Gallic Acid In: 3er International Workshop on Spectroscopy for Biology, 2010, Maresias, São Paulo.

23. Santi, M. N, LORENZÓN, E. N., Tonarelli, G. SÍNTESES DE ANÁLOGOS CICLICOS DE PEPTÍDOS REEMPLAZANDO EL PUENTE DISULFURO POR UN ENLACE LACTAMA. In: III Encontro Bioquímico del Litoral VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. LORENZÓN, E. N., Soutullo, A., Santi, M. N, Tonarelli, G. Epitopes antigénicos cíclicos del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y su evaluación biológica mediante enzimoimmunoensayos In: XII Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2004, Curitiba.

### **Patentes**

1. SANTOS FILHO, NORIVAL A., LORENZÓN, ESTEBAN N.; CILLI, E. M.; RAMOS, M. A. S.; BAUAB, T. M. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEO ANTIBACTERIANO A PARTIR DA PEÇONHA DA SERPENTE BOTHROPS JARARACUSSU, REFERIDO PEPTÍDEO ANTIBACTERIANO, SEU DÍMERO E USO”. Data de depósito: 17/12/2014. Número de registro: BR 10 2014 031582-9. Depositante/Titular: IQ UNESP Araraquara, FCFar UNESP Araraquara.

2. LORENZÓN, ESTEBAN N, CILLI, E. M., RAMOS, M. A. S., BAUAB, T. M. “Peptídeo sintético dimérico antimicrobiano e antifúngico e seus usos”. Data de depósito: 03/09/2014. Número de registro: BR 10 2014 021761 4. Depositante/Titular: IQ UNESP Araraquara, FCFar UNESP Araraquara.

3. LORENZÓN, E. N., Nuñez, J., Moroni, G., Iturraspe, J. PHARMACEUTICAL FORMULATION OF TAXANE, 2010. País: Estados Unidos. Número do registro: US/20100255104A1. Data de depósito: 30/03/2010.

### **Apresentação de seminário**

1. Esteban Nicolas Lorenzon. Peptídeos Antimicrobianos: antibióticos do futuro?, 2014. Seminário proferido para docentes e alunos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Cidade: Araraquara.

2. LORENZÓN, ESTEBAN NICOLÁS. Peptídeos Antimicrobianos: antibióticos do futuro?, 2014. Seminário proferido na UFSCar para alunos do curso de Biotecnologia. Cidade: São Carlos.

## **Supervisões**

### **Iniciação científica**

1. Júlia Pinto Piccoli. Síntese e atividade de conjugados ácido gálico – GnRH-III. 2012. Iniciação científica (Lic em Química) - IQ UNESP Araraquara.
2. Michely Fernanda Leopoldo. Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para aplicação de um peptídeo antimicrobiano. 2011. Iniciação científica (Farmácia e Bioquímica) - IQ UNESP Araraquara.

## **Bancas**

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão de Graduação**

1. GARRIDO, S. S., SALGADO, H. R. N., LORENZÓN, E. N. Participação em banca de Michely Fernanda Leopoldo. Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para aplicação de um peptídeo com ação antimicrobiana, 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### **Outras**

1. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2013. Instituto de Química- UNESP, 2013.
2. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Janaina Pires, 2013.
3. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Maria Olivia Campos Masiero, 2013.
4. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Thaís Milena de Souza Bezerra, 2013.
5. Comissão de bolsas do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia. 2012. Instituto de Química- UNESP, 2012.
6. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Graziely Ferreira Céspedes, 2012.
7. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Juliana Sá Leal de Figueiredo, 2012.
8. Solicitação de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior- PDSE/CAPES da doutoranda em Biotecnologia Marina Paganini Marques, 2012.

A minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

A minha família, pelo amor incondicional.

A Alline, pelo amor e companheirismo.

Ao Eduardo, pela confiança e por sua orientação em questões profissionais e pessoais.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Lentilha, Graziely, Saulo, Julia, Norival, Matheus, Larissa, Natã, Paulo, Edson, pelo companheirismo e por fazer mais fácil e divertido o trabalho.

Aos meus amigos Guillermo Compagnucci, Jorge Manzotti, Ulises Bogardi, Ezequiel Jeandrevin, Guillermo Moroni, Gabriel Hunzicker, Noelia Döning e Romina Buratto por fazer cada reencontro especial.

A Prof. Dra. Thais Bauab e seu grupo de pesquisa, em especial a Leonardo e Matheus, pela ajuda nos testes microbiológicos.

A Prof. Dra. Karin do Amaral Riske pela valiosa ajuda nos testes biofísicos.

A Wennia, Sandra, Célia, Ana Paula e Cintia por serem muito prestativas comigo.

Ao CNPq pela bolsa.

## **EPIGRAFE**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

Versões diméricas dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) Aureína 1.2 (AU) e Magainina 2 (MG2) foram sintetizadas e avaliadas em relação à influência da dimerização e da posição do linker (N- ou C- terminal) na estrutura e atividade biológica. Em solução aquosa, o peptídeo AU não apresentou estrutura secundária definida. Por sua vez, os dímeros (AU)<sub>2</sub>K e E(AU)<sub>2</sub> apresentaram uma estrutura helicoidal. Em presença de miméticos de membrana, os três peptídeos adquiriram uma estrutura tipo  $\alpha$ -hélice. Estudos preliminares de atividade hemolítica e vazamento de carboxifluoresceína mostraram que a atividade do peptídeo AU é dependente da concentração. No entanto, para as versões diméricas este efeito foi menos pronunciado. Isto sugeriu que a dimerização muda o mecanismo de ação, o que logo foi confirmado por diferentes técnicas biofísicas (microscopia de contraste, calorimetria de titulação isotérmica, dicroísmo circular e vazamento de carboxifluoresceína). Em relação à atividade antimicrobiana, as versões diméricas tiveram uma diminuição da atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans* quando comparadas com o monômero. Entretanto, os dímeros apresentaram a capacidade de agregar células de *C. albicans*. Empregando técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular e fluorescência), foi evidenciado que o dímero (AU)<sub>2</sub>K interage com mananos, o principal componente da parede celular de *C. albicans*. Esta interação não foi observada para o monômero. Em função destes resultados, foi proposto um modelo pelo qual o dímero interage com os mananos, levando à agregação das células de levedura. Em um segundo bloco o peptídeo MG2 foi estudado. Em solução aquosa, o peptídeo MG2 e as duas versões diméricas não apresentaram estrutura secundária definida. Por sua vez, em presença de miméticos de membrana, os três peptídeos adquiriram estrutura helicoidal. Os resultados mostraram que a dimerização N-terminal não afetou a atividade biológica do peptídeo MG2. Já, o peptídeo (MG2)<sub>2</sub>K apresentou uma atividade antimicrobiana entre 8 e 16 vezes maior que o monômero. Motivados por estes resultados, a velocidade de atividade foi avaliada. Os dados mostraram que a dimerização C-terminal do peptídeo MG2 aumenta consideravelmente a velocidade com que o peptídeo age sobre *E. coli*. Os peptídeos MG2 e E(MG2)<sub>2</sub> não apresentaram atividade hemolítica, enquanto que (MG2)<sub>2</sub>K foi hemolítico, mas só acima da concentração inibitória mínima. Os resultados de vazamento de carboxifluoresceína mostraram que as versões diméricas tem uma maior capacidade de permeabilizar LUVs. De modo geral, os resultados mostraram que em função do peptídeo utilizado e a posição do linker, a dimerização pode aumentar, diminuir ou não alterar a atividade biológica. Assim, a dimerização não é um tópico conclusivo e constitui uma interessante estratégia no desenho de novas moléculas com potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** Peptídeos antimicrobianos. Dimerização. Atividade biológica. Mecanismo de ação.

## **ABSTRACT**

Dimeric versions of the antimicrobial peptides (AMPs) Aurein 1.2 (AU) and Magainin 2 (MG2) were synthesized and evaluated for the influence of dimerization and the position of the linker (N- or C-terminal) in the structure and biological activity. In aqueous solution, AU showed no defined secondary structure. On the other hand, the dimers (AU)<sub>2</sub>K and E(AU)<sub>2</sub> showed a helical structure. In the presence of membrane mimetics, the three peptides acquired a  $\alpha$ -helix structure. Preliminary studies of hemolytic activity and leakage of carboxyfluorescein showed that the activity of AU is concentration dependent. However, this effect was less pronounced for the dimeric versions. This suggested that dimerization would change the mechanism of action, a fact that was confirmed by different biophysical techniques (contrast microscopy, isothermal titration calorimetry, circular dichroism and leakage of carboxyfluorescein). Regarding antimicrobial activity, dimeric versions had a marked decrease in activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Càndida albicans* when compared to the monomer. However, dimers showed the ability to aggregate cells of *Candida albicans*. Using spectroscopic techniques (circular dichroism and fluorescence), it was shown that (AU)<sub>2</sub>K interacts with mannans molecules, the main component of the cell wall of *C. albicans*. This interaction was not observed for the monomer. Based on these results, a model has been proposed by which the dimer interacts with mannans, leading to aggregation of the yeast cells. In a second part, MG2 was studied. In aqueous solution MG2 and the two dimeric versions showed no defined secondary structure. However, in the presence of membrane mimetics, all three peptides have acquired helical structure. The results showed that the N-terminal dimerization did not affect the biological activity of the peptide MG2. On the other hand, the peptide (MG2)<sub>2</sub>K showed an antimicrobial activity between 8 and 16 times higher. Encouraged by these results, the “time-kill” activity was evaluated. The data showed that the C-terminal dimerization of MG2 increases the speed with which the peptide acts on *Escherichia coli*. The peptides MG2 and E(MG2)<sub>2</sub> showed no hemolytic activity, while (MG2)<sub>2</sub>K was hemolytic, but only above the minimum inhibitory concentration. Carboxyfluorescein leakage assay showed that the dimeric versions have a greater ability to permeabilize LUVs. Overall, the results showed that depending on the peptide used, and the position of the linker, dimerization can increase or decrease the biological activity. Thus, dimerization is not a conclusive topic and is an interesting strategy in the design of new molecules with biotechnological potential.

**Keywords:** Antimicrobial peptides. Dimerization. Biological activity. Mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resistência de alguns microrganismos aos antibióticos tradicionais. 1- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, 2- Enterococos resistentes a vancomicina, 3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a imipenem, 4- <i>Acinetobacter ssp</i> resistente a imipenem, 5- <i>Cândida ssp</i> resistente a fluconazol. ....	25
Figura 2 - Mecanismos de aquisição de resistência. Mutação (a) e transferência gênica (b). ....	26
Figura 3 - Principais causas da resistência aos antibióticos. ....	27
Figura 4 - Número de novos antibióticos aprovados pela FDA. ....	28
Figura 5 - Mecanismos de ação dos PAMs. ....	29
Figura 6 - Evolução das pesquisas sobre peptídeos antimicrobianos. ....	30
Figura 7 - PAMs com as quatro estruturas secundárias mais representativas. ....	31
Figura 8 – Principais características físico-químicas dos PAMs catiônicos. ....	32
Figura 9 - Mecanismos de ação propostos para PAMs que agem sobre a membrana plasmática. a) “barrel-stave”, b) “toroidal pore”, c) “carpet-like” ....	33
Figura 10 - Mecanismos alternativos de ação dos PAMs. Atividade (a) em membranas plasmáticas; (b,c) sobre o metabolismo de ácidos nucleicos; (d) na síntese da parede celular; (e,f) na síntese e enovelamento de proteínas; (g) na membrana da mitocôndria ou na síntese de ATP/NADH.....	34
Figura 11 – Estrutura tridimensional do peptídeo Aureina 1.2 ....	37
Figura 12 - Estrutura tridimensional do peptídeo Magainina 2. ....	38
Figura 13 - Algumas metodologias utilizadas para o estudo da interação peptídeo-lipídeo.....	39
Figura 14 - Vesículas de diferentes tamanhos. ....	41
Figura 15 - Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos. ....	43
Figura 16 - Esquema básico da SPPS segundo a estratégia Fmoc e Boc. ....	44
Figura 17 - Estratégias de sínteses dos peptídeos diméricos. Sínteses dos peptídeos dimerizados pela extremidade C-terminal (a) e N-terminal (b). ....	46
Figura 18 - Representação esquemática da ligação peptídica mostrando os ângulos $\Phi$ e $\Psi$ .....	49
Figura 19 - Espectros de CD característicos das principais estruturas secundárias de peptídeos e proteínas. Alfa-hélice (a), folha-beta (b) e random-coil (c).....	49
Figura 20 - Perfis de vazamento de carboxifluoresceína em vesículas tratadas com PAMs. Exemplo de formação de poros (a). Mecanismo de solubilização-carpete (b).....	51
Figura 21 - Diferenciação dos mecanismos de dissolução da bicamada lipídica (a) e de formação de poros (b) em GUVs. Ampliação de 68X. ....	56
Figura 22 - Curvas de titulação calorimétrica lipídeo/peptídeo. Fluxo de Calor em função do tempo (a). Calores de reação obtidos da integração de cada traço calorimétrico (b). ....	57
Figura 23 - Perfis cromatográficos do peptídeo AU bruto (preto) e puro (vermelho).....	59
Figura 24- Perfis cromatográficos do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K bruto (preto) e puro (vermelho).....	60
Figura 25 - Perfis cromatográficos do peptídeo E(AU) <sub>2</sub> bruto (preto) e puro (vermelho).....	60
Figura 26 - Espectro de massas do peptídeo AU puro. ....	62
Figura 27 - Espectro de massas do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K puro. ....	62
Figura 28 - Espectro de massas do peptídeo E(AU) <sub>2</sub> puro.....	63
Figura 29 - Espectros de CD dos peptídeos AU, E(AU) <sub>2</sub> e (AU) <sub>2</sub> K em solução aquosa (a) e em 10 mmol/L de LPC.....	64

Figura 30- Estrutura da AU ligada a micelas de SDS.....	65
Figura 31 – Representação da estrutura secundária (a) e da superfície de potencial eletrostático (b) do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K em solução aquosa obtida pelo programa “Pep Fold”. A superfície em azul representa as regiões hidrofílicas e em vermelho as hidrofóbicas.....	66
Figura 32 - Permeabilização de LUVs de DPPA/DPPC (5/95) pelos peptídeos AU, E(AU) <sub>2</sub> e (AU) <sub>2</sub> K. Concentração: 1 (a), 4 (b) e 16 (c) µmol/L. ....	67
Figura 33 - Atividade hemolítica dos peptídeos AU, (AU) <sub>2</sub> K e E(AU) <sub>2</sub> . ....	68
Figura 34 – Foto da microplaca correspondente ao estudo da atividade dos peptídeos AU, (AU) <sub>2</sub> K e E(AU) <sub>2</sub> sobre <i>C. albicans</i> . Os pontos brancos foram identificados como agregados de células de leveduras. ....	70
Figura 35 - Alinhamento da estrutura primária dos peptídeos LL-37 e (AU) <sub>2</sub> K.....	71
Figura 36 - Espectros de fluorescência e CD dos peptídeos AU (a e b) e (AU) <sub>2</sub> K (c e d) em diferentes concentrações de manano (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 vezes a concentração dos peptídeos). ....	72
Figura 37 – Modelo proposto para a interação do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K com mananos.....	72
Figura 38 - Modelo proposto para a interação do peptídeo AU e (AU) <sub>2</sub> K com a parede celular de leveduras. (Adaptado de Hardison and Brown, 2012). ....	73
Figura 39 - Efeito do peptídeo AU sobre GUVs compostas de 95/5 (A) e 50/50 (B) SOPC/SOPG. ....	75
Figura 40 - Efeito do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K sobre GUVs compostas de 95/5 (A) e 50/50 (B) SOPC/SOPG.....	76
Figura 41 – Curva calorimétrica de titulação (a) e integração da área da curva (b) do peptídeo AU (40 µmol/L) com LUVs contendo 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG (10 mmol/L). ....	78
Figura 42 - Curva calorimétrica de titulação (a) e integração da área da curva (b) do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K (40 µmol/L) com LUVs contendo 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG (10 mmol/L). ....	79
Figura 43 - Espectros de CD do peptídeo AU em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.....	81
Figura 44 – Variação da elipticidade molar a 222 nm para o peptídeo AU em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.....	81
Figura 45 – Espectros de CD do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG. ....	82
Figura 46 - Variação da razão de elipticidade molar 222/208 nm para o peptídeo (AU) <sub>2</sub> K em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.....	82
Figura 47 - Porcentagem de vazamento de CF para o peptídeo AU em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.....	83
Figura 48 - Porcentagem de permeabilização em LUVs promovida pelo peptídeo AU em diferentes relações peptídeo/lipídeo. LUVs compostas de 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG.....	84
Figura 49 - Porcentagem de vazamento de CF para o peptídeo (AU) <sub>2</sub> K em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.....	85
Figura 50 - Porcentagem de permeabilização de LUVs do peptídeo (AU) <sub>2</sub> K para diferentes relações peptídeo/lipídeo. LUVs compostas de 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG. ....	86
Figura 51 - Comparação dos dados de microscopia, vazamento de CF, CD e ITC do peptídeo AU em vesículas com 50/50 de SOPC/SOPG.....	89
Figura 52 - Perfis cromatográficos do peptídeo MG2 bruto (preto) e puro (vermelho).....	91
Figura 53 - Perfis cromatográficos do peptídeo (MG2) <sub>2</sub> K bruto (preto) e puro (vermelho). ....	91

Figura 54 - Perfis cromatográficos do peptídeo E(MG2) <sub>2</sub> (preto) e puro (vermelho).....	92
Figura 55 - Cromatogramas correspondentes as diferentes etapas na dimerização do peptídeo MG2 para a obtenção do dímero E(MG2) <sub>2</sub> .....	93
Figura 56 - Espectro de massas do peptídeo MG2 puro. ....	94
Figura 57 - Espectro de massas do peptídeo (MG2) <sub>2</sub> K puro. ....	94
Figura 58 - Espectro de massas do peptídeo E(MG2) <sub>2</sub> puro. ....	95
Figura 59 - Espectros de CD dos peptídeos MG2, (MG2) <sub>2</sub> K e E(MG2) <sub>2</sub> em solução aquosa (a); 10 mmol/L LPC (b) e TFE (c). ....	96
Figura 60 - Cinética de morte celular dos peptídeos MG e (MG2) <sub>2</sub> K contra <i>E. coli</i> (a) e <i>S. aureus</i> (b). ....	100
Figura 61 - Atividade hemolítica dos peptídeos MG2, (MG2) <sub>2</sub> K e E(MG2) <sub>2</sub> . ....	101
Figura 62 - Permeabilização de LUVs contendo SOPC/SOPG (5/95) em diferentes concentrações de MG2 (a), (MG2) <sub>2</sub> K (b) e E(MG2) <sub>2</sub> (c). ....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação dos peptídeos do bloco da AU. .....	47
Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação dos peptídeos do bloco da MG2.....	47
Tabela 3- Dados das sínteses dos peptídeos correspondentes ao bloco da aureína 1.2.....	63
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos AU, (AU) <sub>2</sub> K e E(AU) <sub>2</sub> . ....	69
Tabela 5 - Dados das sínteses dos peptídeos MG2, (MG2) <sub>2</sub> K e E(MG2) <sub>2</sub> . ....	95
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos MG2, (MG2) <sub>2</sub> K e E(MG2) <sub>2</sub> .....	97
Tabela 7 - Comparação da atividade antimicrobiana de diferentes versões diméricas do peptídeo MG2.	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### **1. Aminoácidos:**

Ala (A): Alanina

Arg (R): Arginina

Asp (D): Ácido aspártico

Glu (E): Ácido Glutâmico

Gly (G): Glicina

His (H): Histidina

Ile (I): Isoleucina

Leu (L): Leucina

Lys (K): Lisina

Met (M): Metionina

Phe (F): Fenilalanina

Ser (S): Serina

Val (V): Valina

$\beta$ A: beta-alanina

### **2. Outras terminologias**

ACN: Acetonitrila

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFM: atomic force microscopy (microscopia de força atômica)

ATP: adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina)

Boc: t-butiloxicarbonila

CD: circular dichroism (dicroísmo circular)

CF: carboxifluoresceína

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DCM: diclorometano

DIC: N,N-diisopropilcarbodiimida

DMF: N,N-dimetilformamida

DSC: Differential scanning calorimetry (calorimetria de varredura diferencial)

MS: mass spectrometry (espectrometria de massas)

EM: electron microscopy (microscopia eletrônica)

EPR: electron paramagnetic resonance (ressonância paramagnética eletrônica)

FDA: Food and drug administration

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonila

GUV: giant unilamellar vesicles (vesículas unilamelares gigantes)

HC<sub>50</sub>: hemolytic concentration (concentração que produz lise de 50%)

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

IR: infrared (infra-vermelho)

ITC: isothermal titration calorimetry (calorimetria de titulação isotérmica)

LPC: 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

LUV: large unilamellar vesicles (vesículas unilamelares grandes)

MD: molecular dynamics (dinâmica molecular)

MH: Müeller-Hinton

MIC: minimal inhibition concentration (concentração inibitória mínima)

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NMR: ressonância magnética nuclear

PAMs: peptídeos antimicrobianos

PB: tampão fosfato

RPM: rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS: dodecilsulfato de sódio

SOPC: 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

SOPG: 1-estearoil-2-oleoil-sn-fosfatidilglicerol

SPFS: sínteses de peptídeo em fase sólida

SUV: small unilamellar vesicles (vesículas unilamelares pequenas)

TFA: ácido trifluoracético

TFE: 2,2,2-trifluoroetanol

TIS: triisopropilsilano

### **3. Símbolo**

$\theta$ : elipticidade molar

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1- Resistência aos antibióticos .....	25
1.2- Peptídeos antimicrobianos .....	28
1.2.1- Características .....	30
1.2.2-Mecanismos de ação .....	32
1.2.3-Dimerização .....	35
1.2.4- PAMs de anfíbios.....	36
1.3-Metodologias para o estudo do mecanismo de ação de PAMs .....	39
1.3.1-Miméticos de membrana.....	40
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1- Sínteses dos peptídeos.....	43
3.2- Purificação e caracterização dos produtos de sínteses .....	47
3.3- Dicroísmo circular .....	48
3.4- Vazamento de carboxifluoresceína .....	50
3.5- Atividade hemolítica .....	52
3.6- Determinação da concentração inibitória mínima .....	53
3.7- “Time Killing” .....	54
3.8- Fluorescência .....	54
3.9- Microscopia de contraste de fase .....	55
3.9- Calorimetria de titulação isotérmica .....	56
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....</b>	<b>59</b>
4.1- Resultados da aureína 1.2 .....	59
4.1.1- Síntese dos peptídeos .....	59
4.1.2- Dicroísmo circular (CD) .....	64
4.1.3- Vazamento de carboxifluoresceína .....	66
4.1.4- Atividade hemolítica.....	68
4.1.5- Atividade antimicrobiana.....	69
4.1.6- Interação peptídeo-mananos .....	70

4.1.7- Mecanismo de ação.....	74
4.1.8- Conclusões do bloco do peptídeo Aureína 1.2.....	89
4.2- Resultados da magainina 2.....	90
4.2.1- Síntese dos peptídeos .....	90
4.2.2- Dicroísmo circular .....	96
4.2.3- Atividade antimicrobiana.....	97
4.2.4- “Time killing” .....	99
4.2.5- Atividade hemolítica.....	100
4.2.6- Vazamento de carboxifluoresceína .....	102
4.2.7- Conclusões do bloco do peptídeo Magainina 2 .....	103
<b>5- CONCLUSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>6- REFERÊNCIAS.....</b>	<b>106</b>

# 1-INTRODUÇÃO

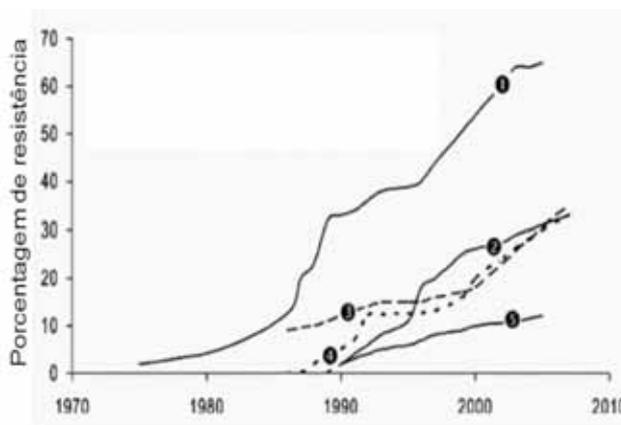
## 1.1- Resistência aos antibióticos

Não há dúvidas de que a resistência aos antibióticos constitui um dos maiores desafios da medicina e o maior da infectologia na atualidade (Fair e Tor, 2014; Khan e Siddiqui, 2014; Martínez e Baquero, 2014).

O primeiro alerta sobre essa situação foi feito em 1981, durante a “International Plasmid Conference on Molecular Biology”, na cidade de Santo Domingo, República Dominicana, onde se alertava que os antibióticos começavam a perder sua efetividade e, se ações não fossem tomadas, poderia chegar o dia no qual esses agentes não seriam mais úteis para combater doenças (Levy *et al.*, 1981). Esse momento parece estar próximo.

A resistência aos antibióticos é considerada uma questão de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde, entre outras organizações, e vem sendo cada vez maior (figura 1).

**Figura 1** - Resistência de alguns microrganismos os antibióticos tradicionais. 1- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, 2- Enterococos resistentes a vancomicina, 3- *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem, 4- *Acinetobacter ssp* resistente a imipenem, 5- *Cândida ssp* resistente a fluconazol.



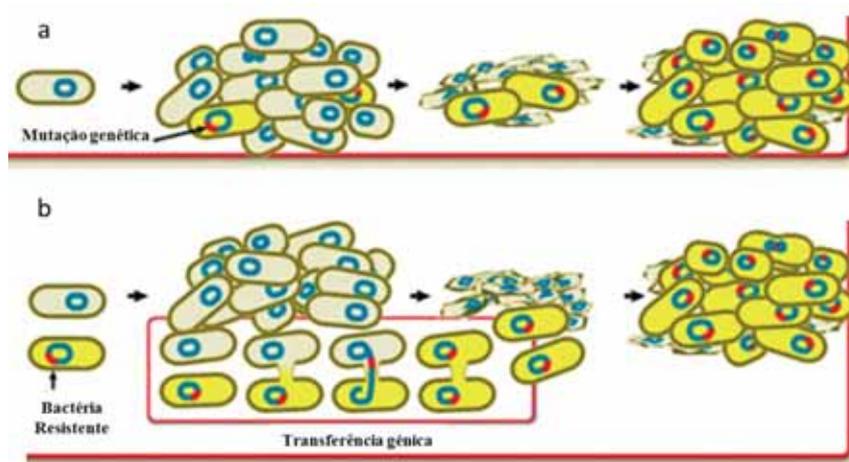
Fonte: Adaptado de: <http://www.dfwfoundation.org>.

É interessante destacar que a problemática não é alheia ao Brasil. O panorama da resistência aos antimicrobianos é preocupante, e a crescente identificação de cepas multirresistentes nos hospitais brasileiros vem causando preocupação entre os profissionais da saúde (Rossi, 2011). A resistência aos antibióticos tem prolongado o tempo de internação de pacientes, aumentando os custos e, principalmente, elevando a mortalidade. Entre os casos de resistência no Brasil, *Enterococos* resistentes à vancomicina e *Estafilococos* resistentes à meticilina são os que se destacam (Dabul e Camargo, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno que está relacionado à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antibióticos. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo e que resultam em modificações na sequência de bases que formam o DNA. Essas modificações ao acaso podem conferir uma vantagem, e assim possibilitar a seleção da cepa resistente uma vez que essa entra em contato com o antibiótico (figura 2a).

A outra origem da resistência, muito mais frequente, é a transferência de genes causadores do fenômeno, a chamada resistência transferível (figura 2b). Essa resistência acontece por meio dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação de elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons (Cunha, 1998; Martínez, 2012).

**Figura 2** - Mecanismos de aquisição de resistência. Mutação (a) e transferência gênica (b).



**Fonte:** <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/Pages/default.aspx>

Como explicado anteriormente, a resistência antimicrobiana pode ser considerada um fenômeno natural, mas o uso irracional de antibióticos, entre outras causas, vem contribuindo para o aumento desse problema (figura 3).

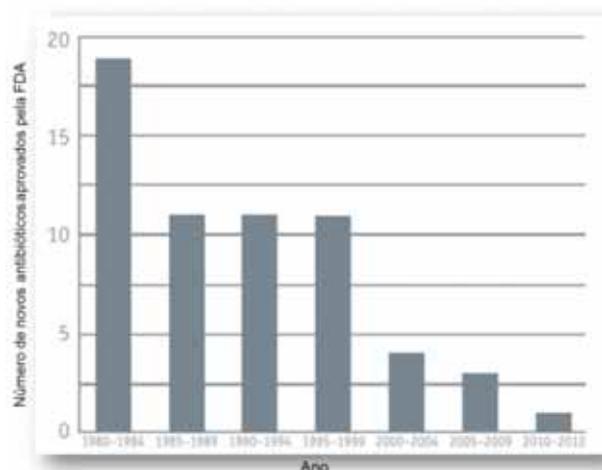
**Figura 3** - Principais causas da resistência aos antibióticos.



**Fonte:** <http://www.who.int/world-health-day/2011/en/>

O inadequado uso de antibióticos é, provavelmente, a principal causa da ocorrência de microrganismos resistentes. Considera-se que mais da metade das prescrições são inadequadas e pelo menos 2/3 dos antibióticos são usados sem prescrição médica no mundo (Wannmacher, 2004). Somado a isso, há uma diminuição do número de novos antibióticos aprovados para a comercialização (figura 4), o que agrava ainda mais a situação (Shlaes *et al.*, 2013). Finalmente, a falta de programas efetivos de controle do uso de antibióticos também contribui para o aumento do problema.

**Figura 4** - Número de novos antibióticos aprovados pela FDA.



**Fonte:** Adaptado de: Center for Drug Evaluation and Research, FDA. 2013

Os microrganismos têm demonstrado uma incrível flexibilidade de adaptação que lhes permitiu colonizar praticamente todos os ambientes da Terra, incluindo o homem. A incrível plasticidade do seu genoma lhes permite desenvolver mecanismos de resistência para praticamente qualquer antibiótico (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013).

Mesmo que o panorama da resistência pareça sombrio, é necessário reafirmar que, desde a descoberta de Fleming, os antibióticos vêm trazendo bem-estar à humanidade e, mesmo tendo que enfrentar o grande desafio da resistência, esses continuarão sendo as armas mais poderosas para o controle dos microrganismos.

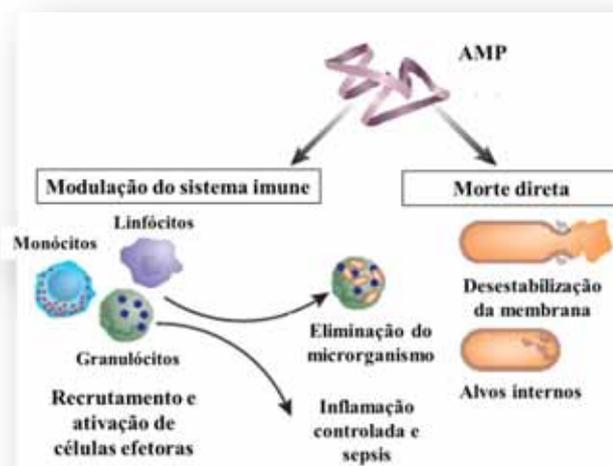
## 1.2- Peptídeos antimicrobianos

A situação acima descrita obriga os pesquisadores a trabalhar no desenvolvimento de novas moléculas para o controle das doenças provocadas por microrganismos patógenos. Entre essas moléculas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa interessante já que atuam principalmente mediante mecanismos nos quais os microrganismos dificilmente

desenvolvem resistência (Marr *et al.*, 2006; Fjell *et al.*, 2012; Roscia *et al.*, 2013). Em contraste com os antibióticos convencionais, que exercem atividade tóxica pela ligação a alvos específicos, a maioria dos PAMs tem sido considerada desestabilizante de membrana.

Os PAMs são componentes do sistema de defesa de primeira linha de muitas formas de vida e podem ser encontrados em microrganismos, insetos, plantas e até no homem. Em organismos superiores, essas moléculas fazem parte do sistema imune inato, o qual é a principal defesa para a maioria desses organismos (Hancock e Sahl, 2006). Os PAMs têm a capacidade de ativar o sistema imune e provocar a eliminação do agente patógeno, mas também podem matá-lo diretamente (figura 5).

**Figura 5** - Mecanismos de ação dos PAMs.



**Fonte:** Modificado de Hancock e Sahl, 2006.

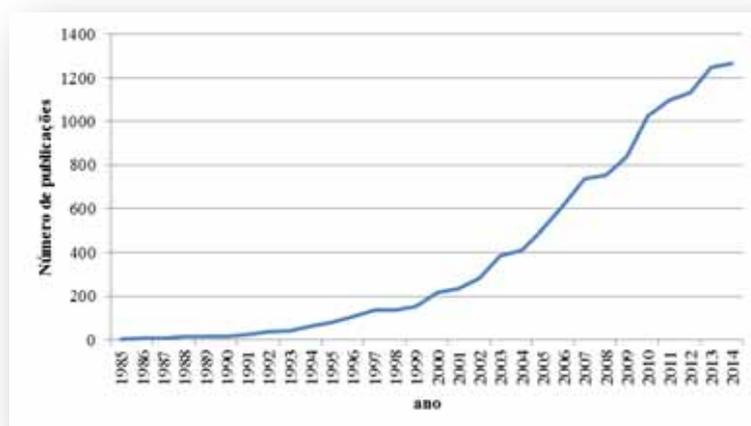
O amplo espectro de atividade, a rápida ação microbicida e a possibilidade de ser utilizado em combinação com outros antibióticos fazem com que os estudos com PAMs sejam cada vez maiores, evidenciando o alto potencial dessas moléculas (Fjell *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2012; Wenzel *et al.*, 2014). A larga gama de atividade dos PAMs é, talvez, sua principal característica e a que os posiciona como alvo de estudo de pesquisas em diferentes áreas das ciências biológicas e da saúde. Muitos PAMs apresentam uma atividade biológica multifuncional, sendo ativos

contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e até vírus. A atividade antiparasitária também tem sido descrita para muitas dessas moléculas. Finalmente, muitos PAMs têm se mostrado ativos contra diferentes linhagens de células tumorais (Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Li *et al.*, 2012; Roscia *et al.*, 2013).

Além de inibir o crescimento microbiano, muitos dos PAMs têm mostrado a capacidade de inibir tanto a formação de biofilmes como também a desintegração do mesmo, uma vez formado (Batoni *et al.*, 2011; Pompilio *et al.*, 2011).

Essas características fazem que o número de publicações relacionadas aos PAMs venha crescendo exponencialmente, evidenciando o forte interesse da comunidade científica por esse tipo de moléculas (figura 6).

**Figura 6** - Evolução das pesquisas sobre peptídeos antimicrobianos.



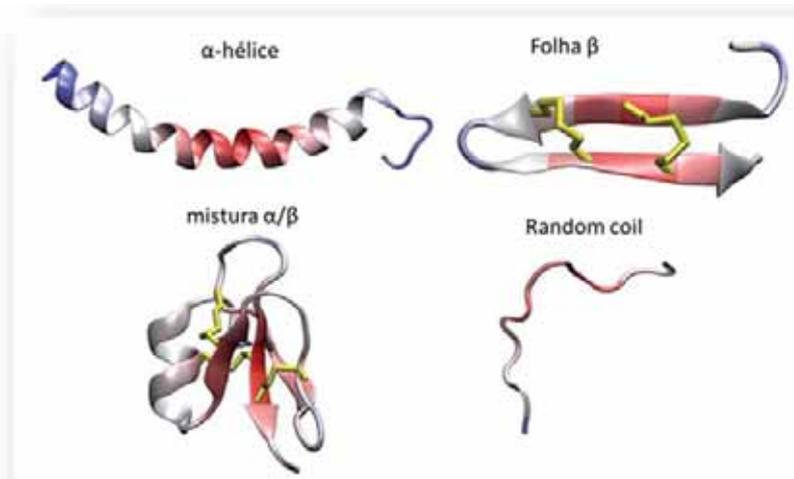
**Fonte:** Web of Knowledge, 2014. Critério de busca: “antimicrobial peptide”.

### 1.2.1- Características

Os PAMs apresentam uma grande variedade estrutural, entretanto, é possível agrupá-los em quatro grupos característicos de estruturas secundárias:  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$ , mistura  $\alpha/\beta$  e randômica (figura 7). As estruturas helicoidais são formadas durante a interação do peptídeo com a superfície externa de membranas. Os peptídeos estruturados em folha- $\beta$  são formados pelo

emparelhamento de cadeias polipeptídicas, podendo formar dois padrões distintos de folha- $\beta$ : a forma antiparalela e a forma paralela. Também é possível encontrar PAMs com estrutura mista  $\alpha/\beta$  estabilizada por ligações de dissulfeto, como é o caso da defensina humana 2. Finalmente, mesmo sendo parte de um pequeno grupo, alguns PAMs não apresentam estrutura secundária definida, mesmo quando estão em contato com uma interfase água-lipídeo (Jenssen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014).

**Figura 7** - PAMs com as quatro estruturas secundárias mais representativas.



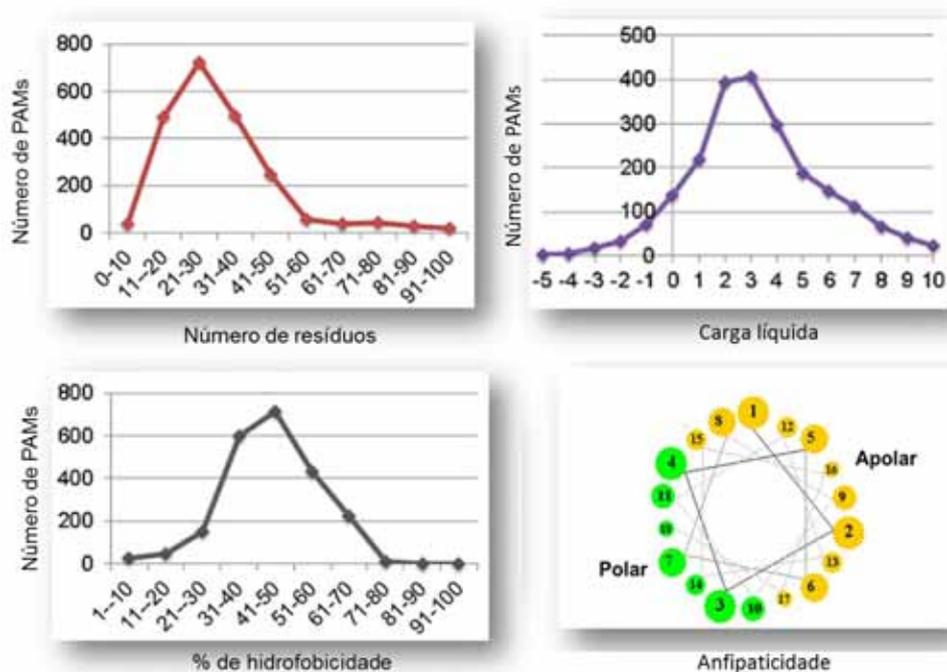
**Fonte:** Zhang, 2014

O maior grupo de PAMs que agem sobre as membranas celulares, algumas vezes denominados PAMs catiônicos, apresentam certas propriedades físico-químicas que os caracterizam como um grupo especial de biomoléculas: 1) são constituídos normalmente por 12 a 50 resíduos de aminoácidos, 2) apresentam carga líquida positiva, 3) possuem aproximadamente 50% de resíduos hidrofóbicos; e 4) formam uma  $\alpha$ -hélice com caráter anfipático (figura 8).

A cationicidade ocorre devido à presença de resíduos de aminoácidos básicos, tais como arginina e lisina. Muitos modelos mostram que esse caráter é determinante para a atração inicial dos PAMs à superfície das membranas de bactérias e de outros microrganismos. Já, a

anfipaticidade é caracterizada pela separação da estrutura da  $\alpha$ -hélice em uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. O caráter anfipático é formado por uma sequência periódica de resíduos polares e apolares em um intervalo entre três a quatro resíduos de aminoácidos. Dessa forma, as cadeias laterais polares e apolares dos resíduos de aminoácidos posicionam-se adequadamente para uma separação em faces opostas (Matsuzaki, 2009; Li *et al.*, 2012; Wang, 2013).

**Figura 8** – Principais características físico-químicas dos PAMs catiônicos.



Fonte: Modificado de Wang, 2013.

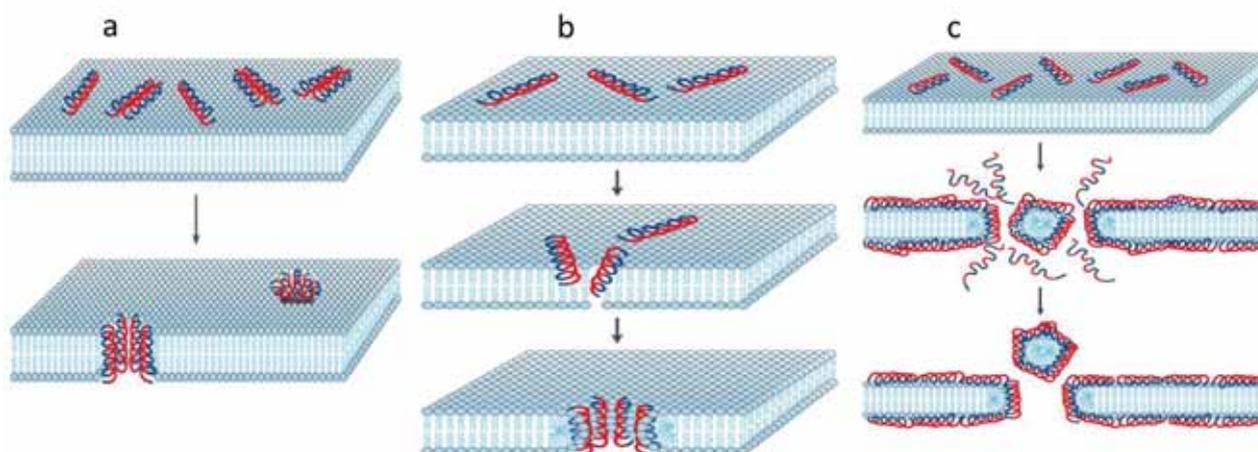
### 1.2.2-Mecanismos de ação

Muitos PAMs foram estudados, porém, o mecanismo de ação destas moléculas ainda não é totalmente claro (Gofman *et al.*, 2010; Wimley, 2010; Cirac *et al.*, 2011). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o modo de ação dos PAMs que envolve, principalmente, a desestabilização da membrana plasmática dos microrganismos. A formação de poros ou o efeito

detergente dos peptídeos explica o evento acima (Brogden, 2005; Sengupta *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2009).

Neste processo, em uma primeira etapa, mediante interações eletrostáticas, os PAMs interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana plasmática. Após essa interação, e dependendo de variáveis próprias da membrana (composição, carga, etc) e do peptídeo (sequência, carga, concentração e estado de oligomerização), a desestabilização da membrana pode ocorrer mediante três mecanismos (Giangaspero *et al.*, 2001). O modelo conhecido como “barrel-stave” (figura 9a) descreve a formação de poros ou canais intramembranares na forma de barril, em que cada aduela pode ser representada por uma cadeia peptídica na forma de uma alfa hélice anfipática. Nesse modelo, a face hidrofóbica do peptídeo interage com as caudas apolares dos fosfolipídios da membrana, enquanto a face hidrofílica permanece voltada para o interior do poro.

**Figura 9** - Mecanismos de ação propostos para PAMs que agem sobre a membrana plasmática. a) “barrel-stave”, b) “toroidal pore”, c) “carpet-like”.



**Fonte:** Modificado de Brogden, 2005 .

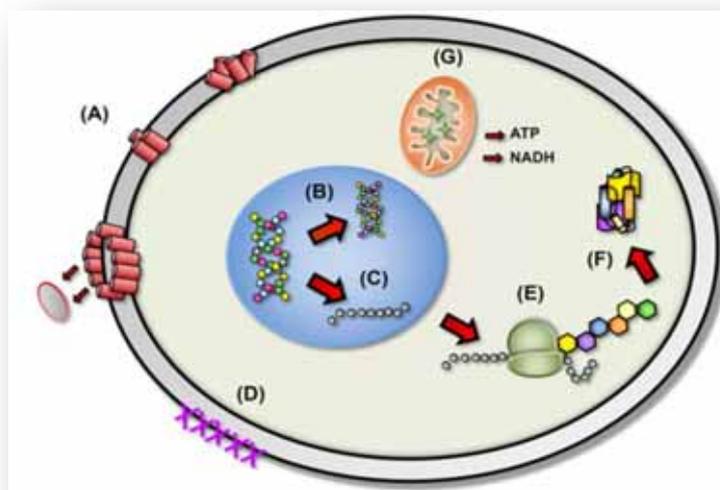
Segundo o mecanismo “toroidal pore” (figura 9b), baseado também na formação de poros, os peptídeos ficam associados às cabeças dos fosfolipídios e induzem uma curvatura na bicamada lipídica. Esse modelo difere do “barrel-stave”, pois além dos peptídeos, as cabeças polares dos

lipídios constituem o interior polar do poro formado. O peptídeo Magainina 2 é um exemplo de PAM que age segundo esse mecanismo (Tamba *et al.*, 2010).

Em contraste com esses dois mecanismos, o mecanismo denominado “carpet-like” (figura 9c) propõe a permeabilização da membrana por meio da ação detergente dos peptídeos. Assim, a partir de uma determinada concentração de peptídeos na superfície da membrana (“threshold concentration”) ocorre a formação de agregados micelares, iniciando o processo de solubilização (Brogden, 2005; Lorenzon *et al.*, 2013).

É interessante destacar que, além da atividade sobre membranas plasmáticas (figura 10a), outros alvos intracelulares também devem ser tidos em conta. Um grande número de PAMs têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática e interferir em uma grande variedade de processos biológicos, como o metabolismo de ácidos nucleicos (figura 10b e c), a síntese e enovelamento de proteínas (figura 10e e f), a síntese da parede celular (figura 10d), a alteração da membrana mitocondrial e a síntese de ATP/NADH (figura 10g), entre outros (Andreu e Rivas, 1998; Peters *et al.*, 2010).

**Figura 10** - Mecanismos alternativos de ação dos PAMs. Atividade (a) em membranas plasmáticas; (b,c) sobre o metabolismo de ácidos nucleicos; (d) na síntese da parede celular; (e,f) na síntese e enovelamento de proteínas; (g) na membrana da mitocôndria ou na síntese de ATP/NADH.



**Fonte:** Modificado de (Peters *et al.*, 2010).

### 1.2.3-Dimerização

Como descrito, a maioria dos PAMs atua em nível da membrana celular dos microrganismos. Pesquisas mostraram que, independentemente do mecanismo de ação, a agregação/oligomerização dos PAMs é um pré-requisito (Arnusch *et al.*, 2007; Sengupta *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2009). É por isso que, além dos fatores apresentados na Figura 8, atualmente se sugere que a oligomerização dos PAMs também contribui com sua atividade e seletividade (Sal-Man *et al.*, 2002; Glukhov *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Zhu e Shin, 2009b).

Levando isso em conta, vários PAMs foram dimerizados obtendo maior atividade antimicrobiana e vantagens farmacotécnicas, como o aumento da solubilidade e a resistência frente a proteases (Hornef *et al.*, 2004; Pini *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Falciani *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Welling *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Dewan *et al.*, 2009; Güell *et al.*, 2012; Hernandez-Gordillo *et al.*, 2014; Lakshminarayanan *et al.*, 2014). Porém, o efeito da dimerização na atividade biológica não é claro, já que algumas versões diméricas não apresentaram maior atividade, ou foram muito tóxicas (Mäntylä *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Zhu e Shin, 2009a; Lorenzon *et al.*, 2012; Lorenzon *et al.*, 2013; Cameron *et al.*, 2014; Jamasbi *et al.*, 2014).

Diferentes estratégias foram abordadas para as sínteses de peptídeos diméricos. Os mesmos foram obtidos: 1) pela formação de ligações de dissulfeto (Lee *et al.*, 2008) 2) por poliaminoácidos (He *et al.*, 2007); 3) pelo ácido  $\epsilon$ -aminocapróico (entre o extremo amino-terminal de um peptídeo e o extremo carboxila-terminal de outro) (He *et al.*, 2007); 4) pelos grupos amino-terminal de um polietilenoglicol derivatizado (Biernat *et al.*, 2006); 5) empregando um derivado do ácido aminopropanóico (Kamysz *et al.*, 2006); 6) mediante resíduos de lisina ou ácido glutâmico (Khrushchev *et al.*, 2007); entre outros.

A autoassociação de peptídeos e proteínas para formar dímeros e oligômeros é um fenômeno relativamente comum na natureza. Estudos mostraram que a dimerização ou oligomerização é um fator chave na regulação de enzimas, canais iônicos e receptores, entre outros (Marianayagam *et al.*, 2004). Dessa forma, a dimerização de PAMs se apresenta como uma estratégia muito interessante no desenho de novas moléculas com potencial terapêutico (Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010; Lakshminarayanan *et al.*, 2014).

#### 1.2.4- PAMs de anfíbios

Como citado anteriormente, PAMs têm sido encontrados em praticamente todas as formas de vida. Em trabalhos relativamente recentes uma nova fonte de PAMs foi descoberta: a secreção da pele de anfíbios (Rinaldi, 2002; Apponyi *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2009; Conlon, 2011; König e Bininda-Emonds, 2011; Won *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014).

Embora esses peptídeos venham sendo alvo de muitas pesquisas, a maioria das famílias de anuros ainda não teve suas toxinas completamente estudadas. Em vista disso, o estudo de PAMs extraídos de rãs pode ser uma fonte importante para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, não só pela sua atividade intrínseca, mas também pela sua utilização como modelos a partir dos quais diferentes análogos com propriedades melhoradas podem ser desenhados.

Entre essas moléculas, Aureína 1.2 e Magainina 2 são dois PAMs muito estudados, porém as bases moleculares dos seus mecanismos de ação e os efeitos de modificações em sua estrutura, como a dimerização, ainda não foram completamente entendidos.

##### 1.2.4.1- Aureína 1.2

O PAM aureína 1.2 pertence à família das aureínas, originalmente isoladas das rãs australianas *Litoria aurea* e *Litoria raniformis* (Chen *et al.*, 2005). Dentro dessa família, o peptídeo aureína 1.2 é um dos peptídeos mais ativo e melhor caracterizado. Ela é uma molécula relativamente curta, com 13 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 1480 g/mol e a seguinte estrutura primária:



Em relação à sua estrutura secundária, o peptídeo não tem uma estrutura definida em solução aquosa, mas adota uma estrutura helicoidal na presença de solventes estruturantes como

o trifluoroetanol ou miméticos de membrana como micelas e vesículas (Rozek *et al.*, 2000; Marcotte *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005) (figura 11).

O peptídeo aureína 1.2 além de possuir atividade antimicrobiana é também ativo contra algumas linhagens tumorais. Além disso, nas concentrações biologicamente ativas, não apresenta toxicidade contra hemácias (Giacometti *et al.*, 2007; Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Essas características fazem do peptídeo um interessante molde a partir do qual diferentes análogos têm sido desenhados (Li *et al.*, 2006; Mishra e Wang, 2012; Lorenzon *et al.*, 2013).

**Figura 11** – Estrutura tridimensional do peptídeo Aureína 1.2



**Fonte:** Protein Data Bank (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1vm5/summary.html>)

Segundo a bibliografia, o mecanismo de ação proposto para este peptídeo é o “carpet like” (Balla *et al.*, 2004; Ambroggio *et al.*, 2005; Mechler *et al.*, 2007; Gehman *et al.*, 2008).

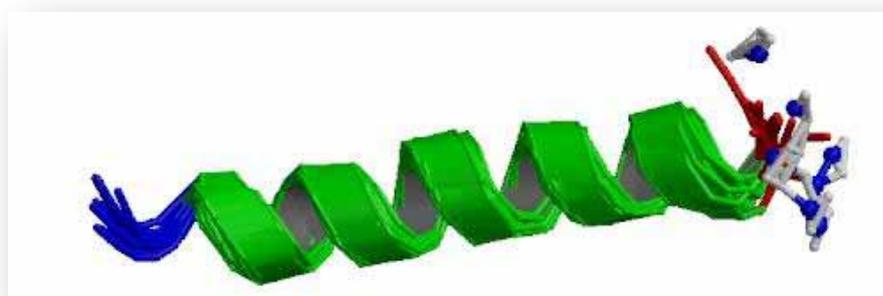
#### 1.2.4.2- Magainina 2

O peptídeo magainina 2 é um dos primeiros PAMs a serem descobertos e, talvez, um dos mais estudados desde sua descoberta por Michael Zasloff em 1987 (Zasloff, 1987; Gregory *et al.*, 2009; Lee e Lee, 2014). A magainina 2 pertence à família das magaininas, grupo de PAMs isolados da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, e possui 23 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 2466 g/mol e a seguinte estrutura primária:

## GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH<sub>2</sub>

Como a grande maioria dos PAMs, a Magainina 2 não apresenta uma estrutura secundária definida em água, mas em presença de solventes estruturantes ou miméticos de membrana, adota uma estrutura helicoidal anfipática (figura 12).

**Figura 12** - Estrutura tridimensional do peptídeo Magainina 2.



**Fonte:** Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2MAG>)

Em relação à sua atividade biológica, o peptídeo é ativo contra um grande número de microrganismos, desde bactérias Gram+, Gram-, fungos, protozoários e até células tumorais (Aboudy *et al.*, 1994; Westerhoff *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 2006). Essa multifuncionalidade do peptídeo faz dele uma molécula muito interessante de ser estudada, apresentando um grande potencial biotecnológico. Assim, desde sua descoberta, um grande número de análogos da magainina 2 têm sido sintetizados visando o aumento de sua atividade antimicrobiana (Zasloff *et al.*, 1988; Bessalle *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 2001; Han e Lee, 2013).

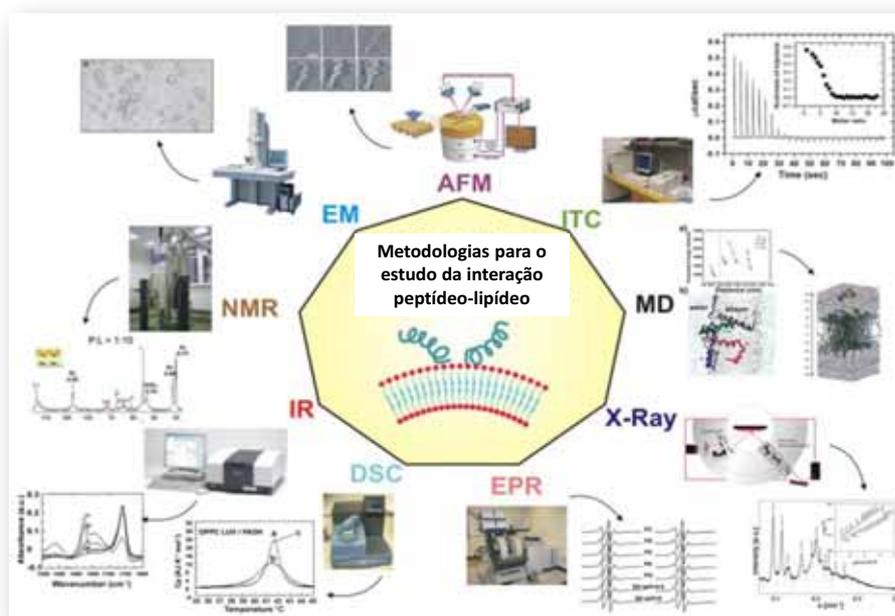
De acordo com a bibliografia, o mecanismo de ação da magainina 2 estaria relacionado com a formação de poros toroidais na membrana plasmática tanto dos microrganismos como de células tumorais (Matsuzaki *et al.*, 1996; Tamba *et al.*, 2010).

### 1.3-Metodologias para o estudo do mecanismo de ação de PAMs

O mecanismo de ação de uma determinada molécula bioativa é sempre um quesito essencial na hora de fundamentar a sua atividade. As bases moleculares do mecanismo de ação também são importantes no desenho de novas moléculas bioativas.

No caso particular dos PAMs, a interação peptídeo-lipídeo tem sido objeto de consideráveis debates, fazendo necessária a utilização de diferentes técnicas experimentais e teóricas para a elucidação desse fenômeno. Entre essas técnicas (Figura 13) destacam-se a ressonância magnética nuclear, a microscopia ótica e de força atômica, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), o vazamento de carboxifluoresceína (CF), a fluorescência, o dicroísmo circular (CD) e a dinâmica molecular, entre outras (Galdiero *et al.*, 2013).

**Figura 13** - Algumas metodologias utilizadas para o estudo da interação peptídeo-lipídeo.



**Fonte:** Adaptados de Galdiero *et al.*, 2013.

A utilização conjunta de algumas destas metodologias fornece dados complementares que favorecem o entendimento da interação peptídeo-lipídeo (Galdiero *et al.*, 2013). Porém, um acurado conhecimento sobre o mecanismo de ação dos PAMs muitas vezes é difícil de atingir, já

que diferentes técnicas podem fornecer diferentes conclusões sobre um mesmo fenômeno (Shai, 1999). Além disso, o mecanismo de ação depende de variáveis como a concentração e o estado de oligomerização do peptídeo; e da composição da membrana (Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Por outro lado, muitas vezes é difícil diferenciar os mecanismos carpete e toroidal, já que o primeiro tem sido considerado uma extensão do segundo (Mechler *et al.*, 2007).

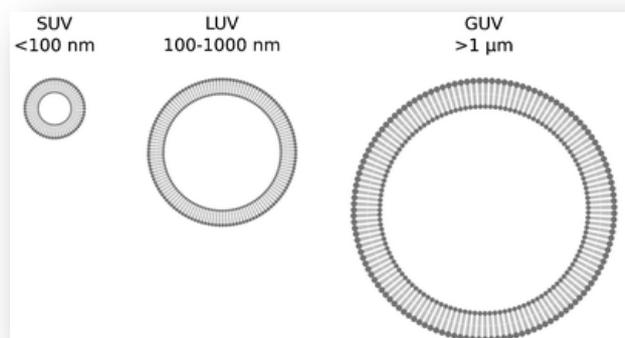
### 1.3.1-Miméticos de membrana

Tendo em conta que muitos dos PAMs têm como principal alvo as membranas dos microrganismos e que muitos estudos, por questões práticas, são impossíveis de serem realizados com as bactérias e os fungos, diferentes sistemas que mimetizam as membranas destes são utilizados (Papo e Shai, 2003; Kosol e Zangger, 2010).

Os sistemas miméticos mais usados para estudar a interação peptídeo/membrana são as vesículas lipídicas, pois sua forma de bicamada lipídica é similar à parte lipídica das membranas celulares. Ressaltamos, no entanto, que esse sistema macromolecular é simples, não possuindo proteínas nem carboidratos em sua composição, diferindo assim de uma membrana biológica.

Em função do tamanho, as vesículas podem ser classificadas como: 1) vesículas unilamelares pequenas (SUVs), que possuem diâmetro aproximado entre 10 e 100 nm, 2) vesículas unilamelares grandes (LUVs), apresentando diâmetro aproximado entre 100 e 1000 nm, e 3) vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que possuem diâmetro maior que 1  $\mu\text{m}$  (figura 14) (Van Swaay e Demello, 2013).

**Figura 14** - Vesículas de diferentes tamanhos.



**Fonte:** Dirk van Swaay 2013

Essas vesículas têm sido utilizadas em combinação com técnicas espectroscópicas e microscópicas para estudar a interação com PAMs e assim correlacionar os dados biofísicos com a atividade biológica.

Os fosfolipídios são caracterizados pelo comprimento e a saturação da cadeia lipídica, portanto, a confecção de vesículas com diferentes lipídios pode propiciar a formação de vesículas com propriedades diversas. A carga da superfície da vesícula também pode ser manipulada pela introdução de lipídeos neutros, carregados negativa e/ou positivamente.

As diferenças existentes entre células eucarióticas e procarióticas podem propiciar o desenvolvimento de alvos específicos. A principal diferença tem a ver com a composição lipídica. Enquanto os eucariotos contêm em sua maioria fosfolipídios zwitteriônicos (dipolares) na face externa, as células procarióticas por sua vez, apresentam uma maior quantidade de fosfolipídios negativos. Por força da presença de maior carga negativa nas membranas procarióticas, esta apresenta maior interação com os PAMs carregados positivamente (Toke, 2005).

Assim, a confecção de vesículas a partir de diferentes lipídeos pode contribuir não só com informação sobre o mecanismo de ação dos PAMs, mas também sobre a sua seletividade.

## 2- OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito da dimerização na estrutura, no mecanismo de ação e na atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2.

Inicialmente, para se atingir este objetivo foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- 1- Sínteses dos peptídeos nas formas monoméricas
- 2- Sínteses dos peptídeos nas formas diméricas (C- e N- terminal).
- 3- Estudos da conformação dos peptídeos mediante CD em solução aquosa e em presença de miméticos de membranas.
- 4- Estudos de vazamento de CF em vesículas de diferentes composições.
- 5- Avaliação das atividades antimicrobianas (*E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).
- 6- Avaliação do tempo de morte (“time kill”).
- 7- Determinação da atividade hemolítica.

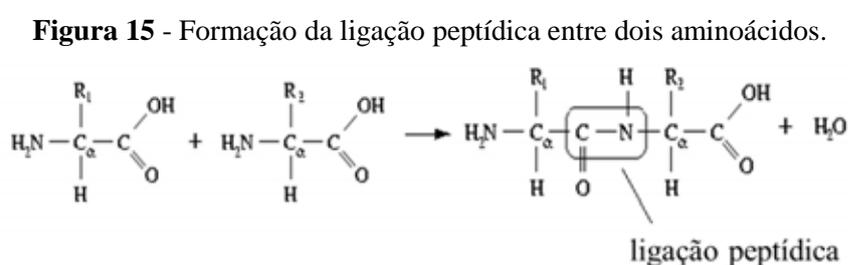
Em função dos resultados obtidos no decorrer da pesquisa, outros estudos foram feitos com o objeto de compreender o mecanismo de ação dos peptídeos.

- 8- Estudos da interação peptídeo-mananos por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular.
- 9- Observação da interação peptídeo-GUVs por microscopia de contraste.
- 10- Determinação da interação peptídeo-LUVs por calorimetria de titulação isotérmica.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Sínteses dos peptídeos

A síntese química de peptídeos implica na formação de ligações peptídicas (figura 15) entre os grupos carboxila e amina dos diferentes aminoácidos que constituem uma sequência determinada.



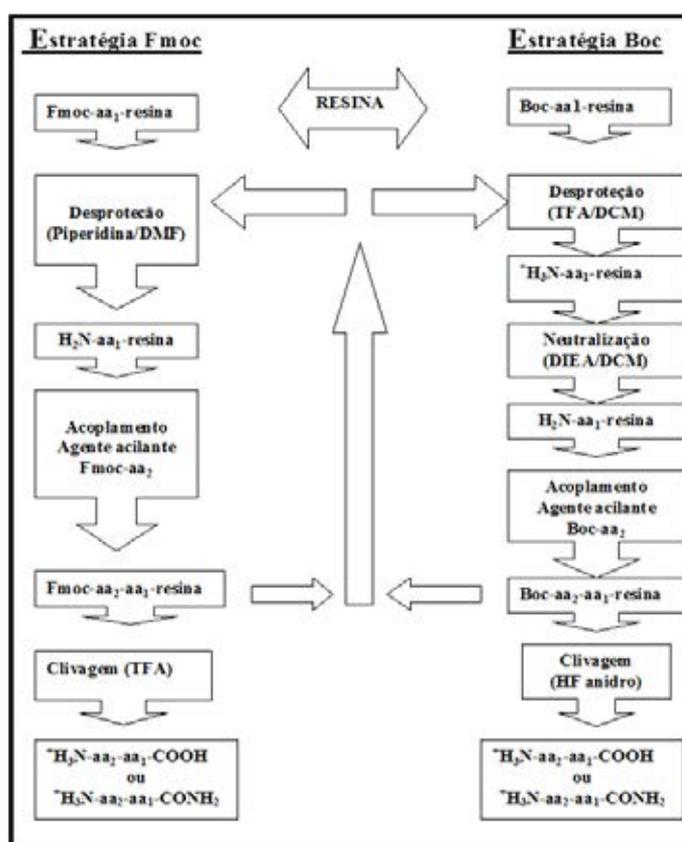
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Inicialmente, a síntese de peptídeos era realizada em solução. Nos anos 60, Merrifield desenvolveu a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) como ferramenta para a rápida e eficiente produção de peptídeos sintéticos, trabalho que lhe valeu o Prêmio Nobel de Química em 1986 (Merrifield, 1963). O protocolo proposto por Merrifield tem sido relativamente pouco alterado nos últimos anos. Os aperfeiçoamentos técnicos estão basicamente voltados para o desenvolvimento de novos reagentes de acoplamento, resinas e de grupos protetores de cadeias laterais, entre outros (Albericio, 2000).

A SPFS é baseada no crescimento da cadeia peptídica, aminoácido por aminoácido, a partir de sua região C-terminal que se encontra ligada covalentemente ao suporte polimérico. Assim, o crescimento da cadeia peptídica é no sentido do aminoácido C-terminal para o N-terminal. A remoção de subprodutos de reação e reagentes em excesso em cada etapa é realizada por filtração e lavagem. Essas características, juntamente com a capacidade de automatizar o processo são algumas das vantagens que fizeram da SPFS o método de escolha mais utilizado atualmente para a síntese de peptídeos.

Duas estratégias principais têm sido desenvolvidas para a SPFS: a química do tert-butiloxicarbonila (Boc) e a do 9-fluorenilmetiloxicarboxila (Fmoc). A estratégia Boc requer o uso de ácido trifluoroacético (TFA) para as desproteções do grupo Boc e de fluoreto de hidrogênio para a clivagem. Essas condições ácidas em alguns casos podem provocar a degradação de alguns aminoácidos, além da necessidade de instrumentais mais complexos. Essas dificuldades orientaram as pesquisas para o desenvolvimento da química Fmoc, que utiliza piperidina para remover o grupo protetor do  $\alpha$ -amino (Fmoc) (Figura 16), e ácido trifluoroacético (TFA) na etapa final de clivagem do peptídeo da resina e desproteção de cadeias laterais (Céspedes, 2009).

**Figura 16** - Esquema básico da SPFS segundo a estratégia Fmoc e Boc.



Fonte: extraído de Céspedes, 2009.

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram obtidos manualmente pelo método de SPFS, consistindo de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. Como protocolo padrão, os acoplamentos foram realizados mediante a ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido com *N,N'*-diisopropilcarbodiimida/*N*-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) durante duas horas com agitação, utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Nessa etapa foi usado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina. A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada em meio básico com uma solução 20% piperidina em DMF durante 20 minutos. Entre cada passo experimental foram efetuadas lavagens com DMF e DCM. O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado mediante o teste da ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970), sendo que no caso de resultado positivo (cor azul), a reação de acoplamento era repetida. No caso de resultado negativo (cor amarela) a Fmoc-peptidil-resina era desprotegida e o Fmoc-aminoácido seguinte era acoplado.

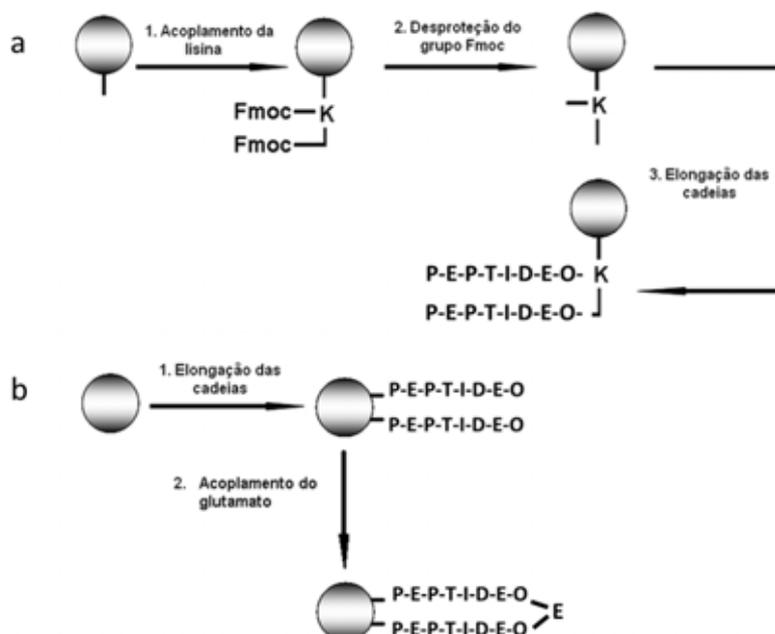
Ao fim das sínteses, para separar os peptídeos das resinas, foi realizada a reação de clivagem utilizando uma solução composta de supressores de reações colaterais (*scavengers*) em ácido trifluoroacético (TFA). As reações foram conduzidas sob agitação moderada durante duas horas à temperatura ambiente. Ao término, os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e lavados 3 vezes com esse solvente para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. O precipitado obtido foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto.

As sínteses dos três peptídeos correspondentes ao bloco da AU foram desenvolvidas seguindo os protocolos acima descritos, utilizando a resina Rink Amide MBHA de 0,6 mmol/g. Para a síntese do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K, foi utilizado um resíduo de lisina (K) como linker entre as duas cadeias de AU. O aminoácido K caracteriza-se por ter dois grupos amino a partir dos quais se pode realizar a elongação de cadeias peptídicas, e desta forma obter moléculas diméricas. Para esta síntese foi utilizado o grupo Fmoc como protetor dos grupos  $\epsilon$ - e  $\alpha$ -amino da lisina. Dessa forma, a eliminação conjunta dos protetores permitiu a elongação simultânea das duas cadeias peptídicas (figura 17a). Já na síntese do peptídeo E(AU)<sub>2</sub>, foi utilizado, após a síntese das cadeias

monoméricas, um resíduo de glutamato como linker das duas cadeias de AU (figura 17b). Esse aminoácido foi utilizado na forma de Fmoc-Glu, que se caracteriza por ter dois grupos carboxila ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) livres, podendo ser acoplado às extremidades N-terminal de duas cadeias peptídicas presas à resina e dessa forma produzir peptídeos diméricos unidos pela extremidade N-terminal.

As sínteses dos três peptídeos correspondentes ao bloco da MG2 foram desenvolvidas seguindo a mesma estratégia acima, mas desta vez, utilizando a resina NovaPEG Rink Amide resin LL de 0,23 mmol/g. A bibliografia reporta que a síntese do peptídeo MG2 é difícil (Bacsa *et al.*, 2008), desta forma, o baixo grau de substituição e a boa solvatação da resina NovaPEG poderia resolver o problema relacionado a dificuldade de síntese.

**Figura 17** - Estratégias de sínteses dos peptídeos diméricos. Sínteses dos peptídeos dimerizados pela extremidade C-terminal (a) e N-terminal (b).



**Fonte:** elaborado pelo autor.

### 3.2- Purificação e caracterização dos produtos de sínteses

A purificação dos produtos das sínteses foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo, utilizando uma coluna C<sub>18</sub> Phenomenex de 25 x 2,12 cm. Durante a purificação foram recolhidas frações de 5 mL, e a pureza dessas determinada por CLAE analítica com coluna C<sub>18</sub> KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm. Os tubos contendo o material puro foram juntados e liofilizados, obtendo-se frações que foram analisadas na mesma coluna analítica acima descrita. As condições cromatográficas utilizadas estão mostradas na tabela 1.

**Tabela 1** - Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação dos peptídeos do bloco da AU.

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA em H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA em ACN
Gradiente	40-80% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
Fluxo	5 mL/min	1 mL/min
Comprimento de onda	220 nm	220 nm

A purificação dos produtos das sínteses correspondentes ao bloco da MG2 foi realizada da mesma forma que a do primeiro bloco de peptídeos. Mas dessa vez, as condições cromatográficas utilizadas são as mostradas na tabela 2.

**Tabela 2** - Condições cromatográficas empregadas na análise e purificação dos peptídeos do bloco da MG2.

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA em H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA em ACN
Gradiente	30-60% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
Fluxo	5 mL/min	1 mL/min
Comprimento de onda	220 nm	220 nm

A caracterização dos peptídeos sintetizados também foi realizada por espectrometria de massas (EM). Os espectros de massas correspondentes ao bloco do peptídeo AU foram obtidos em um espectrômetro LCQ Fleet LC/MS (Thermo Analítica), mediante infusão direta, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Química Orgânica. Os espectros correspondentes ao bloco do peptídeo MG2 foram obtidos em um espectrômetro amaZon SL (Bruker), também mediante infusão direta e em modo positivo. Este equipamento se localiza no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

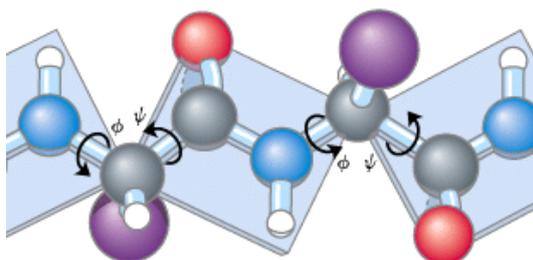
### 3.3- Dicroísmo circular

Entre os diferentes mecanismos de ação dos PAMs que agem sobre a membrana dos microrganismos, há um ponto em comum à grande parte deles: a formação de uma estrutura tipo  $\alpha$ -hélice quando em contato com membranas biológicas ou miméticas. Assim, a análise por CD contribui com informações importantes a respeito da estrutura dessas moléculas.

O CD é uma técnica espectroscópica que possibilita classificar e quantificar os tipos de estruturas secundárias de moléculas opticamente ativas, como proteínas e peptídeos (Avitabile *et al.*, 2014).

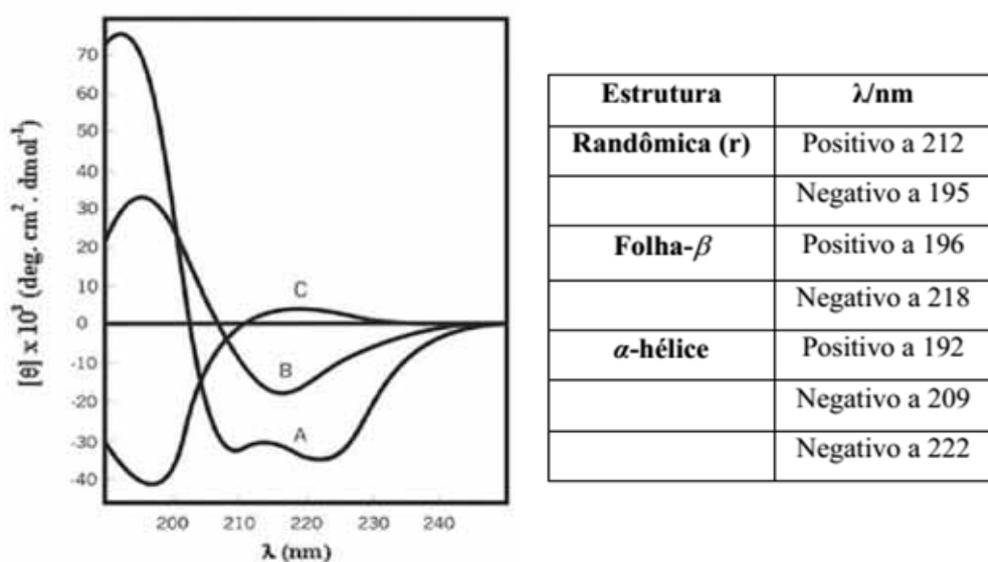
Devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH, a rotação ao redor da ligação peptídica é restrita, sendo possível apenas na ligação entre o átomo de nitrogênio e do carbono alfa (HN-C $\alpha$ ), representado pelo ângulo de rotação  $\Phi$  (phi), e na ligação entre o átomo de carbono alfa e a carbonila (C $\alpha$ -C=O), representado pelo ângulo de rotação  $\Psi$  (psi) (figura 18) (Nelson e Cox, 2011). As estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e estruturas randômicas, entre outras) obtidas por ângulos phi e psi específicos são as responsáveis pelos espectros de CD (figura 19) (Greenfield e Fasman, 1969).

**Figura 18** - Representação esquemática da ligação peptídica mostrando os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$ .



**Fonte:** adaptado de Nelson e Cox, 2011.

**Figura 19** - Espectros de CD característicos das principais estruturas secundárias de peptídeos e proteínas. Alfa-hélice (a), folha-beta (b) e random-coil (c).



**Fonte:** extraído de Greenfield e Fasman, 1969.

Essas formas regulares e ordenadas de arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo com que a luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente de uma luz com polarização no sentido anti-horário. A espectroscopia de dicroísmo circular mede justamente essa diferença de absorção de radiação polarizada circularmente (Greenfield, 2006).

Dessa forma, o conhecimento das mudanças conformacionais e das estruturas secundárias dos peptídeos fornece dados cruciais para entender a relação entre a função e a estrutura dessas moléculas de grande interesse biológico.

Neste trabalho, os peptídeos foram estudados numa concentração de 30-40  $\mu\text{mol/L}$  em tampão fosfato 20  $\text{mmol/L}$ , pH 7,2 (PB). Dependendo dos peptídeos e dos objetivos específicos para cada bloco, os experimentos foram realizados em PB, 10  $\text{mmol/L}$  de lisofosfatidilcolina (LPC), mananos e vesículas contendo 5-95 e 50-50% de 1-estearoil-2-oleoil-sn-fosfatidilglicerol (SOPG)-1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (SOPC) (mais detalhes na sessão de resultados dos respectivos blocos).

Utilizou-se celas de 1,0 mm de caminho óptico e 6 varreduras por espectro. Os mesmos foram obtidos em millidegrees e convertidos a elipticidade molar  $[\theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ). Para todos os experimentos o tempo de integração foi de 3 s por ponto e a leitura foi feita a cada 0,5 nm. Os experimentos foram realizados a 25 °C. O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro Jasco J-815 localizado no Instituto de Química de Araraquara – UNESP (equipamento multiusuário).

### 3.4- Vazamento de carboxifluoresceína

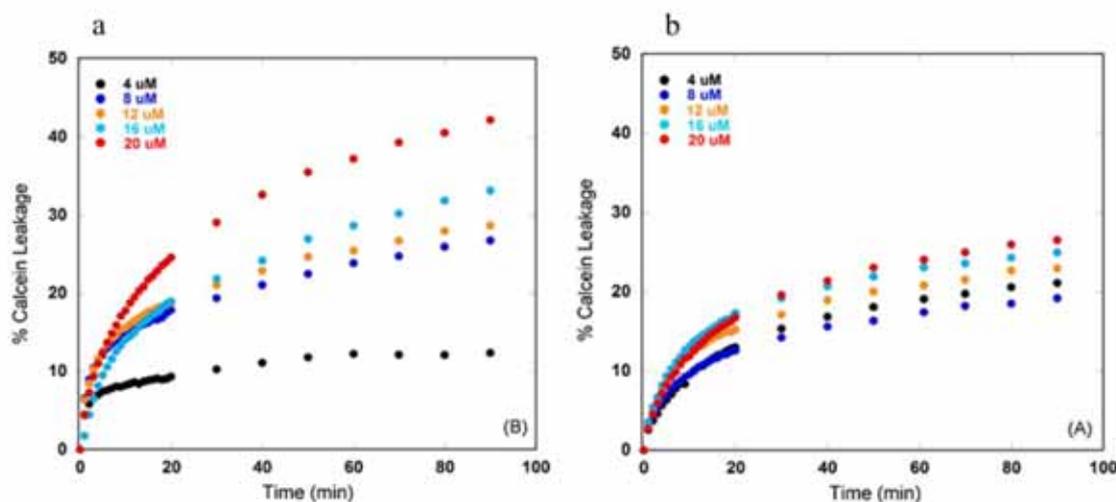
LUVs contendo um fluoróforo (carboxifluoresceína, calceína, entre outros) têm sido usadas para estudar a seletividade e o mecanismo de ação de PAMs. Os dados fornecidos por este estudo são úteis para a comparação com a atividade biológica e com seu modo de ação (Lorenzon *et al.*, 2012).

A afinidade de um determinado peptídeo por uma composição lipídica específica pode ser estudada utilizando LUVs que possuam os principais lipídeos que constituem as membranas procarióticas e eucarióticas (Crusca *et al.*, 2011; Lorenzon *et al.*, 2012).

Em relação ao mecanismo de ação, essa metodologia se apresenta muito interessante. Um aumento gradual da permeabilização conforme a concentração do peptídeo em estudo é incrementada, significa que o mecanismo encontrado é o de formação de poros (figura 20a). Por outro lado, porcentagens de permeabilização não dependentes da concentração ou com variação

muito pequena corresponderiam ao mecanismo de solubilização-carpete (figura 20b) (Russell *et al.*, 2010).

**Figura 20** - Perfis de vazamento de carboxifluoresceína em vesículas tratadas com PAMs. Exemplo de formação de poros (a). Mecanismo de solubilização-carpete (b).



**Fonte:** extraído de Russell et al., 2010.

Assim, esse teste provê informações valiosas sobre a interação peptídeo-lipídeo, especificamente no que se refere à seletividade e ao mecanismo de ação dos PAMs.

Nesta tese, os lipídeos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (DPPA), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (SOPC) e 1-estearoil-2-oleoil-sn-fosfatidilglicerol (SOPG) foram pesados na proporção desejada e dissolvidos em uma solução de clorofórmio-metanol (4-1). Posteriormente, a solução foi evaporada em N<sub>2</sub> até formar um filme fino aderido na parede de um tubo. Esse filme foi mantido sob vácuo durante 12 h para eliminação total dos solventes. Posteriormente, o filme foi hidratado com uma solução de carboxifluoresceína (CF) 80 mmol/L em tampão HEPES 0,01 mol/L pH 7,2 (HEPES), formando vesículas multilamelares (MLVs). Durante uma hora, o filme foi submetido repetidamente a banho a 60°C, vortex e ultrassom, para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas. Para obter as vesículas unilamelares grandes (LUVs), as MLVs foram passadas por um extrusor contendo um filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Avanti Polar Lipids). Para a homogeneização do tamanho das vesículas foram realizados 40

ciclos de extrusão. A CF não incorporada às vesículas foi removida por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) estabilizada com tampão HEPES 0,01 mmol/L, glicose 0,15 mmol/L e pH 7,2. Nestes estudos foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com comprimentos de onda ajustados em 492 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente. O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição do Triton x-100, o qual provoca a dissolução total das vesículas e a liberação da CF. As análises foram realizadas em triplicata a temperatura ambiente. Devido à instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi usada no mesmo dia. A dosagem dos lipídeos foi realizada mediante o teste de quantificação de fosfatos (Rouser *et al.*, 1970).

### **3.5- Atividade hemolítica**

Foram feitos testes com eritrócitos para avaliar a toxicidade dos peptídeos sintetizados. Este estudo é muito importante para se ter uma avaliação preliminar da toxicidade dos peptídeos em estudo.

O protocolo utilizado neste trabalho foi o de Onuma *et al.*, com algumas modificações (Onuma *et al.*, 1999). Hemácias de sangue humano foram separadas do plasma por centrifugação e lavadas 3 vezes com tampão PBS (35 mmol/L fosfato de sódio; 0,15 mol/L de cloreto de sódio) pH 7,4. Uma suspensão celular a 1 % (v/v) e diluições seriadas dos peptídeos foram usadas na determinação da concentração que lisa 50% das hemácias (HC<sub>50</sub>). Depois da incubação a 37°C por 1 h, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 405 nm foi determinada usando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch). O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 100 µL da suspensão celular misturada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), enquanto que o valor de 0% de hemólise foi obtido utilizando 100 µL da suspensão celular com 100 µL de tampão. O ensaio foi realizado em duplicata.

### 3.6- Determinação da concentração inibitória mínima

A avaliação da atividade antimicrobiana é, seguramente, o teste mais importante a ser realizado quando PAMs são estudados. Estes testes, junto com o CD fornecem valiosas informações que podem ser utilizadas para avaliar a relação estrutura-atividade biológica dos peptídeos.

A ação antimicrobiana dos peptídeos sintetizados foi testada contra três microrganismos: *E. coli*, *S.aureus* e *C. albicans*, representantes das bactérias Gram negativas e Gram positivas, e das leveduras, respectivamente. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A CIM é definida como a menor concentração em que não há crescimento detectável do microrganismo.

Para a determinação da CIM seguiu-se o protocolo descrito no manual “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), do ano de 2012. Os ensaios consistiram na incubação das bactérias (*E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923) com uma diluição seriada (de 128 a 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) dos peptídeos em microplacas esterilizadas de 96 poços (Costar microtiter plate) em um volume final de 100  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana e 50  $\mu\text{L}$  de peptídeo dissolvido em água). A quantidade inicial de células foi aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL. Como controle da ausência de proliferação bacteriana, utilizou-se o antibiótico ciprofloxacina. Os controles de meio de cultura (Muller-Hinton) e de solvente (água) também foram realizados. A inibição do crescimento foi determinada visualmente com ajuda de resazurina, após incubação por 24 h a 37°C. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para a determinação da CIM da levedura *Candida albicans* (ATCC 18804), a mesma foi incubada com uma diluição seriada dos PAMs (128 a 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ). A quantidade inicial de levedura foi aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL. A inibição do crescimento foi determinada visualmente após incubação por 48 h a 37°C com ajuda de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Os controles negativos e positivos foram obtidos com fluconazol e meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.7- “Time Killing”

A avaliação da atividade antimicrobiana em termos da CIM fornece dados sobre o efeito dos PAMs em diferentes microrganismos em períodos que podem variar entre 24 e 48 h. Porém, mediante esta técnica não é possível avaliar o que acontece nos estágios iniciais da interação do peptídeo com o microrganismo. Neste sentido, o teste denominado de “time killing” fornece informações importantes referentes à velocidade de ação do peptídeo em estudo.

Este teste foi realizado utilizando o dobro da CIM, seguindo como base o protocolo descrito por Zhu e Shin, 2009 (Zhu e Shin, 2009b). A quantidade inicial de bactéria foi de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL. Depois de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos de contato com os peptídeos a 37°C, alíquotas de 20 µL foram diluídas e plaqueadas de forma a obter UFC que possam ser contabilizadas. O volume de 1 mL dessas diluições foi semeado em placas contendo o meio Müeller-Hinton (MH) ágar e incubadas a 37°C por 24 h. O controle foi realizado em ausência de peptídeo. O ensaio foi realizado em duplicata.

### 3.8- Fluorescência

Uma das técnicas mais empregadas atualmente em análises da interação de peptídeos e proteínas com outras macromoléculas é a fluorescência (Lorenzón *et al.*, 2014). Esta técnica é baseada, resumidamente, na emissão de energia na forma de luz após a sua absorção (Lakowicz, 1983). A absorção de energia por certos grupos, denominados cromóforos, os faz passar para um estado excitado, ocorrendo logo em seguida emissão de parte desta energia em comprimentos de onda específicos, voltando para seu estado fundamental.

Os dados obtidos por esta técnica permitem estudar o ambiente em torno do peptídeo e a interação desse com as moléculas do solvente e/ou outras macromoléculas. Este estudo é possível devido à sensibilidade dos fluoróforos (resíduos aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina) ao ambiente que os circunda, que alteram a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão.

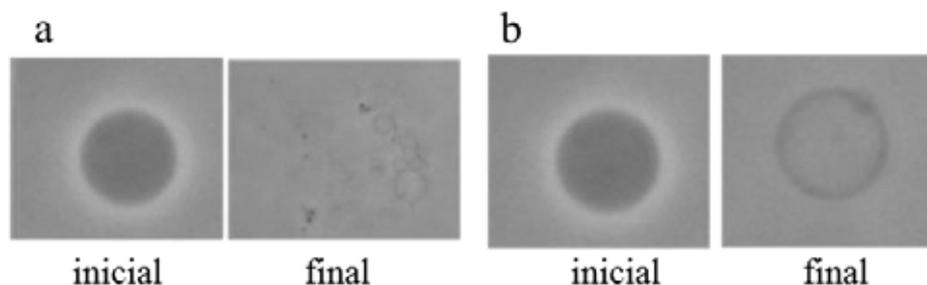
Com o objetivo de estudar a possível interação dos peptídeos AU e (AU)<sub>2</sub>K com mananos, a técnica de fluorescência foi utilizada. Os experimentos foram realizados com 90 µmol/L de peptídeo e concentrações crescentes do polissacarídeo (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50X) em PBS. Os espectros de emissão foram obtidos entre 270 e 400 nm, utilizando 257 nm como comprimento de excitação (fenilalanina).

### **3.9- Microscopia de contraste de fase**

Desde a introdução do método de eletroformação, as GUVs vêm sendo um modelo muito utilizado para mimetizar membranas biológicas (Walde *et al.*, 2010). Atingindo um diâmetro de até 100 µm, esses miméticos de membrana podem ser facilmente observados com um microscópio confocal (Wesołowska *et al.*, 2009). As GUVs são confeccionadas de forma tal que, no meio interno apresentam uma solução de um determinado açúcar, enquanto que no meio externo, apresentam outro. A diferença de índice de refração entre a solução interna e a contida fora das vesículas permite, pela diferença de contraste, a sua observação.

Dessa forma, se o peptídeo em estudo produz uma perturbação na membrana, seja mediante a formação de poros ou solubilização da membrana, as concentrações de açúcar dentro e fora se igualarão e a diferença de contraste será perdida. A vantagem desta técnica se baseia na visualização da vesícula gigante e na possibilidade de distinguir os dois eventos antes mencionados. No caso do peptídeo agir segundo o mecanismo de solubilização será observada além da perda de contraste a destruição da membrana (figura 21a). Por outro lado, se o peptídeo em estudo produz poros, a perda de contraste será observada, mas a vesícula permanecerá visível (figura 21b).

**Figura 21** - Diferenciação dos mecanismos de dissolução da bicamada lipídica (a) e de formação de poros (b) em GUVs. Ampliação de 68X.



**Fonte:** dados do autor ainda não publicados.

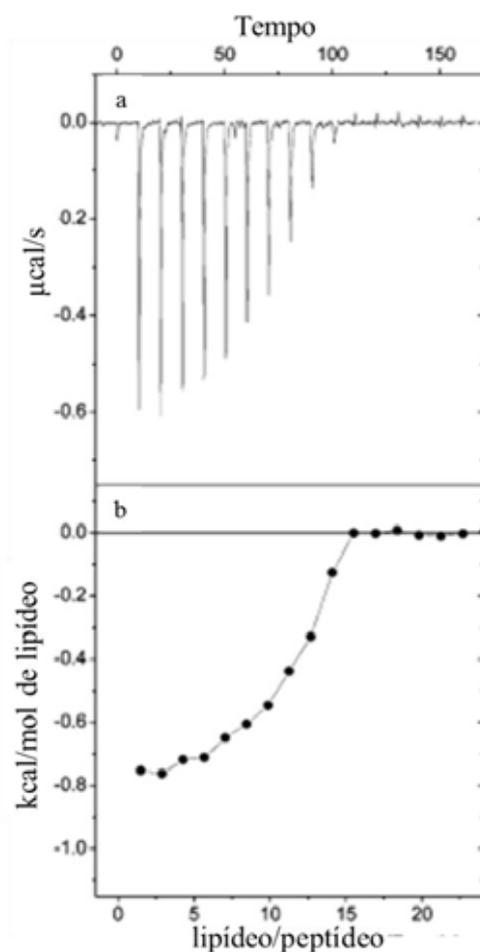
As condições experimentais utilizadas para a obtenção das GUVs foram a eletroformação com 1 V a 10 Hz por 1 h. A hidratação do filme (composto pelos mesmos lipídeos utilizados no teste de permeabilização de vesículas e ITC) foi realizada com uma solução de sacarose 0,2 mol/L e diluída em glicose 0,2 mol/L (condição de isotonicidade). Para evitar efeitos de pressão osmótica, a osmolaridade das soluções de sacarose e glicose foi checada em um osmômetro Osmette A 5002, Precision (USA). As diferenças de índice de refração entre a sacarose dentro e a glicose fora das vesículas proveem as melhores condições de contraste para a observação em um microscópio de contraste de fase. A suspensão contendo as GUVs foi transferida a uma câmara de observação (constituída simplesmente por uma lâmina e uma lamínula). O microscópio utilizado foi o Zeiss Axiovert 200 (Germany). Imediatamente depois da adição dos peptídeos, GUVs representativas foram focadas e observadas durante aproximadamente 10 min.

### 3.9- Calorimetria de titulação isotérmica

Além da observação direta e indireta da interação de PAMs com miméticos de membrana (microscopia de perda de contraste e vazamento de carboxifluoresceína, respectivamente), muitas vezes é interessante estudar a termodinâmica dessa interação.

Da mesma forma que uma reação química pode ser endotérmica ou exotérmica, a interação peptídeo-lipídeo também pode absorver ou liberar calor. Essa variação de calor, mesmo que da ordem das microcalorias, pode ser medida (figura 22).

**Figura 22** - Curvas de titulação calorimétrica lipídeo/peptídeo. Fluxo de Calor em função do tempo (a). Calores de reação obtidos da integração de cada traço calorimétrico (b).



**Fonte:** extraída de (Domingues *et al.*, 2013)

A ITC é uma das técnicas mais empregadas para determinar a entalpia de diferentes sistemas biomoleculares, fornecendo a partir desta, uma completa descrição do sistema por meio da obtenção de parâmetros termodinâmicos a energia livre de Gibbs  $\Delta G$  e a entropia da reação  $\Delta S$  (Wieprecht *et al.*, 2002; Seelig, 2004; Domingues *et al.*, 2013), entre outros.

A variação de calor produzida pela interação peptídeo-lipídeo pode ser atribuída a processos que acontecem simultaneamente, dificultando assim a interpretação dos dados. Dessa forma o calor liberado pode ser consequência de uma combinação de eventos como interações eletrostáticas entre o peptídeo e a superfície da membrana, mudanças conformacionais do peptídeo, reorganização dos lipídeos, e outros fenômenos pouco compreendidos (Henriksen e Andresen, 2011).

Neste trabalho, para evitar a utilização de peptídeos em concentrações elevadas, soluções contendo 40  $\mu\text{mol/L}$  dos peptídeos foram adicionadas na célula calorimétrica e tituladas com uma suspensão de LUVs 10  $\text{mmol/L}$  (seringa de injeção). Foram realizadas injeções de 5  $\mu\text{l}$  de LUV a cada 10 min. As medidas do calor liberado/absorvido foram realizadas num microcalorímetro VP-ITC (Northampton, MA) a 25  $^{\circ}\text{C}$ . O tampão utilizado foi o HEPES 10  $\text{mmol/L}$ . O calor de diluição foi descontado da variação de calor produzida pela interação peptídeo-LUVs. Os dados experimentais foram analisados no software ORIGIN para ITC.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:

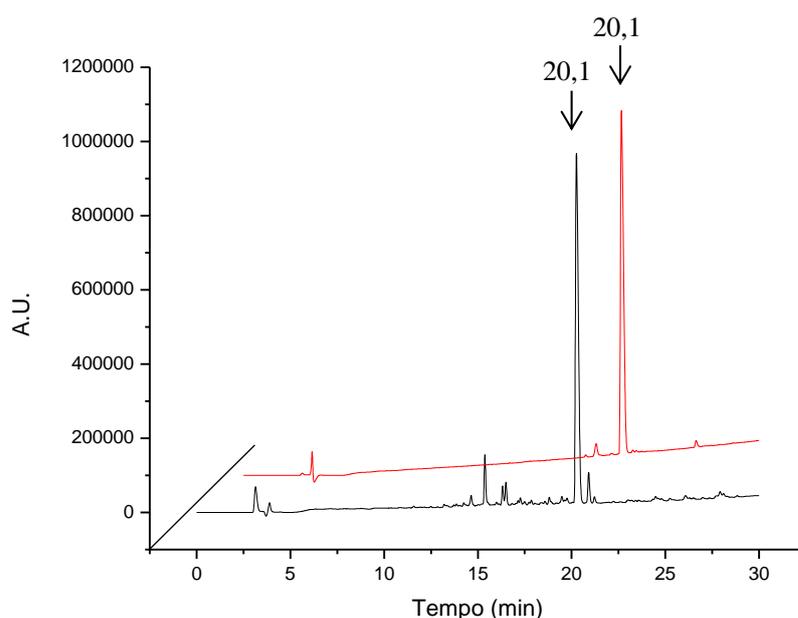
### 4.1- Resultados da aureína 1.2

#### 4.1.1- Síntese dos peptídeos

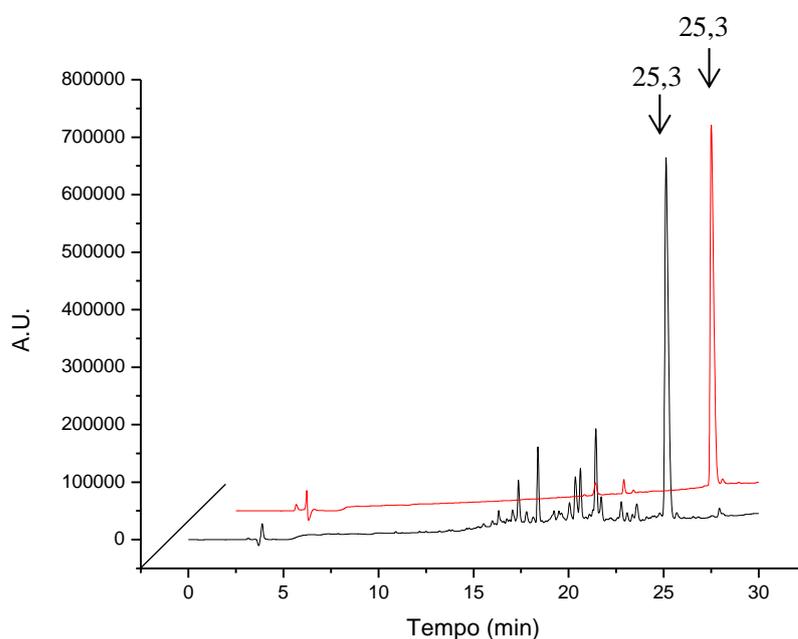
A síntese dos três peptídeos correspondentes ao bloco do peptídeo AU foi desenvolvida seguindo os protocolos básicos da SPFS, utilizando a resina Rink Amide MBHA de 0,6 mmol/g. Para a síntese do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K foi utilizado no início da síntese um resíduo de lisina como linker entre as duas cadeias de AU (figura 18a), enquanto na síntese do peptídeo E(AU)<sub>2</sub> foi empregado, após a síntese das cadeias monoméricas, um resíduo de glutamato como linker das duas cadeias de AU (figura 18b).

Os perfis cromatográficos obtidos dos peptídeos do bloco da aureína 1.2 (AU) brutos e puros podem ser observados nas figuras 23 a 25.

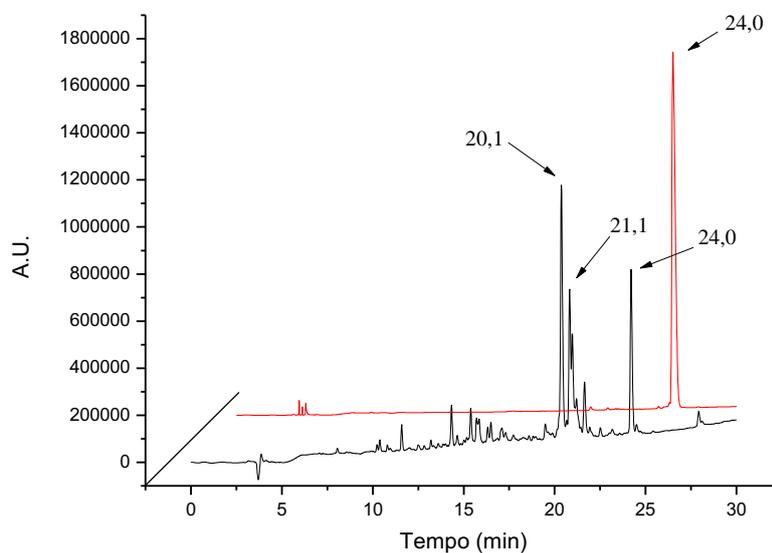
**Figura 23** - Perfis cromatográficos do peptídeo AU bruto (preto) e puro (vermelho).



**Figura 24-** Perfis cromatográficos do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K bruto (preto) e puro (vermelho).



**Figura 25 -** Perfis cromatográficos do peptídeo E(AU)<sub>2</sub> bruto (preto) e puro (vermelho).

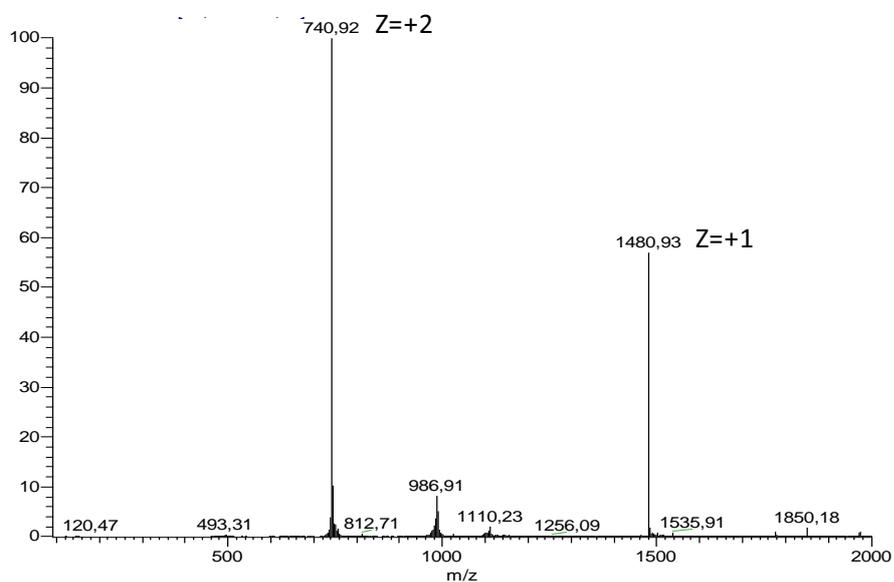
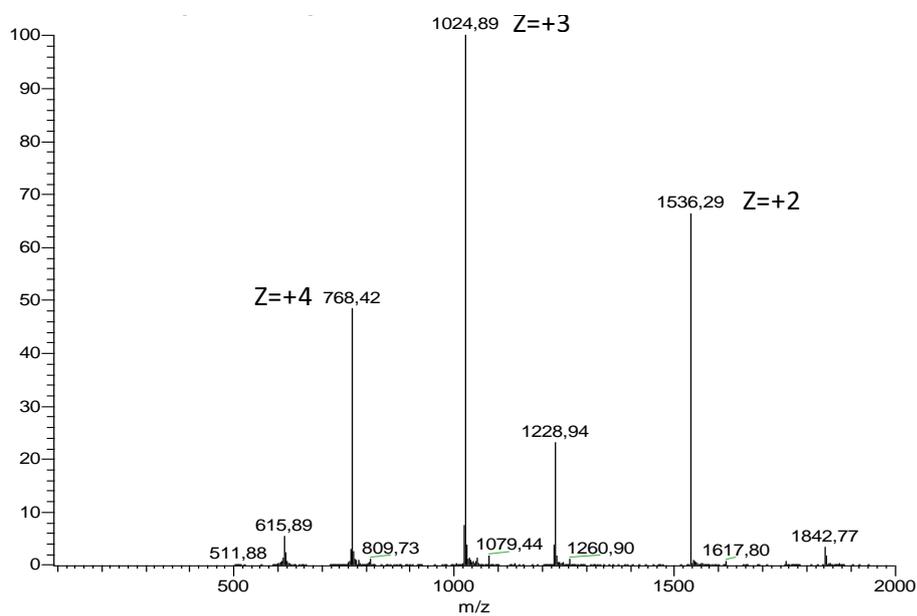


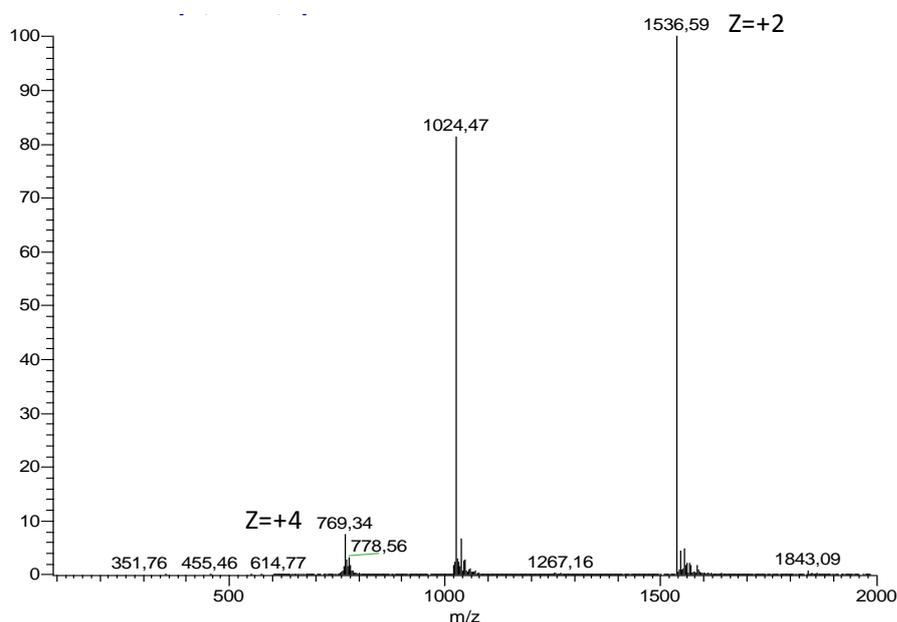
Quando comparados os perfis dos peptídeos brutos das figuras 23 a 25 e Tabela 3, podemos observar que a melhor síntese, caracterizada pelo menor número de picos, foi a do peptídeo monomérico. A síntese do dímero contendo a lisina também apresentou um bom resultado, com poucos contaminantes. O pior resultado foi encontrado para a síntese que

envolveu a ligação do glutamato ao final da síntese da cadeia peptídica. Desde que o peptídeo E(AU)<sub>2</sub> é obtido a partir da ligação de duas cadeias de AU por um resíduo de glutamato, não é possível a utilização de excesso de aminoácidos. A utilização de igual quantidade de Fmoc-Glu, em relação a quantidade de sítios teóricos, poderia levar a obtenção de sequências contendo a AU ligada a apenas um resíduo de Glu. Desta forma, foi utilizada apenas metade de equivalentes de Fmoc-Glu. Esta baixa quantidade de reagente pode explicar a obtenção de maior quantidade de subprodutos. A presença do peptídeo Glu-AU e AU detectados pela CLAE (picos de 21,1 e 20,1 min, respectivamente) e por espectrometria de massas (não mostrado), nos levou a fazer uma etapa adicional, com a adição somente de agentes acoplantes (DIC/HOBt). Esta etapa foi realizada na tentativa de aumentar o número de cadeias diméricas. No entanto, apesar desta etapa aumentar a obtenção do peptídeo dimérico, a análise do perfil cromatográfico do bruto final permitiu a observação de picos referentes ao peptídeo monomérico e ao contendo Glu-AU.

As análises por CLAE das frações puras mostraram que as purificações foram eficientes atingindo, para os três peptídeos, porcentagens de pureza maior que 98%.

As amostras puras foram analisadas por espectrometria de massas (EM). Os resultados são mostrados nas figuras 26 a 28. Os valores das massas moleculares teóricas e observadas estão apresentados na tabela 3.

**Figura 26** - Espectro de massas do peptídeo AU puro.**Figura 27** - Espectro de massas do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K puro.

**Figura 28** - Espectro de massas do peptídeo E(AU)<sub>2</sub> puro**Tabela 3**- Dados das sínteses dos peptídeos correspondentes ao bloco da aureína 1.2.

Peptídeo	Rendimento final (%)	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (MM) – g/mol	
			MMObservada	MMCalculada
AU	28,4	20,1	1480,9	1479,8
(AU) <sub>2</sub> K	13,0	25,3	3069,6	3069,7
E(AU) <sub>2</sub>	3,2	24,0	3071,2	3070,6

Juntas, as análises por CLAE e EM evidenciam o sucesso na obtenção dos peptídeos desejados. Adicionalmente, os tempos de retenção evidenciados pelos dados de CLAE mostraram que a dimerização aumenta a hidrofobicidade dos peptídeos diméricos. Ao contrário do esperado, o peptídeo E(AU)<sub>2</sub> foi menos hidrofóbico que o (AU)<sub>2</sub>K, visto que o primeiro possui apenas uma carga positiva na extremidade N-terminal, enquanto que o segundo possui duas.

Após a obtenção dos peptídeos, estes foram avaliados em relação a sua estrutura e atividade.

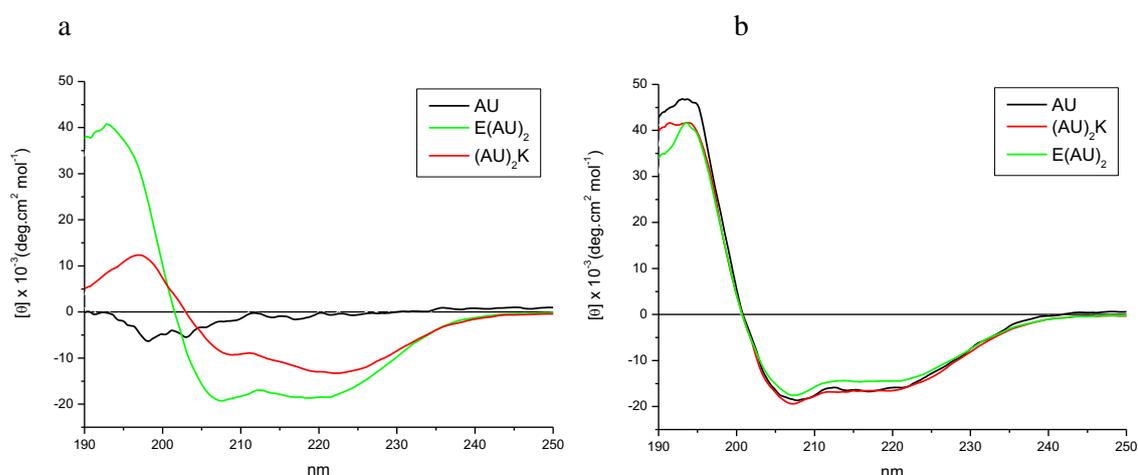
#### 4.1.2- Dicroísmo circular (CD)

O conhecimento da estrutura secundária de moléculas como proteínas e peptídeos é crucial para entender a relação entre a função e a atividade destas moléculas. Em tal sentido, o efeito da dimerização na estrutura secundária dos peptídeos sintetizados foi estudado por CD. A estrutura secundária dos peptídeos foi avaliada em tampão PBS e micelas de LPC.

Os resultados, apresentados na figura 29a, revelaram que em solução aquosa o peptídeo AU não apresentou uma estrutura secundária definida, enquanto que os peptídeos  $(AU)_2K$  e  $E(AU)_2$  já apresentaram estrutura helicoidal. É interessante observar que no espectro do peptídeo  $(AU)_2K$  o pico correspondente a 222 nm é mais intenso que o de 208 nm. Isto mostra que o peptídeo apresenta uma estrutura denominada “coiled-coil”, isso é, duas  $\alpha$ -hélices interagindo entre si (Bromley e Channon, 2011).

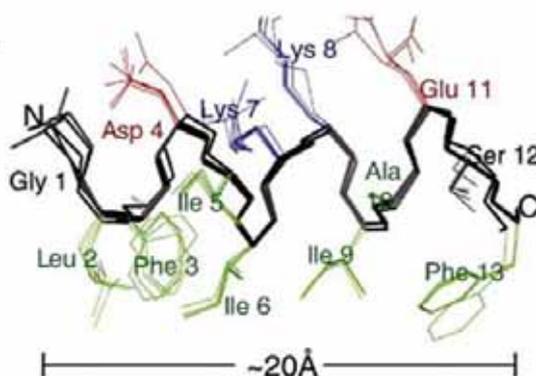
Na presença de LPC os três peptídeos adquiriram uma estrutura em  $\alpha$ -hélice bem definida e similar entre si, com as características bandas negativas em 208 e 222 nm e a positiva em torno de 195 nm. (Figura 29b).

**Figura 29** - Espectros de CD dos peptídeos AU,  $E(AU)_2$  e  $(AU)_2K$  em solução aquosa (a) e em 10 mmol/L de LPC.



A falta de estrutura secundária definida em solução aquosa e a estruturação tipo  $\alpha$ -hélice em solventes estruturantes, micelas e vesículas, tem sido reportada previamente para o peptídeo AU (Marcotte *et al.*, 2003; Seto *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010). Haney, et al., (2009) determinaram por RMN a estrutura desse peptídeo na presença de micelas de SDS, mostrando que, ao longo de toda sua extensão, o peptídeo adota uma estrutura anfipática tipo  $\alpha$ -hélice bem definida, orientando os resíduos hidrofóbicos (verde) do lado oposto aos resíduos hidrofílicos (azul e vermelho) (figura 30).

**Figura 30-** Estrutura da AU ligada a micelas de SDS.

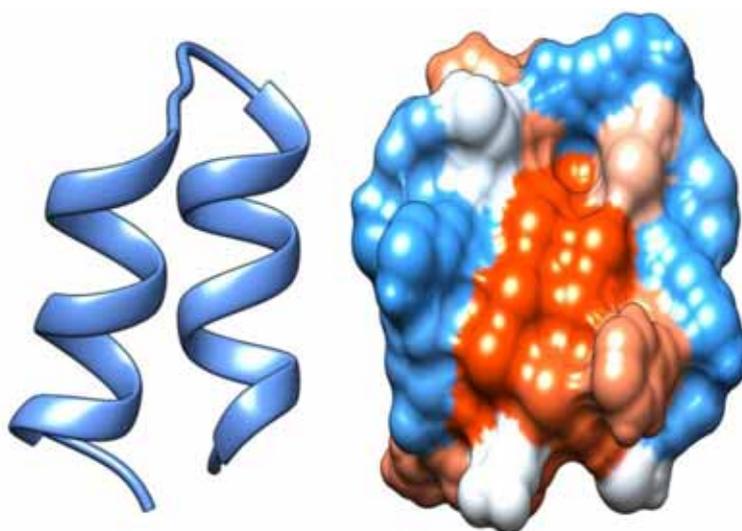


Fonte: extraído de (Haney *et al.*, 2009).

Assim, os nossos resultados referentes à estrutura do peptídeo aureína 1.2 são condizentes com os da literatura.

Por se tratar de moléculas inéditas, não há até o momento bibliografia a respeito da estrutura dos dímeros. Porém, mediante o programa “Pep Fold” (Maupetit *et al.*, 2009), a estrutura 3D do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K em solução foi predita. O resultado pode ser observado na figura 31, onde fica evidente que o peptídeo, mesmo tendo a possibilidade de ficar estendido, apresenta suas duas  $\alpha$ -hélices bem próximas, provavelmente mantendo-se juntas mediante interações hidrofóbicas. Já, em presença do mimético de membrana LPC, o peptídeo parece estar numa conformação mais estendida.

**Figura 31** – Representação da estrutura secundária (a) e da superfície de potencial eletrostático (b) do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K em solução aquosa obtida pelo programa “Pep Fold”. A superfície em azul representa as regiões hidrofílicas e em vermelho as hidrofóbicas.



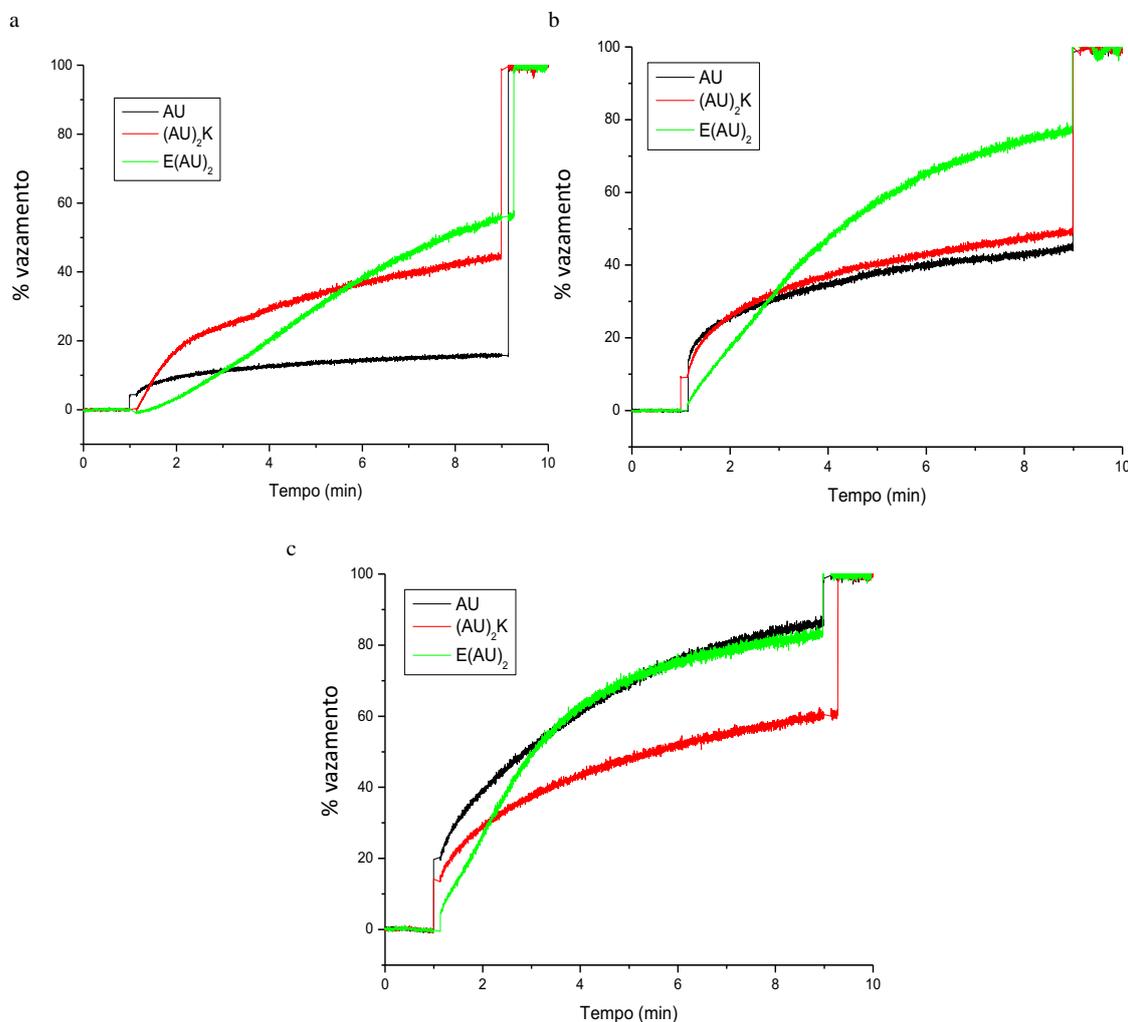
Estudos por dinâmica molecular (MD) dos peptídeos em solução aquosa e em presença de bicamadas lipídicas estão sendo realizados. Esses dados serão muito importantes não só para confirmar os dados experimentais obtidos por CD, mas também para poder discutir os resultados de atividade biológica considerando a relação estrutura-função.

#### **4.1.3- Vazamento de carboxifluoresceína**

Visando obter informações a respeito da interação dos peptídeos com miméticos de membrana, LUVs contendo 5% de DPPA e 95% de DPPC foram confeccionadas. O DPPA foi adicionado à composição da vesícula por apresentar carga negativa, mimetizando assim a carga negativa da membrana plasmática das bactérias. A figura 32 mostra o perfil de liberação de CF para estas vesículas em diferentes concentrações de peptídeos.

**Figura 32** - Permeabilização de LUVs de DPPA/DPPC (5/95) pelos peptídeos AU, E(AU)<sub>2</sub> e (AU)<sub>2</sub>K.

Concentração: 1 (a), 4 (b) e 16 (c)  $\mu\text{mol/L}$ .



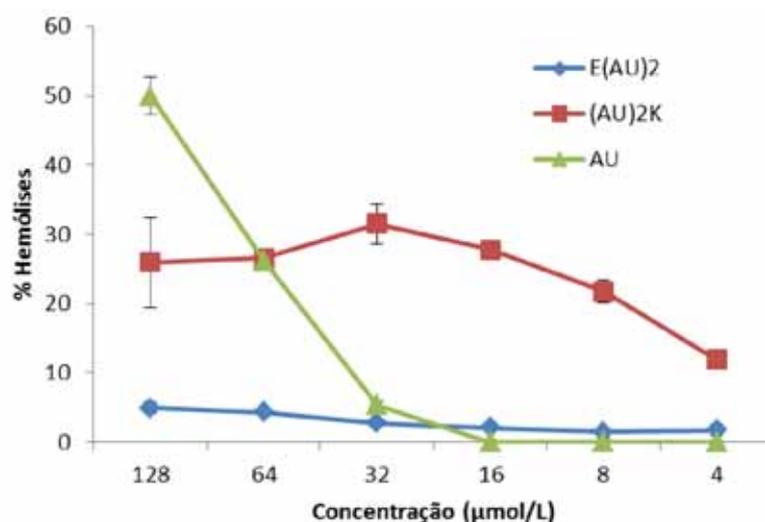
Para o peptídeo AU, a porcentagem de vazamento de CF aumenta significativamente com a concentração, passando de aproximadamente 15% para 85% de permeabilização quando a concentração varia de 1 para 16  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. Esse comportamento foi menos evidenciado para os dímeros, sugerindo que a dimerização poderia estar alterando o mecanismo de ação do peptídeo AU. Como foi citado na sessão de materiais e métodos, alguns estudos indicam que a relação entre a concentração e a liberação de CF está diretamente associada com o mecanismo de ação (Russell *et al.*, 2010). O aumento gradual da intensidade de fluorescência com a concentração de peptídeo é relacionada ao mecanismo de formação de poros (figura 20a).

Por outro lado, pequenas variações nas porcentagens de permeabilização correspondem ao mecanismo de solubilização - carpete (figura 20b).

#### 4.1.4- Atividade hemolítica

O desenvolvimento de novos antimicrobianos requer necessariamente que eles não atuem nas células eucariotas. Dessa forma, o teste de atividade hemolítica foi utilizado como modelo para avaliar a toxicidade dos peptídeos. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 33, onde fica evidente que a dimerização afeta a atividade hemolítica. A atividade da versão monomérica só é encontrada em concentrações acima de 16  $\mu\text{mol/L}$ , ponto a partir do qual a atividade é proporcional à concentração. Por outro lado, as versões diméricas sofrem pequena variação em função da concentração. No entanto, os resultados obtidos quando comparamos as duas versões diméricas foram diferentes. O peptídeo  $\text{E(AU)}_2$  apresentou uma atividade próxima a zero enquanto o  $(\text{AU})_2\text{K}$  mostrou atividade entre 15 e 30% de hemólise.

**Figura 33** - Atividade hemolítica dos peptídeos AU,  $(\text{AU})_2\text{K}$  e  $\text{E(AU)}_2$ .



É interessante destacar que estes resultados mostraram relação com os observados nos testes de permeabilização antes descritos. Assim, em LUVs e em hemácias, a atividade do monômero parece ser mais dependente da concentração do que as versões diméricas.

#### 4.1.5- Atividade antimicrobiana

Determinou-se a CIM por meio do teste de microdiluição em placas. Os microrganismos escolhidos para avaliar a atividade biológica dos peptídeos foram *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, sendo esses representantes das bactérias Gram negativas, Gram positivas e leveduras, respectivamente. A atividade, avaliada em termos da CIM, pode ser observada na tabela 4. Para todos os microrganismos testados, as versões diméricas tiveram uma marcada diminuição ou perda de atividade antimicrobiana quando comparadas com o monômero. É interessante ressaltar que este fenômeno também foi observado quando os PAMs Temporin A e Penetratin foram dimerizados (Mäntylä *et al.*, 2005; Zhu e Shin, 2009b).

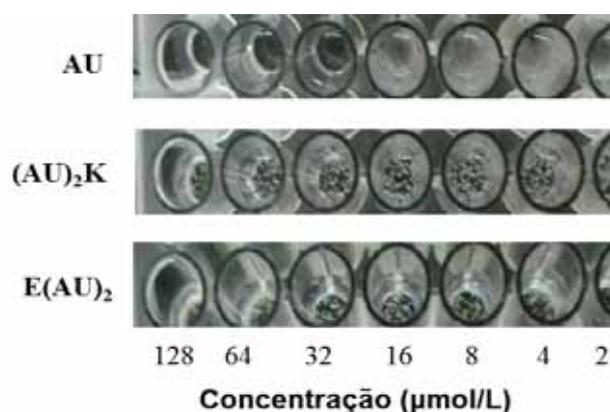
**Tabela 4** - Atividade antimicrobiana dos peptídeos AU, (AU)<sub>2</sub>K e E(AU)<sub>2</sub>.

Peptídeo	CIM (µmol/L)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
AU	16	8	32
(AU) <sub>2</sub> K	128	>128	>128
E(AU) <sub>2</sub>	128	>128	>128

A diminuição ou perda da atividade biológica não contradiz os dados de capacidade de permeabilizar vesículas. Para exercer sua atividade, os PAMs precisam atravessar outros componentes da parede celular antes de atingir a membrana plasmática, como os lipopolissacarídeos e estruturas complexas como peptídeoglicanos, ausentes nas vesículas (Papo e Shai, 2003; He *et al.*, 2014). Nós atribuímos, a alta atividade de permeabilizar vesículas e a baixa atividade biológica dos peptídeos diméricos a interação com os outros componentes da parede celular. Esta interação impede que os peptídeos atinjam a membrana celular e promovam a morte do microrganismo.

Adicionalmente, chamou a nossa atenção que as versões diméricas, em todo o intervalo de concentração, apresentaram a capacidade de agregar células de *C. albicans*, enquanto que o peptídeo AU não mostrou este efeito (figura 34).

**Figura 34** – Foto da microplaca correspondente ao estudo da atividade dos peptídeos AU, (AU)<sub>2</sub>K e E(AU)<sub>2</sub> sobre *C. albicans*. Os pontos brancos foram identificados como agregados de células de leveduras.

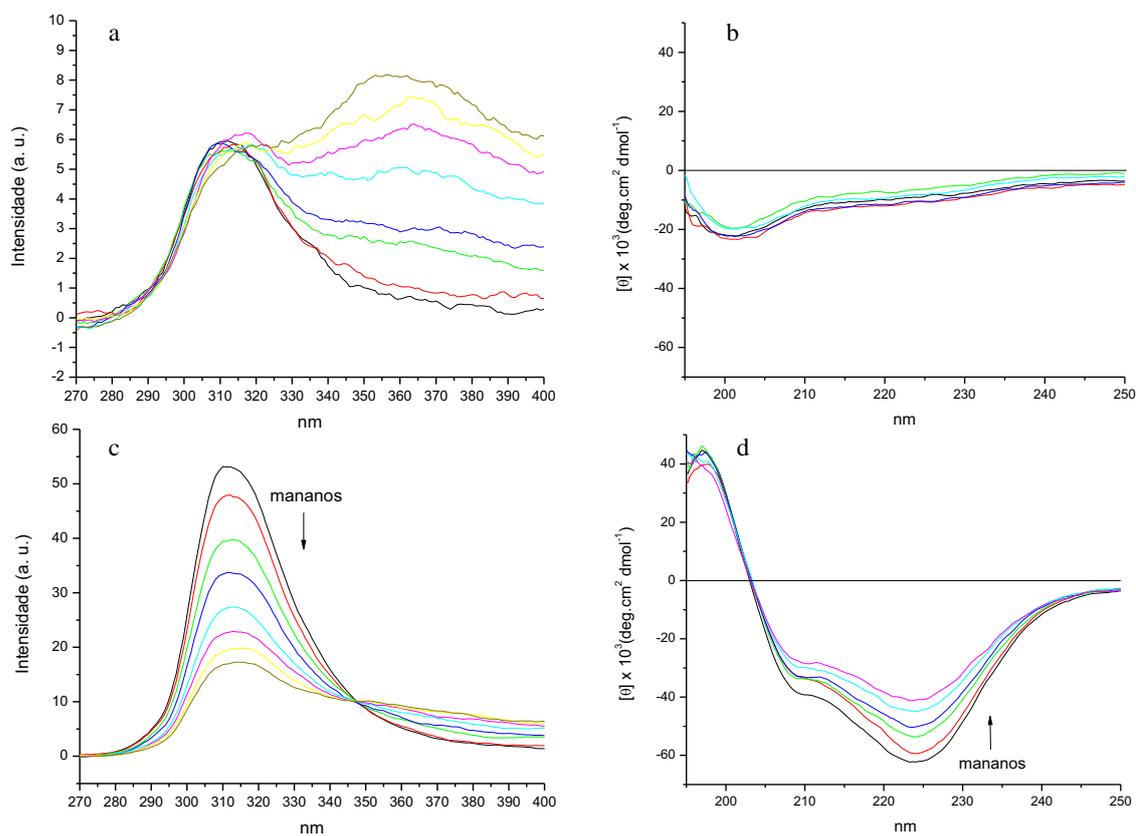


#### 4.1.6- Interação peptídeo-mananos

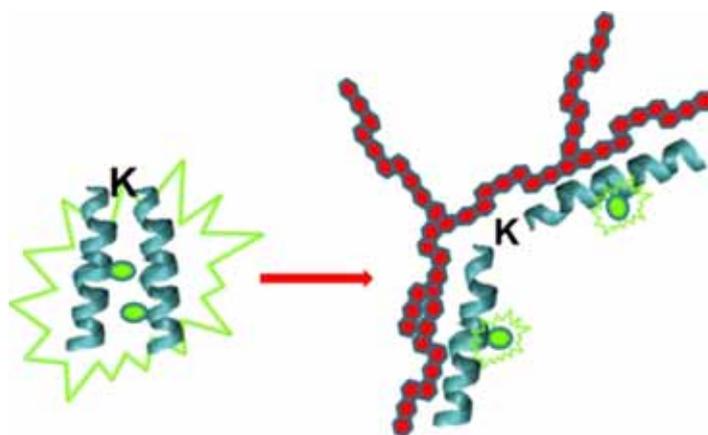
A capacidade dos dímeros de agregar células de levedura, de possuírem baixa atividade biológica e de permeabilizar vesículas sugerem que há algum componente na parede das leveduras que impede os peptídeos de atingir a membrana plasmática. Recentemente, a capacidade do peptídeo LL-37 de agregar células de levedura foi atribuída à ligação do peptídeo com moléculas de mananos, o principal componente da parede celular de *C. albicans* (Tsai *et al.*, 2011). Tendo isso em consideração, hipotetizou-se que a falta de atividade antifúngica poderia ser explicada em termos da interação dos dímeros com carboidratos da parede celular. É interessante observar que os peptídeos (AU)<sub>2</sub>K e LL-37 possuem certa identidade na estrutura primária (figura 35), o que poderia explicar o fato dessas moléculas terem propriedades biológicas similares.



**Figura 36** - Espectros de fluorescência e CD dos peptídeos AU (a e b) e  $(AU)_2K$  (c e d) em diferentes concentrações de manano (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 vezes a concentração dos peptídeos).

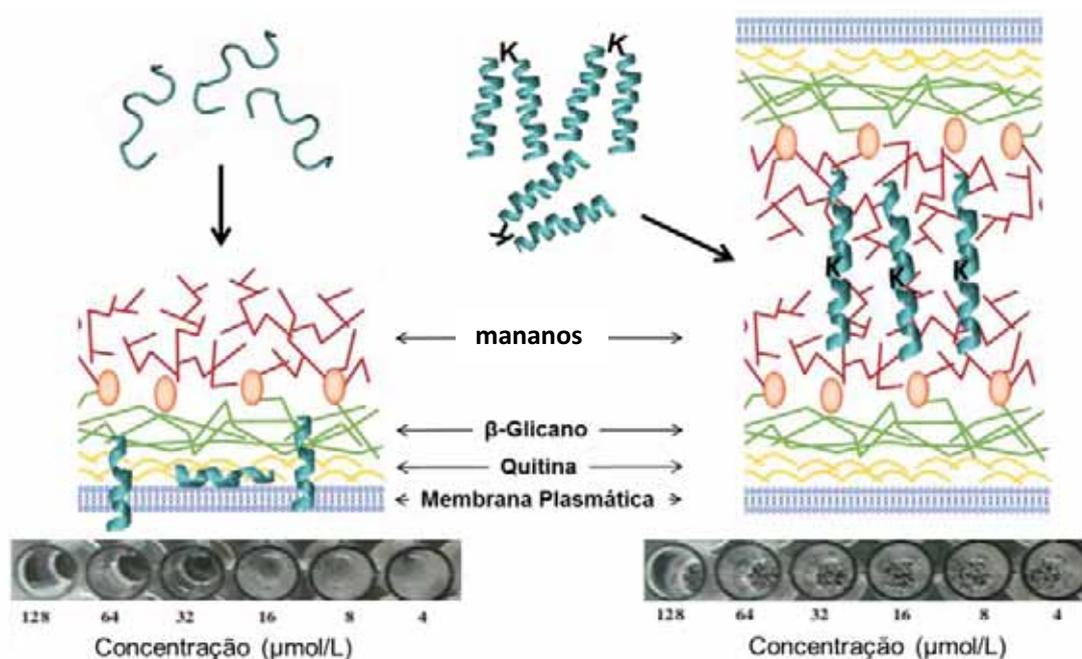


**Figura 37** – Modelo proposto para a interação do peptídeo  $(AU)_2K$  com mananos.



De acordo esses dados, e em conjunto com os acima descritos (atividade biológica e permeabilização), o peptídeo AU atravessaria a parede celular de *C. albicans*, atingindo a membrana plasmática conduzindo a morte da célula. Por outro lado, devido à interação com os mananos, as versões diméricas não conseguiriam atingir a membrana plasmática (figura 38).

**Figura 38** - Modelo proposto para a interação do peptídeo AU e (AU)2K com a parede celular de leveduras. (Adaptado de Hardison and Brown, 2012).



Interações específicas entre PAM e polissacarídeos (entre outras moléculas) parece ser um fenômeno relativamente comum, e deve ser considerado na hora de desenhar uma nova molécula com propriedades antimicrobianas (Ding *et al.*, 2003).

Analisando os dados obtidos, fica claro que a dimerização do peptídeo AU reduziu a atividade antimicrobiana. Esse fato pode ser explicado, em primeiro lugar, pela interação dos peptídeos diméricos com componentes da parede celular dos microrganismos, como confirmado mediante o teste de interação com mananos. Analogamente, a falta de atividade frente a bactérias pode ser devido à interação dos peptídeos com moléculas como os lipopolissacarídeos (Papo e

Shai, 2003; Domingues *et al.*, 2012). Em segundo lugar, o estado “estruturado” em solução aquosa pode fazer com que as versões diméricas experimentem uma interação inicial diferente com a membrana, levando a uma mudança no mecanismo de ação ou até à diminuição da atividade. Em um trabalho recente de Jamasbi *et al.*, a versão dimérica de um análogo do PAM melitina também se mostrou menos ativo quando comparado com o monômero. Chama a atenção que esse dímero também apresenta uma estruturação tipo helicoidal, mesmo em solução (Jamasbi *et al.*, 2014). Assim, o estado “não-estruturado” de alguns PAMs parece ser um requisito para a sua atividade biológica.

#### **4.1.7- Mecanismo de ação**

Independentemente da perda de atividade antimicrobiana, os resultados de CD e vazamento de CF nos alentaram estudar com mais detalhes a possível diferença no mecanismo de ação provocada pela dimerização do peptídeo. Para isso decidimos utilizar diferentes técnicas biofísicas como a microscopia de contraste, calorimetria de titulação isotérmica, CD e vazamento de CF. Como sistemas modelos de membranas foram utilizadas LUVs e GUVs compostas de diferentes proporções dos lipídeos SOPC e SOPG. O SOPG foi utilizado para conferir carga negativa às vesículas e, desta forma, mimetizar membranas procarióticas (Polozov e Gawrisch, 2004). É importante esclarecer que, devido ao baixo rendimento de sínteses do peptídeo E(AU)<sub>2</sub>, o mesmo não foi utilizado em todos os experimentos.

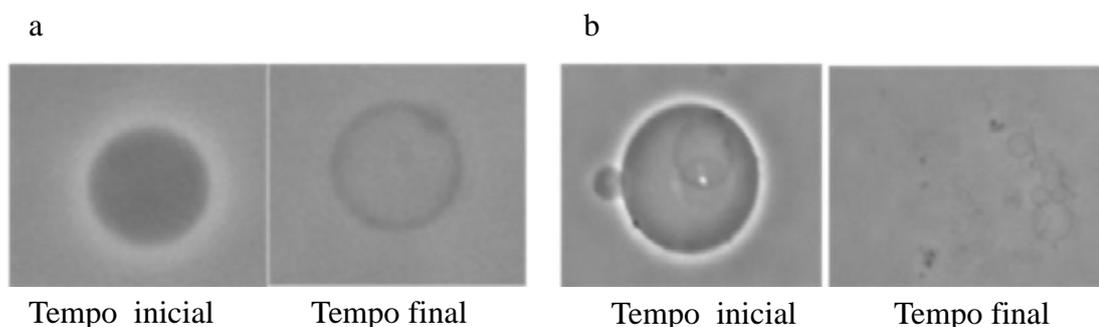
##### **4.1.7.1- Microscopia de contraste**

Visando obter informação em relação à possível mudança no mecanismo de ação provocada pela dimerização, a técnica de microscopia de contraste de fase foi utilizada. Essa foi escolhida porque permite visualizar diretamente os efeitos provocados pelos peptídeos nas bicamadas lipídicas de GUVs.

Assim, GUVs compostas de SOPC/SOPG, nas proporções 50/50, 75/25 e 95/5 foram confeccionadas e avaliadas frente aos peptídeos AU e (AU)<sub>2</sub>K nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20  $\mu\text{mol/L}$ . É interessante destacar que a concentração dos peptídeos não mudou significativamente a forma com que estes interagiram com as GUVs, mas sim a velocidade com que o efeito produzido foi evidenciado. Quanto maior a concentração de peptídeo, mais rapidamente os peptídeos agiram sobre as membranas.

Como pode ser observado na figura 39, a atividade do monômero sobre GUVs com 95/5 de SOPC/SOPG é caracterizada pela perda gradual de contraste. Este comportamento é atribuído à formação de poros, isto é, ocorre sem a solubilização da membrana. Por outro lado, sobre GUVs com 50/50, o peptídeo provoca uma instantânea perda de contraste, seguido da desintegração completa da membrana. A perda de contraste, da mesma forma que para GUVs com 95/5 está relacionada com o vazamento do açúcar no interior da GUV, no entanto, neste caso ocorreu o processo de solubilização da bicamada lipídica, provavelmente devido à formação de um grande número de poros.

**Figura 39** - Efeito do peptídeo AU sobre GUVs compostas de 95/5 (A) e 50/50 (B) SOPC/SOPG.



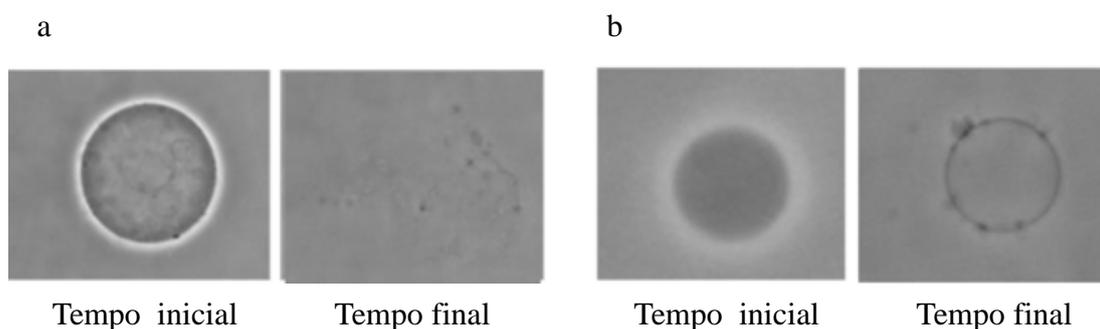
É interessante ressaltar que, segundo a bibliografia, o peptídeo AU é considerado como representante dos PAMs que agem segundo o mecanismo “carpete”. Independentemente da composição lipídica e a técnica empregada, o argumento encontrado na bibliografia sobre a ação detergente do peptídeo tem a ver com o tamanho da molécula. Segundo vários pesquisadores, o curto comprimento do peptídeo, quando comparado com a espessura das membranas, seria a

causa da falta de capacidade de formação de poros (Ambroggio *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Mccubbin *et al.*, 2011).

Porém, mediante a técnica utilizada no nosso experimento, o peptídeo parece formar poros em GUVs com 95/5 de SOPC/SOPG e solubilizar aquelas com 50/50. É por isso que a atribuição de um determinado mecanismo de ação para um dado PAM muitas vezes não é absoluta, e sim relativa, dependendo principalmente da composição lipídica. A dependência do modo de interação de PAMs com a carga da superfície de miméticos de membrana tem sido reportada previamente para outros peptídeos (Van Den Bogaart *et al.*, 2007; Manzini *et al.*, 2014). Além disso, o mecanismo de solubilização pode ser entendido como uma extensão do mecanismo de formação de poros, isto é, a formação de um grande número de poros pode levar a uma desintegração da membrana (David *et al.*, 2012). No entanto, as variáveis que governam a transição de um mecanismo para outro ainda não são completamente entendidas.

Por outro lado, o peptídeo dimérico  $(AU)_2K$  parece agir de forma inversa a AU. Sobre GUVs com 95/5 de SOPC/SOPG ocorre uma instantânea perda de contraste e a desintegração completa da membrana, enquanto que sobre GUVs com 50/50 de produz somente uma perda gradual de contraste (figura 40).

**Figura 40** - Efeito do peptídeo  $(AU)_2K$  sobre GUVs compostas de 95/5 (A) e 50/50 (B) SOPC/SOPG.



Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas versões diméricas (dados não apresentados). Ambos os peptídeos teriam o mesmo mecanismo de ação, porém o peptídeo  $(AU)_2K$  parece ser mais rápido que o  $E(AU)_2$ , provavelmente pela presença das duas cargas

positivas na extremidade N-terminal. O nosso grupo mostrou em análogos da Hylina-a1, que a presença de cargas positivas na extremidade amino-terminal é importante para a atividade dos PAMs (Crusca *et al.*, 2011)

Em relação à composição lipídica 75/25, não foi possível discriminar claramente o mecanismo de ação dos peptídeos, possivelmente por se tratar de uma interação tipo “mista” entre o mecanismo de formação de poros e solubilização. Recentemente, foi demonstrado que um mesmo peptídeo pode agir sobre uma determinada composição lipídica mediante uma combinação de mecanismos, tornando muito difícil a interpretação dos dados (Juhaniwicz e Sek, 2014). Tendo isto em consideração, os estudos continuaram somente com as composições 95/5 e 50/50 de SOPC/SOPG.

Os resultados, em geral, demonstraram que a composição lipídica e a dimerização afetaram a forma com que os peptídeos agem sobre as GUVs.

#### **4.1.7.2- Calorimetria de titulação isotérmica**

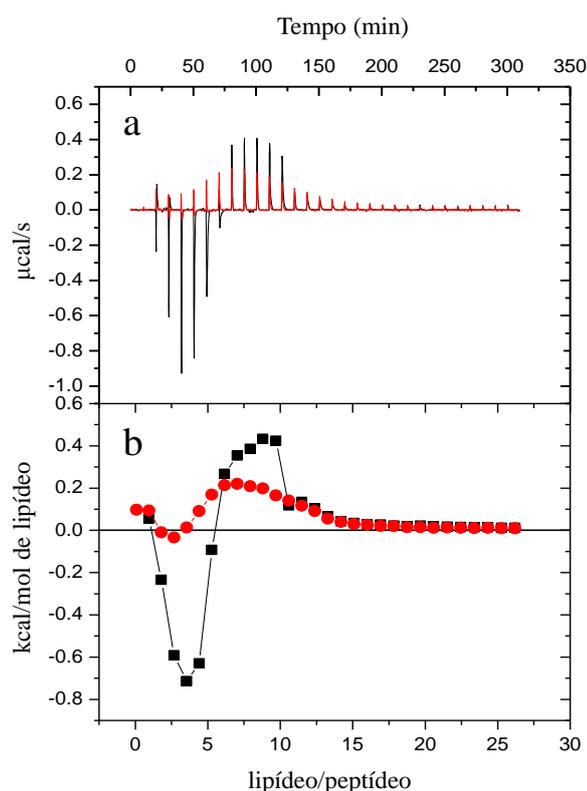
Visando compreender qualitativamente a termodinâmica da interação dos peptídeos com os miméticos de membrana avaliados por microscopia, recorreu-se à técnica de ITC.

A figura 41 mostra as isotermas de titulação do peptídeo AU com LUVs compostas de 95/5 e 50/50 SOPC/SOPG. Para ambas as composições foi observada uma componente exotérmica e outra endotérmica para relações lipídeo/peptídeo baixa e alta, respectivamente. É interessante observar que a intensidade dos dois processos, principalmente o exotérmico, é maior para as LUVs compostas de SOPC/SOPG 50/50.

Assim, pode se dizer que a energia envolvida na interação do peptídeo AU é maior quanto maior é a carga negativa na superfície das vesículas. Este significativo aumento da intensidade de interação pode explicar os dados de microscopia. Como mencionado anteriormente, o mecanismo de formação de poros e o de solubilização podem estar relacionados. Assim, segundo os dados de ITC, muita mais energia (tanto liberada quanto absorvida) está envolvida na interação do

peptídeo com LUVs 50/50, o que poderia estar provocando a mudança de um mecanismo para o outro (poro em vesículas 95/5 para carpete em vesículas 50/50).

**Figura 41** – Curva calorimétrica de titulação (a) e integração da área da curva (b) do peptídeo AU (40  $\mu\text{mol/L}$ ) com LUVs contendo 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG (10  $\text{mmol/L}$ ).

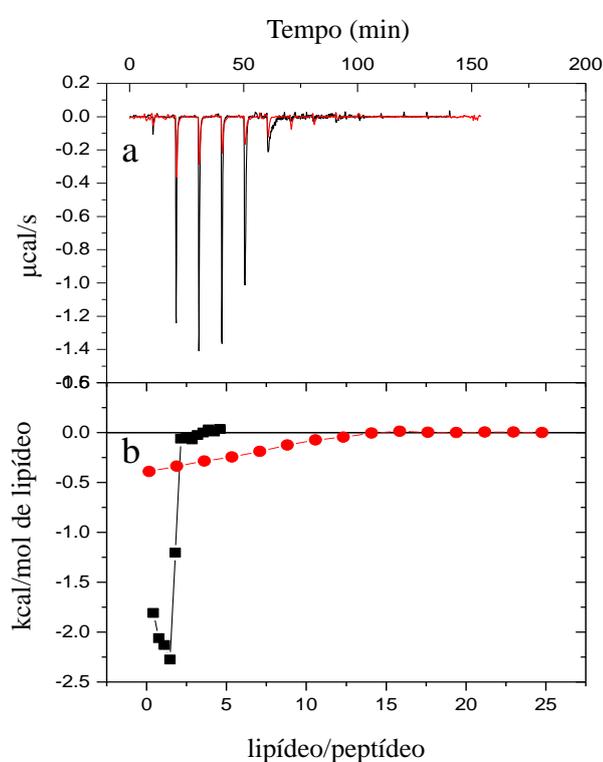


Em relação ao peptídeo  $(\text{AU})_2\text{K}$ , os resultados mostraram somente uma componente, a exotérmica. É interessante destacar que, além de uma significativa diferença de intensidade desta componente, o perfil das isotermas também é diferente (figura 42).

Analisando os resultados, é evidente que a componente exotérmica do dímero é maior e mais acentuada quando o peptídeo é titulado com LUVs contendo 50/50 de SOPC/SOPG. Já, com LUVs contendo 95/5 de SOPC/SOPG a isoterma apresenta um mínimo (máximo exotérmico) no início da titulação e experimenta uma progressiva diminuição conforme se incrementa a quantidade de vesículas. Mesmo existindo diferenças significativas para os dois

modelos de membranas, não é possível correlacionar estes resultados com os obtidos mediante microscopia. Neste ponto destacamos que as condições experimentais são diferentes, enquanto na microscopia o peptídeo é adicionado à vesícula, no segundo o contrário acontece. Desta forma, fenômenos diferentes podem estar sendo evidenciados.

**Figura 42** - Curva calorimétrica de titulação (a) e integração da área da curva (b) do peptídeo (AU)<sub>2</sub>K (40  $\mu$ mol/L) com LUVs contendo 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG (10 mmol/L).



Quando comparamos o monômero e o dímero nos dois modelos de membrana, podemos observar que, os perfis e as intensidades das isotermas são diferentes, fato pelo qual poderíamos afirmar que a composição lipídica e a dimerização afetam a forma com que os peptídeos agem sobre as LUVs.

A ausência de referências bibliográfica sobre estudos por ITC da interação do peptídeo AU (e subsequentemente das versões diméricas) com miméticos de membrana dificulta uma

análise comparativa. Além disso, mesmo sendo uma técnica bastante utilizada, ainda há uma grande dificuldade na atribuição de um determinado mecanismo de ação avaliando as isotermas obtidas (Abraham *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2010; Henriksen e Andresen, 2011).

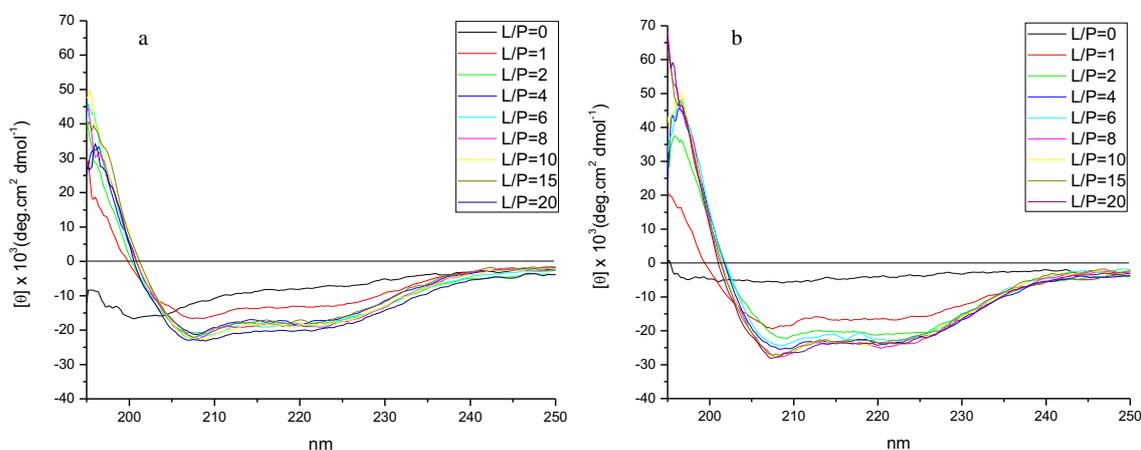
#### **4.1.7.3- Dicroísmo circular em vesículas**

No intuito de relacionar os processos biofísicos observados por microscopia e ITC com a estrutura, os peptídeos foram estudados por CD. Desta vez, os mesmos foram titulados com LUVs de composição similar às utilizadas nos experimentos antes mencionados.

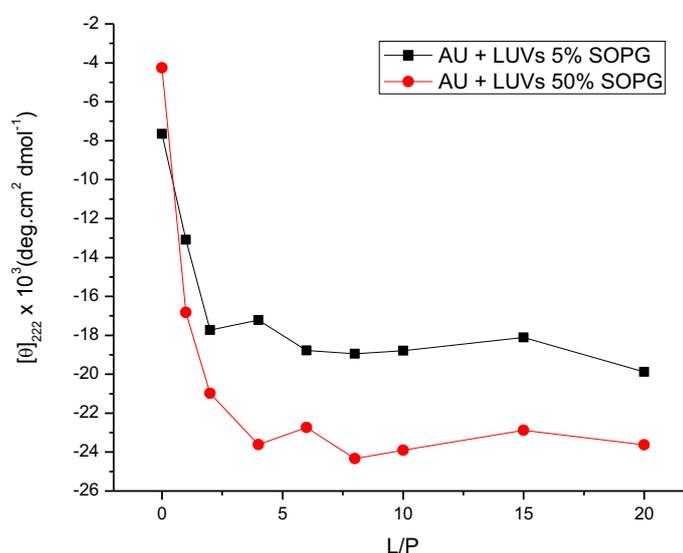
Na figura 43 observa-se que na ausência de LUVs o peptídeo não tem estrutura secundária definida, como previamente observado (figura 29a). Por sua vez, a adição de LUVs promove uma estruturação tipo helicoidal. Esta estruturação, mesmo que em outro mimético de membrana (LPC), também já tinha sido observada (figura 29b).

Quando comparadas as duas composições lipídicas, a estruturação do peptídeo ocorre mais intensamente em LUVs com 50% de SOPG do que em LUVs com 5% de SOPG. Esta maior estruturação, medida em termos de elipticidade molar a 222 nm, pode ser observada na figura 44 e estaria relacionada com uma maior interação do peptídeo com a membrana. Isto poderia ser a explicação da maior intensidade das isotermas e solubilização das vesículas contendo 50% de SOPG. Assim, os dados de CD estão em concordância com os resultados de ITC e microscopia.

**Figura 43** - Espectros de CD do peptídeo AU em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



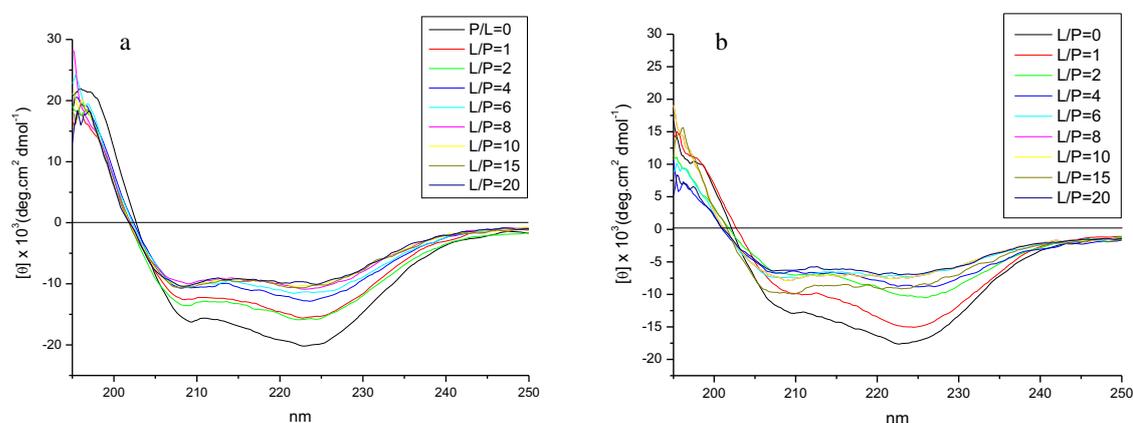
**Figura 44** – Variação da elipticidade molar a 222 nm para o peptídeo AU em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



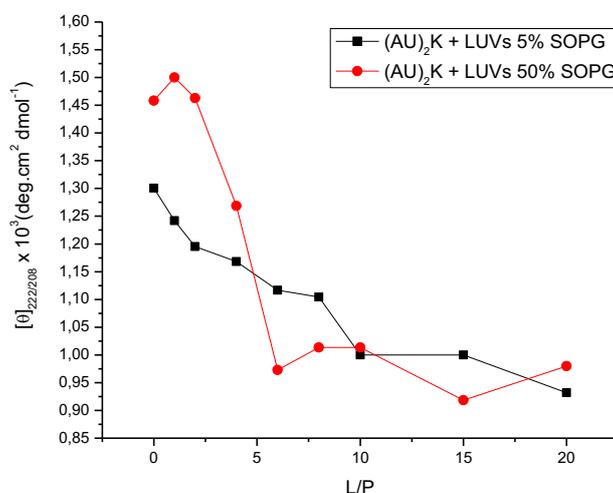
Em relação ao peptídeo (AU)<sub>2</sub>K, em solução aquosa este apresenta uma estrutura secundária definida como “coiled-coil”, resultado também observado na figura 29a e 36b. É interessante destacar que a intensidade de absorção nos comprimentos de onda em 208 e 222 nm vai diminuindo conforme se incrementa a concentração lipídica (figura 45). Porém, a proporção

com que a intensidade nestes dois comprimentos de onda diminui é diferente, o comprimento de onda em 220 nm sofre uma variação mais acentuada que a em 208 nm. De fato, a intensidade em 222 nm diminui mais que a de 208 nm quando a quantidade de lipídeos aumenta (figura 46). Este comportamento indica que o peptídeo está inicialmente com suas cadeias interagindo umas com outras, e quando em contato com a membrana adotaria uma conformação mais estendida, sem ter as suas duas hélices em contato uma com a outra.

**Figura 45** – Espectros de CD do peptídeo  $(AU)_2K$  em diferentes concentrações de LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



**Figura 46** - Variação da razão de elipticidade molar 222/208 nm para o peptídeo  $(AU)_2K$  em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



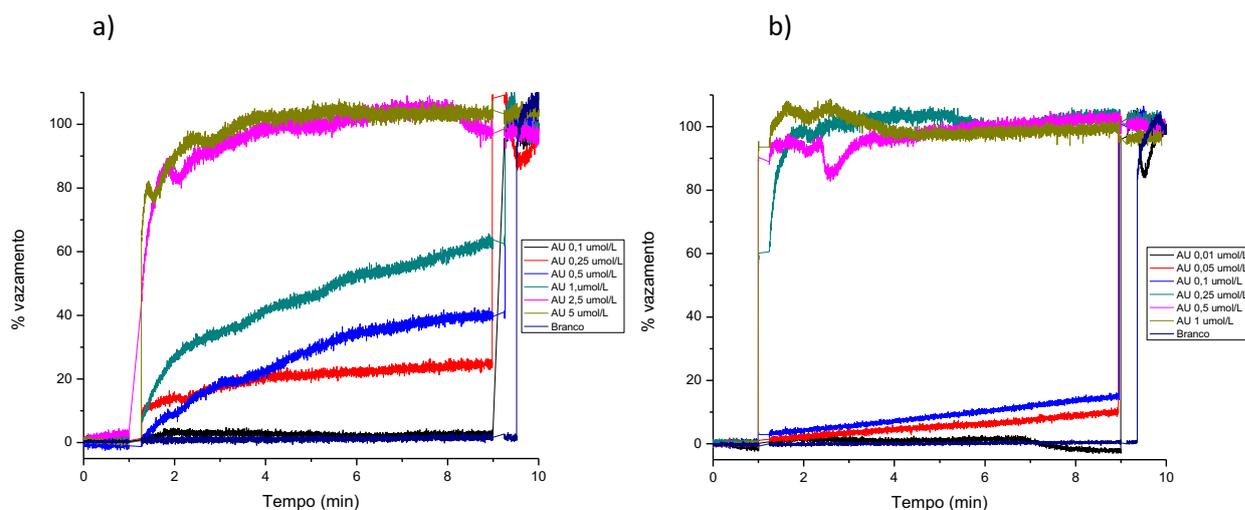
Quando comparadas as duas composições lipídicas, não parece haver diferenças significativas para o peptídeo (AU)<sub>2</sub>K.

#### 4.1.7.4- Vazamento de carboxifluoresceína de LUVs contendo SOPC e SOPG.

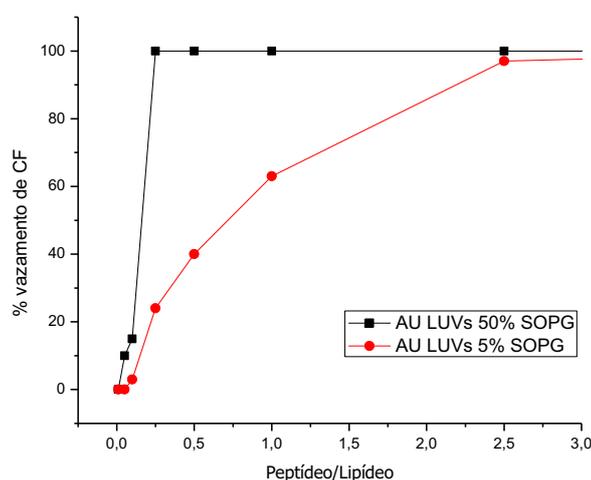
No intuito de obter mais informação relacionada ao efeito da dimerização e da composição lipídica, os peptídeos AU e (AU)<sub>2</sub>K foram avaliados quanto a sua capacidade de permeabilizar LUVs preenchidas com CF.

Na figura 47 pode-se observar a porcentagem e o perfil de vazamento de CF provocado pelo peptídeo AU sobre LUVs compostas de 95/5 e 50/50 SOPC/SOPG. Para ambas as composições lipídicas, o peptídeo se mostrou ativo, porém a dependência da concentração do peptídeo na porcentagem de permeabilização foi notavelmente diferente. No caso das LUVs contendo 5% de SOPG, se observou uma atividade proporcional à concentração do peptídeo (figuras 47 e 48).

**Figura 47** - Porcentagem de vazamento de CF para o peptídeo AU em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



**Figura 48** - Porcentagem de permeabilização em LUVs promovida pelo peptídeo AU em diferentes relações peptídeo/lipídeo. LUVs compostas de 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG.



É interessante destacar que estes resultados são condizentes com aqueles em LUVs com 5% DPPA, onde o peptídeo AU também mostrou uma permeabilização concentração-dependente (figura 32). Mesmo sendo lipídeos diferentes (comprimento e insaturações), SOPG e DPPA conferem à vesícula carga negativa e foram utilizados na mesma proporção.

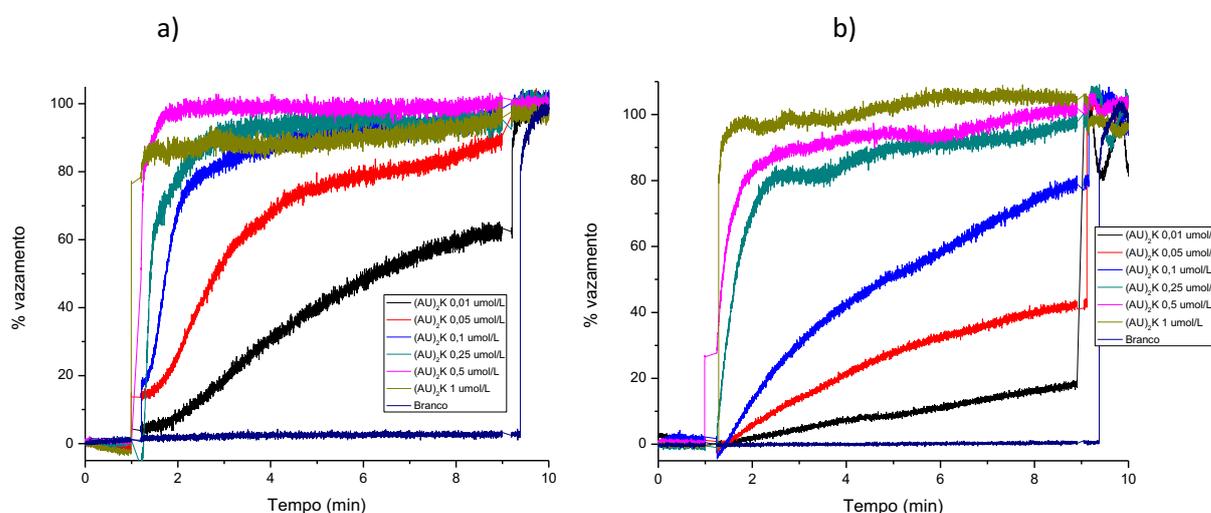
Também é interessante ressaltar que a atividade concentração-dependente nesta composição lipídica, indicou que o peptídeo AU agiria sobre LUVs com 5% de lipídeos negativamente carregados segundo o mecanismo de formação de poros. Assim, este resultado está em concordância com os dados anteriores.

Por outro lado, em LUVs contendo 50/50 de SOPC/SOPG, o peptídeo apresenta uma súbita mudança de permeabilização (de aproximadamente 0-15 até 100%) quando a concentração atinge 0,25  $\mu\text{mol/L}$  (figura 47 e 48). Este comportamento corresponde ao mecanismo “carpet” e também está em concordância com os testes anteriores. Neste modo de ação os peptídeos se acumulam na superfície da bicamada lipídica como um “carpete” e, após atingir a concentração limiar (“threshold concentration”), a membrana plasmática é permeada e desintegrada em um mecanismo semelhante à ação de um detergente. Segundo nossos dados, essa concentração está relacionada à relação peptídeo/lipídeo entre 0,15 a 0,25.

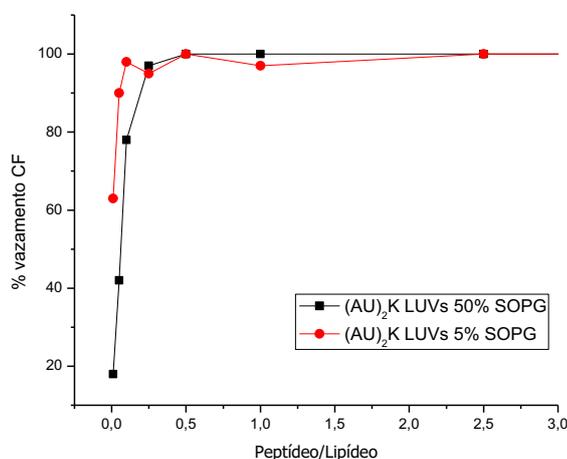
Por sua vez, para a versão dimérica  $(AU)_2K$ , os perfis de permeabilização não mudaram significativamente (figura 49). Diferente do que foi encontrado para o peptídeo AU, para ambas as composições lipídicas a permeabilização teve uma marcada dependência com a concentração, principalmente para LUVs contendo 50/50 SOPC/SOPG (figura 50). Assim, não foi possível encontrar uma concordância clara entre este teste e os anteriores.

Acreditamos que, neste caso podemos ter os dois mecanismos acontecendo ao mesmo tempo. Como mencionado anteriormente, mediante AFM foi proposto que o peptídeo melitina agiria segundo uma combinação dos mecanismos “carpete” e “toroidal pore”. Assim, uma precisa diferenciação entre os mecanismos pode ser difícil (Juhaniwicz e Sek, 2014), e provavelmente depende das condições experimentais utilizadas.

**Figura 49** - Porcentagem de vazamento de CF para o peptídeo  $(AU)_2K$  em LUVs compostas de 95/5 (a) e 50/50 (b) de SOPC/SOPG.



**Figura 50** - Porcentagem de permeabilização de LUVs do peptídeo  $(AU)_2K$  para diferentes relações peptídeo/lípido. LUVs compostas de 95/5 (vermelho) e 50/50 (preto) de SOPC/SOPG.



Quando comparados o monômero e o dímero, vemos que para as LUVs contendo 50/50 de SOPG/SOPC, a dependência da porcentagem de permeabilização com a concentração é completamente diferente, evidenciando que a dimerização estaria mudando o mecanismo de ação. Apesar de, na concentração 0,25  $\mu\text{mol/L}$  ambos atingirem 100% de permeabilização, a brusca mudança (de 0-15% até 100%) encontrada para o monômero corresponderia ao mecanismo “carpet”. Já o dímero, que apresenta um aumento gradual da permeabilização com a concentração, teria um mecanismo relacionado à formação de poros.

#### 4.1.7.5- Mecanismo de ação e as metodologias utilizadas para seu estudo.

Conhecer o mecanismo de ação de uma determinada molécula é sempre um quesito indispensável para fundamentar a sua atividade biológica. O entendimento detalhado do mecanismo de ação também é importante, porque fornece as bases moleculares para o desenho de novas moléculas bioativas. Nesse sentido, muitas metodologias vêm sendo empregadas, porém às

vezes é difícil atingir um acurado conhecimento sobre o mecanismo de ação (Galdiero *et al.*, 2013).

A interação do peptídeo AU com bicamadas lipídicas tem sido objeto de estudo de várias pesquisas nos últimos anos (Ambroggio *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Mccubbin *et al.*, 2011). Segundo estes estudos, que empregaram diferentes técnicas biofísicas, o peptídeo AU agiria por meio do mecanismo “carpete”. Porém, há evidências que diferentes técnicas podem fornecer distintas conclusões a respeito do mecanismo de ação dos PAMs (Shai, 1999). Isto pode ser atribuído ao fato de um mesmo peptídeo poder agir segundo diferentes mecanismos de ação em função, por exemplo, da composição lipídica utilizada no experimento, a concentração do peptídeo e da ordem de adição dos componentes (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Neste trabalho, evidenciamos que o mecanismo de ação do peptídeo AU não pode ser generalizado, já que parece depender tanto da composição do mimético de membrana utilizado, como também do estado de oligomerização (dimerização) do peptídeo.

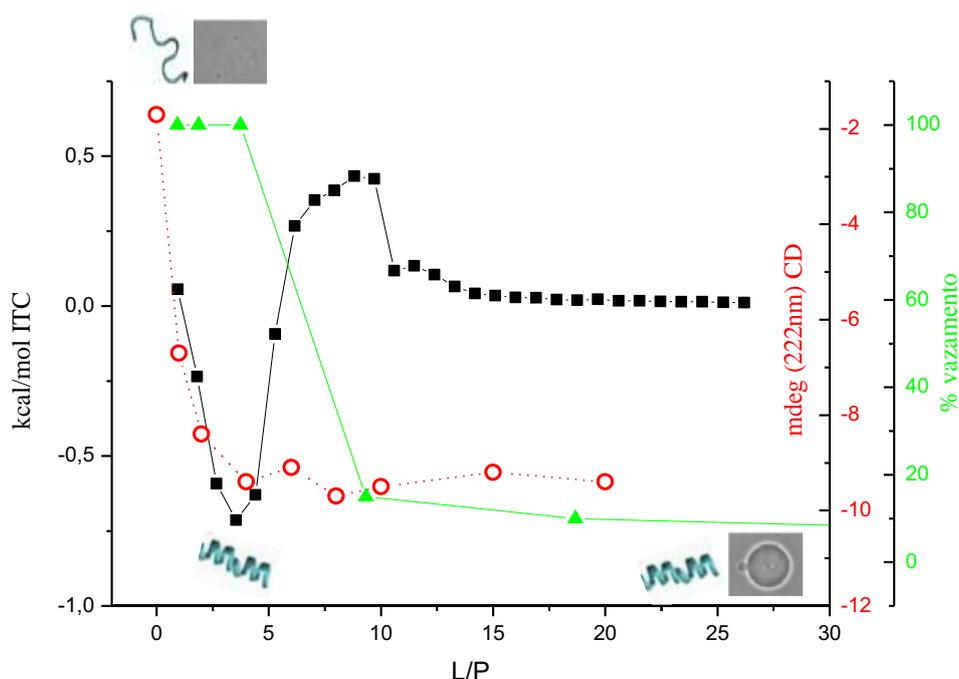
As técnicas de microscopia de contraste e vazamento de CF estão baseadas nos mesmos princípios, porém são diferentes enquanto ao modo de “detecção”. No primeiro caso, os efeitos do peptídeo sobre o mimético de membrana são observados de forma direta, utilizando um microscópio. Já, no segundo caso, a detecção é indireta e utiliza a espectroscopia de fluorescência. Além disso, no teste de microscopia com GUVs, uma vesícula é observada por vez, enquanto que nos experimentos de vazamento de CF, o aumento da intensidade de fluorescência é resultado da contribuição de muitas LUVs. Assim, esta última metodologia, mesmo que de forma indireta, fornece informação mais representativa sobre a interação do peptídeo com as vesículas.

Como mencionado anteriormente, a técnica de CD fornece dados sobre a conformação de peptídeos tanto em solução, como também em presença de miméticos de membrana. Os dados obtidos mediante esta técnica são muito importantes para o entendimento da relação estrutura-função. Mediante esta técnica evidenciamos diferenças significativas na conformação dos peptídeos. Estas diferenças afetam a forma como os peptídeos interagem inicialmente com as membranas e assim, podem ser a causa da mudança no mecanismo de ação.

Finalmente, a técnica de ITC vem sendo cada vez mais usada na investigação termodinâmica da interação entre peptídeos e lipídeos (Russell *et al.*, 2010; Henriksen e Andresen, 2011). Porém, geralmente é difícil atribuir a variação de calor a um determinado processo de interação entre estas duas biomoléculas. Mesmo sem poder correlacionar diretamente com as outras técnicas, os nossos resultados mostraram que tanto a dimerização como a composição lipídica pode afetar o processo de interação.

Como dito anteriormente, algumas das técnicas utilizadas no estudo da interação peptídeo-lipídeo podem fornecer dados que muitas vezes não podem ser relacionados com outras técnicas. Neste trabalho, quatro técnicas foram utilizadas com o objetivo acima mencionado. Mesmo encontrando grandes dificuldades para relacionar os resultados das técnicas utilizadas, vemos que, para o caso específico do peptídeo AU em 50/50 de SOPC/SOPG, os resultados fornecidos pelas diferentes técnicas utilizadas parecem estar relacionados. Na figura 51 vemos que conforme se incrementa a relação L/P, o peptídeo começa a estruturar-se, atingindo um máximo de estruturação na relação L/P igual a 4. É interessante observar que este máximo de estruturação corresponde com o máximo do pico exotérmico determinado por ITC. É interessante destacar também, que a máxima porcentagem de vazamento é atingida com a mesma relação L/P que produz o máximo de estruturação e o máximo do pico exotérmico ( $L/P = 4$ ). Como dito anteriormente, quando se estuda a interação de peptídeos com miméticos de membrana, o sinal obtido de um experimento de ITC pode ser atribuído a uma combinação de eventos. Segundo nossos dados, o sinal exotérmico corresponderia com, pelo menos, os dois processos mais importantes da interação peptídeo-lipídeo: 1) a estruturação de peptídeo e 2) a permeabilização da vesícula.

**Figura 51** - Comparação dos dados de microscopia, vazamento de CF, CD e ITC do peptídeo AU em vesículas com 50/50 de SOPC/SOPG.



#### 4.1.8-Conclusões do bloco do peptídeo Aureina 1.2

Analisando os dados obtidos, fica claro que a dimerização do peptídeo AU reduz a atividade antimicrobiana, mas não a capacidade de permeabilizar miméticos de membrana. Estes fatos estariam relacionados com a interação dos dímeros com componentes da parede celular dos microrganismos. Como confirmado mediante a agregação de células de *C. albicans*, a perda de atividade antifúngica está relacionada diretamente com a interação dos dímeros com mananos. Analogamente, a perda de atividade antibacteriana poderia também estar relacionada à interação dos dímeros com componentes da membrana, como lipopolissacarídeos.

Por outro lado, a estruturação dos dímeros em solução aquosa provocaria uma mudança no mecanismo de ação. Além disso, a composição lipídica dos miméticos de membrana também pode afetar o mecanismo. No caso de vesículas contendo 50/50 de SOPC/SOPG, os experimentos

de microscopia, CD e vazamento de CF mostraram que o peptídeo AU age segundo o mecanismo “carpete”.

## 4.2- Resultados da magainina 2

Propõe-se que o peptídeo MG2 age segundo o mecanismo de formação de poros, mediante a associação de várias moléculas (Kim *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Tamba e Yamazaki, 2009; Santo e Berkowitz, 2012). Este fato tem inspirado o desenho de versões diméricas visando potencializar a atividade antimicrobiana do peptídeo. Para isto, os pesquisadores usaram uma ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína adicionados na extremidade (ou próximo) C-terminal do peptídeo (Mukai *et al.*, 2002; Dempsey *et al.*, 2003).

Como citado anteriormente, diferentes estratégias tem sido utilizadas para a síntese de peptídeos diméricos. Neste trabalho, foram desenhadas, sintetizadas e avaliadas a estrutura e atividade biológica de versões diméricas, tanto C- como N-terminal do peptídeo MG2. Assim, avaliamos o efeito da posição do linker, estudo que, segundo nosso conhecimento, não têm precedentes. Para isto, da mesma forma que para no bloco do peptídeo AU, foram utilizados os aminoácidos lisina e glutamato como ligantes das duas cadeias. Desta forma, diferente dos peptídeos diméricos reportados na bibliografia, as sínteses foram desenvolvidas em uma etapa só, sem a necessidade de adição de resíduos de cisteína e de uma etapa de oxidação.

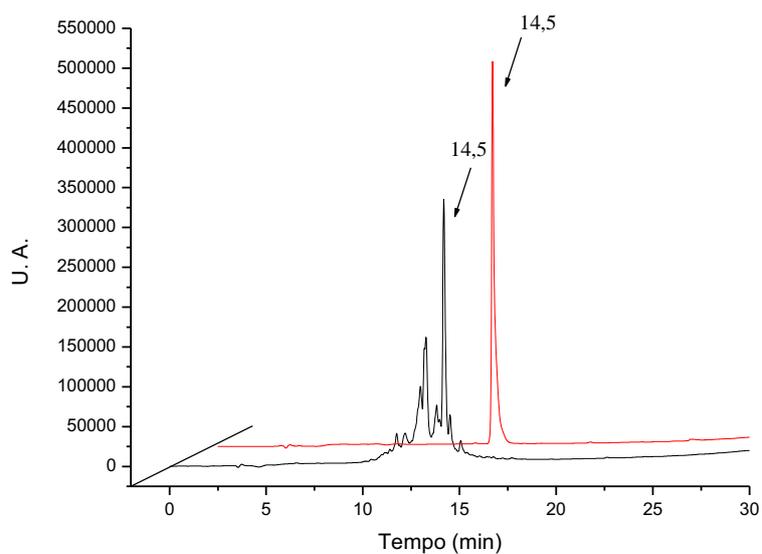
### 4.2.1- Síntese dos peptídeos

A síntese dos três peptídeos correspondentes ao bloco do peptídeo MG2 foi desenvolvida seguindo os protocolos básicos da SPFS. Diferente do bloco do peptídeo AU, desta vez, foi utilizada a resina NovaPEG Rink Amide resin LL de 0,23 mmol/g. A bibliografia reporta que a síntese do peptídeo MG2 é difícil (Bacsa *et al.*, 2008). Considerando isto, o baixo grau de substituição e a boa solvatação da resina NovaPEG poderia minimizar este problema.

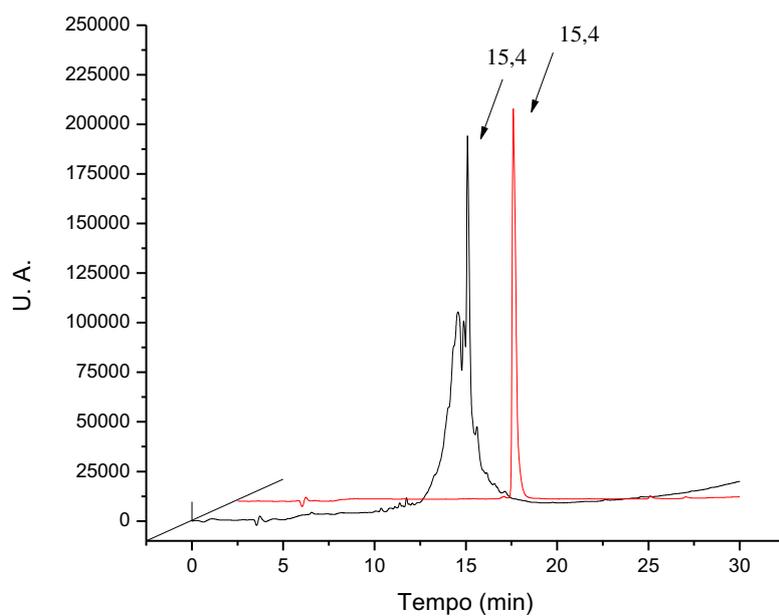
A purificação dos produtos das sínteses foi realizada da mesma forma que a do primeiro bloco de peptídeos. Porém, as condições cromatográficas utilizadas foram ligeiramente diferentes

(tabela 4). Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos e puros podem ser observados nas figuras 52 a 54.

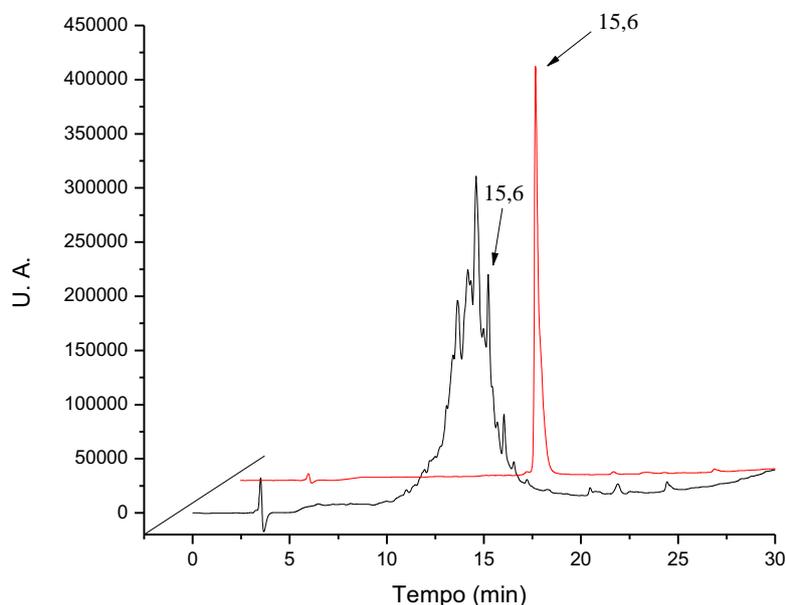
**Figura 52** - Perfis cromatográficos do peptídeo MG2 bruto (preto) e puro (vermelho).



**Figura 53** - Perfis cromatográficos do peptídeo (MG2)<sub>2</sub>K bruto (preto) e puro (vermelho).



**Figura 54** -Perfis cromatográficos do peptídeo E(MG2)<sub>2</sub> (preto) e puro (vermelho).

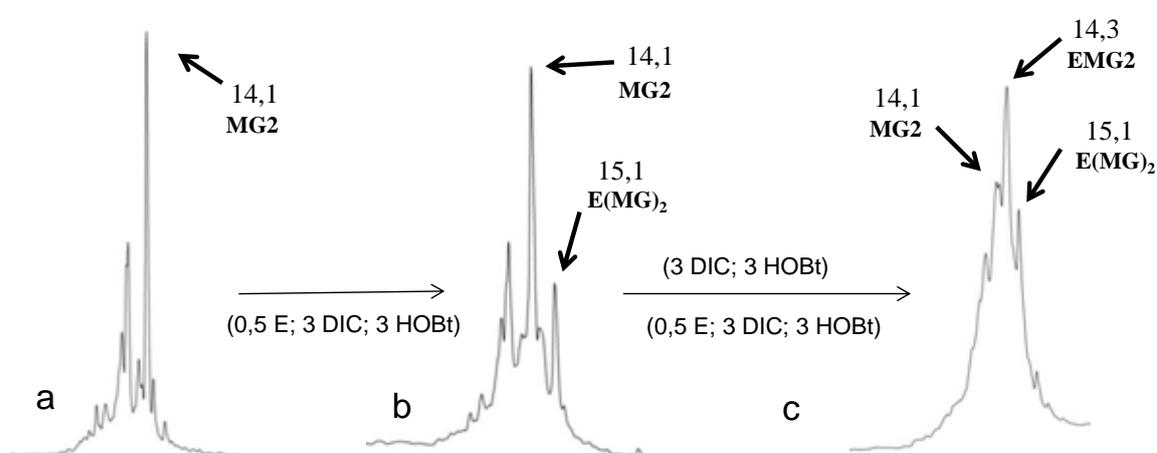


Quando comparados os perfis dos peptídeos brutos, vemos que, como já tinha sido observado na síntese do peptídeo E(AU)<sub>2</sub> a ligação do linker glutamato é uma etapa pouco eficiente, e contribui com vários subprodutos. Mesmo tratando-se de peptídeo e linker diferentes, Biernat *et al.* também reportou dificuldades na dimerização de nonapeptídeos pela extremidade N-terminal com o composto  $\alpha,\omega$ -bis(ácido acético) poli-(etileno glicol) ativado com pentafluorfenol (Biernat *et al.*, 2006).

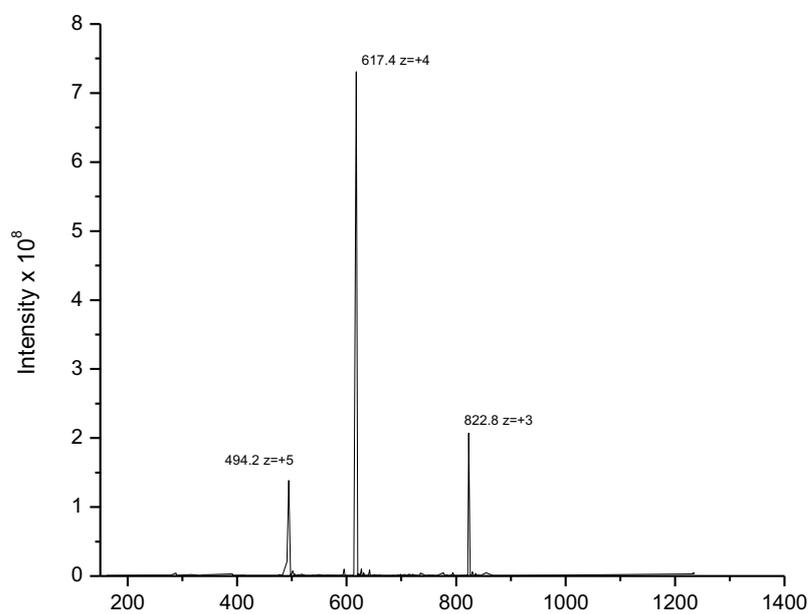
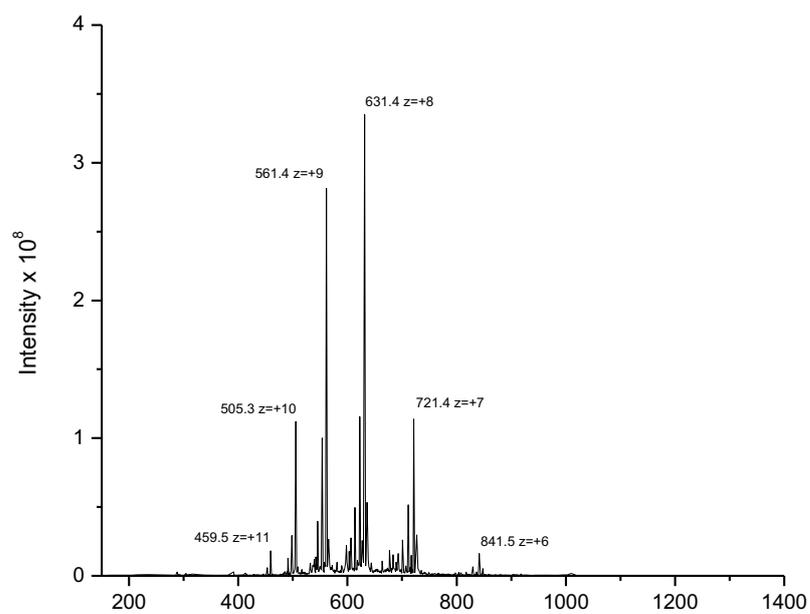
É interessante aclarar que o peptídeo E(MG2)<sub>2</sub> bruto da figura 54 é o produto de três reações a partir do peptídeo MG2 (figura 55a, pico de 14,1 min). Numa primeira etapa, 0,5 equivalentes de ácido glutâmico, em relação ao número de sítios teóricos da resina, foram utilizados, visto que, uma molécula do aminoácido deve ligar duas cadeias peptídicas. O excesso de reagentes acoplantes (DIC/HOBt) foi de 3 equivalentes visando uma maior eficiência das reações de condensação. O resultado pode ser observado na figura 55b, onde o pico de 15,1 min corresponde ao material desejado. Numa segunda etapa, só os reagentes de acoplamento foram utilizados visando ligar aquelas cadeias contendo o resíduo de glutamato com cadeias peptídicas que não o continha. Finalmente, se repetiu a primeira etapa no intuito de aumentar ainda mais a

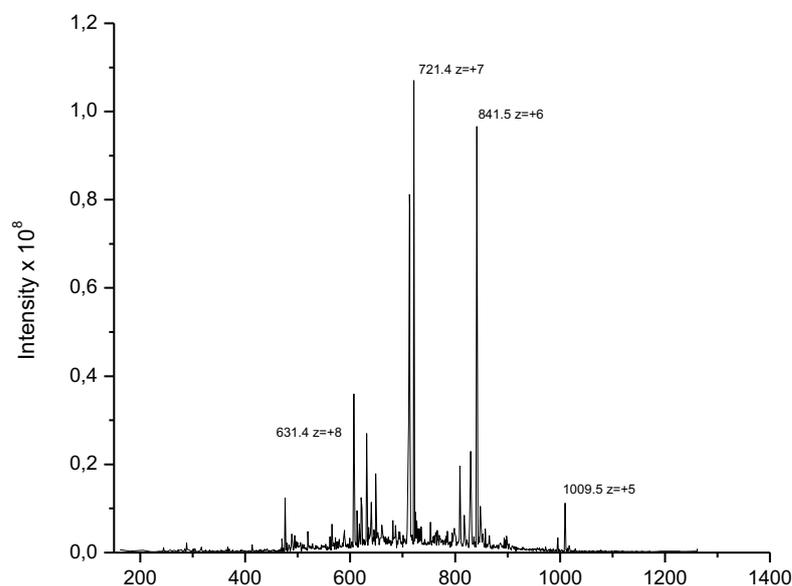
quantidade do material desejado. A figura 55c mostra a diminuição do pico correspondente ao peptídeo MG2 e um aumento no pico correspondente ao peptídeo E-MG2. O produto desta reação foi considerado como material final desde que não houve um aumento significativo do pico de interesse.

**Figura 55** - Cromatogramas correspondentes as diferentes etapas na dimerização do peptídeo MG2 para a obtenção do dímero E(MG2)<sub>2</sub>.



As análises por CLAE das frações puras mostraram que as purificações foram eficientes atingindo, para os três peptídeos, porcentagens de pureza maior que 98%. As amostras puras foram analisadas por espectrometria de massas (EM). Os resultados são mostrados nas figuras 56 a 58, onde fica evidente a obtenção do material desejado. Os valores das massas teóricas e observadas estão apresentados na Tabela 5.

**Figura 56** - Espectro de massas do peptídeo MG2 puro.**Figura 57** - Espectro de massas do peptídeo  $(MG2)_2K$  puro.

**Figura 58** - Espectro de massas do peptídeo E(MG2)<sub>2</sub> puro.**Tabela 5** - Dados das sínteses dos peptídeos MG2, (MG2)<sub>2</sub>K e E(MG2)<sub>2</sub>.

Peptídeo	Rendimento (%)	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (MM) - (g/mol)	
			MMObservada	MMCalculada
MG2	7,1	14,5	2465,6	2466,0
(MG2) <sub>2</sub> K	3,3	15,4	5043,2	5043,0
E(MG2) <sub>2</sub>	1,1	15,6	5043,6	5043,8

Mesmo com baixo rendimento, a SPFS demonstrou ser efetiva na obtenção dos peptídeos desenhados. Além disso, os cromatogramas acima obtidos permitiram evidenciar que a técnica de CLAE foi adequada para a purificação dos peptídeos. Os tempos de retenção evidenciados pelos dados de CLAE mostraram que a dimerização aumenta a hidrofobicidade dos peptídeos diméricos. O dímero N-terminal foi mais hidrofóbico que o (MG2)<sub>2</sub>K, visto que primeiro não possui as cargas positivas na extremidade N-terminal, como ocorre com o peptídeo dimerizado pela extremidade C-terminal. Finalmente, os espectros de massas confirmam a identidade dos peptídeos.

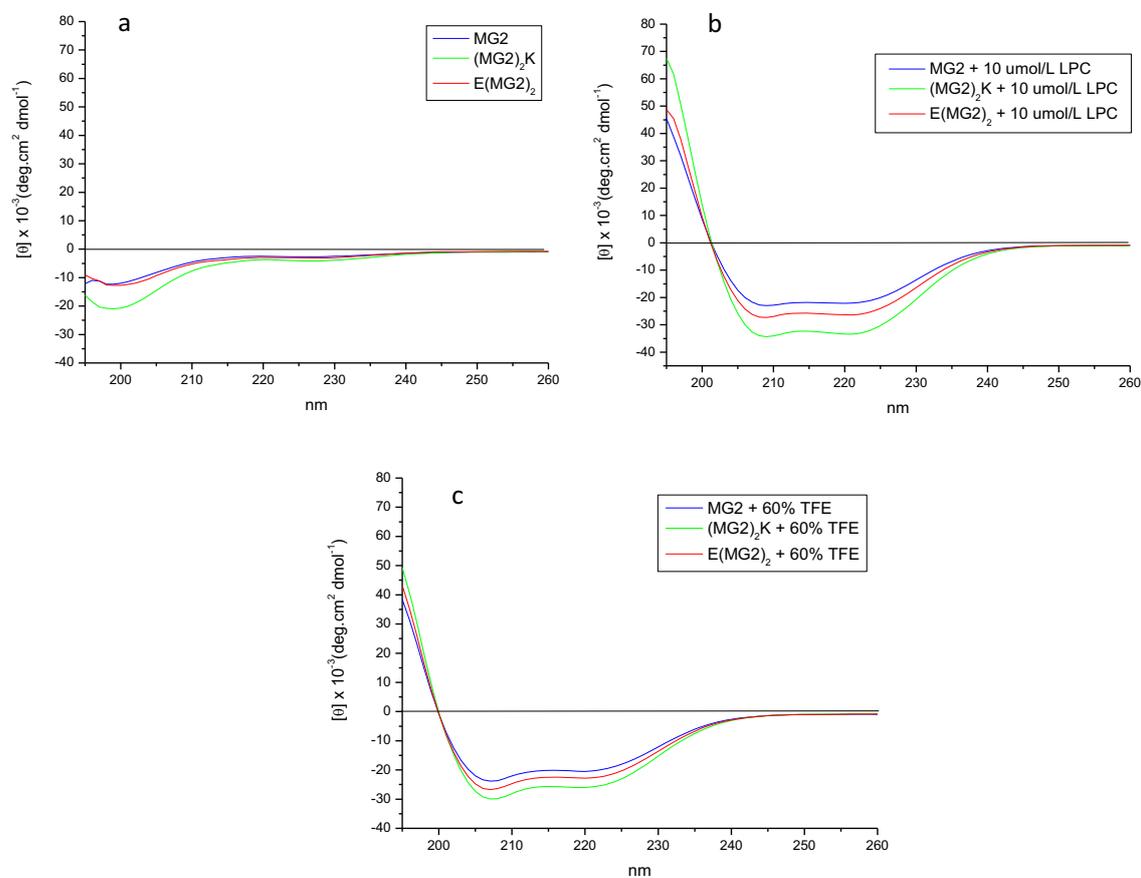
#### 4.2.2- Dicroísmo circular

Da mesma forma e com o mesmo objetivo que no bloco do peptídeo AU, a conformação dos peptídeos MG2 e as duas versões diméricas foi estudada por CD.

O efeito da dimerização na estrutura secundária foi avaliada em PB (pH=7,4); trifluoretanol (TFE) e lisofosfatidilcolina (LPC).

Os resultados, apresentados na figura 59, revelaram que em solução aquosa nenhum dos peptídeos apresenta uma estrutura secundária definida. Já, na presença de TFE ou LPC os três peptídeos adquiriram uma estrutura helicoidal bem definida.

**Figura 59** - Espectros de CD dos peptídeos MG2, (MG2)<sub>2</sub>K e E(MG2)<sub>2</sub> em solução aquosa (a); 10 mmol/L LPC (b) e TFE (c).



Como descrito anteriormente, o peptídeo MG2 é, talvez, um dos PAMs mais estudados. Assim, sua estrutura secundária tem sido determinada previamente por CD, tanto em solução aquosa como também em presença de solventes estruturantes e miméticos de membrana (Wieprecht *et al.*, 1997; Mukai *et al.*, 2002; Dempsey *et al.*, 2003). A estruturação do peptídeo MG2 está em conformidade com a bibliografia citada.

Por sua vez, os dímeros apresentaram o mesmo comportamento conformacional que o monômero, mostrando que a dimerização, tanto C- como também N-terminal, não afeta significativamente a estrutura secundária do peptídeo.

#### 4.2.3- Atividade antimicrobiana

Com os peptídeos caracterizados enquanto a sua identidade, pureza e estrutura secundária; a atividade antimicrobiana foi avaliada. Os resultados podem ser observados na tabela 6. Frente às duas bactérias testadas, a atividade antimicrobiana do dímero N-terminal resultou ser a mesma que a do monômero. Já, a dimerização C-terminal produz uma molécula surpreendentemente mais ativa contra *E. coli* e *S. aureus*, (16 e 8 vezes, respectivamente). Segundo os nossos resultados, a atividade antifúngica dos três peptídeos foi maior que 128  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tabela 6** - Atividade antimicrobiana dos peptídeos MG2, (MG2)<sub>2</sub>K e E(MG2)<sub>2</sub>.

Peptídeo	CIM ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
MG2	16	128	>128
E(MG2) <sub>2</sub>	16	128	>128
(MG2) <sub>2</sub> K	1	16	>128

A diferença de atividade entre os dímeros pode ser entendida se considerarmos que a dimerização C-terminal produz uma molécula dimérica com dois extremos aminos livres,

enquanto que a dimerização N-terminal só um. Assim, é de se esperar que o dímero (MG2)<sub>2</sub>K apresente uma maior interação com as cabeças negativamente carregadas dos fosfolipídeos da membrana bacteriana.

A comparação entre valores de CIM obtidos por diferentes grupos de pesquisa, na maioria das vezes, se vê dificultada devido à utilização de diferentes cepas e diferentes metodologias (quantidade inicial de microrganismo, método de detecção da morte celular, tratamento estatístico dos resultados, etc.). Porém, o peptídeo MG2 tem se mostrado mais ativo frente a *E. coli* do que frente a *S. aureus*, e mais ativo frente a *S. aureus* do que frente a *C. albicans*. Assim, nossos resultados são condicentes com a bibliografia. (Zasloff, 1987; Mukai et al., 2002; Pandey et al., 2011).

Como citado anteriormente, versões diméricas do peptídeo MG2 têm sido previamente estudadas. Comparativamente, na tabela 7 pode ser observado o aumento na atividade antimicrobiana provocado pela dimerização desta sequência. Mesmo sendo moléculas diferentes, as três versões correspondem a moléculas dimerizadas pela região C-terminal.

**Tabela 7** - Comparação da atividade antimicrobiana de diferentes versões diméricas do peptídeo MG2.

Nome	Sequência	Aumento atividade <sup>a</sup>		Referência
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
(MG2) <sub>2</sub> K	H-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNSK-NH <sub>2</sub> H-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	16X	8X	Autor
MG2-CC	H-GIGKFLHSAKKWGKAFVGEIMNSβAC-NH <sub>2</sub> H-GIGKFLHSAKKWGKAFVGEIMNSβAC-NH <sub>2</sub>	2X	2X	Mukai, 2002
(MG2-N22C) <sub>2</sub>	H-GIGKFLHSAKKWGKAFVGEIMCS-NH <sub>2</sub> H-GIGKFLHSAKKWGKAFVGEIMCS-NH <sub>2</sub>	2-4X	ND	Dempsey, 2003

a: comparada com o peptídeo MG2. ND: não determinado

Além de modificações pontuais (F12W, N22C) e a adição de um resíduo de β-alanina (βA) (adicionada para dar flexibilidade e distância entre as cadeias), o dímero (MG2)<sub>2</sub>K difere dos outros dois peptídeos em relação ao “linker” utilizado. Estas variáveis podem ser as

responsáveis pelo diferente aumento na atividade antimicrobiana quando comparados com à versão monomérica.

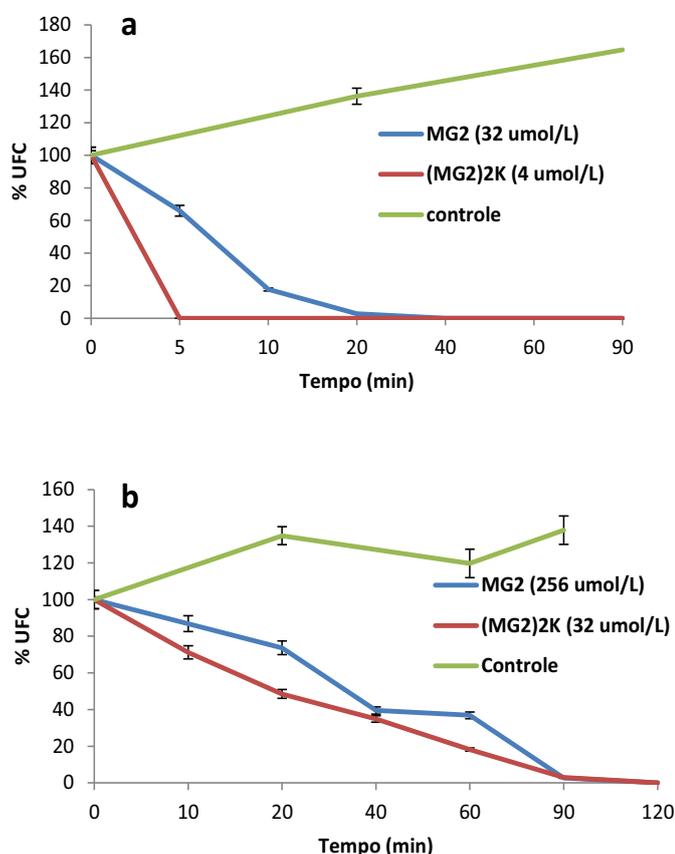
#### 4.2.4- “Time killing”

Em função dos resultados alentadores de atividade biológica, foi estudada a velocidade de ação dos peptídeos, isto é, o tempo necessário para o peptídeo matar as bactérias. Neste estudo, o dobro da CIM foi utilizado para se ter certeza que a concentração de peptídeo seria suficiente para matar as bactérias nos tempos programados no experimento (Burrows *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 60. Contra *E. coli* (figura 60a), o dímero (somente o dímero (MG2)<sub>2</sub>K foi estudado) matou o microrganismo em menos de 5 min, enquanto o tempo necessário para o monômero produzir o mesmo efeito foi de 20 a 40 min. Assim, fica evidente que a dimerização C-terminal do peptídeo MG2 aumenta consideravelmente a velocidade com que o peptídeo age sobre o microrganismo. É necessário esclarecer ainda que, por questões experimentais, o tempo mínimo de medição entre amostras foi de 5 min.

Por outro lado, contra *S. aureus*, o dímero age com a mesma velocidade que o monômero (figura 60b). Se considerarmos a membrana plasmática como alvo destes peptídeos, e que em *S. aureus* existe uma espessa camada de peptídeoglicano e moléculas de ácido lipoteicóico, poderíamos propor que a passagem através destas estruturas é mais demorada para o dímero. Porém, uma vez atingida a membrana plasmática, o dímero agiria mais rapidamente.

**Figura 60** - Cinética de morte celular dos peptídeos MG e (MG2)<sub>2</sub>K contra *E. coli* (a) e *S. aureus* (b).



A atividade de versões diméricas de alguns PAMs também foi reportada previamente, mas as razões do aumento da velocidade de ação não foram explicadas (Hornef *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Zhu e Shin, 2009b). Como descrito anteriormente, muitas pesquisas confirmam que, independentemente do mecanismo de ação, a agregação do peptídeo, antes ou após a interação da membrana, é necessária para a formação de poros. Se considerarmos a oligomerização como a etapa determinante da velocidade de ação, o tempo necessário para aproximar o número de moléculas necessárias para a formação de poros deveria ser menor se elas já estão próximas, devido ao seu estado de dimerização. Essa hipótese pode explicar as diferenças na velocidade de atividade bactericida das versões monoméricas e diméricas.

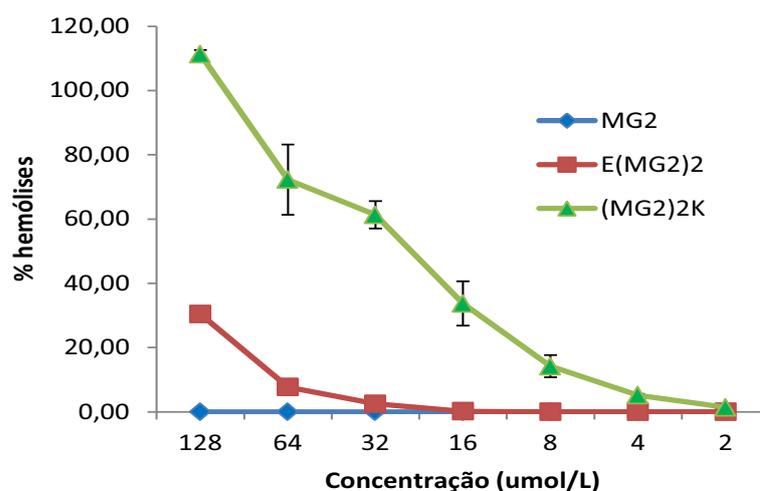
#### 4.2.5- Atividade hemolítica

Da mesma forma que para o bloco do peptídeo AU, o teste de atividade hemolítica foi desenvolvido visando obter uma aproximação da toxicidade dos peptídeos. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 61. O peptídeo MG2 não apresentou atividade hemolítica no intervalo de concentração utilizado. Segundo a bibliografia, este peptídeo não é hemolítico no intervalo de concentrações em que atua em microrganismos (Pandey *et al.*, 2011; Fox *et al.*, 2012).

Enquanto aos dímeros, o peptídeo (MG2)<sub>2</sub>K foi o mais hemolítico, porém somente começa ter atividade significativa acima da CIM. Finalmente, o dímero E(MG2)<sub>2</sub> teve uma atividade intermediária, mostrando atividade intermedia entre o peptídeo MG2 e o (MG2)<sub>2</sub>K, o que demonstra que tanto a dimerização quanto a posição do linker afeta a atividade hemolítica. Mesmo não sendo exatamente as mesmas moléculas, estes resultados são condicentes com o reportado na bibliografia para outras versões diméricas do peptídeo MG2 (Mukai *et al.*, 2002; Dempsey *et al.*, 2003).

Somados aos dados acima, o fato dos dímeros apresentarem atividade hemolítica enquanto o monômero não, indica mais uma vez que a dimerização pode estar alterando o mecanismo de ação dos peptídeos.

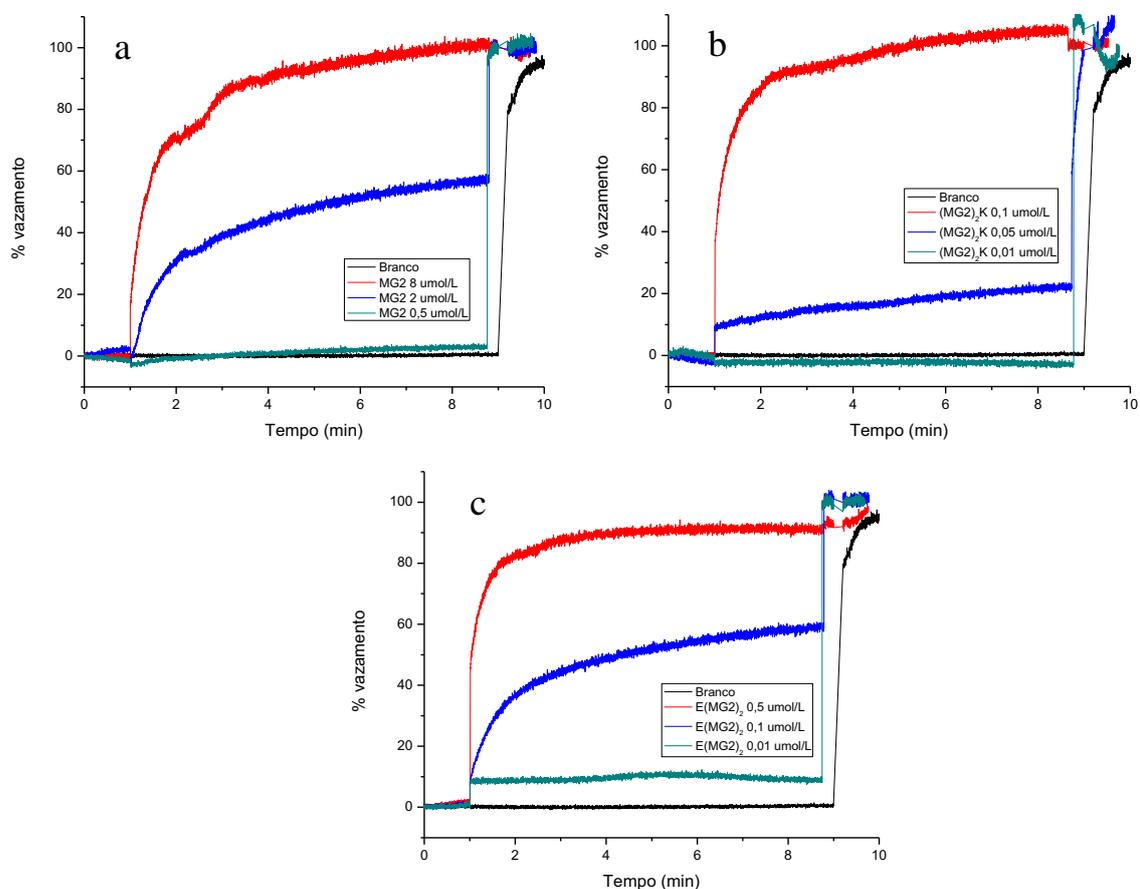
**Figura 61** - Atividade hemolítica dos peptídeos MG2, (MG2)<sub>2</sub>K e E(MG2)<sub>2</sub>.



#### 4.2.6- Vazamento de carboxifluoresceína

Com o objetivo de obter informações a respeito da interação dos peptídeos com miméticos de membrana e correlacioná-los com os resultados de atividade antimicrobiana; LUVs contendo 5% de SOPG e 95% de SOPC foram confeccionadas. O SOPG, como explicado anteriormente, foi escolhido por apresentar carga negativa, mimetizando assim a carga negativa da membrana plasmática das bactérias. Por causa da significativa diferença de capacidade de permeabilização, e visando obter perfis de permeabilização compreendidos entre 0 e 100%, os peptídeos foram avaliados em concentrações diferentes. A figura 62 mostra os perfis de vazamento de CF para diferentes concentrações de peptídeos.

**Figura 62** - Permeabilização de LUVs contendo SOPC/SOPG (5/95) em diferentes concentrações de MG2 (a),  $(MG2)_2K$  (b) e  $E(MG2)_2$  (c).



Como pode ser observado na figura acima, as versões diméricas mostraram maior capacidade de permeabilizar LUVs. A concentração necessária para atingir 100% de vazamento foi de 0,1 e 0,5  $\mu\text{mol/L}$  dos peptídeos  $(\text{MG2})_2\text{K}$  e  $\text{E}(\text{MG2})_2$ , respectivamente. Já, para atingir essa mesma porcentagem de vazamento, foi necessário 8  $\mu\text{mol/L}$  do peptídeo MG2. A diferença de permeabilização entre os peptídeos  $(\text{MG2})_2\text{K}$  e MG2 está relacionada com os dados de atividade antimicrobiana. Esta diferença é muito mais marcada no teste de permeabilização de vesículas, mas temos que considerar, novamente, que componentes da parede celular são importantes no modo de ação de PAMs. Este conceito também explica a maior permeabilização do dímero  $\text{E}(\text{MG2})_2$  de aproximadamente 20 vezes maior que a do monômero, possuindo, no entanto, a mesma atividade antibacteriana tanto para *E. coli* como para *S. aureus*.

Quando comparados entre eles, vemos que o dímero  $(\text{MG2})_2\text{K}$  se apresentou mais ativo do que o  $\text{E}(\text{MG2})_2$  (aproximadamente 5 vezes mais). Esta maior capacidade de permeabilizar membranas está diretamente relacionada com a maior atividade antimicrobiana mostrada pelo peptídeo  $(\text{MG2})_2\text{K}$  (aproximadamente 8 vezes maior). Como explicado acima, a dimerização C-terminal produz uma molécula dimérica com dois extremos aminos livres, enquanto que a dimerização N-terminal só um. Assim, a interação com as cabeças negativamente carregadas dos fosfolipídeos que compõem as LUVs seria maior para o peptídeo  $(\text{MG2})_2\text{K}$ . A importância da região N-terminal para a atividade de PAMs tem sido previamente confirmada pelo nosso grupo de pesquisa (Cilli *et al.*, 2007; Crusca *et al.*, 2011).

#### **4.2.7- Conclusões do bloco do peptídeo Magainina 2**

Os resultados mostraram que a dimerização N-terminal não afetou a atividade biológica do peptídeo MG2. Já, o peptídeo  $(\text{MG2})_2\text{K}$ , obtido mediante a dimerização C-terminal, apresentou uma atividade antimicrobiana 8-16 vezes maior. Estes resultados sugerem que a proximidade das cadeias é um fator importante na atividade biológica deste peptídeo. O fato da dimerização C-terminal deixar dois extremos aminos carregados positivamente, pode contribuir com o aumento da atividade biológica.

Assim, o peptídeo (MG2)<sub>2</sub>K pode ser considerado como potencial antimicrobiano no tratamento de infecções causadas por *E. coli* e *S. aureus*.

O aumento da atividade não estaria relacionado com a estrutura dos peptídeos, desde que a dimerização não mudou significativamente a conformação dos peptídeos nem em solução aquosa nem em presença de solventes estruturantes ou miméticos de membrana.

## 5- CONCLUSÃO

- ✓ De modo geral, os resultados mostraram que a dimerização de PAMs é uma estratégia muito interessante de ser estudada.
- ✓ A dimerização pode, dependendo do caso, alterar a estrutura secundária do peptídeo em solução aquosa.
- ✓ Em função do peptídeo utilizado, a dimerização pode aumentar, diminuir ou não afetar a atividade biológica.
- ✓ A natureza do linker e a posição do mesmo afetam a atividade e devem ser tidos em conta na hora de desenhar peptídeo diméricos.
- ✓ A dimerização parece alterar o mecanismo de ação dos peptídeos, podendo agir de modo diferente do monômero de partida.
- ✓ O conhecimento do efeito da dimerização de PAMs pode contribuir significativamente no desenho de novas moléculas antimicrobianas.

## 6- REFERÊNCIAS

- ABOUDY, Y. et al. Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus types 1 and 2. **Int. J. Pept. Protein Res.**, v. 43, n. 6, p. 573-582, 1994.
- ABRAHAM, T. et al. Isothermal titration calorimetry studies of the binding of the antimicrobial peptide gramicidin S to phospholipid bilayer membranes. **Biochemistry**, v. 44, n. 33, p. 11279-11285, 2005.
- ALBERICIO, F. Editorial: current perspectives in peptide chemistry. I. synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 99-100, 2000.
- AMBROGGIO, E. E. et al. Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. **Biophys. J.**, v. 89, n. 3, p. 1874-1881, 2005.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.
- APPONYI, M. A. et al. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v. 25, n. 6, p. 1035-1054, 2004.
- ARNUSCH, C. J. et al. Enhanced membrane pore formation by multimeric/oligomeric antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 46, n. 46, p. 13437-13442, 2007.
- AVITABILE, C.; D'ANDREA, L. D.; ROMANELLI, A. Circular dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. **Sci. Rep.**, v. 4, 2014. doi:10.1038/srep04293.
- BACSA, B. et al. Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: a critical comparison of microwave and conventional heating technologies. **J. Org. Chem.**, v. 73, n. 19, p. 7532-7542, 2008.
- BALLA, M. S.; BOWIE, J. H.; SEPAROVIC, F. Solid-state NMR study of antimicrobial peptides from Australian frogs in phospholipid membranes. **Eur. Biophys. J.**, v. 33, n. 2, p. 109-116, 2004.
- BATONI, G. et al. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 256-279, 2011.
- BESSALLE, R. et al. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. **FEBS Lett.**, v. 274, n. 1/2, p. 151-155, 1990.
- BIERNAT, M. et al. Amino-terminal dimerization of peptides on the solid support. Synthesis and biological activity of the immunosuppressive HLA-DR fragments linked by poly(ethylene glycol)s. **Bioconjug. Chem.**, v. 17, n. 5, p. 1116-1124, 2006.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BROMLEY, E. H.; CHANNON, K. J. Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 103, p. 231-275, 2011.

BURROWS, L. L. et al. Activity of novel non-amphipathic cationic antimicrobial peptides against *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 899-907, 2006.

CAMERON, A.; ZOYSA, G. H.; SAROJINI, V. Antimicrobial peptides against *Pseudomonas syringae* *pv. actinidiae* and *Erwinia amylovora*: chemical synthesis, secondary structure, efficacy, and mechanistic investigations. **Biopolymers**, v. 102, n. 1, p. 88-96, 2014.

CASTRO, M. S. et al. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.

CÉSPEDES, G. **Sínteses e estudos estrutura/função de um peptídeo extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus* e análogos**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

CHEN, T. et al. The structural organization of aurein precursor cDNAs from the skin secretion of the Australian green and golden bell frog, *Litoria aurea*. **Regul. Pept.**, v. 128, n. 1, p. 75-83, 2005.

CHENG, J. T. et al. Effect of membrane composition on antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian southern bell frogs. **Biophys. J.**, v. 96, n. 2, p. 552-565, 2009.

CILLI, E. M. et al. Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1201-1204, 2007.

CIRAC, A. D. et al. The molecular basis for antimicrobial activity of pore-forming cyclic peptides. **Biophys. J.**, v. 100, n. 10, p. 2422-2431, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100-S24**: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty second informational supplement. Wayne, 2012.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 68, n. 13, p. 2303-2315, 2011.

CRUSCA, E. et al. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs Today**, v. 34, n. 8, p. 691-698, 1998.

- DABUL, A. N.; CAMARGO, I. L. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 142, n. 3, p. 479-483, 2014.
- DAVID, A. P.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. **Antimicrobial peptides**. Weinheim: Wiley, 2012. 270 p.
- DEMPSEY, C. E.; UENO, S.; AVISON, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 402-409, 2003.
- DEWAN, P. C. et al. Antimicrobial action of prototypic amphipathic cationic decapeptides and their branched dimers. **Biochemistry**, v. 48, n. 24, p. 5642-5657, 2009.
- DING, L. et al. Interaction of antimicrobial peptides with lipopolysaccharides. **Biochemistry**, v. 42, n. 42, p. 12251-12259, 2003.
- DOMINGUES, M. M. et al. Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 338-344, 2012.
- DOMINGUES, T. M. et al. Interaction of the antimicrobial peptide gomesin with model membranes: a calorimetric study. **Langmuir**, v. 29, n. 27, p. 8609-8618, 2013.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspect. Medicin. Chem.**, v. 6, p. 25-64, 2014.
- FALCIANI, C. et al. Molecular basis of branched peptides resistance to enzyme proteolysis. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 69, n. 3, p. 216-221, 2007.
- FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.
- FOX, M. A. et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 197-205, 2012.
- GALDIERO, S. et al. Peptide-lipid interactions: experiments and applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 9, p. 18758-18789, 2013.
- GEHMAN, J. D. et al. Effect of antimicrobial peptides from Australian tree frogs on anionic phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 47, n. 33, p. 8557-8565, 2008.
- GIACOMETTI, A. et al. In vitro activity of aurein 1.2 alone and in combination with antibiotics against gram-positive nosocomial cocci. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1494-1496, 2007.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 21, p. 5589-5600, 2001.

GLUKHOV, E. et al. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 33960-33967, 2005.

GOFMAN, Y. et al. Interaction of an antimicrobial peptide with membranes: experiments and simulations with NKCS. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, n. 12, p. 4230-4237, 2010.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GREGORY, S. M.; POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. Magainin 2 revisited: a test of the quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles. **Biophys. J.**, v. 96, n. 1, p. 116-131, 2009.

GÜELL, I. et al. Multivalent display of the antimicrobial peptides BP100 and BP143. **Beilstein J. Org. Chem.**, v. 8, p. 2106-2117, 2012.

HAN, E.; LEE, H. Effects of PEGylation on the binding interaction of magainin 2 and tachyplesin I with lipid bilayer surface. **Langmuir**, v. 29, n. 46, p. 14214-14221, 2013.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.

HANEY, E. F. et al. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1639-1655, 2009.

HE, J.; KRAUSON, A. J.; WIMLEY, W. C. Toward the *de novo* design of antimicrobial peptides: lack of correlation between peptide permeabilization of lipid vesicles and antimicrobial, cytolytic, or cytotoxic activity in living cells. **Biopolymers**, v. 102, n. 1, 2014.  
doi:10.1002/bip.22281.

HE, J. et al. Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1351-1358, 2007.

HENRIKSEN, J. R.; ANDRESEN, T. L. Thermodynamic profiling of peptide membrane interactions by isothermal titration calorimetry: a search for pores and micelles. **Biophys. J.**, v. 101, n. 1, p. 100-109, 2011.

HERASIMENKA, Y. et al. Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1127-1132, 2005.

HERNANDEZ-GORDILLO, V.; GEISLER, I.; CHMIELEWSKI, J. Dimeric unnatural polyproline-rich peptides with enhanced antibacterial activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 2, p. 556-559, 2014.

HORNEF, M. W. et al. Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 8, p. 836-843, 2004.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein Cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152, 2010.

JAMASBI, E. et al. Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2759-2766, 2014.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JUHANIEWICZ, J.; SEK, S. Atomic force microscopy and electrochemical studies of melittin action on lipid bilayers supported on gold electrodes. **Electrochim. Acta**, 2014. In Press.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KAMYSZ, W. et al. Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. **J. Pept. Sci.**, v. 12, n. 8, p. 533-537, 2006.

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. War on terror cells: killing the host that harbours 'superbugs' is an infection control strategy in our fight against infectious diseases. **Pathog. Glob. Health**, v. 108, n. 1, p. 4-10, 2014.

KHRUSHCHEV, A. I. U. et al. Branched antimicrobial peptides. **Bioorg. Khim**, v. 33, n. 6, p. 588-592, 2007.

KIM, C. et al. Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the antimicrobial peptides, magainin-2 and aurein-3.3. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1788, n. 7, p. 1482-1496, 2009.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. Evidence for convergent evolution in the antimicrobial peptide system in anuran amphibians. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 20-25, 2011.

KOSOL, S.; ZANGGER, K. Dynamics and orientation of a cationic antimicrobial peptide in two membrane-mimetic systems. **J. Struct. Biol.**, v. 170, n. 1, p. 172-179, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983.

LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Synthetic multivalent antifungal peptides effective against fungi. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087730.

LEE, J. Y. et al. Salt-resistant homodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. **FEBS J.**, v. 275, n. 15, p. 3911-3920, 2008.

LEE, W.; LEE, D. G. Magainin 2 induces bacterial cell death showing apoptotic properties. **Curr. Microbiol.**, v. 69, n. 6, p. 794-801, 2014.

LEHMANN, J. et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. **Eur. Urol.**, v. 50, n. 1, p. 141-147, 2006.

LEVY, S.; CLOWES, R.; KOENING, E. **Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids**. New York: Plenum Press, 1981.

LI, X. et al. NMR studies of aurein 1.2 analogs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1203-1214, 2006.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012.

LIU, S. et al. Multivalent antimicrobial peptides as therapeutics: design principles and structural diversities. **Int. J. Pept. Prot. Res.**, v. 16, n. 3, p. 199-213, 2010.

LIU, Z. G. et al. Multivalent antimicrobial peptides from a reactive polymer scaffold. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 12, p. 3436-3439, 2006.

LORENZÓN, E. N.; PICCOLI, J. P.; CILLI, E. M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2627-2631, 2014.

LORENZON, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

LORENZON, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1521-1528, 2013.

MÄNTYLÄ, T. et al. Effect of temporin A modifications on its cytotoxicity and antimicrobial activity. **APMIS**, v. 113, n. 7/8, p. 497-505, 2005.

MANZINI, M. C. et al. Peptide: lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1838, n. 7, p. 1985-1999, 2014.

MARCOTTE, I. et al. Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 122, n. 1/2, p. 107-120, 2003.

MARIANAYAGAM, N. J.; SUNDE, M.; MATTHEWS, J. M. The power of two: protein dimerization in biology. **Trends Biochem. Sci.**, v. 29, n. 11, p. 618-625, 2004.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, n. 5, p. 468-472, 2006.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Front. Microbiol.**, v. 3, 2012. doi:10.3389/fmicb.2012.00001.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Ups. J. Med. Sci.**, v. 119, n. 2, p. 68-77, 2014.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **BBA: Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

MATSUZAKI, K. et al. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11361-11368, 1996.

MAUPETIT, J.; DERREUMAUX, P.; TUFFERY, P. PEP-FOLD: an online resource for *de novo* peptide structure prediction. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 498-503, 2009.

McCUBBIN, G. A. et al. QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides. **Eur. Biophys. J.**, v. 40, n. 4, p. 437-446, 2011.

MECHLER, A. et al. Specific and selective peptide-membrane interactions revealed using quartz crystal microbalance. **Biophys. J.**, v. 93, n. 11, p. 3907-3916, 2007.

MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 3, p. 245-250, 2009.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MISHRA, B.; WANG, G. Ab initio design of potent anti-MRSA peptides based on database filtering technology. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 134, n. 30, p. 12426-12429, 2012.

MUKAI, Y. et al. Parallel and antiparallel dimers of magainin 2: their interaction with phospholipid membrane and antibacterial activity. **J. Pept. Sci.**, v. 8, n. 10, p. 570-577, 2002.

NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NGUYEN, K. T. et al. Molecular interactions between magainin 2 and model membranes in situ. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, n. 36, p. 12358-12363, 2009.

ONUMA, Y. et al. Identification of putative palytoxin as the cause of cluetoicism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

- PANDEY, B. K. et al. Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. **Biochem. J.**, v. 436, n. 3, p. 609-620, 2011.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **Plos Pathog.**, v. 6, n. 10, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1001067.
- PINI, A. et al. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 7, p. 2665-2672, 2005.
- POLOZOV, I. V.; GAWRISCH, K. Domains in binary SOPC/POPE lipid mixtures studied by pulsed field gradient 1H MAS NMR. **Biophys. J.**, v. 87, n. 3, p. 1741-1751, 2004.
- POMPILIO, A. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. **Peptides**, v. 32, n. 9, p. 1807-1814, 2011.
- RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 799-804, 2002.
- RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6/7, p. 293-297, 2013.
- ROSCIA, G. et al. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 641-649, 2013.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.
- ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v. 5, n. 5, p. 494-496, 1970.
- ROZEK, T. et al. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* - the solution structure of aurein 1.2. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5330-5341, 2000.
- RUSSELL, A. L. et al. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chem. Phys. Lipids**, v. 163, n. 6, p. 488-497, 2010.
- SAL-MAN, N.; OREN, Z.; SHAI, Y. Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells. **Biochemistry**, v. 41, n. 39, p. 11921-11930, 2002.

SANTO, K. P.; BERKOWITZ, M. L. Difference between magainin-2 and melittin assemblies in phosphatidylcholine bilayers: results from coarse-grained simulations. **J. Phys. Chem. B**, v. 116, n. 9, p. 3021-3030, 2012.

SEELIG, J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1666, n. 1/2, p. 40-50, 2004.

SENGUPTA, D. et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **BBA: Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2308-2317, 2008.

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SETO, G. W. et al. Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, n. 11, p. 2787-2800, 2007.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, n. 1/2, p. 55-70, 1999.

SHLAES, D. M. et al. The FDA reboot of antibiotic development. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 10, p. 4605-4607, 2013.

TAMBA, Y.; YAMAZAKI, M. Magainin 2-induced pore formation in the lipid membranes depends on its concentration in the membrane interface. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, n. 14, p. 4846-4852, 2009.

TAMBA, Y. et al. Kinetic pathway of antimicrobial peptide magainin 2-induced pore formation in lipid membranes. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, n. 37, p. 12018-12026, 2010.

TAYLOR, K. et al. Covalent dimer species of beta-defensin Defr1 display potent antimicrobial activity against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 5, p. 1719-1724, 2007.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TSAI, P. W. et al. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011.  
doi:10.1371/journal.pone.0017755.

UNGER, T.; OREN, Z.; SHAI, Y. The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action. **Biochemistry**, v. 40, n. 21, p. 6388-6397, 2001.

van den BOGAART, G. et al. The lipid dependence of melittin action investigated by dual-color fluorescence burst analysis. **Biophys. J.**, v. 93, n. 1, p. 154-163, 2007.

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

WALDE, P. et al. Giant vesicles: preparations and applications. **ChemBioChem**, v. 11, n. 7, p. 848-865, 2010.

WANG, G. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 728-758, 2013.

WANG, G.; LI, Y.; LI, X. Correlation of three-dimensional structures with the antibacterial activity of a group of peptides designed based on a nontoxic bacterial membrane anchor. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 7, p. 5803-5811, 2005.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde, 2004.

WELLING, M. M. et al. Histatin-derived monomeric and dimeric synthetic peptides show strong bactericidal activity towards multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 9, p. 3416-3419, 2007.

WENZEL, M. et al. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 111, n. 14, p. 1409-1418, 2014.

WESOŁOWSKA, O. et al. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. **Acta Biochim. Pol.**, v. 56, n. 1, p. 33-39, 2009.

WESTERHOFF, H. V. et al. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. **Eur. J. Biochem.**, v. 228, n. 2, p. 257-264, 1995.

WIEPRECHT, T.; BEYERMANN, M.; SEELIG, J. Thermodynamics of the coil-alpha-helix transition of amphipathic peptides in a membrane environment: the role of vesicle curvature. **Biophys. Chem.**, v. 96, n. 2/3, p. 191-201, 2002.

WIEPRECHT, T. et al. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochemistry**, v. 36, n. 20, p. 6124-6132, 1997.

WIMLEY, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. **ACS Chem. Biol.**, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2010.

WON, H. S. et al. Activity optimization of an undecapeptide analogue derived from a frog-skin antimicrobial peptide. **Mol. Cells**, v. 31, n. 1, p. 49-54, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** Geneva, 2014. 256 p.

XIE, J. et al. Antimicrobial activities and membrane-active mechanism of CPF-C1 against multidrug-resistant bacteria, a novel antimicrobial peptide derived from skin secretions of the tetraploid frog *Xenopus clivii*. **J. Pept. Sci.**, v. 20, n. 11, p. 876-884, 2014.

YANG, S. T.; KIM, J. I.; SHIN, S. Y. Effect of dimerization of a beta-turn antimicrobial peptide, PST13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. **Biotechnol. Lett.**, v. 31, n. 2, p. 233-237, 2009.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987.

ZASLOFF, M.; MARTIN, B.; CHEN, H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 3, p. 910-913, 1988.

ZHANG, M.; ZHAO, J.; ZHENG, J. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. **Soft Matter**, v. 10, n. 38, p. 7425-7451, 2014.

ZHU, W. L.; SHIN, S. Y. Antimicrobial and cytolytic activities and plausible mode of bactericidal action of the cell penetrating peptide penetratin and its lys-linked two-stranded peptide. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 73, n. 2, p. 209-215, 2009a.

ZHU, W. L.; SHIN, S. Y. Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal action. **J. Pept. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 345-352, 2009b.