

**Universidade de São Paulo**

**Instituto de Química**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

Mariana Canale Manzini

**Efeito da Carga dos Lipídios na  
Interação do BP100 em Modelos de  
Membrana**

**Versão original da Dissertação defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**31/10/2011**

Mariana Canale Manzini

**Efeito da Carga dos Lipídios na  
Interação do BP100 em Modelos de  
Membrana**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Iolanda Midea Cuccovia*

São Paulo  
2011



Aos que mais amo, minha mãe Maria, meu pai Pedro,  
minha avó Rosa, meu namorado Bruno e minha ex-cachorrinha Mili.

## AGRADECIMENTOS

À **Profª Dra. Iolanda Midea Cuccovia**, pela orientação, confiança e amizade. Obrigada por sempre me incentivar a continuar. E também por me permitir conhecer e trabalhar com pessoas incríveis. Obrigada pela paciência.

À **Profª Dra. Katia Regina Perez Daghasanli**, por me orientar, por sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas e por me ensinar tudo muito direitinho! Por me ajudar na UNIFESP, pelas caronas e cafezinhos!

Ao **Profº Dr Hernan Chaimovich**, pelo laboratório, leitura de relatórios e conselhos.

À **Profª Dra Karin do Amaral Riske**, por ter permitido a utilização do Laboratório de Membranas na UNIFESP, pela colaboração, disponibilidade e atenção. Pelas discussões, propostas e grande ajuda.

Ao **Profº Dr. Antonio de Miranda**, pela grande ajuda, idéias e por ter permitido o uso do aparelho de dicroísmo circular.

Marcelo Bemquerer e Magali Rodrigues pela síntese do BP100.

Aos meus amigos de laboratório Bianca, Catarina, Deborah, Gustavo, Filipe, Louise, Marcos, Vanessa e a técnica Márcia, que me acompanharam e me divertiram durante meus dias de mestrado.

Às minhas amigas, com as quais cursei as disciplinas da pós-graduação, Cecília, Gabriela e Mariana que se tornaram grandes companheiras.

À Tatiana da UNIFESP por ter me acompanhado e me ensinado a técnica do dicroísmo circular.

Aos meus pais, minha avó e meu namorado, que sempre me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos. Pela alegria, conforto, confiança, carinho e por se dedicarem tanto a mim.

Ao **CNPQ**, pela bolsa concedida para meu mestrado.

À **FAPESP e ao INCT-Cx** (Instituto Nacional de Ciência e tecnologia de Fluidos Complexos), pelo financiamento do laboratório.

Ao **Laboratório de Sistemas Biomiméticos**, por oferecer as condições necessárias para execução deste trabalho.

“A felicidade não é a ausência de conflitos, é a habilidade para lidar com eles.”

## RESUMO

Manzini, M. C. **Efeito da Carga dos Lipídios na Interação do BP100 em Modelos de Membrana**, 2011, 135 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Uma futura e promissora alternativa às terapias antimicrobianas já conhecidas é o uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs, compostos de menos de 80 aminoácidos, apresentam caráter anfipático o que lhes dá a capacidade de agir em membranas lipídicas. Podem formar poros na membrana causando morte da célula. Seu espectro de ação é variado, sendo seus alvos bactérias, fungos, protozoários e até células de mamíferos.

Os AMPs são encontrados em todos os seres vivos, desde bactérias até mamíferos, apresentam diferentes estruturas, composição de aminoácidos e agem por diversos mecanismos. Dois peptídeos antimicrobianos têm sido estudados por sua grande eficiência: a Cecropina A, peptídeo não hemolítico e que sofre degradação por proteases, e a Melitina, de grande potencial antimicrobiano, mas que causa hemólise.

Para se obter uma melhor ação terapêutica foram sintetizados híbridos desses dois peptídeos, dentre eles, o BP100, cuja sequência é KKLFFKKILKYL-NH<sub>2</sub>. O BP100, além de atuar sobre a membrana de bactérias causando a sua morte, é pouco hemolítico e possui alta seletividade por membranas carregadas negativamente, que é característica das membranas bacterianas.

Estudamos a interação do BP100 com vesículas unilamelares grandes, LUVs, preparadas com misturas de fosfatidilcolina de ovo (PC) e fosfatidilglicerol (PG) utilizando técnicas de fluorescência, dicróismo circular, mobilidade eletroforética,



espalhamento de luz dinâmico e microscopia óptica (neste caso utilizando-se vesículas gigantes, GUVs).

Nossos resultados mostraram que o BP100 permeabiliza LUVs preparadas com diferentes misturas de PC:PG, mesmo em alta força iônica. A presença de carga negativa nas LUVs aumenta significativamente a atividade do peptídeo enquanto o colesterol diminui a sua atividade.

Em meio aquoso o BP100 apresentou uma estrutura ao acaso. Na presença de vesículas de PC sua estrutura não apresentou alteração e em vesículas de PC:PG, observou-se estrutura típica de alfa-hélice.

Mostrou-se também que as LUVs de PC não se agregam na presença de BP100, mas o peptídeo altera a sua mobilidade eletroforética. Nas LUVs contendo PG, entretanto, observou-se agregação e alteração da mobilidade eletroforética, confirmando a forte ligação do BP100 a essas vesículas.

A observação direta da ação do BP100 sobre as GUVs preparadas com PC e PC:PG, mostrou que o peptídeo forma agregados na superfície da membrana e diminui o diâmetro das GUVs. Observou-se agregação de vesículas, formação de brotos na superfície das vesículas e, posteriormente, rompimento das mesmas com o vazamento de todo conteúdo interno.

O conjunto dos dados obtidos é sugestivo de que o BP100 atua formando estruturas similares a poros na membrana das vesículas, através dos quais o conteúdo interno extravasa. A formação de estrutura em  $\alpha$ -hélice do BP100 em LUVs contendo PG que deve favorecer estruturação do poro.

**Palavra-chave:** BP100, peptídeo antimicrobiano, membranas, LUVs, GUVs.

## ABSTRACT

Manzini, M. C. **Charge Effect of Lipids in Interaction of BP100 and Model Membranes**, 2011, 143 p. Master Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been a promising alternative therapy to antibiotics. These molecules, consisting of less than 80 amino acids, with different structures and amino acids composition, have amphipathic character which gives them the ability to act on lipid bilayers. They act, by different mechanisms, over bacteria to mammal cells.

The AMPs are found in all kinds of living creatures, bacteria, plants, insects and mammals. Two important antimicrobial peptides have been studied because of their high efficiency: the Cecropin A, a non-hemolytic peptide which undergoes degradation by proteases, and Melittin, which has high antimicrobial potential but with hemolytic activity.

In order to obtain peptides with better therapeutic action, hybrids peptides of Cecropin and Mellitin were synthesized. One of them, BP100, which has the sequence KKLFFKILKYL-NH<sub>2</sub>, is a target of several studies because it acts on bacteria's membrane causing it's death, but do not cause hemolysis and has a high selectivity for negatively charged membranes, characteristic of bacterial membranes.

Here we study the properties of BP100 and its interaction with large unilamellar vesicles, LUVs, prepared with egg phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG) by extrusion. Fluorescence techniques, circular dichroism, CD, electrophoretic mobility, dynamic light scattering and optical microscopy with

giant vesicles (GUVs) were used in order to obtain informations about its action mechanisms.

Our results showed that BP100 is able to cause leakage of vesicles prepared with different mixtures of PC:PG, even at high ionic strength. The increase in negative charge of the vesicles significantly raises the activity of the peptide whereas the presence of cholesterol decreases its activity.

The secondary structure of BP100 was studied by CD technique in water and a random coil structure was observed. In the presence of PC vesicles, BP100 did not change its structure. However, it acquires a typical alpha-helix structure in the presence of negative vesicles of PC:PG.

Analysis of hydrodynamic diameter of LUVs in the presence of BP100 showed that BP100 didn't cause significant change in PC vesicles diameter but, with anionic vesicles at low ionic strength, large aggregates are formed. BP100 also changed the electrophoretic mobility of both LUVs containing only PC and mixtures of PC:PG, confirming the binding of BP100 at all membranes.

The data set obtained is suggestive that BP100 acts binding to the vesicle membrane forming pores through which the internal contents overflows. The negative surface of the vesicle induces BP100 to acquire an  $\alpha$ -helix conformation which favors the formation of a pore structure.

BP100 also form aggregates at the membrane surface of giant lipid vesicles (GUVs) and reduce its diameter. Aggregation of vesicles, formation of buds on the vesicle's surface and finally the rupture and leakage of internal contents was also observed in GUVs of PC and PC:PG.

**Keywords:** BP100, membranes, LUVs, GUVs.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	14
1.3	Peptídeos antimicrobianos, contexto histórico.....	14
1.4	Propriedade química dos AMPs.....	17
1.5	Modo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	19
1.6	Composição das membranas .....	22
1.7	Aplicação dos AMP .....	24
1.8	A Melitina .....	24
1.9	Cecropina A .....	28
1.10	O peptídeo BP100 .....	30
1.11	Descrição de algumas moléculas utilizadas .....	32
2.	OBJETIVOS .....	35
2.1	Objetivo Geral:.....	35
2.2	Objetivos Específicos:.....	35
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.1	Material .....	36
3.1.4	Aparelhos .....	37
3.2	Métodos .....	38
3.2.4	Dosagem de Fosfato inorgânico .....	38
3.2.5	Dosagem do Colesterol .....	38
3.2.6	Purificação da Carboxifluoresceína .....	39
3.2.7	Determinação da concentração da solução de BP100.....	39
3.2.8	Síntese do Peptídeo BP100 .....	39
3.2.9	Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs) .....	41
3.2.10	Fluorescência .....	43
3.2.11	Supressão de Fluorescência .....	44
3.2.12	Preparação de LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína .....	45
3.2.13	Cinética de Vazamento das LUVs com Carboxifluoresceína.....	46
3.2.14	Estudo da supressão de fluorescência de Pireno Tetrasulfonato de Sódio (PTS) por Metilviologênio (MV) .....	47
3.2.15	Preparação de LUVs com Pireno Tetrasulfonato de Sódio (PTS) .....	51
3.2.16	Cinética de vazamento de LUV contendo PTS em presença de Metilviologênio.....	51
3.2.17	Determinação da Mobilidade Eletroforética e Potencial Zeta .....	52
3.2.18	Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico .....	54
3.2.19	Preparação das LUVs para os experimentos de diâmetro hidrodinâmico e mobilidade eletroforética .....	55
3.2.20	Dicroísmo Circular .....	56
3.2.21	Preparação das amostras para o Dicroísmo Circular, CD: .....	59
3.2.22	Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	60
3.2.23	Microscopia Óptica .....	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1	Estudo da cinética de vazamento de LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína (CF) .....	64
4.1.4	Estudo do efeito de BP100 em LUVs de PC 100%. .....	64
4.1.5	Cinéticas de vazamento de CF de LUVs de PC:PG 9:1 com BP100. ....	67
4.1.6	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 8:2 com BP100. ....	68

4.1.7	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 7:3 com BP100. ....	70
4.1.8	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 6:4 com BP100. ....	71
4.1.9	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 1:1 com BP100. ....	73
4.1.10	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 4:6 com BP100. ....	74
4.1.11	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 3:7 com BP100. ....	75
4.1.12	Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 1:9 com BP100. ....	77
4.1.13	Cinéticas de vazamento de CF de PG 100% com BP100. ....	78
4.2	Efeito de BP100 na Cinética de Vazamento de CF de LUVs contendo Colesterol .....	80
4.2.4	LUVs de PC:Colesterol 63:37 .....	80
4.2.5	Cinética de LUVs de PG:colesterol 64:36 com BP100 .....	82
4.3	Estudo do Vazamento de Vesículas Contendo Pireno-tetrasulfonato de sódio (PTS) com a Adição de BP100 a Baixa Força Iônica. ....	86
4.3.4	Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC 100% com BP100. ....	87
4.3.5	Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 7:3 com BP100. ....	89
4.3.6	Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 1:1 com BP100. ....	90
4.3.7	Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 7:3 com BP100. ....	92
4.3.8	Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PG 100% com BP100. ....	93
4.4	Resultados dos Estudos de Dicroísmo Circular .....	97
4.4.4	Dicroísmo Circular do BP100 em água.....	97
4.4.5	Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs de PC 100% .	98
4.4.6	Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs LUVs de PC:PG 9:1 .....	99
4.4.7	Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs de PC:PG 7:3 100	
4.4.8	Estudo de CD de BP100 em água com LUVs de PC:PG 1:1 .....	103
4.5	Estudos de Mobilidade Eletroforética das LUVs com BP100.....	105
4.6	Estudo do efeito de BP100 no Diâmetro Hidrodinâmico das Vesículas.....	110
4.7	Microscopia Óptica de GUVs em presença do BP100.....	112
5.	CONCLUSÕES .....	124
6.	BIBLIOGRAFIA.....	125
	SÚMULA CURRICULAR .....	134

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.3 Peptídeos antimicrobianos, contexto histórico.

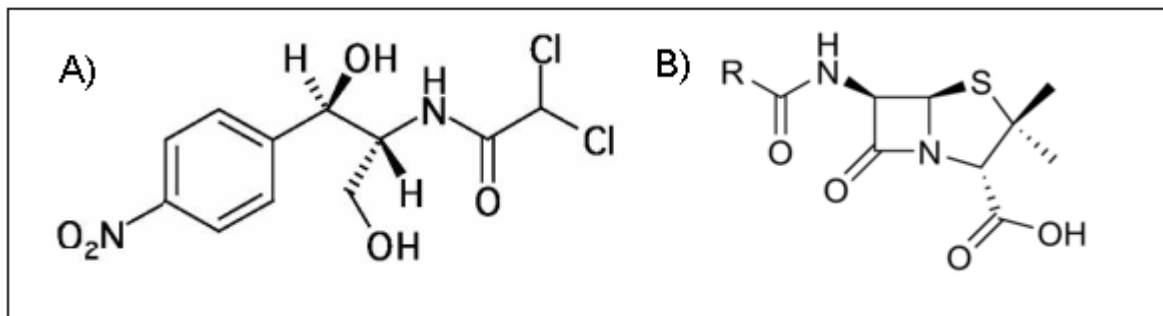
O primeiro relato do controle de crescimento de bactérias isoladas em culturas foi em torno de 1870 por Pasteur, Joubert e Koch (Korolkovas e Burckhalter, 1982). Esse foi um marco na história, possibilitando desenvolvimento e descoberta de técnicas para o controle de infecções.

Em 1928 a descoberta da Penicilina (Figura 1B) por Alexander Fleming causou uma revolução na medicina. A molécula promissora foi isolada do *Penicillium notatum* e foi amplamente utilizada na 2ª Guerra Mundial, época em que também foi desenvolvida a benzilpenicilina. A partir deste momento, muitas moléculas foram isoladas e desenvolvidas com grande potencial para matar bactérias (Korolkovas e Burckhalter, 1982).

Na década de 30 foi descoberto o potencial antibiótico da sulfonamida. Já na década de 40, foram isoladas a actinomicina (1940), estreptotricina (1942), estreptomicina (1943) e a neomicina (1949). Com o desenvolvimento de novas técnicas de síntese, e pesquisas ampliando-se em diversos países, nesta mesma época surgiram a bacitracina, o cloranfenicol (Figura 1A), a clortetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina, anfomicina, oleandomicina, espiramicina, vancomicina, canamicina, paronamicina e as rifampicinas.

Devido ao “boom” de descobertas, as décadas de 40 a 60 foram chamadas de “época de ouro da descoberta dos antibióticos”. Logo após, as descobertas continuaram, porém em menor intensidade (Korolkovas, Burckhalter, 1982).

O uso incorreto de antibióticos, tratamento incompleto de infecções e o consumo inapropriado e excessivo, muitas vezes sem orientação médica e sem identificação prévia dos agentes patogênicos através de exames laboratoriais, colaboraram para o surgimento de bactérias resistentes a essas moléculas antimicrobianas apesar do grande número de antibióticos de última geração existentes (Daffre *et al.*, 2001).



**Figura 1. A-Estrutura da molécula de Cloranfenicol. B- Estrutura da Penicilina.**

Entre os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos microorganismos estão: a presença de enzimas que degradam os antibióticos tais como a  $\beta$ -lactamase, existente principalmente em estafilococcus, que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina e cefalosporinas; a enzima cloranfenicol-acetiltransferase, encontrada em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, que inativa o cloranfenicol. Outros mecanismos, já bastante estudados, são a fosforilação, adenilação ou acetilação de antibióticos aminoglicosídeos. Variações na proteína da subunidade 30S do ribossomo de bactérias, que diminuem a ligação dos antibióticos aminoglicosídeos, mutações na subunidade 50S do ribossomo, responsável pela resistência a eritromicina e diminuição de ligação por fluorquinolonas e alterações da RNA-polimerase, que causam diminuição na ação da rifampicina, são exemplos de

mutações em microorganismos que os tornam resistentes aos fármacos conhecidos (Rang *et al.*, 2004, Tenover, 2006).

Outros mecanismos envolvem as porinas, proteínas que funcionam como bombas de efluxo do antibiótico para fora da célula bacteriana, e alterações da membrana externa de bactérias envolvendo componentes polissacarídeos, alterando a permeabilidade à ampicilina, dentre outros agentes antimicrobianos (Rang *et al.*, 2004).

Por estas razões, a pesquisas por novas classes de moléculas que atuem como agentes antimicrobianos tornaram-se incessante nos últimos anos, além de emergencial. Em contrapartida ao aparecimento de resistência às moléculas antimicrobianas já existentes, em 1969 ocorreu o primeiro relato de um peptídeo com atividade hemolítica e antimicrobiana. Este foi o peptídeo Bombinina, uma molécula de 24 aminoácidos proveniente da secreção subcutânea do anuro *Bombina variegata*.

Na década de 80 foram isoladas as magaininas de *Xenopus laevis* e a partir deste ponto na história, deu-se início a pesquisas mais aprofundadas dessas promissoras moléculas (Prates & Júnior, 2000).

Em 2003 Boman mostrou, em experimentos *in vivo*, que cerca de  $2 \times 10^7$  células bacterianas eram eliminadas por dia na boca de sapos. Estes achados corroboravam as suspeitas de que deveria existir algum mecanismo alternativo que controlasse a replicação desses microorganismos nesse ambiente. Além disso, esse controle também deveria ser o responsável pelos seres humanos não serem infectados pela sua flora bacteriana intestinal, pois cerca de 2 kg de microorganismos vivem no seu trato digestivo e 200 g nas superfícies (Boman, 2003). Essas observações levaram cientistas de todo o mundo a isolar moléculas



que apresentassem atividade antimicrobiana. Grande parte dessas moléculas eram de natureza peptídica, os chamados peptídeos antimicrobianos (AMP), provenientes de plantas (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, Padovan *et al.*, 2010), animais vertebrados e invertebrados (Bulet *et al.*, 1999; Daffre *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2006) além de bactérias (Fontoura, R. & Brandelli, A., 2008).

Diferentes AMP têm apresentado um amplo espectro de ação, sendo efetivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Brogden, 2005), fungos, protozoários, envelopes virais (Daffre *et al.*, 2001, Bulet *et al.*, 2004) e, recentemente, têm sido estudados como possíveis moléculas de combate às células tumorais (Mader & Hoskin, 2006). Isto faz o estudo dos AMPs uma futura alternativa ao uso de antibióticos convencionais, especialmente no tratamento de infecções geradas por microorganismos resistentes a antibióticos já usados (Ferre *et al.*, 2009).

#### **1.4 Propriedade química dos AMPs**

Quanto às propriedades químicas, os AMP são, em grande maioria, moléculas anfipáticas (Dempsey *et al.*, 2010, Brogden, 2005). Possuem de 10 a 80 resíduos de aminoácidos sendo, freqüentemente, 50% resíduos hidrofóbicos e 50% resíduos hidrofílicos carregados positivamente em pH fisiológico. A região catiônica da molécula é responsável pela sua atração por membranas aniônicas de bactérias e, por fim, a conformação e composição dos AMPs permitem a formação de estruturas que causam a morte do microorganismo (Ferre *et al.*, 2009; Brogden, 2005).

A composição de aminoácidos e a estrutura secundária de um AMP são importantes para definir as suas características hidrofílicas e hidrofóbicas, capazes de causar maiores ou menores interações com os diferentes tipos de membranas. A

sua composição é capaz de definir estruturas em  $\alpha$ -hélice, dobrada (em grampo), randômica e outras, dependendo do meio em que a molécula se encontra, e ainda determinam domínios que irão interagir com superfícies ou se inserir no interior hidrofóbico da membrana dos microorganismos (Zhang *et al.*, 2001; Jenssen *et al.*, 2006, Giangaspero *et al.*, 2001, Epand *et al.* 2010, Nguyen *et al.* 2010).

Os peptídeos antimicrobianos são agrupados em quatro principais classes de acordo com sua composição de aminoácidos e conformação (Sforça *et al.*, 2005, Figura 1):

(1) Peptídeos lineares

(2) s com hélices anfipáticas como a magainina (Zasloff, 1987).

(2) Folhas- $\beta$  estabilizadas por ligações dissulfeto como a defensina A, isolada da larva do mosquito *Phormia terranova* (Dimarcq *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 2011).

(3) Peptídeos com predominância de certo aminoácido em sua sequência, como a histatina presente na saliva de humanos, que tem alto teor de histidina (Hertog *et al.*, 2004).

(4) peptídeos com estruturas em clipe (*loop*) devido à presença de ligação de dissulfeto, como a gomesina isolada de hemolinfa da aranha brasileira *Acanthoscurria gomesiana* (Silva *et al.*, 2000).

(5) peptídeos estendidos como a indolizidina, isolada de neutrófilo bovino (Falla *et al.*, 1996).

Existe ainda na literatura trabalhos que reportam o potencial antimicrobiano de peptídeos aniônicos, ricos em aspartato e glutamato, como o peptídeo maximina H5, isolado do anfíbio *Bombina máxima*, que parece ser específico contra *Staphylococcus aureus* (Lai *et al.*, 2002, Harris *et al.*, 2011). Também o peptídeo

aniônico dermicidina (DCD), isolado de glândulas sudoríferas de humanos, tem um espectro de ação antimicrobiano mais amplo (Schitteck *et al.*, 2001). No entanto, o mecanismo de ação destes peptídeos aniônicos ainda não está esclarecido.

Outra classe de peptídeos são os isolados de fragmentos de proteínas como a lactoferricina oriunda da clivagem da lactoferrina (Neto, 2006), a casocidina 1 da caseína (Somkuti *et al.*, 2009) ou o Hb 33-61 da hemoglobina (Ivanov *et al.*, 1997; Sforça *et al.*, 2005).

Alguns tipos de estrutura como a mista (várias estruturas em uma mesma molécula), em loop, em dobra  $\beta$ , em  $\alpha$  hélice e linear estão representadas na Figura 2 com alguns exemplos de peptídeos (Janssen *et al.*, 2006).

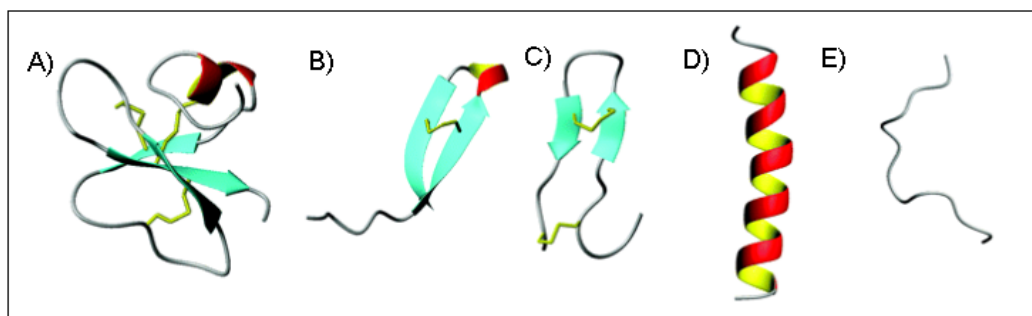


Figura 2. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. (A) Estrutura mista da  $\beta$ -defensina-2 humana; (B) Estrutura em loop; (C) Estrutura em dobra  $\beta$ ; (D) Estrutura em alfa-hélice da magainin-2; (E) Indolicidina estendida. As pontes de dissulfeto estão representadas como uma linha amarela. Figura retirada de Janssen, et al. 2006.

## 1.5 Modo de ação dos peptídeos antimicrobianos

Uma das hipóteses sobre o mecanismo de ação dessas moléculas envolve a habilidade dos AMPs causarem um colapso na membrana devido a formação de poros, através da interação com os lipídios da superfície celular dos microorganismos. Esse poros tornam a célula mais permeável, levando-a a morte. Os peptídeos também podem penetrar na membrana celular, sem formar poros, alcançarem o ambiente citosólico e impedir a síntese de biomoléculas importantes para a sobrevivência do microorganismo, resultando em vazamento de íons e

metabólitos, despolarização da membrana e interrupção do processo de respiração, síntese de biopolímeros e morte celular (Figura 3 A) (Jansen *et al.* 2006; Daffre *et al.* 2001).

De acordo com a teoria de formação dos poros, os peptídeos catiônicos são atraídos para a superfície das membranas por atração eletrostática devido a carga negativa de moléculas como os fosfolipídeos, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, e ácido teicóico de bactérias Gram-positivas, que se localizam assimetricamente na arquitetura da membrana celular desses microorganismos. Além disso, a carga positiva dos resíduos de aminoácidos que constituem os AMPs também interage com os lipídeos de membrana através de receptores específicos pode ativar vários mecanismos que podem levar a morte celular e a interação do AMP com os lipídeos de membrana pode formar estruturas semelhantes a poros os quais também levam a morte da célula (Pelegriani *et al.*, 2011).

Parâmetros intrínsecos e extrínsecos têm sido reportados como determinantes para um limiar de concentração de peptídeo antimicrobiano na superfície da membrana do microorganismo causar a morte celular. Os parâmetros intrínsecos (que dependem das características do próprio peptídeo) seriam fatores que incluem a capacidade dos peptídeos se acomodarem e se oligomerizarem na membrana, enquanto os extrínsecos são determinados pela composição lipídica e fluidez da membrana e estrutura da cabeça polar do lipídeo. Esses fatores influenciam o potencial de membrana, que é um fator crítico para definir a concentração de peptídeo necessária para causar a lise/morte celular (Yeaman & Yount, 2003). Há três mecanismos de ação propostos para a atuação dos AMPs sobre as membranas:

- 1- Poro em forma de barril (Figura 3 C):

Após atingir uma determinada concentração no meio, os peptídeos inserem-se na membrana de forma que vários monômeros interajam entre si lateralmente, formando um canal que atravessa a membrana de um lado para outro. Os peptídeos formam um anel em forma de barril, abrindo um poro na membrana (Janssen *et al.*, 2006).

### 2- Poro toroidal (Figura 3 B):

O poro toroidal é uma estrutura transmembrana formada por peptídeos que se inserem na bicamada formando um complexo alternado de peptídios e lipídios entre suas cadeias. Nesse caso, o poro é composto por lipídios intercalados com os peptídeos (Janssen *et al.* 2006, Pelegrini *et al.* 2011).

### 3- Mecanismo de carpete (Figura 3 D):

Esse mecanismo é caracterizado, inicialmente, pela ligação dos peptídeos em sua forma monomérica ou oligomérica na superfície da membrana celular por uma atração eletrostática, recobrando a membrana. Esse modo de ação é semelhante a formação de um carpete de peptídeos na membrana bacteriana e, conseqüentemente, esse carpete causa deslocamento de lipídeos alterando a fluidez da membrana e reduzindo a sua propriedade de barreira celular. Assim, a bicamada lipídica tem sua curvatura modificada pela formação desses complexos de lipídeos e peptídios ocorrendo a ruptura e lise celular. Nesse processo, o dano celular ocorre resultando numa dispersão de moléculas sem a formação de um poro (Yeaman & Yount, 2003, Pelegrini *et al.* 2011).

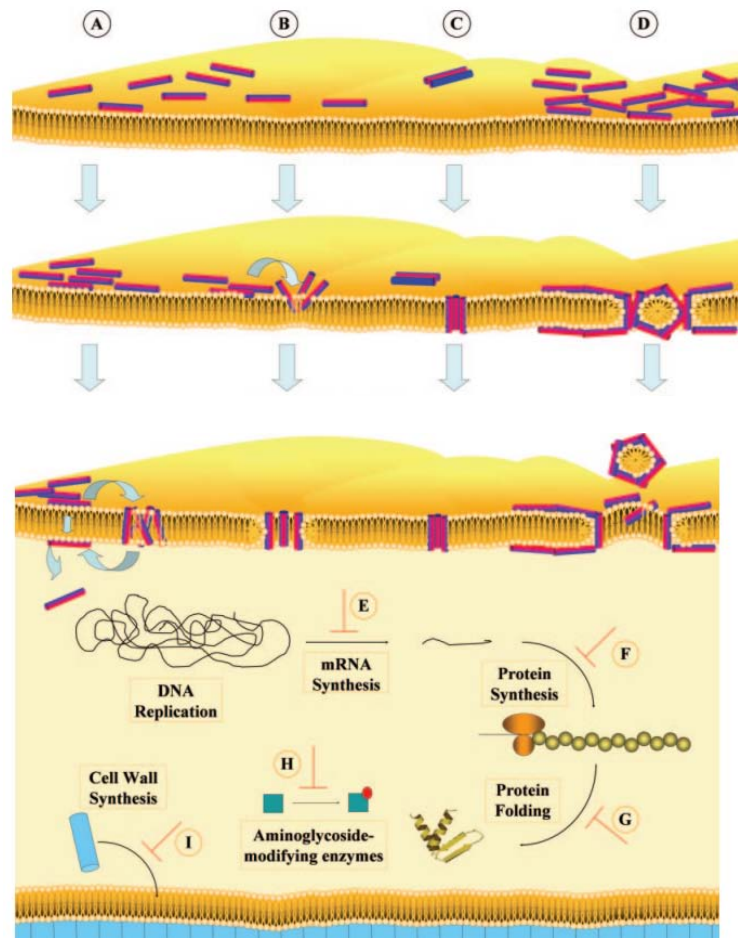


Figura 3. Modelos de ação do peptídeo antimicrobiano. Em amarelo, a membrana plasmática. O cilindro representando o peptídeo, seu lado vermelho é o de característica hidrofílica e o lado azul é o de caráter hidrofóbico. A) Inserção do peptídeo na membrana, translocação e interferência na síntese de biomoléculas. B) Mecanismo de formação do poro toroidal (inserção do peptídeo formando um canal alternado com o lipídio). C) Modelo de poro em barril (o peptídeo se insere formando um canal). D) Mecanismo carpete (o peptídeo solubiliza a membrana formando micelas) (Jensen et al. 2006).

## 1.6 Composição das membranas

Independentemente do tipo de perturbação que o peptídeo exerce sobre a membrana, a atração inicial do AMP é eletrostática, uma vez que estas moléculas são policatiônicas e as membranas de bactérias são carregadas negativamente (Huang, 2000).

Apesar de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas serem muito mais complexas que modelos de membranas, estes microorganismos apresentam uma carga superficial negativa oriunda da presença de fosfolípídeos ácidos, grupos

fosfato dos lipopolissacarídeos (bactérias Gram-negativas) e do ácido teicóico (bactérias Gram-positivas) (Brogden, 2005).

A Tabela 1 mostra a composição lipídica da *E. coli* e da membrana da hemácia. A membrana da *E. coli* apresenta 42% de carga negativa, somando-se o fosfatidilglicerol que possui uma carga negativa por molécula e a cardiolipina que possui duas cargas negativas por molécula. A membrana da hemácia possui composições diferentes na sua parte interna, com lipídios negativos e neutros, e na parte externa, com lipídios neutros somente. Essa composição de lipídios e a razão de carga foram utilizadas para a construção de vesículas utilizadas em nossos experimentos.

**Tabela 1. Composição lipídica, em porcentagem, da membrana da *E. coli* e da membrana do eritrócito (Rouser et al. 1968).**

Composição lipídica (%)	Carga líquida do lipídio	Lipídios da membrana da <i>E. coli</i>	Lipídios totais da membrana do eritrócito
Ácido fosfatídico	-1	0	1,5
Fosfatidilcolina	0	0	19
Fosfatidiletanolamina	0	65	18
Fosfatidilglicerol	-1	18	0
Fosfatidilinositol	-1	0	1
Fosfatidilserina	-1	0	8,5
Cardiolipina	-2	12	0
Esfingomielina	0	0	17,5
Glicolipídios	0	0	10
Colesterol	0	0	25

## 1.7 Aplicação dos AMP

Os AMPs, além de serem candidatos ao tratamento de infecções, são de grande interesse da indústria alimentícia cujo objetivo é utilizar esses AMP para aumentar o tempo útil de alimentos processados (Vuyst, 2007).

A utilização de peptídeos requer mais que o próprio estudo e desenvolvimento de novas moléculas com grande potencial e especificidade terapêutica. Para o uso dos AMP por via oral, por exemplo, como a maioria deles tem grande susceptibilidade de degradação por proteases, haveria necessidade de modificações em sua estrutura, como conjugações químicas e encapsulamento dessas moléculas antibióticas por lipossomas, por exemplo, para que elas pudessem ser utilizadas (Bergeon *et al.*, 2008).

Um dos maiores obstáculos para o uso em grande escala dos AMPs ainda é o custo da produção de peptídeos para uso comercial. A síntese deverá ser aprimorada de modo a ser menos custosa para uma produção em larga escala, já que o preço de um grama de um antibiótico convencional, como os da classe dos aminoglicosídeos, é US\$ 0,80, enquanto um peptídeo antimicrobiano pode custar de US\$ 50,00 a US\$ 400,00 (Marr *et al.*, 2006).

## 1.8 A Melitina

A melitina é um peptídeo antimicrobiano isolado do veneno da abelha *Apis mellifera* que tem a característica de romper membranas lipídicas, formar poros, causar fusão de membranas e hemólise. Esse peptídeo compõe 50% do peso seco do veneno e é caracterizado por possuir 26 aminoácidos e carga +5 ou +6 quando o resíduo de Gly é protonado em pH 7 (Raghuraman & Chattopadhyay, 2006). Sua sequência é:



(+) $\text{NH}_2$ -GIGAVLK(+) $\text{VLT}$ TGLPALISWIK(+) $\text{R}$ (+) $\text{K}$ (+) $\text{R}$ (+) $\text{QQ}$ -CONH<sub>2</sub> sendo os 20 resíduos da ponta N terminal mais hidrofóbicos, possuindo a característica de inserir-se na membrana lipídica, e os últimos 6 aminoácidos, da ponta C terminal, mais hidrofílicos devido as cargas positivas em pH 7, que ancoram na membrana através de pontes salinas nos grupos fosfato das cabeças dos lipídeos que a constituem (Figura 4) (Stömstedt *et al.* 2007).

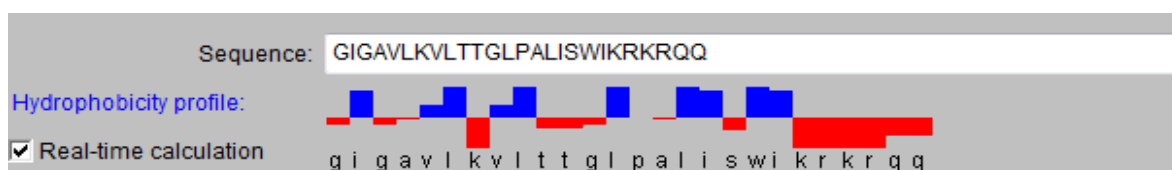
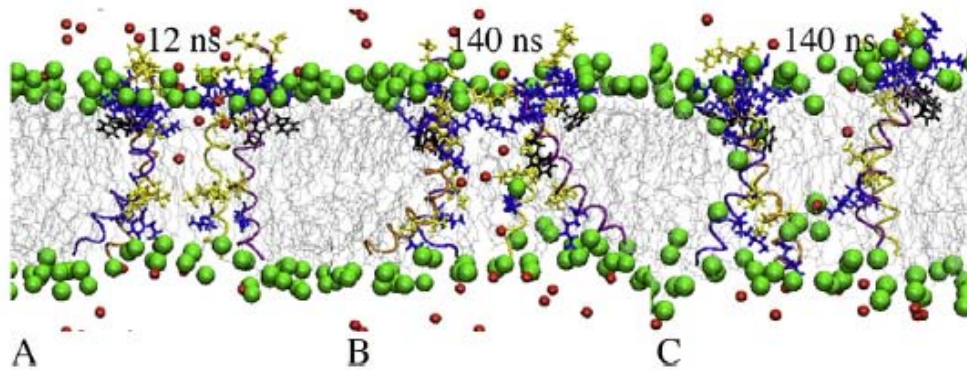


Figura 4. Software de AMPs <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>, sequência de aminoácidos da melitina com representação das regiões hidrofóbicas em azul e hidrofílicas em vermelho.

Vários mecanismos foram propostos para explicar a ação lítica deste peptídeo em vesículas lipídicas, entre eles a fusão de vesículas e micelização. Porém, a proposta mais aceita é a de formação de poros.

A estrutura do peptídeo em meio aquoso é predominantemente randômica em concentrações abaixo da necessária para ocorrer a dimerização da molécula. Esse peptídeo adota, predominantemente, uma estrutura em alfa-hélice quando ligado às membranas lipídicas (Stömstedt *et al.* 2007, Glättli *et al.* 2006, Terra *et al.* 2007).

Assim, a melitina pode fazer poros toroidais e em forma de barril, em tetrâmeros (Figura 5) (Lin & Beumgaertner, 2000) e também já foi reportado que, em membranas aniônicas, esse peptídeo age como detergente. Porém Mihajlovic & Lazaridis sugerem que a melitina interage mais fortemente com os lipídeos no modelo de poro toroidal do que no poro cilíndrico, devido a sua maior solvatação (Mihajlovic & Lazaridis, 2009).



**Figura 5. A-Tetrâmero de melitina interagindo com as cabeças polares dos lipídios e os íons  $\text{Cl}^-$ , num poro cilíndrico. B-Transição e C- Poro toroidal. A figura foi feita por simulação por dinâmica molecular. As moléculas de água foram retiradas para melhor visualização. Os resíduos polares estão em amarelo, os resíduos carregados positivamente em azul, W19 em preto, fosfocolinas representadas como esferas verdes, íons em esferas vermelhas, caudas lipídicas em linhas cinza e o peptídeo em azul, laranja, amarelo e púrpura. Figura retirada de Mihajlovic & Lazaridis, 2009.**

A maneira como o peptídeo interage com a membrana também parece estar relacionada com a composição lipídica da membrana. Experimentos de vazamento do conteúdo interno de vesículas compostas por lipídeo zwitteriônico (palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, POPC) ou ácido (palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol, POPG), mostraram que a atividade do melitina na membrana se dá por dois mecanismos de permeabilização diferentes, dependendo da sua composição (Ladokhin *et al.*, 2001).

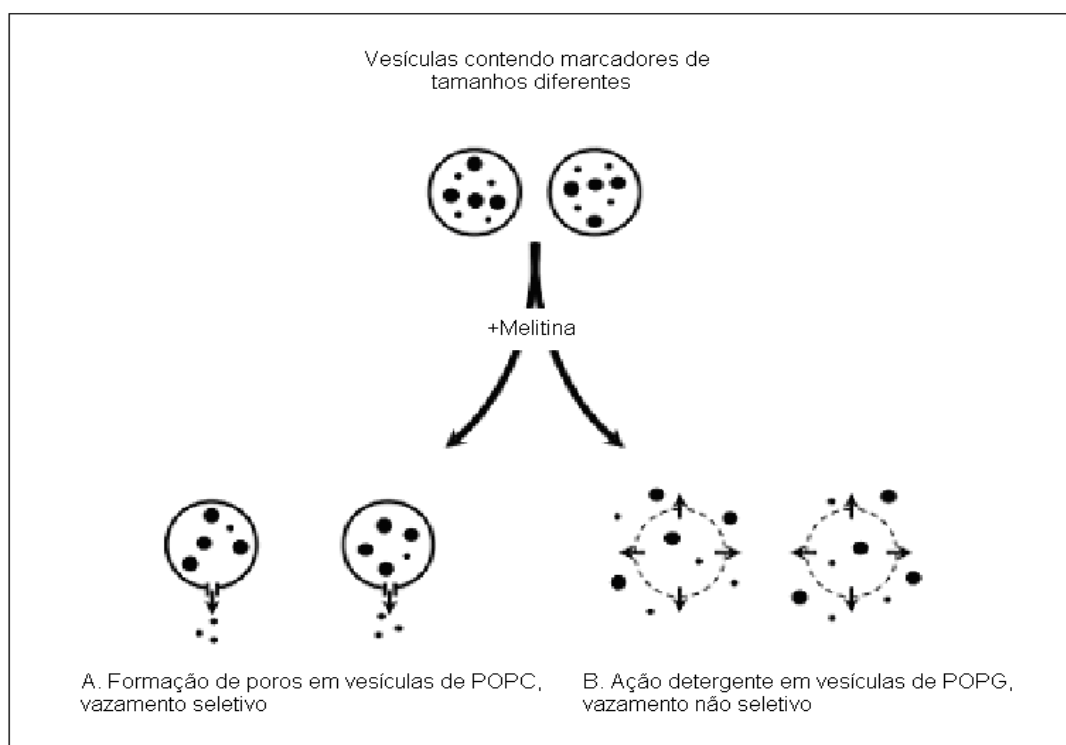
Em vesículas de POPC há a formação estruturas de aproximadamente 25-30 Å de diâmetro pela melitina. Esses agregados trans-membrana de peptídeos em  $\alpha$ -hélice sugerem a formação de poro em forma de barril, pela característica do vazamento do conteúdo interno das vesículas (Figura 6 A).

Para membranas constituídas de POPG, os estudos mostraram um vazamento típico de um detergente, podendo sugerir um mecanismo de tapete (Figura 6 B).

Além disso, experimentos de dicroísmo circular mostraram que, em presença de POPC apenas, a melitina assumia conformação em  $\alpha$ -hélice, capaz de adotar uma orientação trans-membrana (Terra, 2006).

A atividade da melitina é aumentada em células sem colesterol e tem atividade tóxica em diversos tipos de célula (eritrócito, leucócitos e mastócitos). Além disso, ainda pode causar agregação, fusão de membranas e “budding” (Ferre *et al*, 2009, Strömstedt *et al*, 2007).

Devido as suas propriedades anfifílicas, a melitina é um bom modelo para o estudo das interações com membranas. Porém ela não poderia ser utilizada como molécula antibiótica em mamíferos, pois é altamente danosa a células.



**Figura 6. Representação esquemática do modo de ação da melitina sobre vesículas compostas de: A – POPC levando a formação de poro; B - POPG levando a um vazamento do tipo detergente “carpete” (Ladokhin et al, 2001). O experimento de Ladokhin mostra vesículas incorporadas com marcadores de tamanhos diferentes. Na de POPC os menores marcadores apresentam vazamento e nas de POPC o vazamento não é seletivo quanto ao tamanho do marcador (modificado de Ladokhin et al., 2001).**

## 1.9 Cecropina A

Além da melitina, outros peptídeos encontrados na natureza com atividade antimicrobiana são do grupo das Cecropinas A, B ou D, de 35-37 resíduos de aminoácidos (Gudmundsson *et al.* 1991), os quais estão presentes na resposta imune inata de mamíferos e insetos (Marassi, 1999). Essa família de AMPs possui atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, não apresentam toxicidade contra eritrócitos e outras células eucarióticas, mas são susceptíveis a degradação por protease (Ferre *et al.* 2009).

A Cecropina A foi isolado da hemolinfa da *Hyalophora cecropia* ou bicho da seda gigante e sua composição de aminoácidos é KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH<sub>2</sub> (Figura 7).

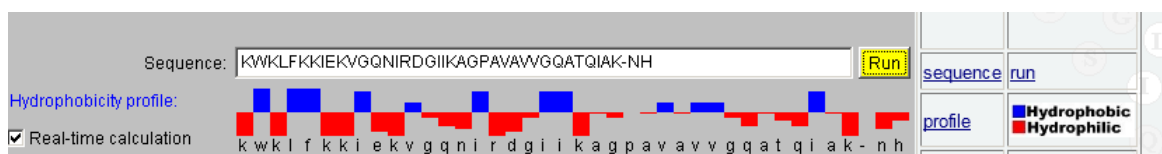


Figura 7. Software de AMPs <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>, sequência de aminoácidos da cecropina A, com representação das regiões hidrofóbicas em azul e hidrofílicas em vermelho.

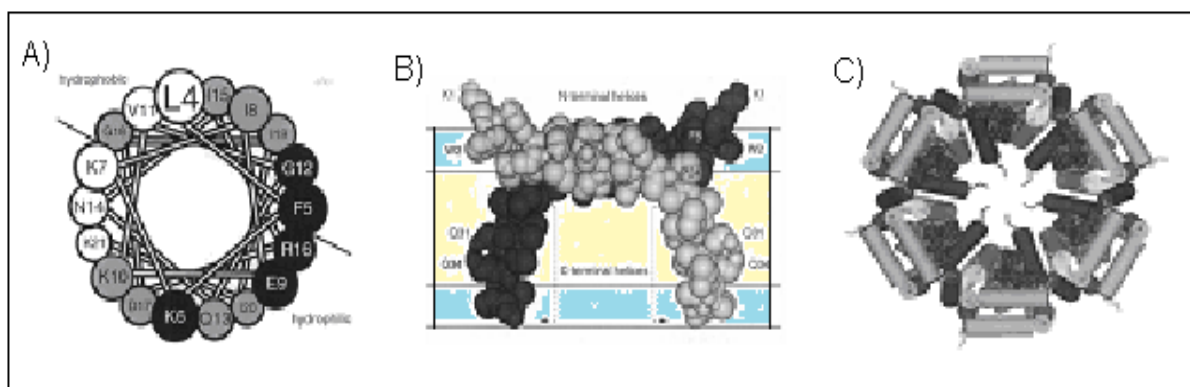
O mecanismo de ação da Cecropina A é dependente da sua concentração e atua causando morte de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Nas Gram-negativas o peptídeo atua ligando-se aos lipopolissacarídeos da membrana do microorganismo, predominantemente por atração eletrostática (Arcidiacono *et al.* 2008).

O principal alvo da Cecropina é a membrana plasmática, levando à permeabilização da membrana por formação de poro e canais iônicos que levam à perda do potencial de membrana, permitindo vazamento e morte celular (Lu *et al.* 2010). Seu efeito citotóxico é observado em numerosas células de linhagens

tumorais, além de apresentar um grande efeito em protozoários, fungos e bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium* ou *Micrococcus lutes* (Cerón *et al.* 2010).

A Cecropina A apresenta estrutura randômica em meio aquoso e em contato com membranas lipídicas adquire conformação em  $\alpha$ -hélice. Seus resíduos de aminoácidos de 5-21 formam uma  $\alpha$ -hélice com carga +6 quando em interação com interfaces lipídicas e, devido a essas cargas, essa parte da molécula se situa na superfície da membrana e não penetra no core hidrofóbico. Já os resíduos de 24-37 apresentam característica hidrofóbica e são capazes de se inserir na membrana lipídica. Na ponta carboxi terminal ainda há uma carga +1 do último resíduo de lisina (Figura 8 B) (Ferre *et al.*, 2009, Silvestro *et al.* 1997).

Em baixa concentração de Cecropina A há a formação de canais iônicos e em maiores concentrações ocorre primeiramente a formação de dímeros do peptídeo que formam, por fim, um poro toroidal representado pela Figura 8 (Silvestro *et al.* 2000; 1997; Durell *et al.* 1992).



**Figura 8. Representação da Cecropina A. A) Esquema mostrando a hélice vertical a partir do  $\text{NH}_2$  terminal da seqüência de aminoácidos da cecropina A. Os resíduos em preto são os conservados em todas as cecropinas, os cinzas são os variáveis e os em branco são os resíduos hidrofóbicos (Durell, et a., 1992). B) Um dímero de cecropina A representado inserido na membrana, a parte hidrofílica nas superfícies interna e externa representadas em azul na membrana, e região hidrofóbica, inserida no core hidrofóbico da membrana em amarelo. C) Modelo de poro toroidal da cecropina A formado pelos dímeros das hélices representadas em B (Silvestro *et al.* 1997).**

## 1.10 O peptídeo BP100

Como cada peptídeo exibe uma seletividade celular e diferentes mecanismos de ação, uma estratégia para tentar obter o máximo de eficácia de um peptídeo antimicrobiano é a combinação entre as seqüências dessas moléculas para se obter peptídeos sintéticos híbridos. Este tipo de estratégia pode minimizar ou eliminar a hemólise, por exemplo, que limitaria o uso sistêmico de uma terapia com AMP.

O BP100 cuja composição é KKLFFKKILKYL-NH<sub>2</sub> (Figura 9) é um híbrido de Cecropina A com Melitina obtido por química combinatória que apresentou grande eficiência, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inibindo o crescimento de bactérias Gram-negativas (Ferre *et al.*, 2009).

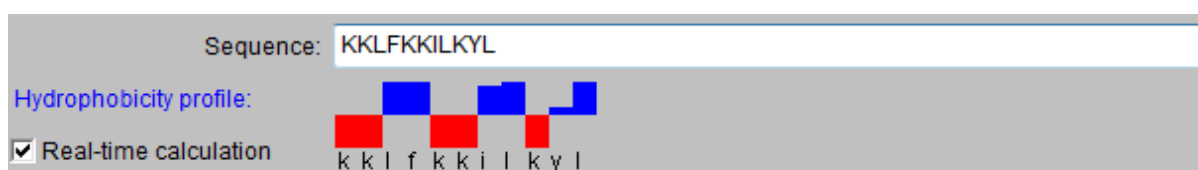


Figura 9. Software de AMPs <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>, seqüência de aminoácidos do BP100 com representação das regiões hidrofóbicas em azul e hidrofílicas em vermelho.

Membranas miméticas de diferentes composições lipídicas foram utilizadas em estudos de vazamento de conteúdo interno de vesículas, com diferentes concentrações de BP100. Verificou-se uma enorme seletividade do BP100 para membranas aniônicas, provocando vazamento do conteúdo interno das vesículas, e baixa atividade do peptídeo sobre vesículas neutras. Nos sistemas compostos por fosfolipídios aniônicos, mesmo em baixas razões de peptídeo/lipídio, foi grande a permeabilização de vesículas por BP100, além de ocorrer neutralização da carga da membrana e agregação de vesículas. Foi evidente também a relação entre a

concentração do BP100 com o vazamento das vesículas, ocorrendo um vazamento mais rápido quanto maior a concentração de peptídeo (Ferre *et al.*, 2009).

As cinéticas de vazamento de vesículas com o BP100 também apresentaram comportamento sigmoidal, incomum para peptídeos antimicrobianos conhecidos até então. Esse fenômeno pode indicar que vários eventos estão ocorrendo na membrana ao longo do tempo de interação do BP100 com a vesícula.

Peptídeos catiônicos também podem alterar a densidade de carga da superfície de vesículas induzindo agregação. Nos estudos de Ferre *et al.*, concentrações de BP100 menores que 15  $\mu\text{M}$  e de lipídeo da ordem de 125  $\mu\text{M}$ , ou seja uma razão de 0,12 peptídeo/lipídeo, não se observou mudanças significativas na turbidez (em vesículas em 100 nm). Porém, acima dessa razão, a densidade óptica da solução aumentava indicando formação de agregados.

As medidas de potencial zeta confirmaram essa saturação de peptídeos na membrana lipídica, resultando na neutralização das cargas dos fosfolipídios negativos. Esse efeito é altamente favorável a agregação de vesículas, pois cancela a repulsão eletrostática entre as vesículas analisadas (Ferre *et al.*, 2009, Alves *et al.*, 2010).

A concentração mínima inibitória, MIC, do BP100 foi determinada para diferentes microorganismos, como *E. amylovora*, *X. vesicatoria*, and *P. syringae*, e foram obtidos valores entre 2,5 a 7,5  $\mu\text{M}$  de BP100. Esses valores de MIC são de baixa toxicidade para os eritrócitos humanos, como mostrado nos resultados de Ferre *et al.*, o que faz deste híbrido de peptídeo um candidato para antibiótico contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas.

Em experimentos de viabilidade celular, o BP100 mostrou efeitos citotóxicos em cultura de fibroblastos de mamíferos em concentrações entre 50 - 60  $\mu\text{M}$  e em

eritrócitos acima de 150  $\mu\text{M}$ , o que é bastante promissor já que ele atua em concentrações muito mais reduzidas em bactérias (2,5 a 7,5  $\mu\text{M}$ ).

Portanto, devido a seletividade do peptídeo por membranas aniônicas, é de interesse estudar o mecanismo de ação desse peptídeo verificando o efeito da carga superficial da membrana e da presença de colesterol na sua atividade, já que este último está presente em eritrócitos de mamíferos.

### **1.11 Descrição de algumas moléculas utilizadas**

Neste trabalho, a composição das vesículas estudadas LUVs e GUVs foi definida utilizando-se como modelo a composição de lipídios de membrana de bactéria e de eritrócito. Como pode ser visto na Tabela 1, a membrana de bactérias possui uma porcentagem considerável de lipídios negativos (42%) enquanto a membrana do eritrócito possui apenas 12,5 % de lipídios negativos. Porém, os lipídios aniônicos no eritrócito ocorrem do lado interno da membrana. A membrana externa do eritrócito possui exclusivamente lipídios de carga líquida zero, e é essa a interface que seria encontrada pelo peptídeo caso ele fosse utilizado como antibiótico. Outra diferença entre as membranas de bactérias e eritrócitos é a presença do colesterol que existe somente nas membranas de mamíferos.

Assim, para mimetizar a membrana das bactérias foram utilizados, nesta dissertação, lipídios neutros e negativos e para mimetizar eritrócitos foram utilizados lipídios de carga líquida zero e colesterol.

Os lipídios escolhidos para tal estudo foram a fosfatidilcolina de ovo, PC, (Maximiano *et al.*, 2008), o colesterol (Rouser, *et al.* 1968, Tabela 1), e o Egg-1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (PG). A PC e o PG obtidos de



ovo são misturas de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina com ácidos graxos contendo diferentes comprimentos e insaturações. Na Figura 10 estão representadas as estruturas dos lipídeos POPC, POPG e colesterol.

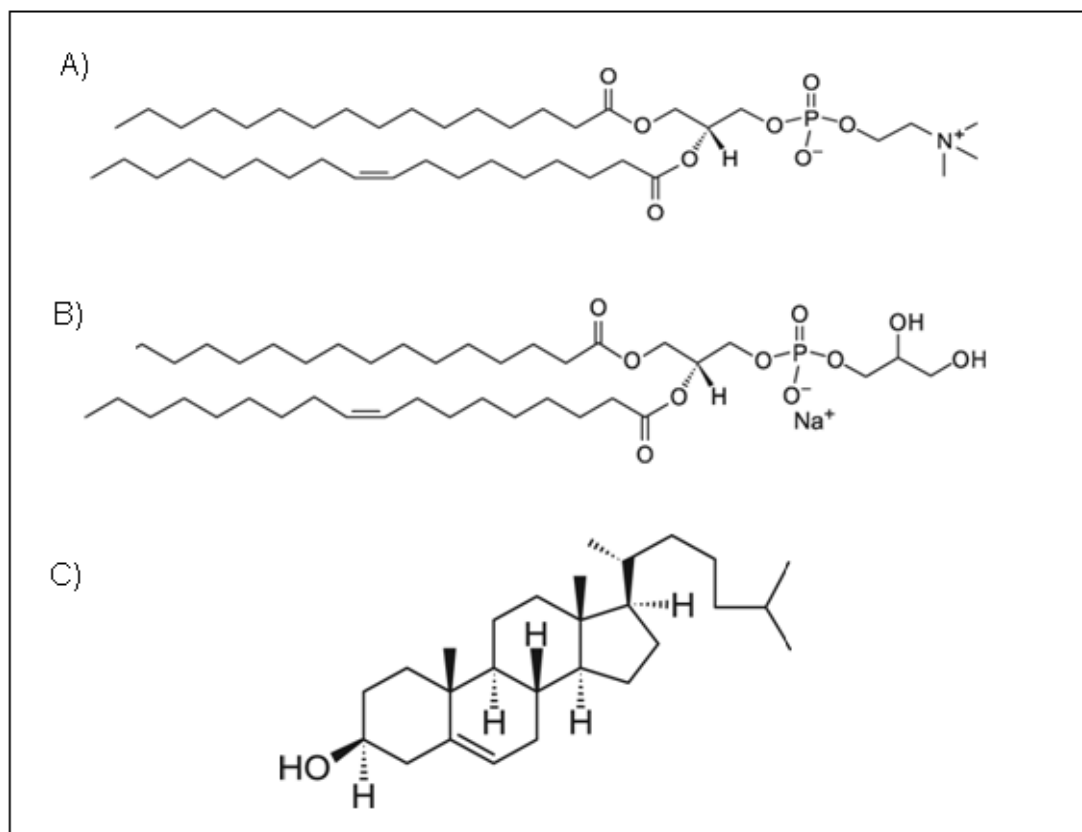


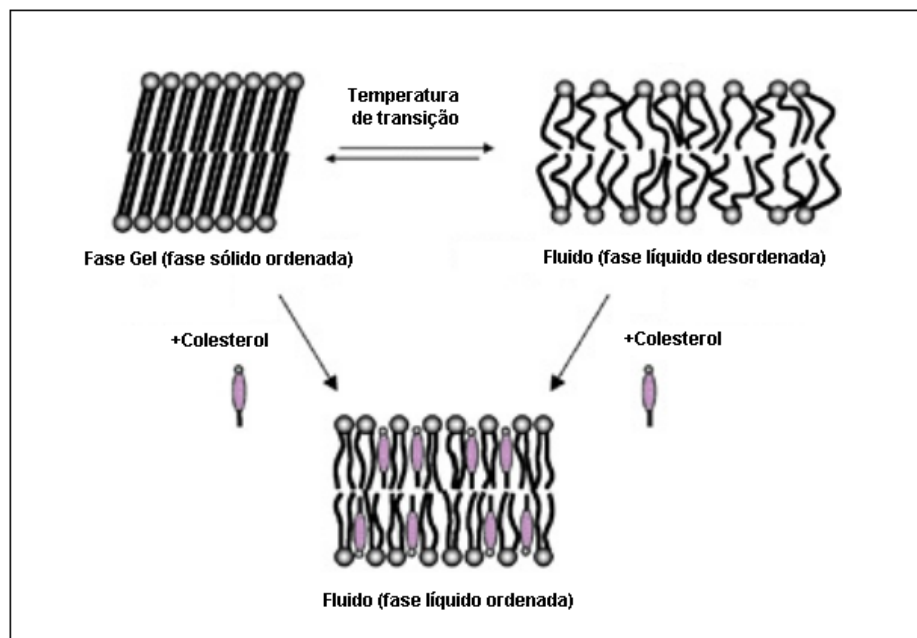
Figura 10 – Estruturas dos lipídeos: A) 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina (POPC), B) (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]) (POPG) e C) Colesterol. Figura extraída de Ahyayauch et al., 2006.

Os lipídeos POPC e POPG, mostrados na Figura 10, possuem cabeça polar constituída pelo glicerol, grupo fosfato, uma colina, e dois ácidos graxos com cadeia longa, sendo uma delas o ácido palmítico (16 carbonos com nenhuma insaturação) e outro um ácido oléico (18 carbonos e uma insaturação entre os carbonos 9 e 10), formando duas ligações éster com o grupo glicerol da molécula.

O tamanho da cauda hidrofóbica e suas insaturações determinam a temperatura de transição de fase do lipídio em questão. Nesta temperatura o lipídio passa da fase gel, que apresenta menor grau de liberdade, para a fase líquida, no

qual apresenta maior grau de liberdade. As temperaturas de transição da POPC e do POPG são da ordem de  $-2^{\circ}\text{C}$  (Ahyayauch *et al.*, 2006; Archilha, 2008).

O colesterol é um constituinte presente em grandes quantidades (20-40 % em mol) na membrana plasmática de eucarióticos, e é ausente nas membranas dos procaríotos. Essa molécula possui temperatura muito alta de transição de fase gel para fase fluida e assim tem a propriedade de alterar as propriedades físico-químicas da membrana lipídica, causando uma organização de fase líquido-ordenada e promovendo a desorganização da fase gel (Mouritsen & Zuckermann, 2004). O colesterol tem a capacidade de aumentar a ordem das membranas lipídicas, chamada de fase-líquido-ordenada (Figura 11), na qual os lipídios estão em fase fluida, porém há uma difusão rápida no plano da bicamada, uma desordem translacional de lipídeos, e ao mesmo tempo essa fase tem uma alta troca conformacional de cadeias lipídicas (Mouritsen & Zuckermann, 2004).



**Figura 11.** Esquema ilustrativo de diferentes fases da membrana lipídica em meio aquoso (Eeman, M. & Deleu, M, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Estudar o mecanismo do peptídeo BP100 em modelos de membrana com diferentes cargas de superfície e em presença de colesterol.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- 1- Estudar diferentes modelos de membranas lipídicas, para testar o efeito de carga negativa na superfície da membrana na atividade do BP100, e mimetizar as membranas celulares de mamíferos e bactérias;
- 2- Utilizar a técnica de dicroísmo circular para avaliar a possível interação do peptídeo híbrido com membranas lipídicas, através das mudanças da estrutura secundária do BP100;
- 3- Quantificar a relação peptídeo/lipídio mínima para a formação de poros em diferentes membranas lipídicas através do acompanhamento da cinética de vazamento de sondas fluorescentes encapsuladas no compartimento aquoso interno das LUVs;
- 4- Investigar a ação do BP100 em membranas lipídicas através da visualização de GUVs por um microscópio óptico;
- 5- Estudar a mudança do diâmetro hidrodinâmico e a mobilidade eletroforética das LUVs de diferentes proporções de carga negativa, com e sem colesterol, pelo BP100.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

A fosfatidilcolina de ovo, PC, foi extraída de gema de ovo segundo técnica descrita (Maximiano, et al., 2008). O Egg-1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosforac-(1-glicerol)], PG, a 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina, POPC, e o (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosforac-(1-glicerol)]), POPG, eram da Avanti Polar Lipids. O colesterol, a 5(6)-carboxifluoresceína, Sephadex – G25 medium, a sacarose, o Tris base, o ácido Perclórico 70% eram da Sigma Aldrich. O ácido ascórbico era da Merck e o Molibdato de amônio da Baker. O metil-viologênio (MV), e pireno tetrasulfonato de sódio, PTS, eram da Molecular Probes. As membranas de policarbonato, com diâmetro de poro de 100 nm, utilizadas para a preparação das vesículas extrusadas, eram da Whatman (Nucleopore Track-Etch Membrane).

5(6)-Carboxifluoresceína foi purificada segundo o método de Weinstein et al, 1977.

Para a síntese do BP100, os derivados de aminoácidos (Fmoc-aminoácidos) e a resina utilizada para a síntese eram produtos da Peptides International (Louisville, Estados Unidos). A N,N-dimetilformamida (DMF) era da SYNTH (São Paulo, Brasil) e foi seca sob hidróxido de potássio e destilada à pressão atmosférica (146 °C) antes da utilização. Os solventes, 2-propanol, metanol e ácido trifluoroacético, eram reagentes de grau analítico (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Os compostos 4-metilpiperidina, triisopropilsilano, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida, 1-hidroxibenzotriazola e o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). O 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato de etila, conhecido comumente como Oxyma, e o triisopropilsilano eram produtos Merck (Darmstadt,

Alemanha). Acetonitrila de grau cromatográfico era produto da Mallinckrodt Chemical- J.T.Baker (Phillipsburg, Estados Unidos).

### 3.1.4 Aparelhos

A preparação de vesículas foi feita com um Extrusor LiposoFast (Avestin Inc.).

Para as medidas de Dicroísmo Circular utilizou-se um aparelho Jasco J-815 CD Spectrometer, equipamento do Grupo de Biofísica da UNIFESP, INFAR, laboratório do Prof. Dr. Antônio Miranda, sob a responsabilidade da aluna Tatiana de Oliveira. Nos experimentos de dicroísmo circular utilizou-se cela cilíndrica de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm.

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-2000 e cela de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

O diâmetro hidrodinâmico e da mobilidade eletroforética das vesículas foram medidos em um aparelho Zetasizer Nano 317.

Para as medidas de Microscopia óptica utilizou-se um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 e câmera Zeiss AxioCam HS (*High Speed*) do Laboratório de Cristalografia do IFUSP. O aparelho possui placas condutoras de ITO (óxido de índio-titânio) da FlexiTec Eletronica Orgânica, multímetro digital e um gerador de funções digital, MFG 4202, Minipá. O porta-amostra com entrada lateral e os espaçadores de teflon foram fabricados pela oficina do Departamento de Física Aplicada do IFUSP. Os experimentos foram realizados pela Prof. Dra Karin do Amaral Riske da UNIFESP, SP

## **3.2 Métodos**

### **3.2.4 Dosagem de Fosfato inorgânico**

A concentração dos fosfolipídios foi determinada dosando-se o fosfato presente nas moléculas. Alíquotas das amostras de lipídio foram adicionadas aos tubos de ensaio (previamente lavados em HCl concentrado) e foram secas numa estufa de 120°C. Após secagem adicionou-se 0,4 mL de ácido perclórico a cada amostra. Os tubos foram tampados com bolas de vidro e mantidos por uma hora em um digestor a 180 °C, tempo necessário para mineralizar totalmente os lipídios. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionaram-se 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio a 1,25 % (p/v) às amostras. Os tubos foram agitados num vórtex. Em seguida, adicionou-se às amostras 0,4 mL de uma solução de ácido ascórbico a 3 % (p/v), agitaram-se os tubos no vórtex novamente, e as amostras foram mantidas em banho-maria por cerca de 10 minutos. Após esse período os tubos foram esfriados em água corrente e a absorbância lida em 797 nm. A curva padrão foi feita junto com as amostras utilizando-se uma solução padrão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,001 M em água.

### **3.2.5 Dosagem do Colesterol**

O colesterol foi recristalizado de etanol a quente. A dosagem de colesterol foi feita utilizando-se o kit da BioTécnica-biotecnologia avançada. Este kit continha uma solução padrão de colesterol de 200 mg/dL em Butanol 10% v/v; Triton x 100 0,1% v/v, e um reagente (R1) que correspondia a uma solução de tampão Pipes 100 mmol/L, pH 7,0; colato de sódio 8 mmol/L; colesterol esterase (CHE) > 750 U/L; colesterol oxidase > 200U/L; peroxidase > 2000 U/L; 4-aminoantipirina 0,6 mmol; fenol 20 mmol/L e azida sódica 0,05 % p/v.

Frações crescentes de 0-14  $\mu\text{L}$  da solução padrão de colesterol foram colocadas em tubos de ensaio e adicionou-se o reagente R1 para um volume final de 1 mL para todas as amostras.

Alíquotas das amostras lipídicas a serem dosadas foram colocadas em volumes crescentes em tubos de ensaio aos quais se adicionou 1 mL do reagente R1 atingindo-se concentrações próximas das usadas na curva padrão de colesterol. Os tubos foram agitados e incubados durante 10 minutos em 37  $^{\circ}\text{C}$ . A absorbância foi medida num espectrofotômetro em 505 nm sendo a cor das soluções estável por 30 minutos.

A partir da curva de absorbância da solução padrão de colesterol, obteve-se a tangente no gráfico de absorbância x [colesterol] que foi utilizada para o cálculo da concentração de colesterol nas amostras.

### **3.2.6 Purificação da Carboxifluoresceína**

Recristalização e remoção de contaminantes polares foram realizadas segundo adaptação dos métodos de Weinstein J. N. *et al.*

### **3.2.7 Determinação da concentração da solução de BP100**

A concentração do peptídeo foi determinada medindo-se a absorbância a 276 nm. Nesse comprimento de onda a tirosina presente no BP100 absorve e a concentração do BP100 pode ser determinada pela lei de Beer-Lambert utilizando-se coeficiente de extinção molar de 1290  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Chen *et al.*, 1956).

### **3.2.8 Síntese do Peptídeo BP100**

O peptídeo H-KKLFKKILKYL-NH<sub>2</sub> foi sintetizado pelo método de fase sólida (Chan & White, 2000; Albericio, 2004), com a utilização da resina “Rink-Amide-

MBHA-Resin” (Peptides International, Louisville, Estados Unidos), com grau de substituição de  $0,52 \text{ mmol.g}^{-1}$ . As reações de desproteção do grupamento Fmoc foram conduzidas com uma solução de 4-metilpiperidina em N,N-dimetilformamida (DMF) a 25% (em volume) durante 30 minutos (em duas etapas de 15 minutos). Os acoplamentos para formação das ligações peptídicas foram conduzidos com N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/1-hidroxibenzotriazola (HOBt), ou DIC/2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etila (Subirós-Funosas et al, 2009) em DMF durante 60 a 120 minutos. As etapas de desproteção e acoplamento foram repetidas alternadamente até a adição do derivado de aminoácido N-terminal e desproteção do grupamento Fmoc amino-terminal. As reações de desproteção e de acoplamento eram monitoradas pela reação de ninhidrina (Chan & White, 2000; Friedman, 2004). Após cada etapa de desproteção e acoplamento, a resina era lavada três vezes com 2-propanol (ou metanol) e DMF, de modo alternado. Completada a síntese, a reação de desproteção final e de desligamento entre o peptídeo e a resina foi conduzida em uma solução de ácido trifluoroacético: triisopropilsilano:água (90:05:05, v:v:v) durante 90 minutos à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com éter diisopropílico gelado sob  $\text{N}_2$  líquido, o sobrenadante foi descartado e o peptídeo foi extraído com água e liofilizado.

O peptídeo foi purificado por cromatografia de fase reversa e foi caracterizado por espectrometria de massas. Para a purificação do peptídeo foi utilizada uma coluna semi-preparativa ODS 9,4 x 250 mm da Agilent (Santa Clara, Estados Unidos). O cromatógrafo utilizado para purificação do peptídeo era composto de uma bomba modelo LC-10, um detector UV-visível modelo SPD-10AV, uma unidade misturadora de solventes, modelo FCV-10AL, um degaseificador modelo DGU-14A, e um injetor manual Rheodyne injector, acessórios esses acoplados a uma unidade



controladora *SCL-10A System Controller* (Shimadzu, Kyoto, Japan). O programa de gradiente utilizado para a cromatografia foi o seguinte: H<sub>2</sub>O:ACN:TFA (95:5:0,1, v:v:v) durante 5 minutos, seguido de gradiente linear até H<sub>2</sub>O:ACN:TFA (35:65:0,1, v:v:v) durante 60 min. A detecção foi a 216 e 280 nm, o fluxo foi de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e as corridas foram conduzidas à temperatura ambiente. A identidade do peptídeo purificado e o grau de pureza foram verificados por espectrometria de massas (MS), em modalidade MALDI-ToF, com o emprego de ácido *2-ciano-4-hidroxicinâmico* como matriz. Os espectros foram adquiridos em espectrômetro de massa modelo Ultraflex III ToF-ToF (Bruker Daltonics, Billerica, Estados Unidos), em modo refletido. A fragmentação do peptídeo por MS/MS foi conduzida por meio da metodologia LIFT™ (Suckau *et al.*, 2003).

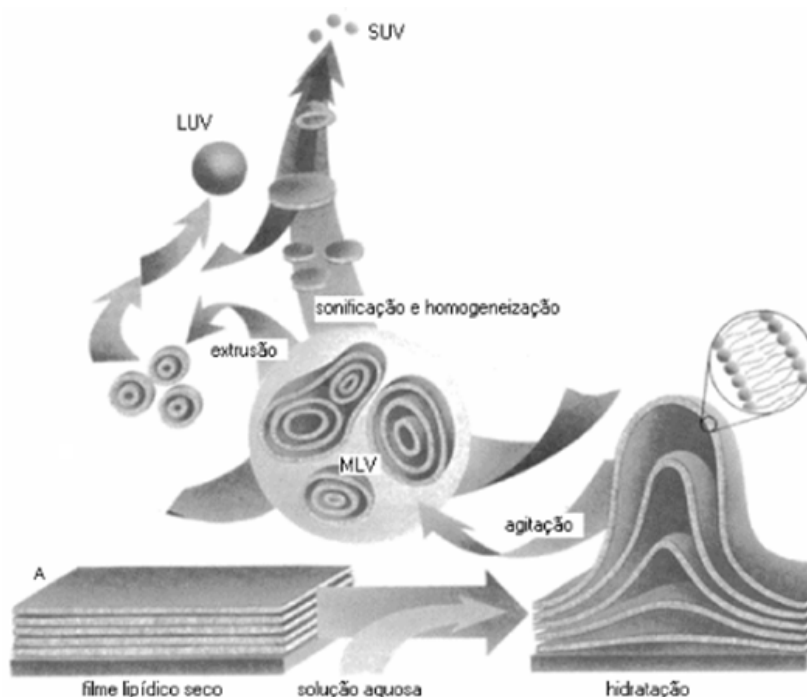
### **3.2.9 Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)**

Para preparação das vesículas pesa-se a quantidade necessária de lipídio em um tubo de ensaio de fundo largo. Os lipídios são dissolvidos em diclorometano e a eliminação do solvente é feita com um fluxo contínuo de N<sub>2</sub>, com rotação do tubo para formação do filme lipídico fino (Figura 12).

Os tubos contendo o filme lipídico são colocados em um sistema de vácuo por 1 h para evaporação de resíduos de solvente orgânico. A seguir adiciona-se 500 µL do tampão ou da solução contendo CF ou PTS ao tubo, e a suspensão é agitada até o descolamento completo do lipídio do tubo. Na suspensão formada temos as MLVs, grandes vesículas multilamelares com diversos diâmetros.

Para formar vesículas unilamelares e uniformizar o seu diâmetro, a suspensão foi extrusada, processo no qual a suspensão lipídica é forçada a

atravessar uma membrana de polycarbonato com poro de diâmetro conhecido (Patty, et al., 2003).



**Figura 12 - Representação esquemática da preparação de LUVs e SUVs (vesículas unilamelares pequenas). Em A o filme lipídico aderido ao tubo de ensaio (Ahyayauch, et al., 2006).**

Nos experimentos descritos aqui utilizamos duas membranas com poros de 100 nm de diâmetro, que são colocadas no centro do extrusor (LiposoFast, Avestin Inc.), entre duas placas de teflon com um furo no centro (Figura 13). A suspensão lipídica é colocada em uma das seringas e forçada a atravessar a membrana passando de uma seringa para outra por um número ímpar de vezes (em nosso trabalho fizemos onze passagens) (Figura 13). Esse processo deve ser realizado em uma temperatura acima da de transição de fase do lipídio. Após o processo de extrusão, o diâmetro das vesículas foi determinado por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) obtendo-se LUVs com um diâmetro médio em torno de 100 nm.



Figura 13 – Extrusor utilizado para a obtenção de LUVs (Ahyayauch, et al., 2006).

### 3.2.10 Fluorescência

Quando uma molécula no seu estado fundamental de energia é excitada, ela irá para qualquer nível vibracional de um estado excitado (Figura 11, estado fundamental representado por  $S_0$ , estado excitado representado por  $S_1$  e  $S_2$ ). Após esse processo, há perda de energia na forma de calor, ocasionando a passagem dos elétrons para níveis vibracionais menos energéticos e conversões internas entre os estados vibracionais (setas amarelas).

Diversos eventos podem resultar da perda de energia por calor. A molécula pode, por exemplo, perder energia o suficiente para voltar ao estado fundamental, liberando um fóton, fenômeno esse que é chamado de fluorescência, representado pela seta vermelha da Figura 14.

As moléculas também podem perder energia passando do estado  $S_1$  para um estado tripleto excitado ( $T_1$ ), através de um cruzamento inter-sistema (seta azul escura, Figura 11). Ainda é possível perder energia partindo desse estado para o estado fundamental ( $S_0$ ). Esse fenômeno é chamado de fosforescência (seta rosa).

Além disso, partindo de  $S_1$ , as moléculas podem perder energia numa forma não radioativa, voltando ao estado fundamental sem emissão de fóton (seta laranja).

O diagrama de Jablonski (Figura 14) representa todos esses fenômenos descritos que competem entre si havendo preferência pelo que possui menos tempo de vida (Lakowicz, 1999).

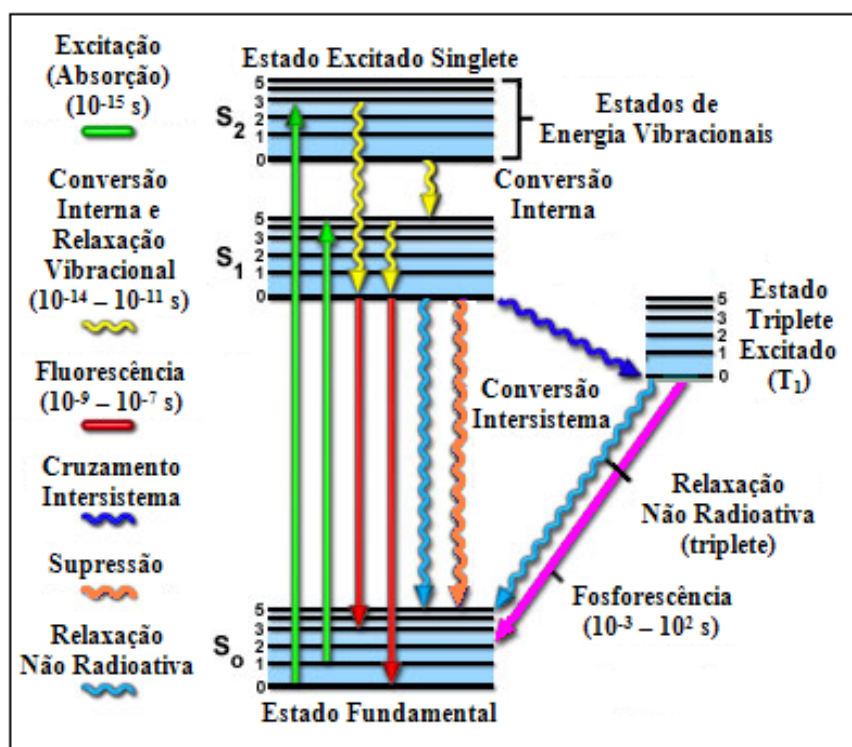
### 3.2.11 Supressão de Fluorescência

A supressão da fluorescência pode ocorrer por mecanismos colisional dinâmico ou estático. A supressão colisional dinâmica ocorre quando o fluoróforo, no estado excitado, é desativado após contacto com o supressor em solução, sem que ocorra alteração química. Já a supressão estática ocorre quando o fluoróforo, no estado excitado, retorna ao estado fundamental através da formação de uma ligação eletrônica com seu supressor. A diminuição da intensidade de fluorescência colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer (Lakowicz, 2006) (Equação 01).

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \quad \text{Equação 01}$$

Onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente,  $k_q$  é a constante de supressão bimolecular,  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor e  $[Q]$  é a concentração do supressor. A constante de supressão de Stern-Volmer é dada por  $K_D = k_q\tau_0$ .

O gráfico de  $F_0/F$  em função da  $[Q]$  intercepta o eixo y em 1 e a sua inclinação corresponde, portanto, ao  $K_D$ . A concentração de supressor necessária para suprimir 50 % da intensidade de fluorescência do fluoróforo é dada por  $K_D^{-1}$  onde  $F_0/F$  é igual a 2 (Lakowicz, 2006).



**Figura 14– Diagrama de Jablonski. Representação dos processos de absorção (seta verde) e relaxação de uma molécula e seus tempos característicos. Figura extraída e modificada de (Lakowics, 1999).**

No caso da 5(6)-carboxifluoresceína, CF, o mecanismo de auto-supressão ocorre por transferência de energia entre os monômeros de CF no estado excitado através de colisões com outros monômeros e com dímeros não fluorescentes em altas concentrações do fluoróforo ( $> 50$  mM). Em menores concentrações, o encontro de moléculas ocorre com menor frequência e portanto o fenômeno de auto-supressão não acontece.

### 3.2.12 Preparação de LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína

Os filmes lipídicos, com as composições lipídicas a serem estudadas, foram hidratados com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8, contendo 50 mM de CF. Prepararam-se suspensões de LUVs a partir de filmes de 6,5 mg de lipídeo total e 0,5 mL de tampão, resultando numa concentração final de fosfolipídios de 17 mM em média (concentração após dosagem de fosfato inorgânico). Os tubos foram agitados num

vórtex até descolamento total dos lipídios da parede formando a suspensão. As vesículas formadas dessa maneira eram multilamelares (MLVs). As MLVs foram extrusadas utilizando-se duas membranas de 100 nm de poro (ver detalhes na metodologia).

Depois da extrusão, a suspensão das LUVs contendo CF (0,5 mL) foi passada por uma coluna de Sephadex G-25 (ver abaixo), utilizando-se tampão de Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 300 mM como eluente, para que a força iônica dentro e fora das vesículas fosse igual. As LUVs contendo CF são eluídas no volume vazio da coluna ( $V_0$ ) enquanto a CF livre sai no volume interno da coluna ( $V_i$ ). As vesículas foram recolhidas num único tubo (aproximadamente 2 mL) e a concentração final de fosfolipídio era, em geral, 2 mM. As LUVs foram mantidas em banho de gelo até a sua utilização. A estabilidade destas vesículas a 8 °C é de cerca de 24 h.

A Sephadex-G25 foi hidratada previamente no tampão de eluição da coluna, foi deaerada e, após montagem de coluna (0,8 cm de diâmetro x 20 cm de altura), foi saturada com uma suspensão de vesículas de mesma composição das utilizadas na preparação com CF porém preparadas no tampão de eluição da coluna por sonicação por 20 min em banho de gelo.

### **3.2.13 Cinética de Vazamento das LUVs com Carboxifluoresceína**

Todas as cinéticas foram realizadas a 30 °C. No tempo zero, uma alíquota das LUVs contendo CF (em geral 5 µL de uma solução 2 mM em lipídio) foi adicionada a uma cela de fluorescência contendo 500 µL de tampão e, no tempo de 100 s, foi feita a adição de BP100. As alíquotas de BP100 adicionadas eram da ordem de 5 µL e adicionou-se no máximo 50 µL de BP100 de uma solução estoque

da ordem de 200  $\mu\text{M}$  (concentração final de 20  $\mu\text{M}$  na cela). A CF foi excitada em  $\lambda=490$  nm e monitorada em  $\lambda=512$  nm (Chen & Knutson, 2004).

A cinética de aparecimento de fluorescência foi seguida até 3.000 s. Após esse tempo, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de Polidocanol 10 % v/v para se obter o rompimento total das vesículas e obter a fluorescência máxima para o cálculo da porcentagem de vazamento.

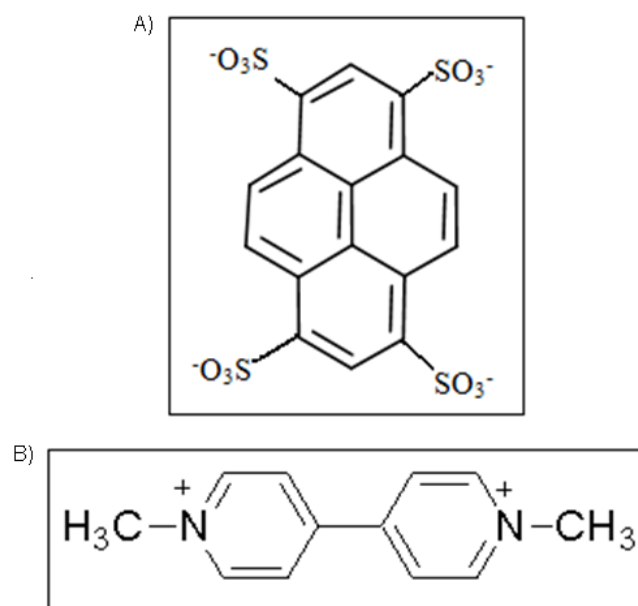
A porcentagem de vazamento em cada cinética foi calculada utilizando-se a equação 2, onde  $I_0$  é a intensidade de fluorescência inicial antes da adição de peptídeo, (após 100 s de cinética),  $I_{(t)}$  é a fluorescência no tempo escolhido, após adição do peptídeo, e  $I_{tot}$  é a fluorescência total após adição de detergente.

$$\% \text{ Vazamento} = \frac{I_{(t)} - I_0}{I_{tot} - I_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

### **3.2.14 Estudo da supressão de fluorescência de Pireno Tetrasulfonato de Sódio (PTS) por Metilviologênio (MV)**

Utilizamos o par fluoróforo/supressor PTS (1,3,6,8 – Pireno tetrasulfonato de sódio)/MV(Metil Viologênio) (Figura 15) uma vez que ele permite observar o vazamento das LUV em baixa força iônica.

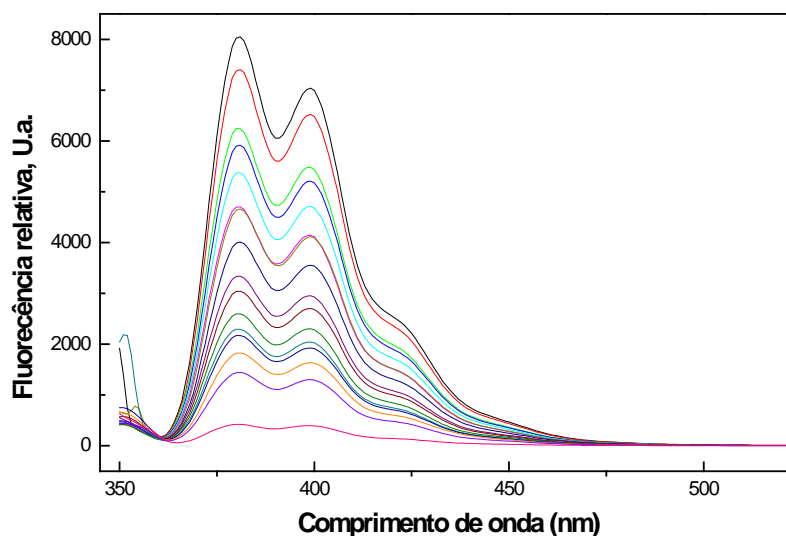
Para se determinar a concentração de MV adequada para suprimir a fluorescência do PTS registramos os espectros de emissão do PTS na ausência e presença de diferentes concentrações de seu supressor.



**Figura 15. A) Estruturas do 1,3,6,8 – Pireno tetrasulfonato de sódio (PTS) e B) Cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (Metil Viologênio - MV).**

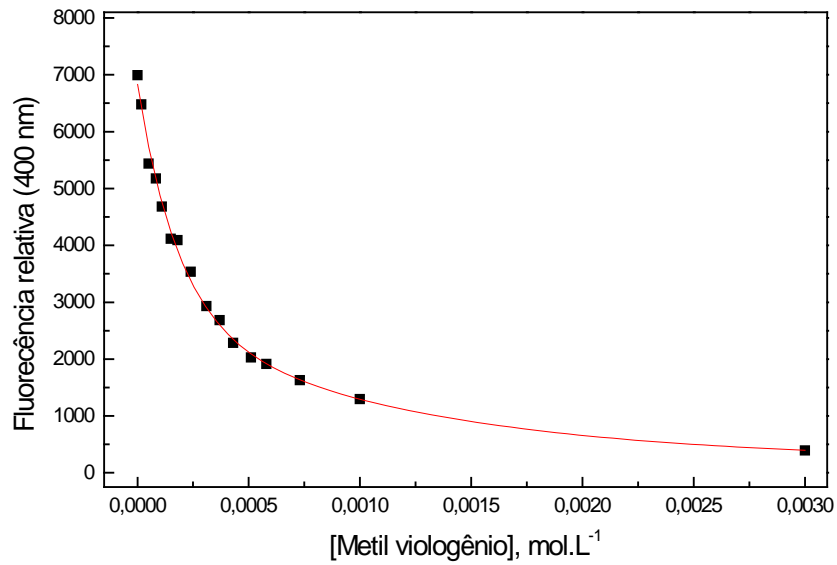
Uma amostra de 3 mL de PTS ( $1,7 \times 10^{-7}$  mol. L<sup>-1</sup>) em tampão acetato 0,01 mol x L<sup>-1</sup> pH 5,1 foi transferida para uma cubeta de quartzo fluorescência e excitada em 350 nm. O espectro de emissão foi registrado em uma faixa de comprimento de onda de 350 a 500 nm. A maior intensidade de fluorescência foi observada na ausência de supressor com dois picos mais intensos, em 381 nm e em 400 nm. Com a adição do MV observa-se uma gradual redução da intensidade de fluorescência dependente da concentração do supressor, Figura 16.





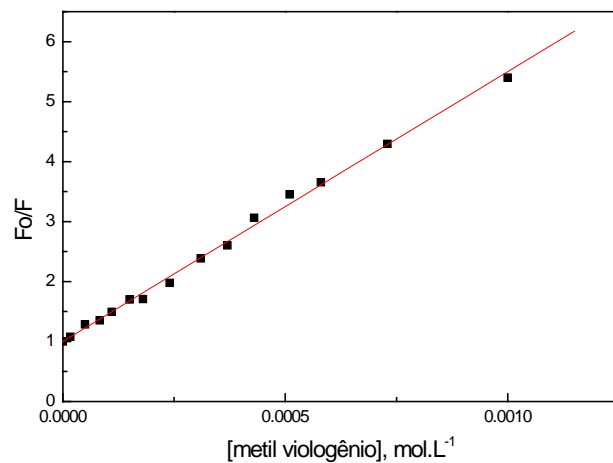
**Figura 16 – Espectros de emissão do PTS ( $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão acetato  $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,1.  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ . MV ( $\text{mol.L}^{-1}$ ): (—) 0; (—)  $1,7 \times 10^{-5}$ ; (—)  $5,0 \times 10^{-5}$ ; (—)  $8,3 \times 10^{-5}$ ; (—)  $1,1 \times 10^{-4}$ ; (—)  $1,5 \times 10^{-4}$ ; (—)  $1,8 \times 10^{-4}$ ; (—)  $2,4 \times 10^{-4}$ ; (—)  $3,1 \times 10^{-4}$ ; (—)  $3,7 \times 10^{-4}$ ; (—)  $4,3 \times 10^{-4}$ ; (—)  $5,1 \times 10^{-4}$ ; (—)  $5,8 \times 10^{-4}$ ; (—)  $7,3 \times 10^{-4}$ ; (—)  $1,0 \times 10^{-3}$ ; (—)  $3,0 \times 10^{-3}$ .**

Na Figura 17 está o gráfico da intensidade de fluorescência a 400 nm do PTS vs [MV]. Pode-se observar o decaimento exponencial da intensidade de fluorescência do PTS em função da concentração do MV. Observamos que, em  $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de MV, aproximadamente 85% da fluorescência do PTS é suprimida. Concentrações maiores do PTS contribuem pouco para o decréscimo da intensidade de fluorescência mas aumentam muito a força iônica do meio. Como o objetivo destes experimentos é usar força iônica baixa, estabelecemos a concentração de 1 mM de MV como adequada para verificar o vazamento de PTS.



**Figura 17 - Intensidade de fluorescência do PTS (400 nm) em função da concentração do MV.**

O gráfico da intensidade de fluorescência do PTS em função da concentração do supressor segundo a equação de Stern-Volmer é linear e intercepta o eixo Y em 1 (Figura 18).



**Figura 18 - Gráfico de Stern-Volmer. Razão das intensidades de fluorescência do PTS em função da concentração de MV.**

Portanto, a concentração de MV necessária para suprimir metade da intensidade de fluorescência do PTS ( $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ ) em tampão acetato  $0,01 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$  pH 5,1 é de  $2,34 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ . Estes experimentos foram realizados por Thiago Benz Pisco e Katia Regina Perez em nosso laboratório.

### **3.2.15 Preparação de LUVs com Pireno Tetrasulfonato de Sódio (PTS)**

Uma solução de PTS  $0,001 \text{ M}$  em água foi adicionada aos filmes lipídicos (em geral  $0,5 \text{ mL}$  para  $6,5 \text{ mg}$  de lipídio). Os tubos foram agitados até descolamento total dos filmes da parede e posteriormente foram colocados em banho de gelo seco e álcool até congelamento, alternando com banho a  $37^\circ \text{ C}$  até descongelamento, por 5 vezes. Depois desta etapa as vesículas foram extrusadas por duas membrana de poro de  $100 \text{ nm}$  e a separação das LUVs contendo PTS da sonda externa foi feita através de cromatografia por Sephadex G-25, eluindo-se as LUVS com tampão Tris HCl  $20 \text{ mM}$ , pH 8 (item 3.3.1 da metodologia). O volume de LUVs recolhido era de cerca de  $1 \text{ ml}$  e a concentração de lipídio era, em geral, de  $2 \text{ mM}$ .

### **3.2.16 Cinética de vazamento de LUV contendo PTS em presença de Metilviologênio.**

Os experimentos de vazamento das LUV contendo PTS foram realizados a  $30^\circ \text{ C}$  e a fluorescência foi monitorada continuamente em  $382 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ). Alíquotas de  $5 \mu\text{L}$  das LUVs com PTS eluídas da coluna de Sephadex-G25 foram adicionadas a uma cubeta contendo  $500 \mu\text{L}$  de MV  $1 \text{ mM}$  (Figura 17 B) em tampão TRIS HCl  $20 \text{ mM}$  pH 8.

Ao final de cada experimento, a supressão de fluorescência máxima do PTS encapsulado foi determinada após a adição de 10  $\mu\text{L}$  de Polidocanol 10% (p/p) e a porcentagem de vazamento foi calculada pela equação 03.

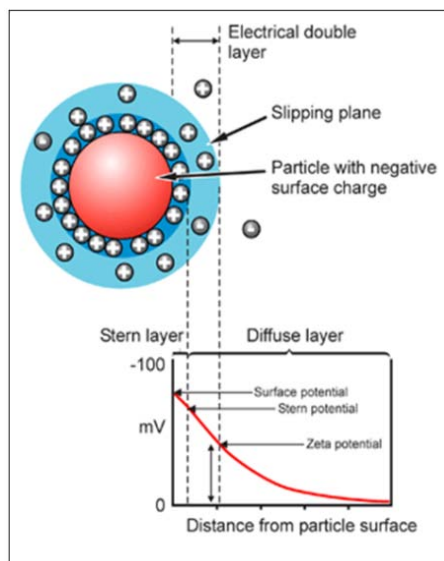
$$\% \text{ Vazamento} = [(I_0 - I_{(t)}) / (I_0 - I_{tot})] \cdot 100 \quad \text{Equação 03}$$

Onde  $I_0$  é a intensidade de fluorescência inicial antes da adição de peptídeo (após 100 s de cinética),  $I_{(t)}$  é a fluorescência no tempo escolhido, após adição do peptídeo, e  $I_{tot}$  é a fluorescência total após adição de detergente.

### **3.2.17 Determinação da Mobilidade Eletroforética e Potencial Zeta**

Algumas partículas dispersas em um sistema aquoso podem adquirir uma carga de superfície, principalmente através da ionização de grupos superficiais ou adsorção de espécies carregadas do meio. Essas cargas superficiais modificam a distribuição dos íons circundantes, resultando em uma camada ao redor da partícula, que é diferente da solução.

Como a partícula se move em movimento browniano, esta camada ao redor da partícula se move como parte dela. O potencial zeta é o potencial no ponto limite desta camada, interface entre os íons adsorvidos na camada e a solução, também chamado de “slipping plane”. A carga nesta interface é muito sensível à concentração e ao tipo de íons em solução (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema mostrando o plano da interface onde é medido o potencial zeta de uma partícula carregada negativamente. A primeira camada de íons adsorvidos, chamada de Stern Layer, é onde se encontram os íons positivos, que se movem com a partícula, representada em azul escuro. O “slipping plane” é o plano em que há o movimento de íons, representado em azul claro. Essas duas camadas são chamadas de “Electrical double layer” ou dupla camada elétrica.

O potencial zeta é uma das principais forças que permeiam as interações interpartículas. Partículas com um elevado potencial de mesma carga, positiva ou negativa, irão se repelir. Convencionalmente, um potencial zeta elevado pode ser elevado em um sentido positivo ou negativo, ou seja, valores menores de -30 mV e valores maiores de 30 mV, ambos seriam considerados como potenciais zeta elevado. Para que moléculas e partículas, que são pequenas o suficiente e de densidade consideravelmente baixa, se mantenham em suspensão, um alto potencial zeta confere estabilidade, ou seja, a solução ou dispersão irá resistir a agregação das partículas.

A medida é feita através da aplicação de um campo elétrico através da dispersão. As partículas dentro da dispersão com um potencial de superfície irão migrar para o eletrodo de carga oposta, com uma velocidade proporcional à magnitude do seu potencial zeta. A velocidade da partícula nesse campo elétrico é

medida através da técnica de anemometria laser Doppler. A mudança de frequência ou fase de um feixe de laser incidente nessas partículas em movimento é medido como a mobilidade das partículas (mobilidade eletroforetica) e esta mobilidade é convertida para o potencial zeta, introduzindo a viscosidade do dispersante e a aplicação das teorias Smoluchowski ou Huckel. Neste projeto foram utilizados os valores obtidos do aparelho Zetasizer Nano em mobilidade eletroforética (Zetasizer manual - Equação 4).

A relação entre a mobilidade eletroforetica e o potencial zeta é dada pela equação 4 (aproximação de Smoluchovski):

$$U_E = 2\varepsilon z f(ka) / 3\eta$$

Equação 04

Aonde o  $U_E$  é a mobilidade eletroforetica,  $\varepsilon$  é a constante dieletrica,  $f(ka)$  é a função de Henry e  $\eta$  é a viscosidade.

### **3.2.18 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico**

Partículas suspensas num meio líquido nunca estão em estado estacionário, possuindo movimento constantemente. Esse movimento, chamado de movimento Browniano, ocorre devido à colisão das moléculas do líquido que circundam a partícula. Pequenas partículas se movem mais rapidamente que partículas maiores. A relação entre o tamanho e a velocidade do movimento Browniano da partícula é definida pela Equação de Stokes-Einstein.

Partículas pequenas, quando iluminadas, possuem a característica de espalharem luz, caracterizando o movimento Browniano. Assim, o espectro de luz que atravessa essa amostra será composto de áreas claras e escuras onde não há

luz detectada. As áreas claras ocorrem onde o espalhamento de luz causado pelas partículas e possuem a mesma fase de onda, resultando numa interferência construtiva. As áreas negras ocorrem onde as ondas de luz, causadas pelo espalhamento, são destrutivas e cancelam umas as outras.

O pontilhado resultante das áreas claras e escuras causadas pelo espalhamento de luz que atravessa uma suspensão se moverá devido ao movimento das partículas variando com certa intensidade e irá caracterizar esse movimento com uma flutuação da intensidade.

O aparelho Zetasizer faz medidas de espalhamento de luz dinâmico, o qual mede o movimento Browniano e o relaciona com o tamanho das partículas pela relação de Stokes-Einstein. Essa medida é feita com a iluminação das partículas com um laser e analisa a intensidade de flutuação do espalhamento de luz. O aparelho possui um correlador que mede o grau de similaridade entre dois sinais num período de tempo. A função de correlação varia conforme o tamanho da partícula e assim que a função de correlação é medida, essa informação é utilizada para calcular a distribuição de tamanho.

### **3.2.19 Preparação das LUVs para os experimentos de diâmetro hidrodinâmico e mobilidade eletroforética**

Os filmes lipídicos de 6,5 mg foram suspensos em 0,5 mL de tampão de TRIS HCl 0,01 M pH 8, agitados até descolamento total do lipídio da parede do tubo de ensaio para o tampão e após esse processo foi feita a extrusão com uma membrana de poro de 100 nm.

Para as medidas de mobilidade eletroforética e de diâmetro cerca de 5-10  $\mu$ L de suspensão lipídica (concentração inicial de 5 mM, em média) foi adicionada a uma cubeta de acrílico e completou-se o volume com tampão para 1 mL.

As primeiras medidas de cada preparação foram feitas sem adição de BP100 e, em seguida, foram adicionadas alíquotas de peptídeo, com concentração final de 1  $\mu\text{M}$  de BP100 a cada adição, até se alcançar uma concentração final de 25  $\mu\text{M}$  de peptídeo na cela.

As condições e parâmetros utilizados para os experimentos foram:

1- Água como dispersante, índice de refração 1,33; viscosidade 0,792 cP, constante dielétrica 76,8 e temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ . Foram feitas em geral 3 corridas por amostra tanto para as medidas de mobilidade eletroforetica quanto para as de diâmetro e o resultado é a media dos 3 valores.

Após os experimentos foi feita a dosagem de fosfato inorgânico como já descrito anteriormente no item 4.2.2 para determinação da concentração real de lipídios na suspensão e cálculo da relação de peptídeo/lipídio.

### **3.2.20 Dicroísmo Circular**

Moléculas que possuem diversos centros quirais, como proteínas e peptídeos, podem interagir com a luz incidente e alterar sua polarização. Assim, a técnica de dicroísmo circular (CD) utiliza esse efeito para determinar a estrutura secundária de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (Kelly, *et al.*, 2005).

A técnica do dicroísmo consiste na absorção por uma molécula de uma luz circularmente polarizada. A luz circularmente polarizada é composta por uma componente que gira em sentido anti-horário (L) e outra que gira no sentido horário (R), as duas de mesma magnitude (Figura 19)

Quando essa luz passa pela amostra, as componentes R e L são absorvidas, na mesma proporção, não é gerado nenhum sinal de CD. Porém, quando existe uma diferença de absorção das duas componentes R e L, o sinal de CD é diferente de zero (Kelly, *et al.*, 2005) (Figura 20).



O equipamento JASCO J-810 mede a diferença de absorção entre as duas componentes R e L (Equação 5). Alguns equipamentos apresentam os dados em elipticidade dicróica ( $[\Theta]$ ), que é definida pela relação:  $\tan^{-1} \theta = b/a$ , onde a razão  $b/a$  é a relação entre o menor e o maior eixo da elipse (Kelly, et al., 2005).

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda)$$

Equação 05

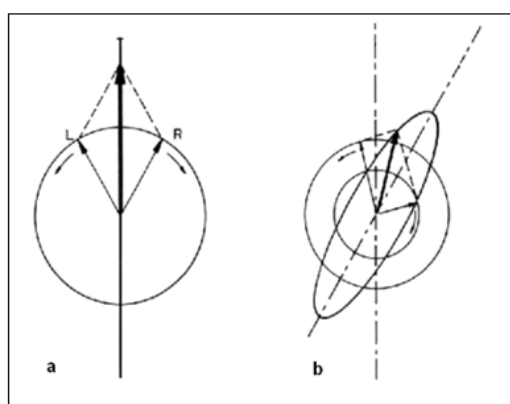


Figura 20. Luz circularmente polarizada da técnica de CD. (a) As componentes L e R polarizadas circularmente a um plano de radiação, são duas componentes representadas com a mesma amplitude após atravessar uma amostra não quiral, gerando um plano polarizado de radiação (soma dos vetores representado pela seta mais grossa, calculado pela soma dos vetores - linhas pontilhadas) (b) As componentes de diferentes magnitudes depois que atravessam uma amostra quiral, geram uma resultante elipticamente polarizada (linha pontilhada) (Kelly, et al., 2005).

Os dados de CD podem ser apresentados em diferença de absorbância ( $\Delta A$ ), elipticidade dicróica e elipticidade molar. Neste dissertação, os resultados foram transformados os valores de diferença de absorbância em elipticidade molar (Equação 06), onde  $\Theta_\lambda$  é a diferença de absorbância dada pelo aparelho,  $m$  é a concentração em molar e  $d$  é o caminho óptico da cubeta (utilizado 0,5 mm) (Kelly, et al., 2005).

$$[\Theta]_{\text{molar},\lambda} = 100 \times \Theta_\lambda / m \times d$$

Equação 06

Os tipos de gráficos que podem ser obtidos pelo espectro de CD, devido às diferentes estruturas existentes em moléculas quirais, como as proteínas, estão representados na Figura 13. Há diferentes tipos de estrutura secundária em proteínas. Na Figura 20 a linha preta, por exemplo, representa uma estrutura em  $\alpha$ -hélice, com duas bandas negativas em 208 e 222 nm e uma banda positiva em 198nm.

Uma estrutura em  $\beta$  antiparalélarepresentada pelo gráfico de linha vermelha com um pico positivo em 195nm e um negativo em 217nm. Além dessas estruturas mais conhecidas ainda existem as estruturas estendidas, de tripla hélice e desnaturada representada pelo colágeno (Figura 16).

Uma estrutura em  $\beta$  antiparalélarepresentada pelo gráfico de linha vermelha com um pico positivo em 195nm e um negativo em 217nm. Além dessas estruturas mais conhecidas ainda existem as estruturas estendidas, de tripla hélice e desnaturada representada pelo colágeno (Figura 21).


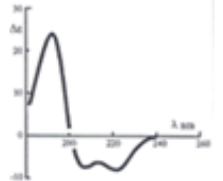
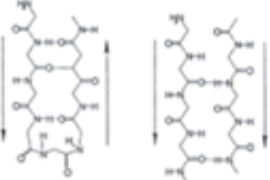
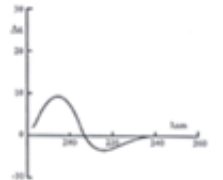
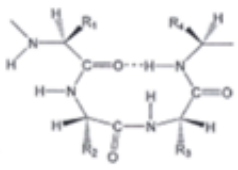
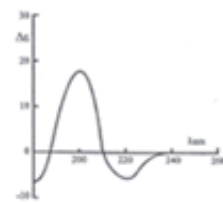

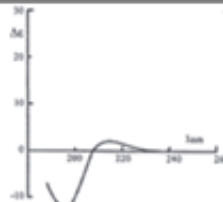

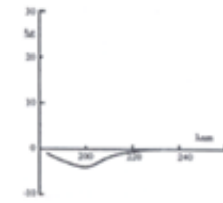
Conformação	Estrutura secundária	Espectro de CD
$\alpha$ -hélice		
Folha $\beta$ paralela e antiparalela		
$\beta$ turn		
Poliprolina		
Desordenada		

Figura 21 – Espectro de CD de  $\alpha$  - hélice ( $\alpha$  - helix), folha -  $\beta$  ( $\beta$ -sheet) e estrutura,  $\beta$  turns, Prolina e desordenada (Coil). Figura extraída de <http://www.photophysics.com/secondarystructure.php>.

### 3.2.21 Preparação das amostras para o Dicroísmo Circular, CD:

Os espectros de CD foram feitos com acúmulo de 4 varreduras (50 nm/s) de 190 a 250 nm em água a 25°C, numa cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5 mm, com aproximadamente 300  $\mu$ L de volume. Dos espectros com LUVs e peptídeo foi subtraído o das LUVs em água.

As análises de dicroísmo circular foram feitas primeiramente com soluções de BP100 em água. Várias concentrações de peptídeo foram utilizadas para análise de qual concentração seria suficiente para resultar num bom sinal no aparelho entre 190 e 250 nm. A concentração de 50  $\mu$ M de BP100 se pareceu mais adequada para a posterior medida com as adições de lipídio. O espectro da água pura foi feito e subtraído de todas as medidas nas várias concentrações do peptídeo.

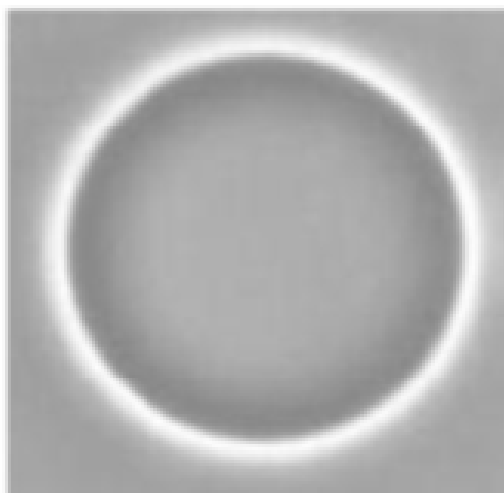
As LUVs foram feitas com 3 mg de lipídeo em 1 mL de água, Para cada solução LUVs na concentração adequada na cela de CD era feito um espectro. Em seguida adicionava-se à cela cerca de 50  $\mu$ L de BP100 280 mM para um volume final de 300  $\mu$ L. As medidas de CD de cada preparação de LUVs e em diferentes concentrações foram feitas independentemente e o espectro obtido das vesículas foi subtraído das medidas de BP100 com as respectivas LUVs. Várias composições lipídicas foram analisadas e em diferentes razões peptídeo/lipídeo. Este trabalho foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Antonio de Miranda, e da sua aluna Tatiana M. Domingues do INFAR/UNIFESP.

### **3.2.22 Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)**

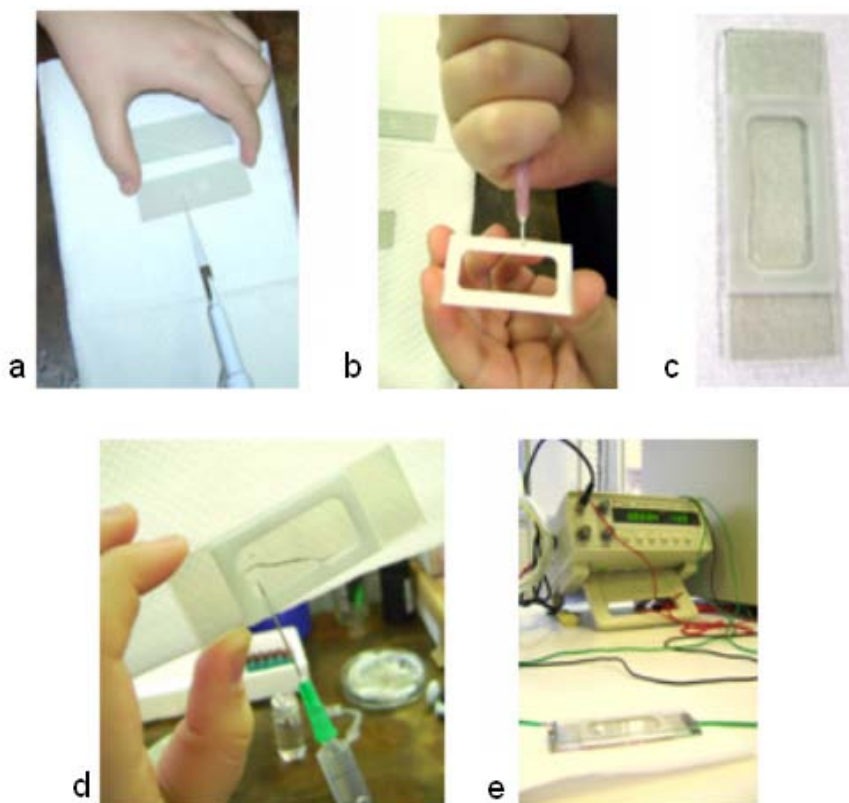
As GUVs foram preparadas em colaboração com a Profa. Dra. Karin do A. Riske da UNIFESP utilizando-se o processo de eletroformação (Angelova e Dimitrov, 1986). A metodologia se inicia com o espalhamento de 10  $\mu$ L de uma suspensão lipídica em clorofórmio (2 mg/ml) sob duas lâminas de microscópio recobertas com um polímero de óxido de estanho dopado com flúor, que conduz corrente elétrica (Figura 23 a). O clorofórmio foi evaporado com um fluxo de nitrogênio formando um filme lipídico (Figura 23 b). As lâminas foram colocadas com as superfícies condutoras voltadas uma para a outra, separadas por uma moldura de teflon de 2 mm de espessura (Figura 23 c). A câmara formada foi preenchida com uma solução

aquosa de sacarose  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (Figura 21 d) e conectada a um gerador de corrente alternada onde foi aplicada uma diferença de potencial de 1 V com uma frequência de 10 Hz durante 1 hora (Figura 23 e). Após este período, a suspensão de GUVs foi coletada e diluída ~10 vezes em uma solução aquosa de glicose  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  para manter a mesma pressão osmótica (Riske e Dimova, 2005). As osmolaridades das soluções de glicose e sacarose eram idênticas.

A diluição em glicose confere um alto contraste óptico às vesículas quando observadas por contraste de fase, devido à diferença de índice de refração das soluções de sacarose e glicose. Além disso, pelo fato de a sacarose ser mais densa que a glicose, as vesículas sedimentam-se, facilitando sua observação por microscopia óptica. A Figura 22 mostra uma GUV com sacarose dentro e glicose fora visualizada por contraste de fase, onde os tons de cinza de dentro e de fora das GUVs são diferentes.



**Figura 22 – Modelo de visualização das GUVs pelo contraste de fase.**



**Figura 23 – Esquema das etapas da fabricação de GUVs pelo método de eletroformação. a) Espalhamento de 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão lipídica em clorofórmio (2 mg/ml) sob duas lâminas de microscópio recobertas com um polímero de óxido de flúor, que conduz corrente elétrica, b) O clorofórmio foi seco sob um fluxo de nitrogênio formando um filme lipídico, c) As lâminas foram colocadas com as superfícies condutoras voltadas uma para a outra, separadas por uma moldura de teflon de 2 mm de espessura, d) A câmara formada foi preenchida com uma solução aquosa de sacarose 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, d) A câmara preenchida foi conectada a um gerador de corrente alternada onde foi aplicada uma diferença de potencial de 1 V com uma frequência de 10 Hz durante 1 hora.**

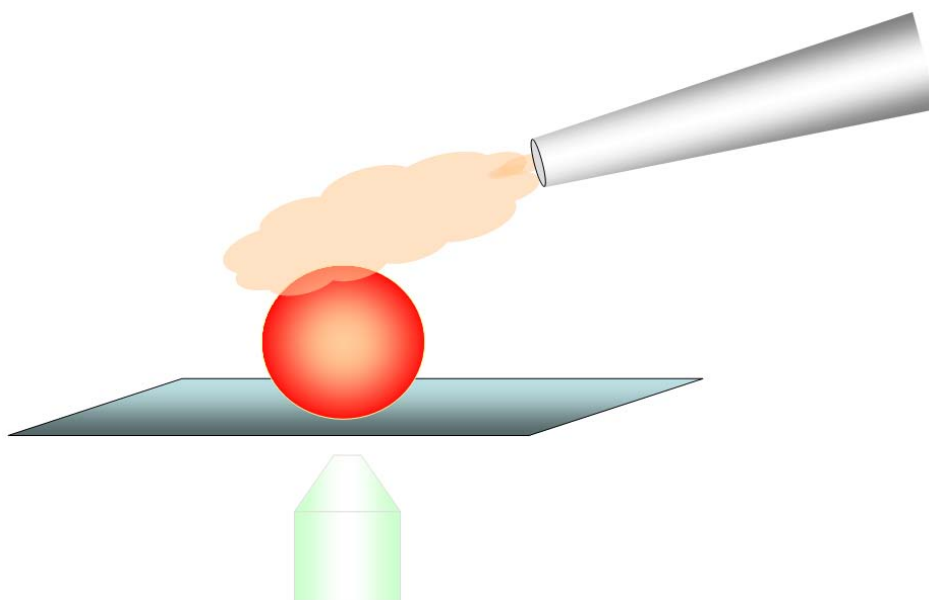
### 3.2.23 Microscopia Óptica

As observações de GUVs foram feitas em um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 (Jena, Germany) equipado com objetivas de contraste de fase com aumento de 20 x, 40 x e 63 x, uma câmera digital Zeiss AxioCam HSm e um sistema de injeção e micromanipulação do Laboratório de Biomembranas da Unifesp, sob responsabilidade da Profa. Dra. Karin A. Riske.

Dois protocolos experimentais diferentes foram utilizados. No primeiro, uma vez determinado o campo de visualização contendo uma ou mais GUVs, uma solução do peptídeo BP100 (0,5-1x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>) foi injetada com o auxílio de uma

micropipeta de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, conforme representado na Figura 23.

O microscópio Zeiss, que pertence ao Laboratório de Cristalografia do IFUSP, possui um sistema de micropipeta acoplado (Sutter Instrument). Esse sistema permite que, através de uma micropipeta de vidro, uma solução seja injetada nas vizinhanças das GUVs, enquanto que estas são observadas pelo microscópio óptico. Isso permite que qualquer alteração na bicamada lipídica, devido a essa injeção, seja observada e gravada. O sistema de injeção está representado na Figura 24.



**Figura 24 – Representação esquemática da injeção de solução ao redor das GUVs. A GUV é representada pelo círculo vermelho, a solução está em laranja, a lamínula em azul, a micropipeta em cinza e a objetiva em verde.**

No segundo arranjo, a cela de observação foi preenchida com uma solução de 10-50  $\mu\text{M}$  de BP100 preparada em 0,2 M glicose. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  da suspensão de GUVs preparadas em sacarose foi adicionada à cela e a filmagem foi rapidamente iniciada.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Estudo da cinética de vazamento de LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína (CF)**

O objetivo desta série de experimentos foi verificar a relação entre a carga das vesículas e as propriedades de permeabilização da bicamada pelo BP100.

As LUVs contendo CF foram preparadas como descrito em Métodos. As concentrações de lipídio finais na cela de fluorescência são fornecidas na legenda das figuras bem como a razão molar de peptídeo/lipídeo em cada experimento. O BP100 foi adicionado na cela após 100 s em todos os experimentos. O polidocanol foi adicionado em tempos diferentes, dependendo da cinética, sendo em geral após 3.000 s. A adição pode ser observada pelo salto de fluorescência que aparece no traçado de fluorescência vs tempo em cada figura. As concentrações de BP100 utilizadas nesta série de experimentos estão na Tabela 2.

#### **4.1.4 Estudo do efeito de BP100 em LUVs de PC 100%.**

O primeiro experimento foi verificar se as LUVs de PC 100 % contendo CF eram estáveis durante tempo de estudo. A fluorescência de vesículas de PC 100% contendo CF foi monitorada por 1.700 s (Figura 25 A). Observou-se um pequeno aumento de fluorescência em função do tempo correspondendo, após 1.700 s, a 1,5 % do total de fluorescência obtida após a adição de polidocanol. Portanto as vesículas eram estáveis o suficiente para estudarmos a atividade do BP100. É importante salientar que o meio externo das LUVs continha Tris/HCl 0.01 M pH 8 e NaCl 0,3 M, portanto com alta força iônica.

O efeito da concentração de BP100 sobre o vazamento de LUVs com 100 % de PC foi estudado mantendo-se fixa a concentração de LUVs em cada experimento

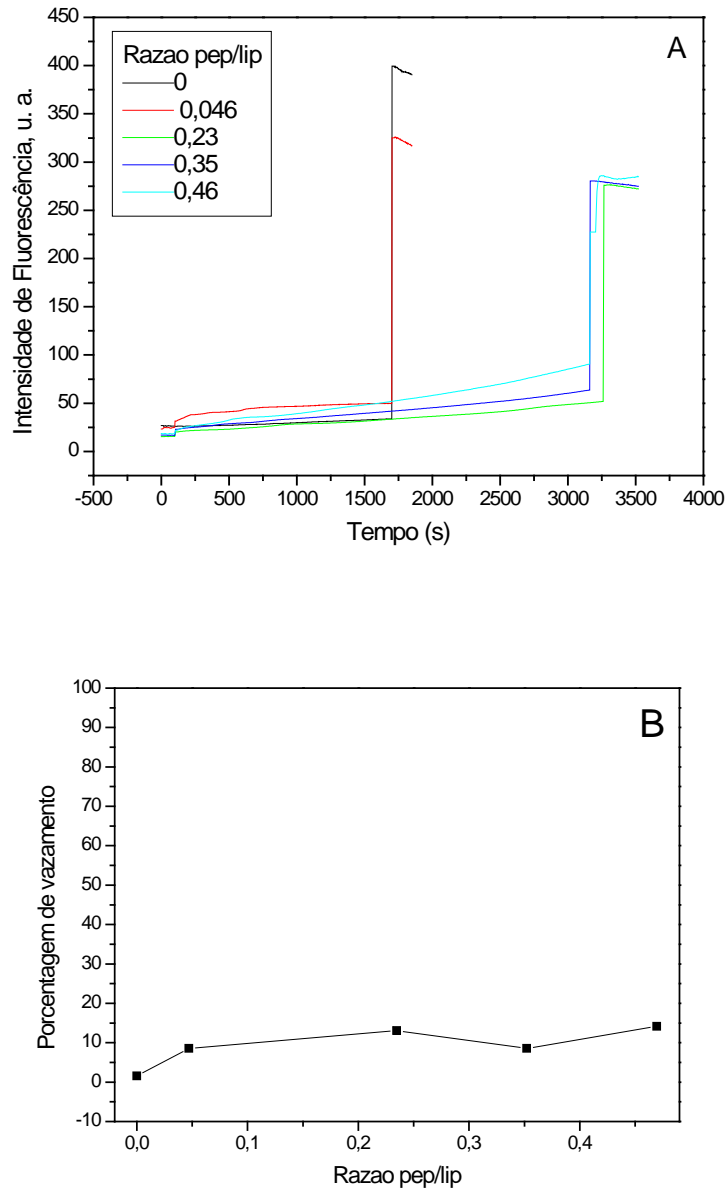


e variando-se a concentração de peptídeo. Para cada concentração de peptídeo utilizada monitorou-se o aumento de fluorescência da CF em função do tempo (Figura 25 A).

Estudou-se o efeito de BP100 no vazamento de CF nas razões molares de peptídeo:lipídio (pep:lip) entre 0,046 e 0,46. Observou-se que o BP100 induziu um aumento linear da intensidade de fluorescência em função do tempo, que foi tanto maior quanto maior a concentração do peptídeo (Figura 25 A). A menor concentração de peptídeo utilizada foi de 1  $\mu\text{M}$ , que está abaixo da menor MIC do BP100 descrita por Ferre *et al.* 2009, que é de 2,5  $\mu\text{M}$ . Essa concentração corresponde a uma relação pep:lip de 0.046 no experimento da Figura 24 A (ver dados na Tabela 2). A maior [BP100] utilizada foi de 10  $\mu\text{M}$  (um pouco acima da maior MIC de 7,5  $\mu\text{M}$ ) que corresponde uma razão pep:lip de 0,46 (linha azul clara, Figura 25 A). A concentração de fosfolipídio utilizada nestes experimentos foi 21,3  $\mu\text{M}$ . Como cerca de 50 % dos lipídios estão na face externa e 50 % na face interna das LUVs, a razão pep:lip é próxima de 1 (0,92) quando usamos 10  $\mu\text{M}$  de BP100, ou seja, 1 peptídeo para cada fosfolipídio da face externa das LUVs.

A velocidade de vazamento de CF, para todas as razões pep:lip estudadas, é ligeiramente maior do que na cinética controle sem o peptídeo (Figura 25 A, linha negra). As porcentagens de vazamento das vesículas, calculadas após 2.500 s, em função da relação peptídeo/lipídeo são mostradas na Figura 25 B. Observa-se nessa figura que, mesmo utilizando concentrações de BP100 maiores que a maior MIC, o vazamento não passou de 14 % em 2.500 s. Portanto, o BP100 altera pouco a permeabilidade da bicamada de vesículas de PC, até a concentração de BP100 usada, provavelmente porque a constante de associação do BP100 com as LUVs

com é muito baixa e a força iônica é muito alta, o que não favorece a ligação do BP100.



**Figura 25. Vazamento de CF de LUVs de PC 100 mol%. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico. Nas cinéticas de 0 e 0,046 peptídeo/lipídeo a adição de polidocanol foi em 1700 s e nas demais após 3.000 s. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função das razões pep/lip, mol/mol, determinada em 2.500 s, exceto para zero e 0,046 pep:lip aonde o tempo utilizado para o cálculo foi em 1.500 s. A concentração de lipídio na cela foi 21,3  $\mu$ M.**

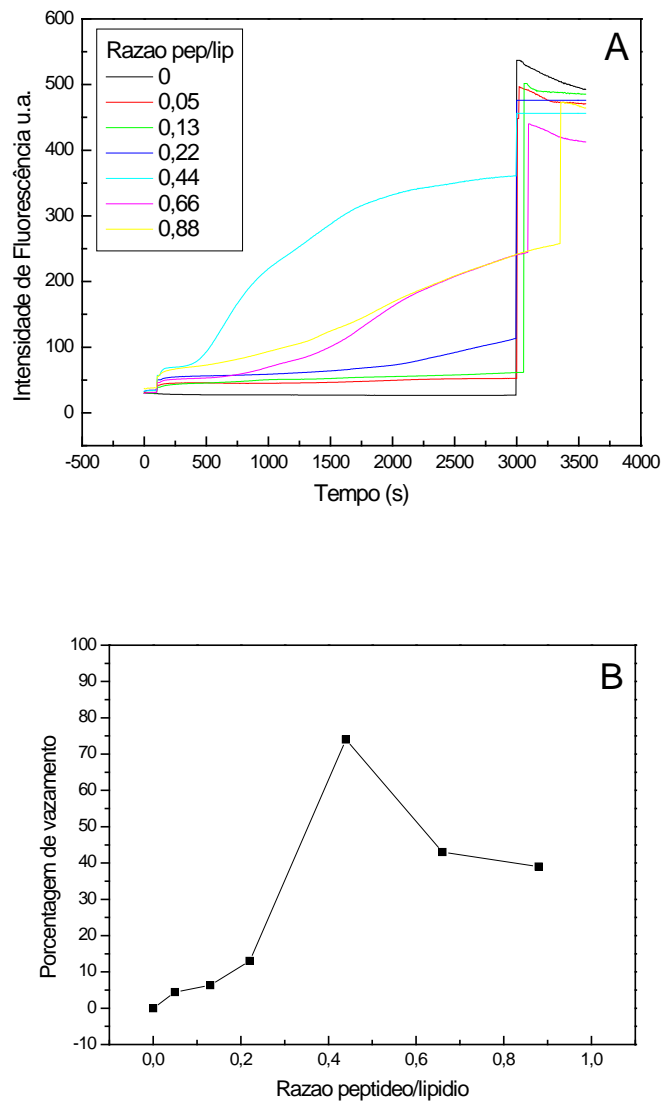
#### 4.1.5 Cinéticas de vazamento de CF de LUVs de PC:PG 9:1 com BP100.

Estudamos o efeito de BP100 no vazamento de CF em LUVs de PC:PG 9:1 mol/mol (Figura 26 A). Nas cinéticas com BP100, em razões pep:lip entre 0,05 e 0,13, a fluorescência aumentou linearmente em função do tempo. Notamos um pequeno aumento de fluorescência imediatamente após a adição do BP100, chegando a 15% de vazamento, o que é devido a uma alta concentração local do peptídeo no momento da adição (Figura 26 A). Este efeito se repetiu nas demais cinéticas.

Nas razões pep:lip acima de 0,22 observaram-se cinéticas bifásicas, da variações de fluorescência vs tempo. Observou-se uma curva sigmoideal de fluorescência vs tempo em razões pep:lip maiores (Figura 26 A). Calculamos a % de vazamento após 2.500 s para todas as cinéticas e o gráfico de % vazamento vs razão pep:lip é mostrado na Figura 25 B. Observa-se que a % de vazamento atinge um valor máximo de 74% para a razão pep:lip de 0,44 diminuindo para razões mais altas. Se considerarmos que a vesícula possui 50 % dos lipídios na face externa e na interna, a razão 0,44 corresponde a uma razão pep:lip próxima de 1:1, considerando-se apenas a concentração de lipídios fora das LUVs.

O efeito do BP100 no vazamento de CF com PC:PG 9:1 é significativamente diferente do observado nas vesículas com 100 % PC. Aparentemente ocorre uma organização do BP100 na membrana da vesícula, que é lenta, e que facilita o extravasamento da CF para o meio.

Após a organização do BP100 na bicamada da membrana, ocorre uma cinética rápida de vazamento de CF ("burst"). A fase lenta posterior pode ser atribuída a cinética de passagem do BP100 de uma vesícula para outra.



**Figura 26. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 9:1 mol:mol. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas razões peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função das razões peptídeo/ lipídeo após 2.500 s. A concentração de lipídios foi de 11,3  $\mu$ M.**

#### 4.1.6 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 8:2 com BP100.

Nas cinéticas de BP100 com LUVs de PC:PG 8:2 na razão 0,06 de peptídeo/lipídeo, o vazamento da CF das vesículas de PC:PG 8:2 foi igual ao do experimento controle e a cinéticas foi linear. Nas razões pep:lip iguais ou superiores

a 0,15 ocorreu um aumento não linear de fluorescência e nas razões de pep:lip de 0,3 e 0,4 observou-se uma cinética trifásica, apresentando uma etapa inicial de vazamento de CF lenta seguida de etapas mais rápidas (Figura 27 A)

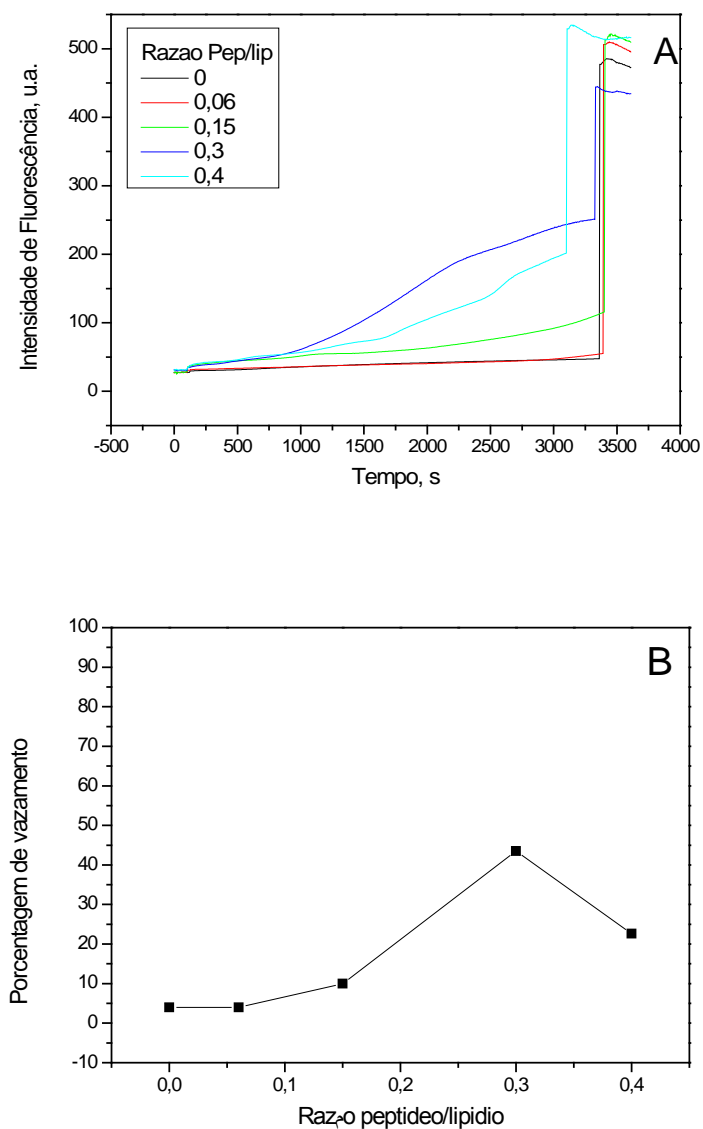
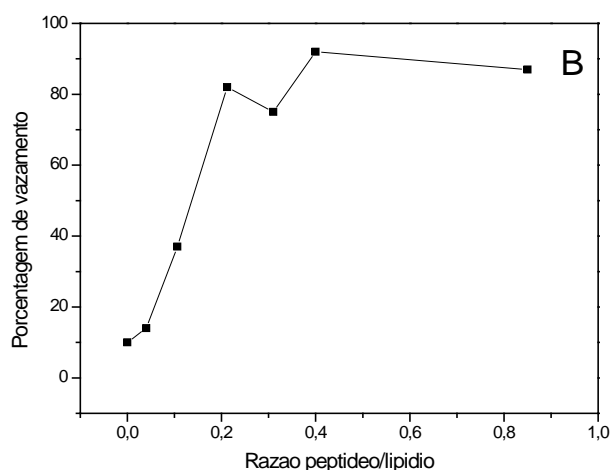
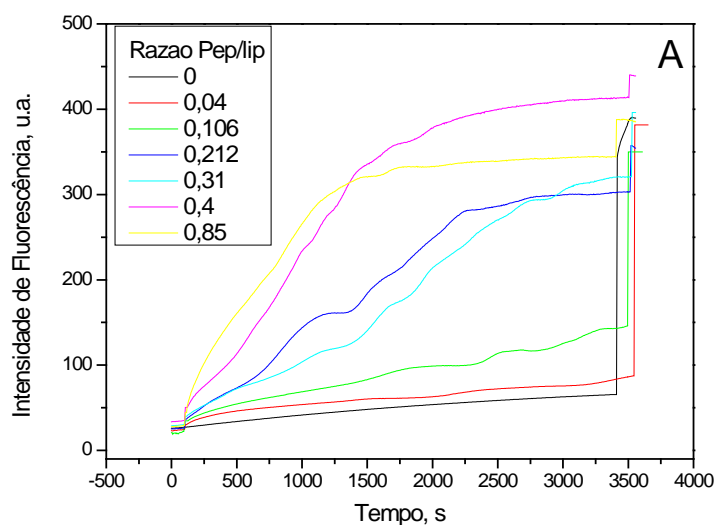


Figura 27. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 8:2. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lípídeo indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lípídeo. A concentração de lípidios foi de 16,4  $\mu$ M.

As porcentagens de vazamento também foram calculadas e, da mesma forma que para as LUVs de PC:PG 9:1, observou-se um máximo de vazamento de CF com a razão de 0,4 pep/lip (Figura 27 B). Aparentemente o excesso de BP100 quando a vesícula tem carga negativa dificultou o vazamento de CF.

#### **4.1.7 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 7:3 com BP100.**

As cinéticas de vazamento de CF com as LUVs de PC:PG 7:3 foram muito mais rápidas do que nas vesículas contendo menos PG. Na razão 0,04 de pep/lip, o aumento da fluorescência vs tempo foi linear e parecido com a velocidade na ausência de peptídeo. Porém, nas razões maiores, as cinéticas apresentaram diversas fases e, na razão de apenas 0,21 pep/lip, o BP100 causou 80% de vazamento de CF, diferentemente das LUVs de PC:PG 8:2 que, na mesma razão pep/lip, chegou a uma porcentagem de vazamento de apenas 13,5 %. Este mesmo fenômeno ocorre com razões maiores de pep/lip, chegando-se a obter praticamente 100 % de fluorescência após 2.500 s. Um vazamento de quase 100% foi observado razão de 0,4 pep/lip, onde a concentração de BP100. Na Figura 28 B observa-se que a % de vazamento aumenta com o aumento da relação pep/lip chegando a um patamar.



**Figura 28-Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 7:3 mol:mol. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lípido indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lípido em 2.500 s. A concentração de lípidios foi de 23,5  $\mu$ M.**

#### 4.1.8 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 6:4 com BP100.

O efeito do BP100 no vazamento das LUVs contendo PC:PG 6:4 mol/mol foi muito maior do que nas LUVs contendo menos PG. Na razão de 0,23 peptídeo/lípido observou-se um comportamento sigmoidal na variação de fluorescência em função

do tempo. Após 2.500 s houve aproximadamente 73 % de vazamento de CF (Figura 29 A e B). Nas razões peptídeo/lipídio maiores que 0,23 as cinéticas foram semelhantes, o comportamento bifásico ficou menos evidente, e obteve-se um vazamento muito rápido CF chegando-se quase 100% de vazamento de CF após 500 s.

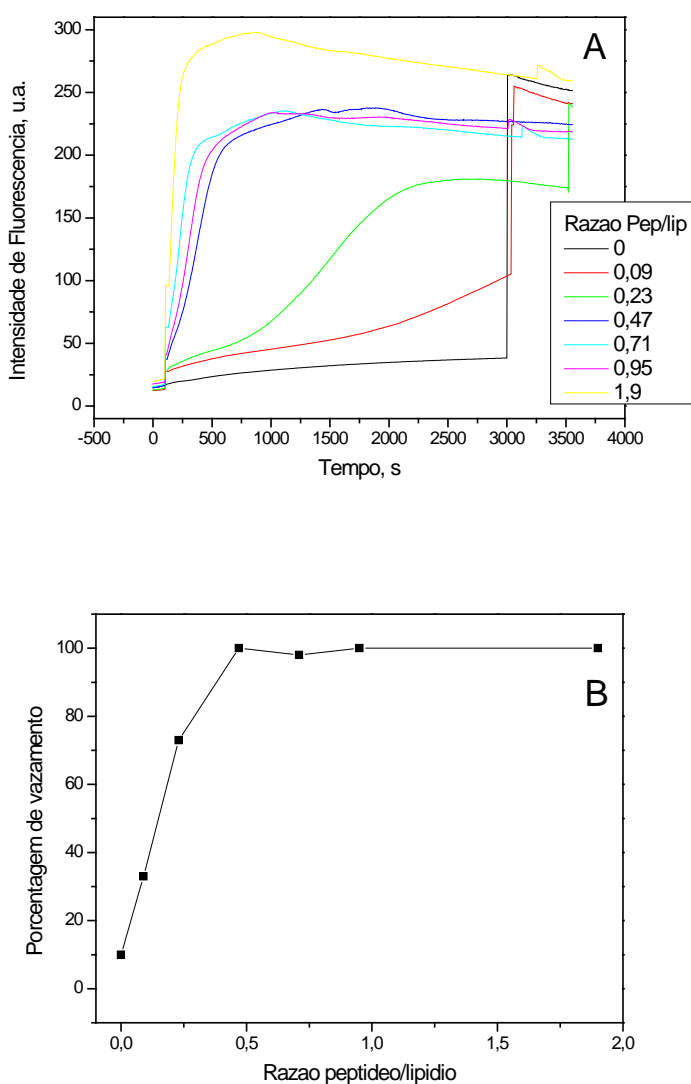


Figura 29. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 6:4 mol/mol. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lipídio indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lipídio. A concentração de lipídios foi de 10,5  $\mu$ M.

O gráfico da Figura 29 B mostra que na razão pep/lip de 0,5 todas as cinéticas chegam ao máximo de fluorescência após 2500 s. Claramente o aumento



de carga negativa das vesículas favorece a estruturação do BP100 na membrana aumentando a eficiência do vazamento de CF.

#### **4.1.9 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 1:1 com BP100.**

Com LUVs de PC:PG 1:1 o vazamento de CF em função do tempo continuou sigmoidal em algumas razões peptídeo/lipídeo e a eficiência do BP100 é ainda maior que nas LUVs com menos PG. Em 0,07 peptídeo/lipídeo, concentração de peptídeo que corresponde ao ponto mínimo da MIC (de 2,5  $\mu\text{M}$  de BP100), apresentou 42 % de vazamento de 2500 s, e um comportamento nitidamente bifásico, com aumento na taxa de vazamento a partir de 1200 s (Figura 30 A).

O vazamento de 100% de CF correspondeu a uma concentração de peptídeo menor que o ponto máximo da MIC de 7,5  $\mu\text{M}$  de BP100, pois a relação de 0,4 pep:lip equivale a 5  $\mu\text{M}$  de BP100 na suspensão lipídica (Figura 30 B).

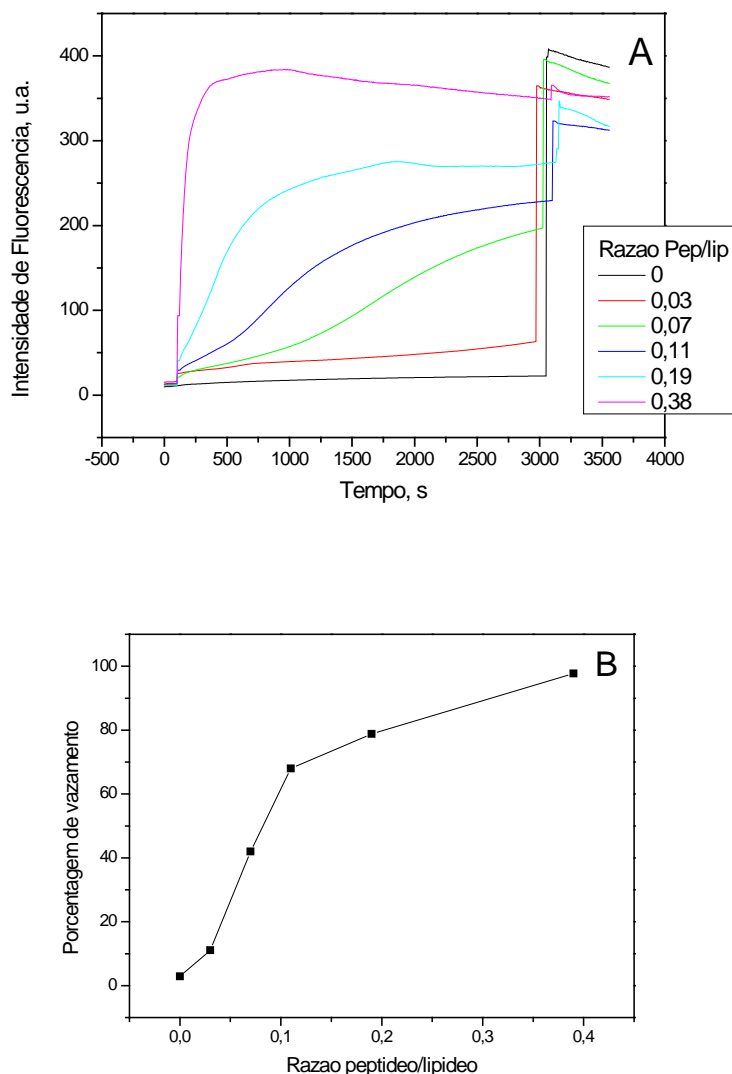
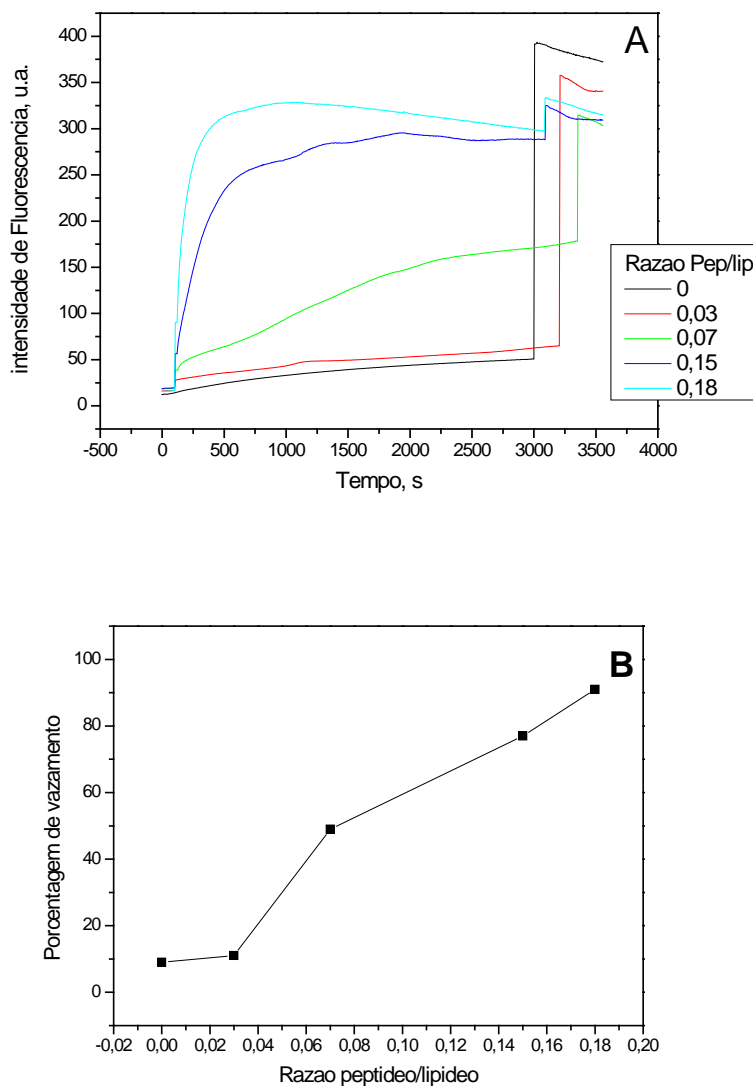


Figura 30. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 1:1 mol:mol (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lipídio indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lipídio. A concentração de lipídios foi de 11,3  $\mu$ M.

#### 4.1.10 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 4:6 com BP100.

Nas LUVs de PC:PG 4:6 mol/mol, na razão de 0,03 pep/lip observou-se uma cinética linear com 11% de vazamento em 2500 s (Figura 31 A). Acima desta razão as cinéticas apresentaram diversas fases e a % de vazamento aumentou. Nas razões de 0,07 a 0,18 peptídeo/lipídeo o comportamento bifásico das cinéticas foi

menos evidente e o vazamento muito rápido após 600 s de adição do BP100 (Figura 31 A e B). O gráfico de % vazamento vs pep:lip é quase linear.

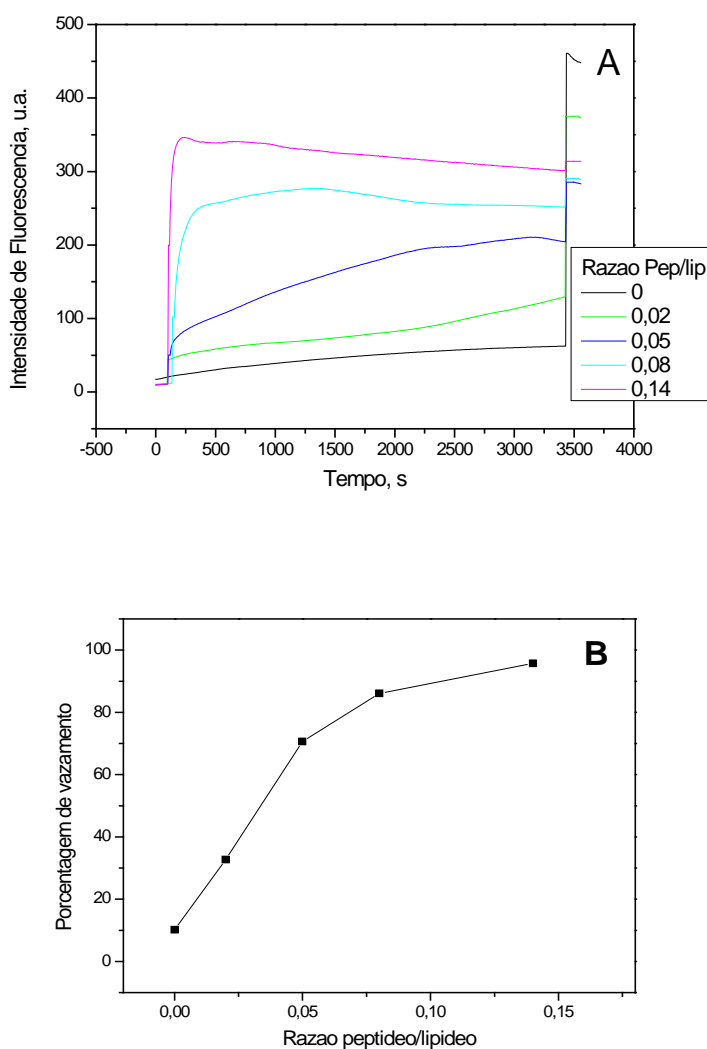


**Figura 31.** Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 4:6 mol:mol (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lípídeo indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lípídeo. A concentração de lípidios foi de 13,2  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.11 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 3:7 com BP100.

Nas LUVs de PC:PG 3:7 observou-se diversas fases, tal como observado nas LUVs com proporções menores de PG. As cinéticas se caracterizaram por um aumento rápido de fluorescência após adição do BP100, e depois disso

apresentaram uma diminuição na taxa de intensidade de fluorescência ou apenas mantiveram uma fluorescência constante, como no caso da relação de 0,08 peptídeo/lípido. Nota-se também que a relação utilizada para obter 100% de vazamento foi de 0,14, razão mais baixa do que foi necessária em LUVs de PC:PG 4:6 para obter a mesma porcentagem de vazamento (Figura 32 A e B). Nessas vesículas, o menor valor da MIC, correspondente a 0,14 pep/lip ou 2,5  $\mu\text{M}$  de BP100, provocou 100% de vazamento de CF das vesículas (Figura 32 B).



**Figura 32. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 3:7 mol:mol. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lípido indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo:lípido. A concentração de lípidos foi de 18,0  $\mu\text{M}$ .**

#### 4.1.12 Cinéticas de vazamento de CF de PC:PG 1:9 com BP100.

As LUVs de 90% de PG apresentaram cinéticas com uma velocidade baixa de vazamento nas relações de 0,013 e 0,03 peptídeo/lípido e, depois em 1500 s, um aumento de velocidade discreto, com uma porcentagem de vazamento de CF de 27 e 37% respectivamente (Figura 33 A e B). Com peptídeo/lípido de 0,04 a ação imediata do BP100 causou 100% de vazamento para essa LUV o mesmo ocorrendo em razões maiores de pep:lip (Figura 33 A e B).

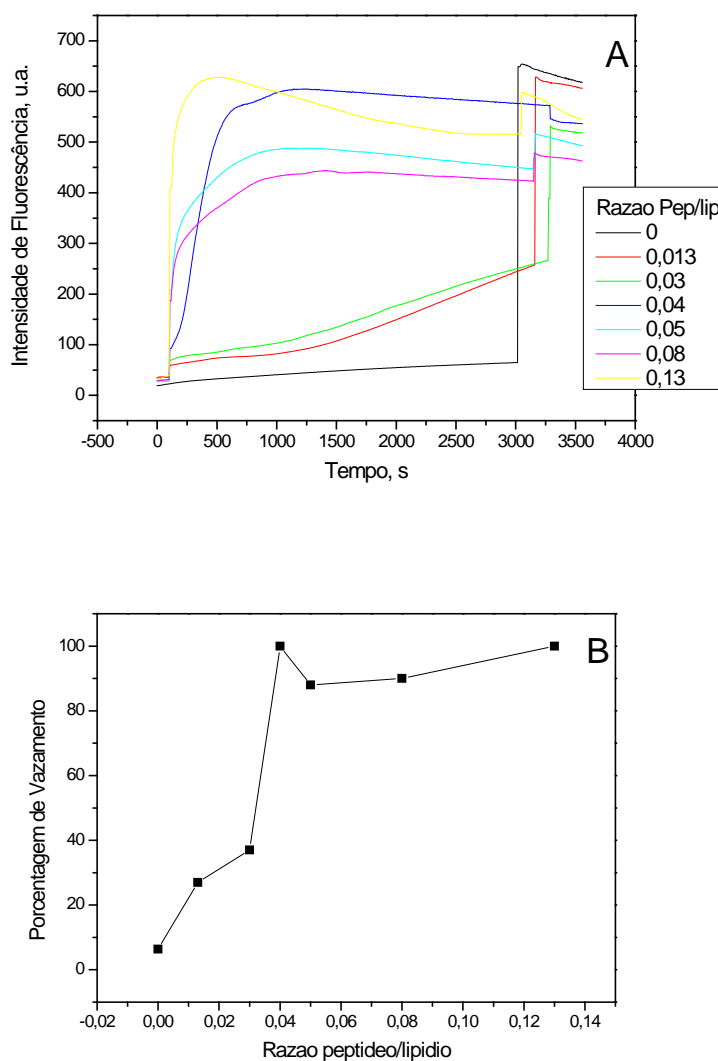
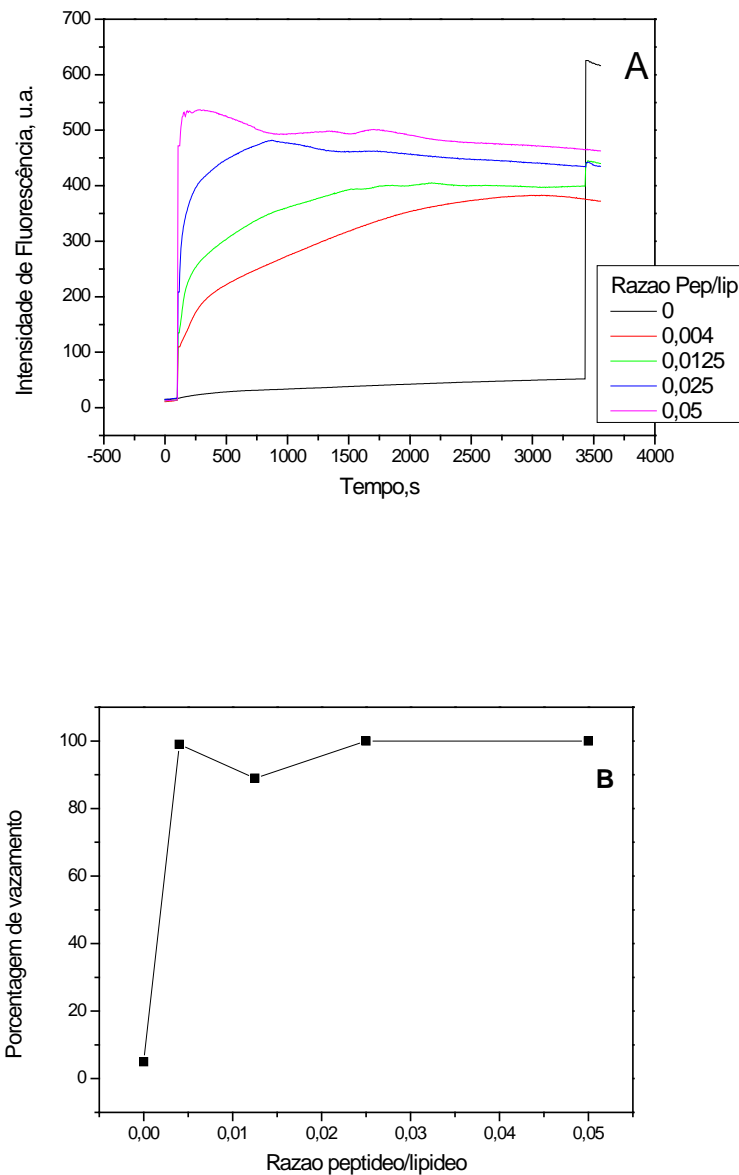


Figura 33. Vazamento de CF de LUVs de PC:PG 1:9 mol:mol. (A) Cinética de vazamento de CF com a adição do BP100 nas razões peptídeo/lípido indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lípido. A concentração de lípidios foi de 18,0  $\mu\text{M}$ .

#### **4.1.13 Cinéticas de vazamento de CF de PG 100% com BP100.**

Com LUVs de PG 100%, obteve-se 100 % de vazamento com uma razão 0,05 peptídeo/lipídeo (Figura 34 B), correspondendo a 1  $\mu\text{M}$  de BP100, valor menor que a menor MIC de 2,5  $\mu\text{M}$ . Portanto, as outras razões de peptídeo/lipídeo estudadas foram menores que 0,05. Essa foi a menor razão de peptídeo/lipídeo necessária para obter 100 % de vazamento comparado a todas as outras LUVs já estudadas.

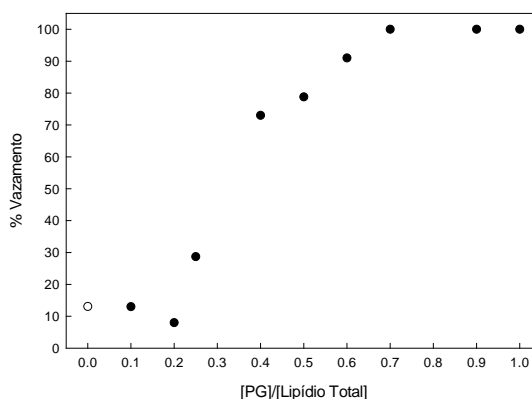
Em apenas 0,004 pep/lip o aumento da intensidade de fluorescência ocorreu rapidamente logo após a adição do BP100 até 500 s, depois a velocidade de vazamento foi mais lenta, entre 500 s a 2000 s e a partir desse tempo a cinética atingiu 100% de vazamento (Figura 34 A). Nas demais razões pep:lip todas as cinéticas foram não lineares, com aumento rápido de fluorescência e chegada a 100% de vazamento após 3.500 s (Figura 34 A e B).



**Figura 34. Vazamento de CF de LUVs de PG 100 %. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs por adição de BP100 nas razões peptídeo/lípídeo indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo:lípídeo. A concentração de lípidios foi de 20,0  $\mu$ M.**

Para verificar o efeito da carga na % de vazamento de CF fizemos o gráfico de % vazamento vs razão [PG]/[Lípídeo Total] na razão fixa de [BP100]:[lípídeo] de 0,2, após 2.500 s (ou 0,4 considerando-se apenas a concentração de lípidios na face

externa da vesícula) (Figura 35). Verifica-se que o vazamento é acelerado a partir de 20 % de PG. Quanto maior a razão peptídeo/lipídio, menor a % de carga negativa necessária para acelerar o vazamento.



**Figura 35.** Vazamento de CF de LUVs após 2.500 s na razão BP100:lipídio de 0,2 em função da razão PG/lipídio total.

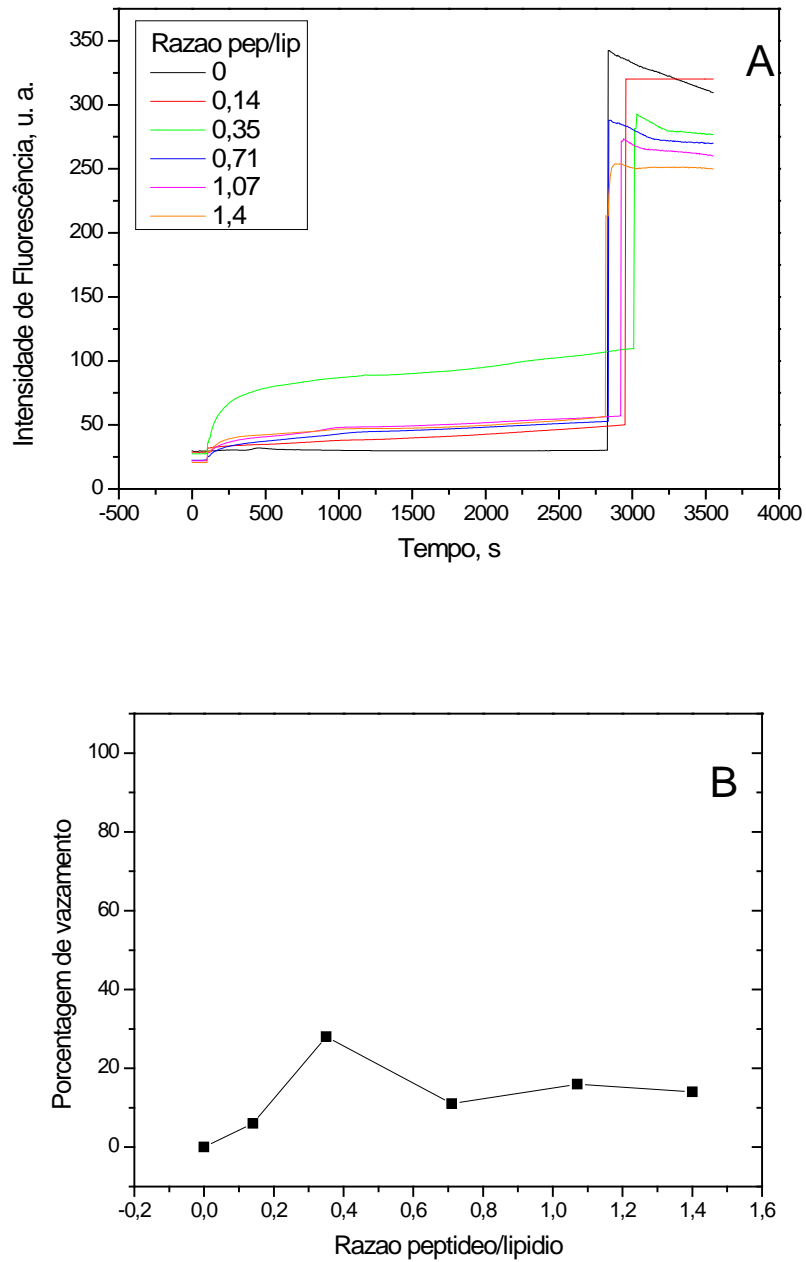
## 4.2 Efeito de BP100 na Cinética de Vazamento de CF de LUVs contendo Colesterol

### 4.2.4 LUVs de PC:Colesterol 63:37

Os experimentos feitos com LUVs contendo colesterol foram comparados aos experimentos com LUVs de PC 100% e PC:PG 4:6.

Em LUVs de PC:colesterol 63:37, as cinéticas de vazamento de CF apresentaram um comportamento linear em todas as relações de peptídeo/lipídeo estudadas com vazamento pequeno, semelhante ao das LUVs de PC 100% (Figura 54 A). A porcentagem de vazamento de CF após 2.500 s foi de 5 a 15% no ponto com maior [BP100] (10  $\mu$ M de BP100), exceto na relação de 0,35 pep/lip aonde houve cerca de 27% de vazamento (Figura 36 A e B). Não está claro porque houve o aparecimento desse máximo de vazamento. A presença do colesterol não causou interferência significativa na ação do BP100 e o efeito do peptídeo no vazamento de CF foi semelhante ao observado com LUVs contendo apenas PC.





**Figura 36. Vazamento de CF de LUVs de PC:colesterol 63:37. (A) Cinética de vazamento de CF das LUVs com adição do BP100 nas relações peptídeo/lípido indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF em função da razão peptídeo/lípido. A concentração de PC é 4,3  $\mu\text{M}$  e a de colesterol 2,5  $\mu\text{M}$ .**

#### **4.2.5 Cinética de LUVs de PG:colesterol 64:36 com BP100**

Na cinética com LUVs de PG:Col 6:4, na razão de pep/lip de 0,125, a porcentagem de vazamento foi praticamente 100 % até 250 s depois da adição do BP100. Nas razões peptídeo/lípídeo menores, houve um vazamento rápido e depois um aumento lento de fluorescência em função do tempo 250 s (Figura 37 A e B). Entretanto, o máximo de fluorescência não foi atingido nas razões menores de pep:lip. O perfil das cinéticas não é bifásico, como observado com as LUVs de PC:PG 4:6. A Figura 37 A mostra a cinética de PG:Col 64:36, e na Figura 37 B a porcentagem de vazamento em diferentes concentrações de BP100 após 2.500 s. Observa-se que a presença de colesterol leva a uma diminuição na % de vazamento de vesículas contendo PG e, além disso, o vazamento total das vesículas não é alcançado no período de estudo.

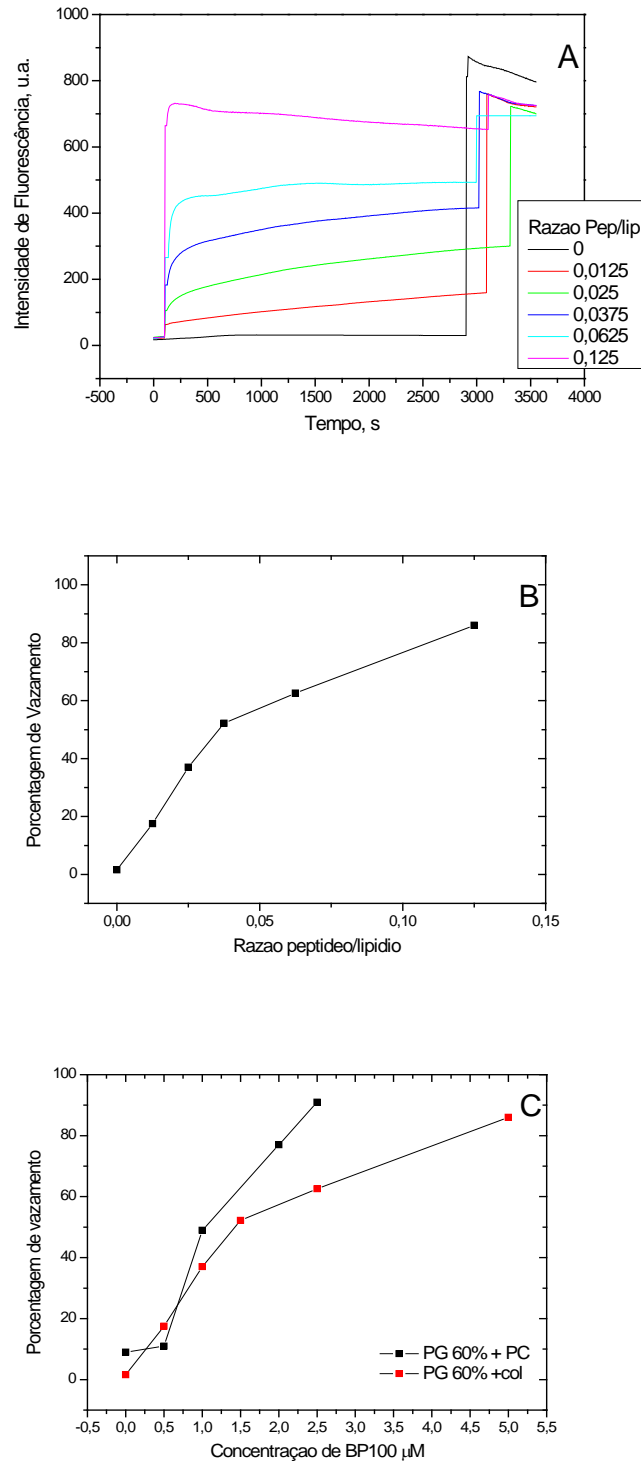


Figura 37. Vazamento de CF de LUVs de PG:colesterol 64:36. (A) PG:col 6:4 com adição do BP100 nas relações peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico. (B) Porcentagem de vazamento de CF de LUVs de PG:colesterol em função da razão pep/lip, após 2400 s. (C) Curvas de % vazamento de CF vs [BP100] de LUVs de PC:PG 6:4 e PG:Col 6,4:3,6, em diferentes razões peptídeo/lipídeo. As concentrações de lipídios foram de 2,0  $\mu$ M de colesterol e 3,5  $\mu$ M de PG.

Na Figura 37 C pode-se ver o efeito da razão pep:lip na % de vazamento das LUVs de PG:Col 64:36 e LUVs de PG:PC 6:4 em função da concentração de BP100. O vazamento nas LUVs de PG:colesterol é menor do que nas vesículas de PC:PG nas razões de pep/lip mais altas (Figura 37 C). Outra característica que diferencia o efeito de BP100 nas LUVs de PG:colesterol é que, aparentemente, uma vez formada a estrutura contendo BP100 na bicamada da vesícula a saída do BP100 é lenta e não se chega a 100 % de vazamento. É como se, uma vez ligado à membrana, o BP100 não sai mais e não permeabiliza outras vesículas.

**Tabela 2- Efeito da Concentração de BP100 e da relação BP100/Lipídio na % de vazamento da CF após 2.500 s. [Pi] é a concentração total de fosfolipídio em cada experimento.**

PC 100% e [Pi] = 21,3 $\mu$ M			PC:PG 9:1 e [Pi] = 11,3 $\mu$ M			PC:PG 8:2 e [Pi] = 16,4 $\mu$ M		
[BP100] $\mu$ M	Pep/Lip	% Vaz	[BP100] $\mu$ M	Pep/Lip	% Vaz	[BP100] $\mu$ M	Pep/Lip	% Vaz
0	0	1,56	0	0	0	0	0	0
1	0,0469	8,58	0,6	0,0531	4,4	1	0,061	0
5	0,235	13,06	1,5	0,133	6,3	2,5	0,152	10
7,5	0,352	8,54	2,5	0,221	13	5	0,305	43,5
10	0,469	14,12	5	0,442	74	7,5	0,457	22,6
			7,5	0,664	43			
			10	0,885	39			
PC:PG 7,5:2,5 e [Pi] = 12,5 $\mu$ M			PC:PG 7:3 e [Pi]= 23,5 $\mu$ M			PC:PG 6:4 e [Pi] = 10,5 $\mu$ M		
0	0	2,6	0	0	10	0	0	10
0,5	0,04	8	1	0,042	14	1	0,095	33
1,5	0,12	11	2,5	0,106	37	2,5	0,238	73
2,5	0,2	28,7	5	0,213	82	5	0,476	100
5	0,4	74,8	7,5	0,319	75	7,5	0,714	98
7,5	0,6	71	10	0,425	92	10	0,952	100
10	0,8	60	20	0,851	87	20	1,905	100
20	1,6	85,4						
PC:PG 5:5 e [Pi] = 13 $\mu$ M			PC:PG 4:6 e [Pi] = 13,2 $\mu$ M			PC:PG 3:7 e [Pi] = 18 $\mu$ M		
0	0	2,9	0	0	9	0	0	10,2
0,5	0,0385	11,1	0,5	0,0379	11	0,25	0,0139	18
1	0,0769	42	1	0,0757	49	0,5	0,0279	32,73
1,5	0,115	100	2	0,151	77	1	0,0555	70,6
2,5	0,192	78,8	2,5	0,189	91	1,5	0,0833	86,1
5	0,385	97,7				2,5	0,1390	95,7
PC:PG 1:9 e [Pi] = 18 $\mu$ M			PG 100% e [Pi] = 20 $\mu$ M					
0	0	6,4	0	0	5			
0,25	0,0139	27	0,08	0,004	99			
0,5	0,0278	37	0,25	0,0125	89			
0,75	0,0417	100	0,5	0,025	100			
1	0,0556	88	0,75	0,0375	100			
1,5	0,0833	90	1	0,05	100			
2,5	0,1389	100						

### **4.3 Estudo do Vazamento de Vesículas Contendo Pireno-tetrasulfonato de sódio (PTS) com a Adição de BP100 a Baixa Força Iônica.**

Em vários experimentos desta dissertação medimos a interação do BP100 com LUVs e GUVs em condições de baixa força iônica. Os estudos de dicroísmo circular, mobilidade eletroforética e diâmetro hidrodinâmico do BP100 e sua interação com as LUVs foram todos realizados em baixa força iônica.

Existem relatos na literatura de peptídeos antimicrobianos que possuem atividade diferenciada com maior ou menor concentração de sal no meio (Brugles *et al.*, 2008, Raghuraman & Chattopadhyay, 2006). Para podermos comparar os resultados obtidos com os diversos métodos e a capacidade de permeabilização das LUVs optamos por utilizar outro método com marcador fluorescente que pudesse ser feito em baixa força iônica também. Para isso utilizamos o PTS como fluoróforo no compartimento aquoso interno das LUVs e adicionamos, externamente, um supressor, neste caso o Metilviologênio (MV). Com este sistema, a força iônica externa é muito menor do que nos experimentos de LUVs com CF.

O PTS é uma molécula fluorescente nas condições de incorporação nas LUVs utilizadas e o MV é seu supressor. Assim, ao colocarmos as vesículas contendo PTS num meio com MV, a amostra apresenta uma fluorescência inicial alta e, quando o PTS passa para o espaço aquoso externo por ação do BP100, o MV suprime a fluorescência do PTS. Portanto é possível verificar o efeito do peptídeo na permeabilidade da membrana das LUVs medindo-se a velocidade de diminuição da fluorescência do PTS na presença de concentração adequada de MV.

Foi feita inicialmente uma curva de calibração de supressão de PTS por MV, como mostrado em Métodos, para determinar a menor quantidade a ser utilizada de MV para suprimir a fluorescência do PTS. Posteriormente, preparamos as vesículas

contendo PTS, que foram passadas pela coluna de Sephadex-G25 para retirada do PTS externo. A eluição das vesículas foi feita com tampão Tris/HCl 0.008 M, pH 8 para compensar a força iônica da solução 1 mM de PTS incorporada no interior das LUVs.

Alíquotas de 5 $\mu$ L das LUVs com PTS incorporado foram adicionadas a uma cubeta de fluorescência contendo 500  $\mu$ L de tampão TRIS/HCl 8 mM pH 8 e 1 mM de metil viologênio (Figura 18 B). A cinética foi realizada pelo tempo desejado e, após adição de polidocanol, a fluorescência se tornou próxima de zero comprovando o rompimento total das vesículas e supressão total da fluorescência do PTS pelo MV.

#### **4.3.4 Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC 100% com BP100.**

Estudou-se o efeito da adição de BP100 na supressão de fluorescência do PTS pelo MV utilizando-se diferentes concentrações de peptídeo. Os resultados estão na Figura 38. Observa-se, em todas as concentrações de peptídeo utilizadas, que a fluorescência do PTS diminui em função do tempo com velocidade sempre maior do que na ausência de peptídeo.

Nas razões molares pep/lip menores que 0,23 o vazamento do fluoróforo foi menor do que 5 % (Figura 38 A e B). Em todas as cinéticas feitas observou-se, após a adição de BP100 em 50 s, ocorreu uma diminuição linear de fluorescência em função do tempo. Em razões molares acima de 0,15 pep/lip, há um vazamento da ordem de 20 % até cerca de 350 s e, após 900 s, a fluorescência ficou constante. Na Figura 38 B pode-se observar que acima da razão pep/lip de 0,15 já ocorreu um aumento de vazamento significativamente diferente do vazamento de PTS na ausência de peptídeo.

Esses resultados são semelhantes ao vazamento de CF de LUVs de PC 100%, pois nestes experimentos também se observou uma cinética linear e um vazamento reduzido, de menos de 20%, comparado com as vesículas sem BP100.

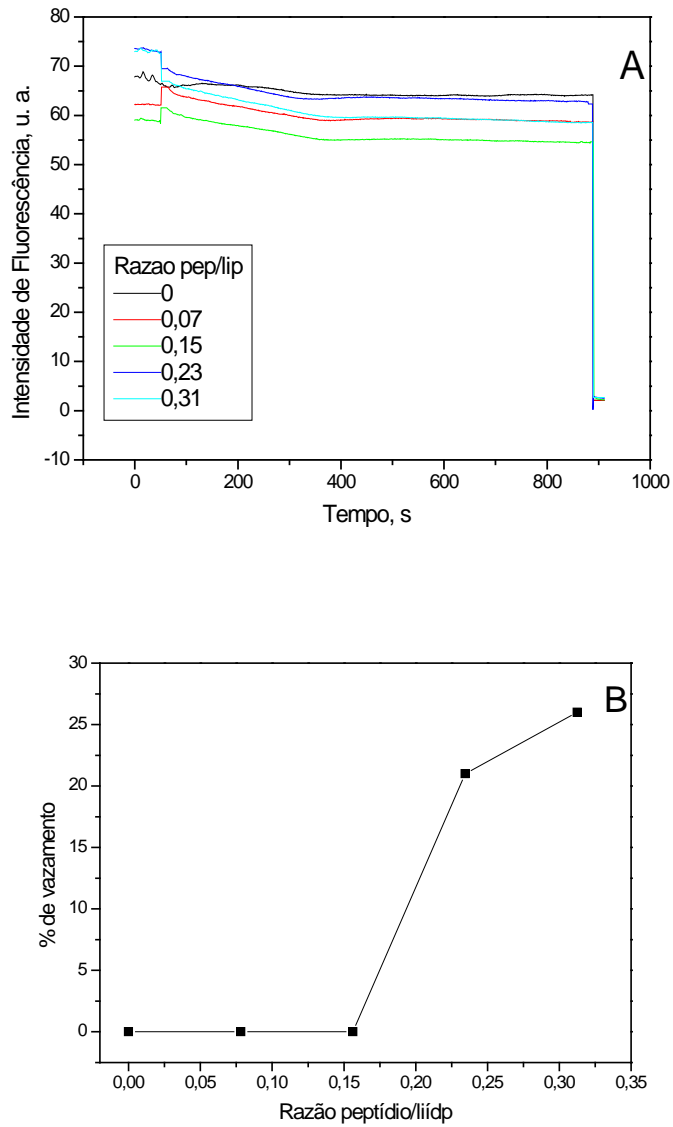


Figura 38. Vazamento de PTS de LUVs de PC 100%. (A) Cinética de vazamento de PTS nas razões de peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico. (B) % de vazamento vs razão peptídeo/lipídeo. [lipídeo] = 11,6  $\mu$ M e MV 1 mM em Tris/HCl 0.01 M pH 8



#### 4.3.5 Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 7:3 com BP100.

O efeito de BP100 na variação de fluorescência em função do tempo das vesículas com PTS estão na Figura 39 A. Na ausência de peptídeo observa-se um vazamento pequeno e linear em função do tempo. Com adição de BP100 observam-se, em todas as razões pep/lip estudadas, duas velocidades distintas no gráfico de fluorescência versus tempo e a % de vazamento foi muito maior do que a observada com as LUVs de PC 100% (Figura 39 A e Figura 38 A e Tabela 3).

Observa-se na Figura 39 B que, mesmo sem a adição de BP100, ocorre vazamento em torno de 10% após 900 s, resultado também observado nos experimentos com CF. As porcentagens de vazamento calculadas para os experimentos de CF e PTS incorporados nas LUVs são diferentes e as porcentagens de vazamento de PTS, nas mesmas relações de pep/lip, apresentam valores muito maiores comparados aos vazamentos de CF das LUVs em alta força iônica (Tabela 3).

A porcentagem de vazamento aumenta com razão pep/lip aparentemente atingindo uma saturação em alta razão pep/lip. Pode-se observar também a existência de um valor mínimo da razão pep/lip onde o fenômeno de vazamento é acelerado (Figura 39 B).

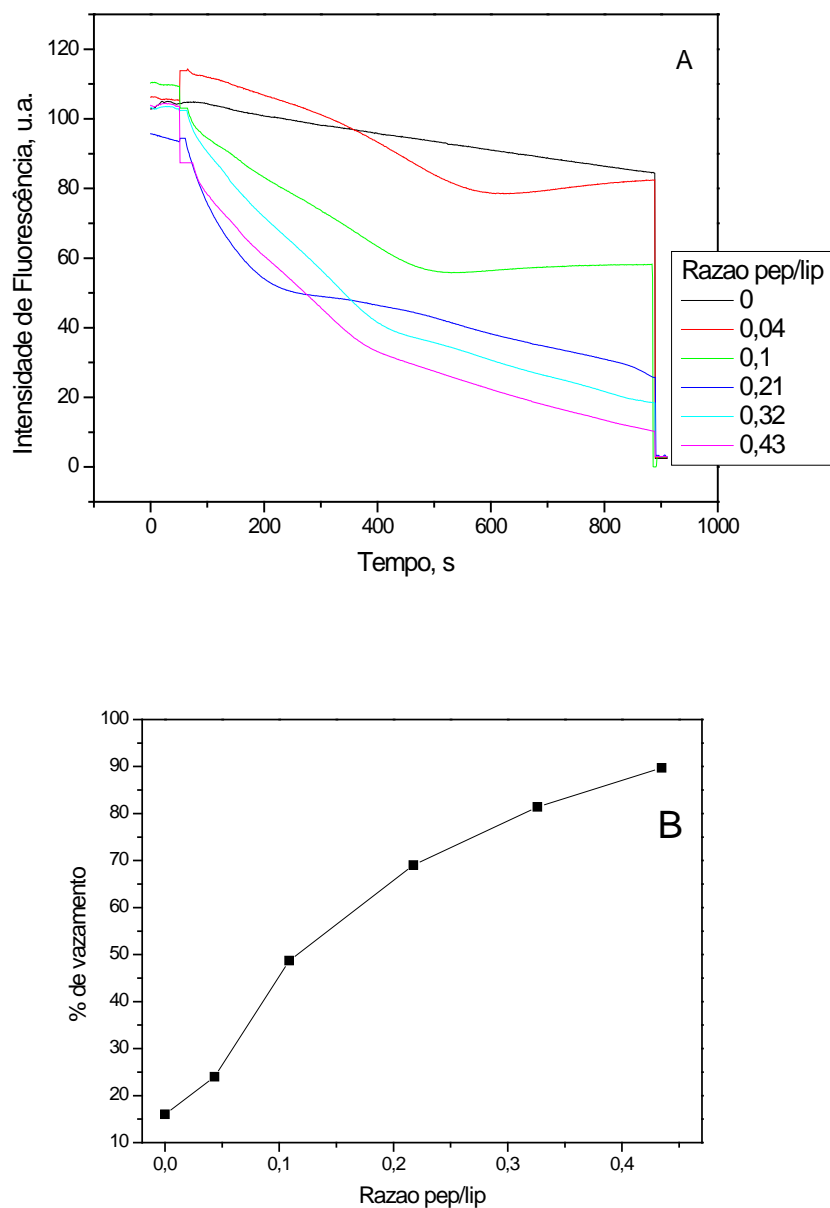
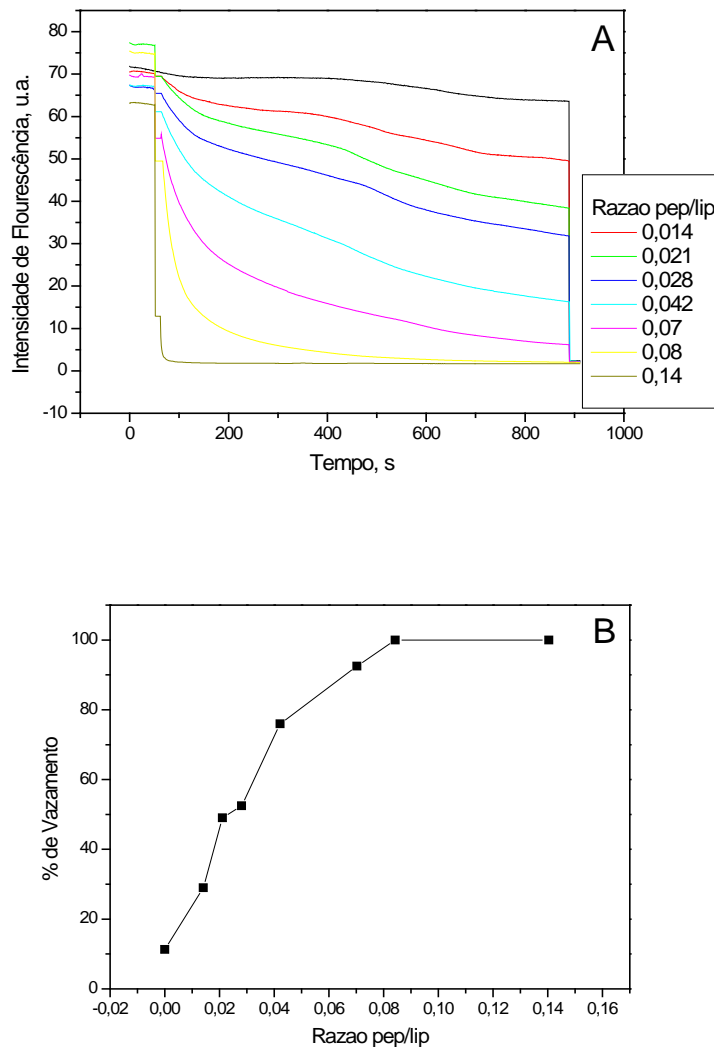


Figura 39. Vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 7:3 em presença de MV. (A) Cinética intensidade de fluorescência do PTS em função do tempo nas razões peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico, [lipídio]= 23  $\mu$ M. (B) Gráfico da porcentagem de vazamento após 900 s.

#### 4.3.6 Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 1:1 com BP100.

O efeito da concentração de BP100 no vazamento de PTS nas LUVs de PC:PG 1:1 pode ser observado na Figura 40 A. Na razão de 0,014 peptídeo/lipídeo

observou-se uma diminuição discreta de intensidade de fluorescência até aproximadamente 200s e depois um aumento de velocidade acima desse tempo. Aparentemente vários fenômenos estão acontecendo com o sistema já que a variação de fluorescência não segue uma função matemática simples em todas as razões pep/lip (Figura 40 A). Na figura 40 B pode-se observar que o gráfico de porcentagem vazamento vs a razão pep/lip é análogo a uma curva de saturação a alta razão pep/lip.



**Figura 40. Vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 1:1 de, num meio com MV. (A) Cinética de intensidade de fluorescência do PTS em função do tempo nas razões de peptídeo/lípido indicadas no gráfico, [lípidios] = 17,8  $\mu$ M. (B) Gráfico da porcentagem de vazamento da respectiva cinética.**

Em todas as razões de pep/lip utilizadas neste experimento, houve uma grande diminuição de fluorescência logo após a adição do peptídeo (Figura 40 A e B). Como a força iônica externa é baixa, a ligação do BP100 às LUVs é mais alta do que nos experimentos com CF realizados em 300 mM de NaCl, o que explica o salto inicial ser maior nas LUVs com PTS do que com as contendo CF.

#### **4.3.7 Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 7:3 com BP100.**

Em LUVs de PG:PG 7:3, em todas as razões peptídeo/lipídeo, ocorre uma diminuição não linear de fluorescência em função de tempo sendo possível observar várias fases. Houve em todas as cinéticas uma grande diminuição da intensidade de fluorescência antes de 200 s e após esse tempo foi observado um vazamento mais lento (Figura 41 A).

As razões estudadas nos experimentos com CF apresentaram vazamento de 95,7% na razão de 0,14 pep/lip enquanto nos experimentos utilizando o PTS também foi obtido 98% de vazamento para essa mesma LUV de 70% de carga negativa em sua composição (Figura 41 A). Portanto, nas LUVs de PG:PC 7:3 com BP100, observou-se uma maior porcentagem de vazamento nos experimentos utilizando o PTS quando comparado aos experimentos de CF (Figura 41 A). Além disso, as LUVs de 70% de carga negativa apresentaram porcentagens de vazamento levemente inferiores às LUVs de 50% de PG.

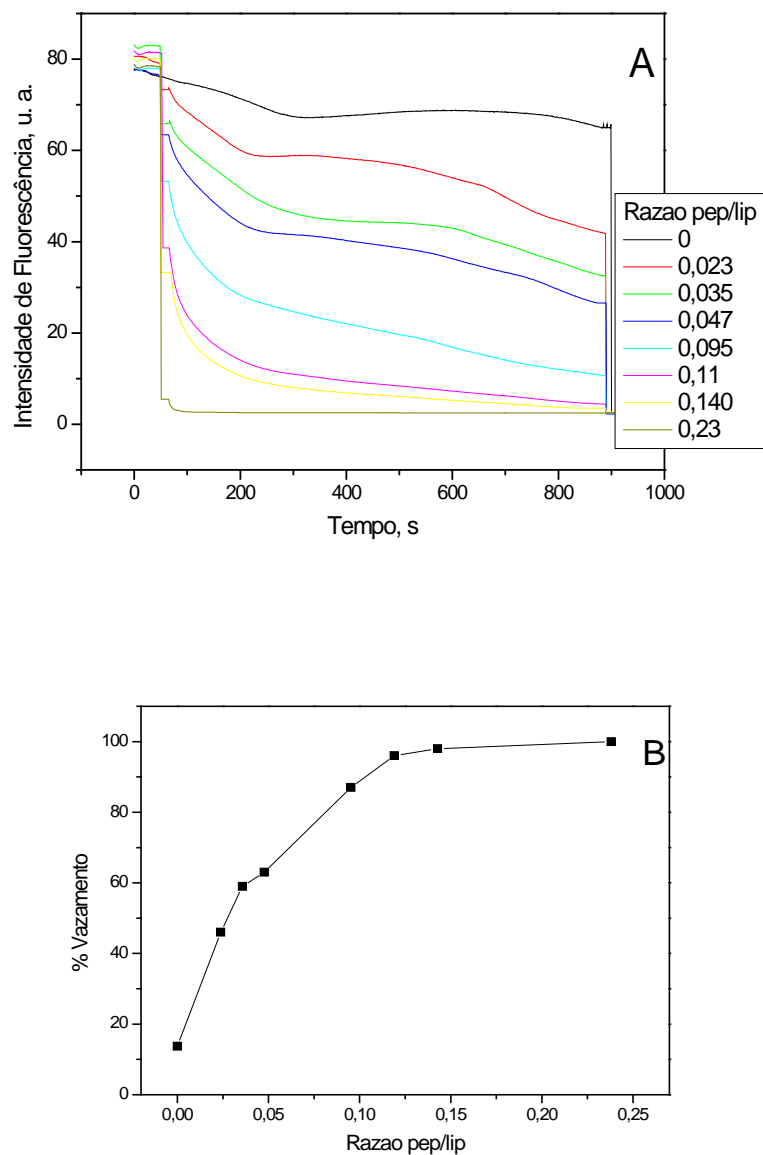
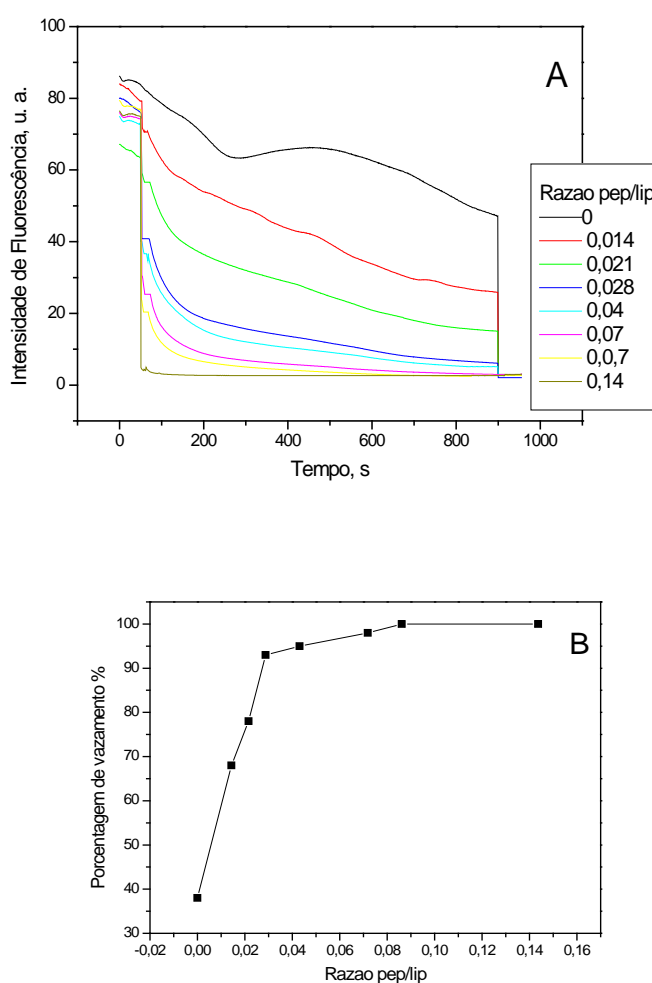


Figura 41. Vazamento de PTS de LUVs de PC:PG 3:7. (A) Cinética fluorescência do PTS em função do tempo nas razões peptídeo/lipídeo indicadas no gráfico [lipídeo]= 11,6  $\mu$ M). (B) Gráfico da porcentagem de vazamento vs pep/lip.

#### 4.3.8 Cinéticas de vazamento de PTS de LUVs de PG 100% com BP100.

A cinética das vesículas de PG 100% sem BP100 apresentou diminuição de fluorescência, especialmente após 300 s, o que indica uma menor estabilidade da

vesícula controle, ocorrendo um vazamento de 38% (Figura 42 A e B). Na razão de 0,014 peptídeo/lípídeo observou-se vazamento rápido após a adição de BP100, porém em torno de 110 s, essa velocidade diminuiu (Figura 42 A). Claramente, nas demais razões de pep:lip ocorrem duas fases no processo de vazamento do PTS, uma fase rápida seguida de outra mais lenta (Figura 42 A). A % de vazamento após 900 s é praticamente 100 % para razões pep:lip acima de 0,02 (Figura 42 B).



**Figura 42. Vazamento de PTS de LUVs de PG 100% num meio com MV. (A) Cinética fluorescência do PTS em função do tempo nas razões peptídeo/lípídeo indicadas no gráfico [lipídeo]= 24,5  $\mu$ M. (B) Gráfico da porcentagem de vazamento da respectiva cinética.**

Comparando-se este experimento com LUVs de PG 100% com PTS encapsulado em baixa força iônica aos experimentos utilizando CF e alta força iônica, é possível notar a grande diferença de porcentagem de vazamento. Na Tabela 3 são mostradas as % de vazamento de PTS e CF em razões peptídeo/lipídeo semelhantes.

Estes resultados mostram claramente que o BP100 se liga às LUVs por um componente eletrostático muito forte e que essa interação é diminuída pela presença de sal. Porém, mesmo na presença de 0,3 M NaCl o BP100 se liga significativamente às LUVs e promove a permeabilização da bicamada das LUVs liberando o conteúdo interno das mesmas.

**Tabela 3. Porcentagem de Vazamento de CF e PTS de LUVs nas várias razões de BP100/lipídeo. A porcentagem de vazamento se refere ao tempo de 900 s para o vazamento de LUVs com CF e PTS.**

LUVs (Lipídeo, $\mu\text{M}$ )	[BP100], $\mu\text{M}$	[BP100]/[Lipídeo]	%Vaz PTS	%Vaz CF*
PC 100% (11,1)	0	0	0	-
	2,5	0,078	0	-
	5	0,156	0	-
	7,5	0,234	21	6
	10	0,312	26	9
	PC:PG 7:3 (23,0)	0	0	16
1		0,044	24	8
2,5		0,109	48,7	13,8
5		0,217	69	37
7,5		0,326	81,4	22,78
10		0,435	89,7	42,17
PC:PG 1:1 (17,8)	0	0	11,3	-
	0,5	0,014	29	-
	0,75	0,021	49	-
	1	0,028	52,5	7
	1,5	0,042	76	-
	2,5	0,07	92,5	11,5
	3	0,084	100	--
	5	0,140 com PTS e 0,11 com CF	100	33
PC:PG 3:7 (21,0)	0	0	13,7	-
	0,5	0,024	46	15,4
	0,75	0,036	59	-
	1	0,048	63	43
	2	0,095	87	-
	2,5	0,119	96	-
	3	0,143	98	100
	5	0,238	100	-
PG 100% (24,5)	0	0	38	-
	0,75	0,014	68	100
	1	0,021	78	100
	1,5	0,029	93	-
	2,5	0,043	95	100
	3	0,072	98	-
	5	0,086	100	-

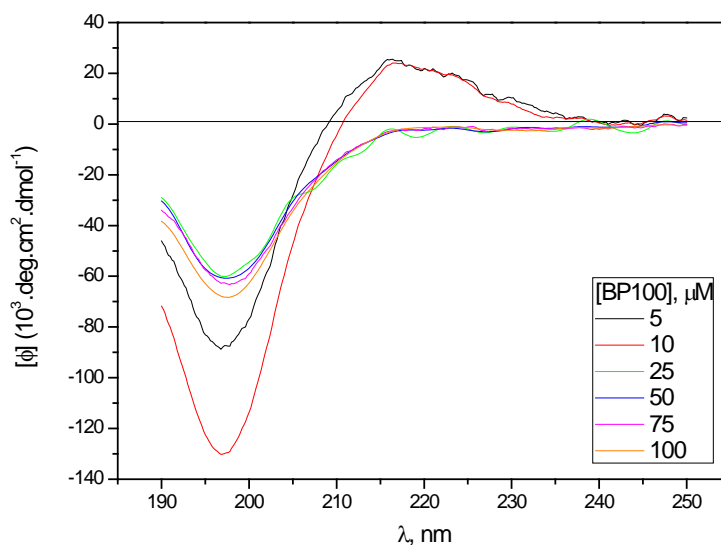
\*As concentrações de lipídio dos experimentos de CF estão na Tabela 2.



## 4.4 Resultados dos Estudos de Dicroísmo Circular

### 4.4.4 Dicroísmo Circular do BP100 em água

Foram obtidos os espectros de dicroísmo circular, CD, de soluções de BP100 em água variando-se a concentração do peptídeo, Figura 43 A. Observou-se uma banda negativa em 197 nm para todas as concentrações. Nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  de BP100 observou-se também uma banda positiva em 216 nm. O espectro de CD do BP100 em água é compatível com uma estrutura ao acaso quando se compara esses resultados com os espectros de estruturas padrões descritos na literatura (Greenfield and Fasman, 1969 e Figura 21).



**Figura 44. Espectro de Dicroísmo Circular do BP100 em 50  $\mu\text{M}$ , com LUVs de PC 100%. As razões molares peptídeo/lipídio estão na figura.**

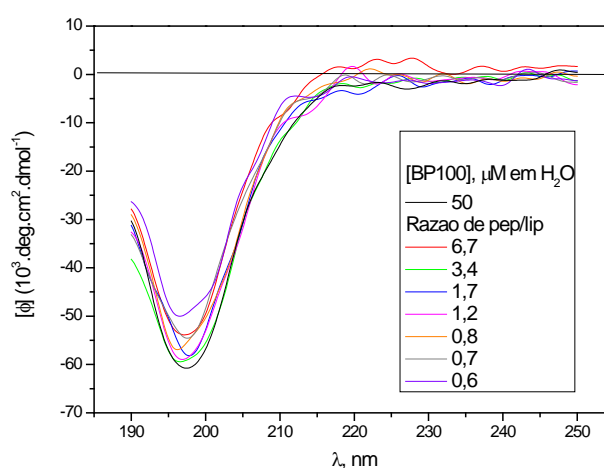
A banda positiva em 216 nm do BP100 não aparece em concentrações acima de 10  $\mu\text{M}$  de peptídeo (Figura 43). Esse comportamento diferenciado, em concentrações maiores que 10  $\mu\text{M}$ , pode ser devido a uma interação entre moléculas de BP100, com um pequeno aumento na conformação em folha  $\beta$

(Greenfield & Fasman 1969), porém mantendo a maior porcentagem do peptídeo com uma estrutura randômica.

Os espectros do BP100 em 50  $\mu\text{M}$  apresentaram uma razão sinal/ruído adequada e essa concentração foi utilizada para verificar o efeito da presença de LUVs, de diferentes composições lipídicas, na estrutura secundária do BP100.

#### 4.4.5 Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs de PC 100%

Estudou-se o efeito da concentração de LUVs de PC 100% no espectro de CD de BP100 50  $\mu\text{M}$  (Figura 44). Os espectros do BP100 na presença de concentrações diferentes de LUVs de PC 100% são muito semelhantes ao obtido com o BP100 puro (Figura 44). Observou-se, porém, em razões de pep/lip entre 0,6 e 6,7 (mol/mol), que além da banda negativa em 197 nm, aparecem pequenos ombros próximos a 200 nm. Acima de 210 nm também se observaram ombros não muito bem definidos e cuja posição variou com concentração de LUVs (Figura 44).



**Figura 44. Espectro de Dicroísmo Circular do BP100 em 50  $\mu\text{M}$ , com LUVs de PC 100%. As razões molares peptídeo/lipídeo estão na figura.**

Comparando-se os experimentos de CD realizados com BP100 e LUVs de PC 100% com os resultados obtidos no estudo de vazamento de CF e PTS notamos as seguintes semelhanças:

1-Houve uma pequena alteração no espectro de CD do BP100 na presença de LUVs com 100 % PC.

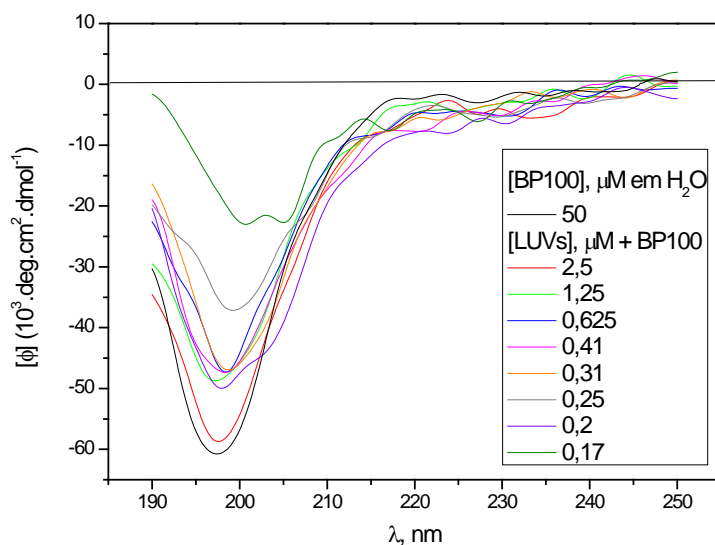
2-Nos experimentos de fluorescência com LUVs com PC100% contendo PTS, em baixa força iônica e razão pep/lip 0,31, a porcentagem de vazamento foi de 26%. Com LUVs de PC100% contendo CF, em alta força iônica, a porcentagem de vazamento foi de 14% numa razão pep/lip 0,46.

Estes resultados, em conjunto, indicam uma pequena interação do BP100 com LUVs de PC 100 %, em baixa e alta força iônica, com pequena mudança na estrutura secundária do BP100.

#### **4.4.6 Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs LUVs de PC:PG 9:1**

O espectro de dicroísmo circular do BP100 mudou significativamente na presença de LUVs de PC:PG 9:1 (Figura 45). Com a adição de concentrações crescentes de LUVs houve um deslocamento da banda em 197 nm para comprimentos de onda maiores e o aparecimento de nova banda negativa próxima de 215 nm. Não foi possível, com as LUVs de PC:PG 9:1, fazer uma relação entre a estrutura do BP100 e a concentração das LUVs mas, claramente, a interação dessas LUVs contendo PG modificou a estrutura secundária do BP100.

O efeito da presença de 10% de PG nas LUVs também aumenta o vazamento das vesículas contendo CF. Este efeito de vazamento está de acordo com a mudança estrutura do BP100 observada por CD.



**Figura 45. Espectro de Dicroísmo Circular do BP100, 50  $\mu\text{M}$ , na presença de LUVs de PC:PG 9:1. As razões molares peptídeo/lipídio estão na figura.**

#### **4.4.7 Estudo de Dicroísmo Circular do BP100 em água com LUVs de PC:PG 7:3**

Com LUVs de PC:PG 7:3 e 50  $\mu\text{M}$  de BP100 (Figura 46), na razão de 2,5 pep/lip, o efeito das LUVS no espectro de CD do BP100 foi semelhante ao obtido em água, observando-se uma banda negativa em 197 nm. À medida em que concentração de LUVs aumenta (diminui a razão pep/lip) observa-se que a banda em 197 nm diminui de intensidade, passa por zero e fica positiva. Na região de 205 a 240 nm aparecem vários ombros em diferentes comprimentos de onda. Na razão de 0,2 pep/lip já é possível observar tres bandas negativas de maior intensidade que nas razões pep/lip maiores, uma banda negativa em 208 nm, 217 nm e a última também negativa em 224 nm (Figura 46 A). O efeito da razão pep/lip na elipticidade molar em 197 e 222 nm é mostrado nas figuras 46 B.

Os resultados obtidos com adição de LUVs de PC:PG 7:3 na solução de BP100 mostraram grande mudança estrutural no BP100 nas mais baixas razões de pep/lip (de 0,4 a 0,16). Esses resultados são correspondentes aos efeitos do BP100 no vazamento de PTS, feito também nas mesmas condições de baixa força iônica. Com 0,4 de pep/lip nos experimentos de fluorescência com PTS, o vazamento correspondeu a 89%, já nos experimentos de CD, essa razão correspondeu a inversão do espectro de dicroísmo da banda 197 nm de sinal negativo para positivo.

Nas razões de 0,3 e 0,2 pep/lip, a cinética de vazamento do PTS apresentou comportamento não linear com até cerca de 80 % de vazamento total (69 e 81% de vazamento respectivamente). Nos experimentos de CD, o espectro da razão de 0,2 peptídeo/lipídeo apresentou a nova conformação do BP100, apresentando bandas negativas em 208 e 222 nm, e positiva em 197 nm.

Pode-se notar, portanto que quanto maior a carga negativa da superfície da vesícula e menor a quantidade de BP100 adicionada à suspensão lipídica (baixas razões pep/lip), maior a mudança estrutural do peptídeo BP100. E, em contrapartida, quanto maior a razão de pep/lip, maior o vazamento PTS.

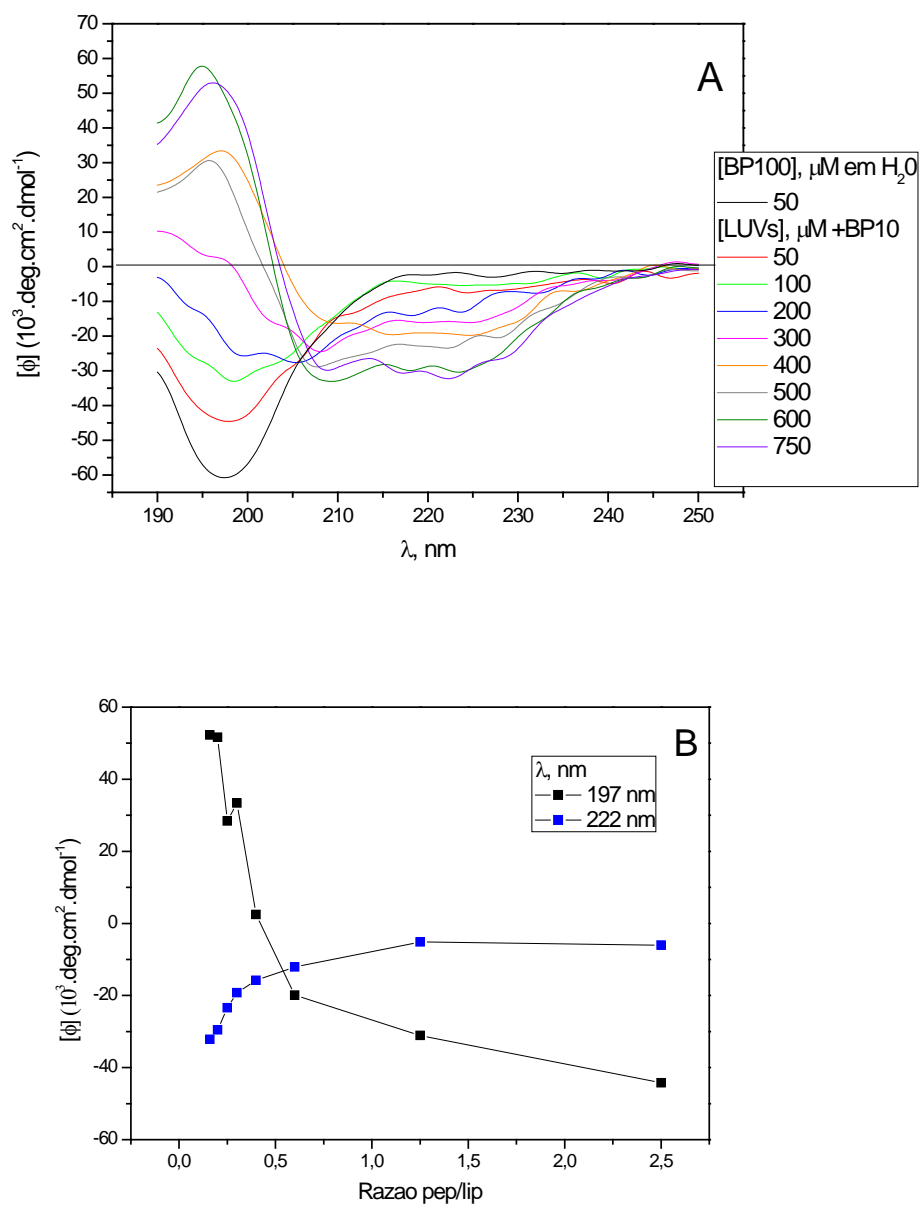


Figura 46. A) Espectros de Dicroísmo Circular do BP100 50  $\mu\text{M}$ , com LUVs de PC:PG 7:3. B) Valores de elipticidade molar vs razão de pep/lip em 197 nm e 222 nm.

#### 4.4.8 Estudo de CD de BP100 em água com LUVs de PC:PG 1:1

O efeito de LUVs de PC:PG 1:1 no espectro de CD do BP100 é mostrado na Figura 47. Observam-se as mesmas mudança que as obtidas com LUVs de PC:PG 7:3. A elipticidade molar diminui em 197 nm com o aumento da concentração das LUVs (Figura 47 B). Com uma razão de pep/lip 0,27 a banda em 197 nm fica positiva e há o aparecimento de outras bandas negativas em 206 nm e 225 nm (Figura 47 A). O efeito das LUVs na elipticidade molar em 197, 207 e 222 nm é mostrado nas figuras 47 B, C, D.

Na razão de 0,1 de pep/lip e LUVs PC:PG 1:1 observou-se uma cinética de vazamento de PTS não linear com vazamento de 100%. Na mesma razão pep/lip o espectro de CD do BP100 foi semelhante a uma estrutura em alfa-hélice, com uma banda positiva em 197 e bandas negativas em 208 e 222 nm.

Assim, pode-se concluir que o aumento na carga negativa das LUVs aproxima a estrutura do BP100 a uma  $\alpha$ -hélice.

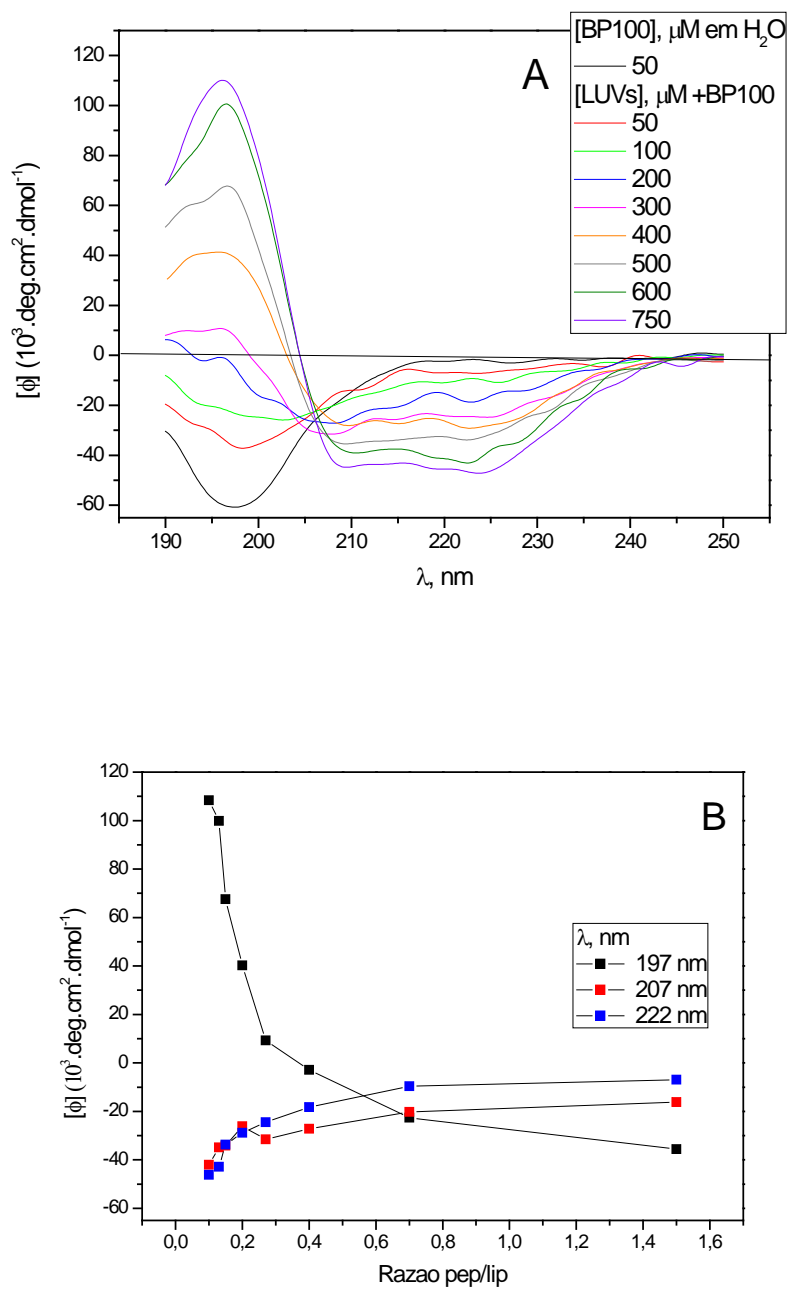


Figura 47. A) Espectro de Dicroísmo Circular do BP100 50  $\mu\text{M}$  com LUVs de PC:PG 1:1. B) Efeito da razão de pep/lip na elipticidade molar do BP100 em 197, 207 e em 222 nm.



#### 4.5 Estudos de Mobilidade Eletroforética das LUVs com BP100

As medidas de mobilidade eletroforética e tamanho das LUVs foram realizados com o fim de complementar as informações já obtidas com os experimentos de fluorescência e dicroísmo circular (CD). Nos estudos com LUVs contendo CF ou PTS observamos que, dependendo da relação pep/lip ocorre a permeabilização das vesículas com liberação para o meio externo dos compostos fluorescentes incorporados no compartimento aquoso. A diferença entre os experimentos de vazamento de LUVs contendo CF dos feitos com LUVs contendo PTS é a força iônica utilizada nos experimentos com CF (ver resultados). Nos experimentos em baixa força iônica observou-se formação de agregados com a adição de BP100 nas LUVs contendo misturas de PC:PG mas não nas LUVs com 100 % PC.

Nos experimentos a seguir mediu-se a mobilidade eletroforética de LUVs de diferentes composições lipídicas após a adição de concentrações crescentes de BP100 (Figura 48 A) em tampão Tris/HCl 0.01 M pH 8, portanto em baixa força iônica.

Para LUVs com 100 % PC a mobilidade inicial foi de  $-1 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$  (Figura 33 A). Adicionando-se BP100 a essas LUVs observa-se que a mobilidade das vesículas diminui, passa por zero e, com o aumento da [BP100], as vesículas passam a ter carga positiva chegando a um valor de  $+1 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$  em  $25 \mu\text{M}$  de BP100. Não foi possível determinar uma constante de ligação do BP100 às LUVs, mas este experimento foi utilizado para demonstrar que o BP100 se liga às LUVs de PC

mesmo na ausência de PG. Apesar das LUVs de PC 100 % serem neutras, como a medida é feita em tampão Tris/HCl, os íons do tampão se ligam aos íons da cabeça polar da PC (trimetilamônio e fosfato) conferindo carga às LUVs que, por isso, migram no campo elétrico. Essa ligação, entretanto, não é suficiente para induzir um vazamento apreciável de CF ou PTS das LUVs no tempo utilizado nesses experimentos.

Em LUVs com 10 e 20% de PG a mobilidade eletroforética inicial é em torno de  $-3,5 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ , compatível com a presença de fosfolípido negativo. Com adição de pequenas quantidades de BP100 a mobilidade eletroforética é reduzida linearmente chegando a  $0 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$  quando a razão pep:lip era igual a 0,2 (Figura 48 B). A partir dessa razão a mobilidade passou a ter valores positivos, mas inclinação da curva de mobilidade vs razão pep:lip diminui bastante. Em  $25 \mu\text{M}$  de BP100 o valor máximo de mobilidade alcançado foi  $+0,5 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ .

Em LUVs de 30, 40, 50 e 70% de PG nas vesículas, os valores iniciais de mobilidade, sem adição de BP100 estavam entre  $-3,5$  e  $-2 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ . O potencial de superfície dessas vesículas praticamente se manteve constante, aumentando ligeiramente até a adição de  $5 \mu\text{M}$  de BP100 (Figura 48 A). Após de adição de  $7,5 \mu\text{M}$  do peptídeo, a mobilidade aumentou abruptamente, chegando próximo a  $0 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$  e se manteve constante até  $25 \mu\text{M}$  de BP100 (Figura 48 A).

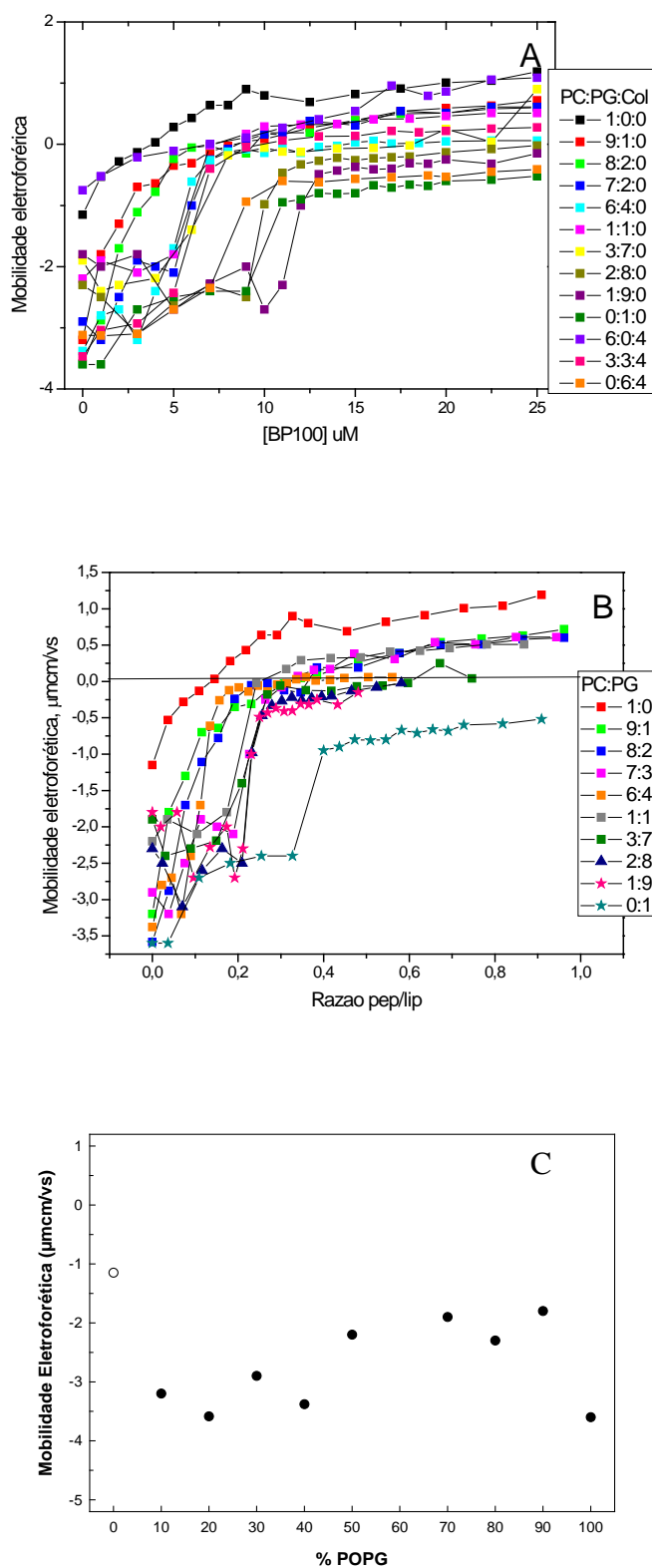


Figura 48. Mobilidade eletroforética das LUVs diversas razões PC:PG em Tampão Tris/HCl 0.01M pH 8,0, da ordem de 25  $\mu\text{M}$  de lipídio. A) Adição de BP100 B) Mobilidade eletroforética x razão de peptídeo/lipídeo de LUVs. C) Mobilidade Eletroforética das LUVs em função da % PG sem adição de BP100.

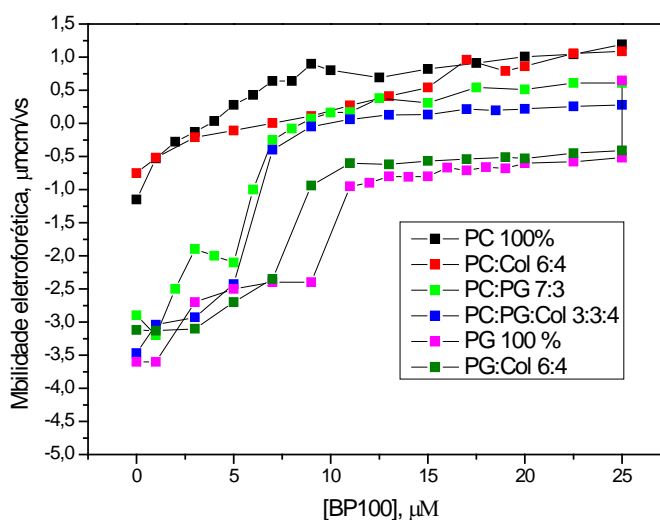
Na figura 48 C a mobilidade eletroforética inicial das vesículas foi graficada em função da razão pep:lip. Observa-se que a mobilidade eletroforética inicial varia pouco com a % PG nas LUVs, mas acima de 20% de PG, a mobilidade se mantém constante e da ordem de  $-3 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$  até 40 % de PG. Acima desta % de PG a mobilidade diminui para  $-2$  até 90 % de PG. Com 100 % de POPG observa-se novo decréscimo. Isto se deve ao fato de que, quando há mais PG na vesícula ocorre maior ligação de contra-íons, ( $\text{Na}^+$  e  $\text{TRIS-H}^+$ ), mantendo-se, porém a carga das vesículas constante.

A adição de BP100 nas LUVs contendo PG não causa grande mudança à mobilidade da vesícula, a não ser quando ocorre neutralização total da carga da vesícula. Isto pode ser verificado pelo salto que se observa no valor de mobilidade na Figura 48 A. A manutenção da carga da vesícula é explicada pela ligação do peptídeo e conseqüente a troca dos contra-íons ( $\text{Na}^+$  e  $\text{TRIS-H}^+$ ) da superfície pelo BP100 que também é positivamente carregado. Portanto ocorre apenas uma substituição dos íons da superfície pelo BP100 com manutenção da carga. A partir da neutralização de todas as cargas da superfície das vesículas, a ligação de mais BP100, impõe uma carga positiva nessas vesículas.

A pequena variação da mobilidade eletroforética das vesículas com adição de baixas concentrações do peptídeo, foi semelhante nas LUVs de 30 a 70% de PG, porém, a concentração de BP100 necessária para ocorrer a neutralização foi diferente (Figura 48 A). Na Figura 48 B estão os valores de mobilidade eletroforética vs pep/lip, de LUVs de composições diferentes, que tem o mesmo perfil que o gráfico da Figura 48 A.

Foi feito também um pequeno estudo do efeito de colesterol na mobilidade eletroforética de LUVs em presença de BP100 (Figura 49). Observa-se que com PC 100 % e PC:colesterol 60:40, em baixas concentrações de BP100, este liga menos às LUVs, como pode ser verificado pela menor mobilidade eletroforética. Mas em altas concentrações de peptídeo, o colesterol não faz mais diferença na ligação. Em LUVs contendo PC:PG 6:4 e PC:PG:colesterol 3:3:4, a presença de colesterol diminui a ligação do peptídeo. Isto pode ser explicado pela diminuição dos grupos carregados na superfície da vesícula (que estão presentes quando existe PC na vesícula) e aumento da rigidez da membrana devido a incorporação do colesterol.

Nos experimentos de mobilidade eletroforética observou-se o aparecimento de turbidez na cubeta em certas LUVs e em algumas relações específicas de pep/lip. Assim, foi feita a determinação do diâmetro hidrodinâmico nas mesmas condições das medidas de mobilidade eletroforética para verificar o efeito do BP100 no tamanho das LUVs.



**Figura 49. Efeito da razão peptídeo/lipídeo na mobilidade eletroforética de LUVs com e sem colesterol, com ~25 µM de lipídio na cubeta.**

#### 4.6 Estudo do efeito de BP100 no Diâmetro Hidrodinâmico das Vesículas

As LUVs resultantes do processo de extrusão apresentam um diâmetro inicial da ordem de 100 nm, independente da composição lipídica. As LUVs de PC 100% e de PC:Col 6:4 não apresentaram variação de diâmetro após adição de BP100 mesmo nas maiores concentrações utilizadas (25  $\mu$ M) (Figura 50).

As LUVs contendo PG, entretanto, a partir de uma determinada razão pep:lip, apresentaram um certo grau de turvação que correspondia à formação de agregados. Com 10 % de PG nas LUVs, a partir de 4  $\mu$ M (relação 0,2 pep/lip) de BP100, o diâmetro das vesículas aumentou de 100 nm chegando a um máximo de aproximadamente 1.400 nm e, a partir de 10  $\mu$ M de peptídeo ( 0,5 pep/lip), o tamanho diminuiu chegando próximo de 300 nm em 22  $\mu$ M de BP100 (Figura 50 A B).

Para LUVs com diferentes % de PG, adições de BP100 promoveram o mesmo fenômeno, ou seja, o diâmetro aparente aumentou chegando a um máximo e depois houve diminuição, o mesmo ocorrendo com a polidispersidade (Figura 50 C).

Pode-se notar que quanto mais aniônica a membrana, maior a concentração de BP100 necessária para causar a agregação das LUVs. As LUVs de 10% de PG apresentaram mudança de diâmetro hidrodinâmico com 4  $\mu$ M de BP100 enquanto as de PG 100% foi preciso de 11  $\mu$ M do peptídeo por exemplo.

A razão de 0,44 pep/lip, aonde se observa a agregação de LUVs de PG 100%, é muito maior que a razão mínima para o efeito de vazamento de aproximadamente 100% de PTS em baixa força iônica, que ocorre em 0,029 pep/lip.

Em LUVs de 30% de POPG foi preciso uma razão de 0,37 pep/lip para causar a agregação de LUVs. Essa razão de BP100/lipídeo corresponde a cinética de vazamento de PTS não linear e que apresenta quase 100% de vazamento (razão de

0,4 pep/lip nas cinéticas). Além disso, no experimento de dicroísmo circular, essa razão apresentou uma transição do comportamento randômico para a estrutura semelhante a uma alfa-hélice.

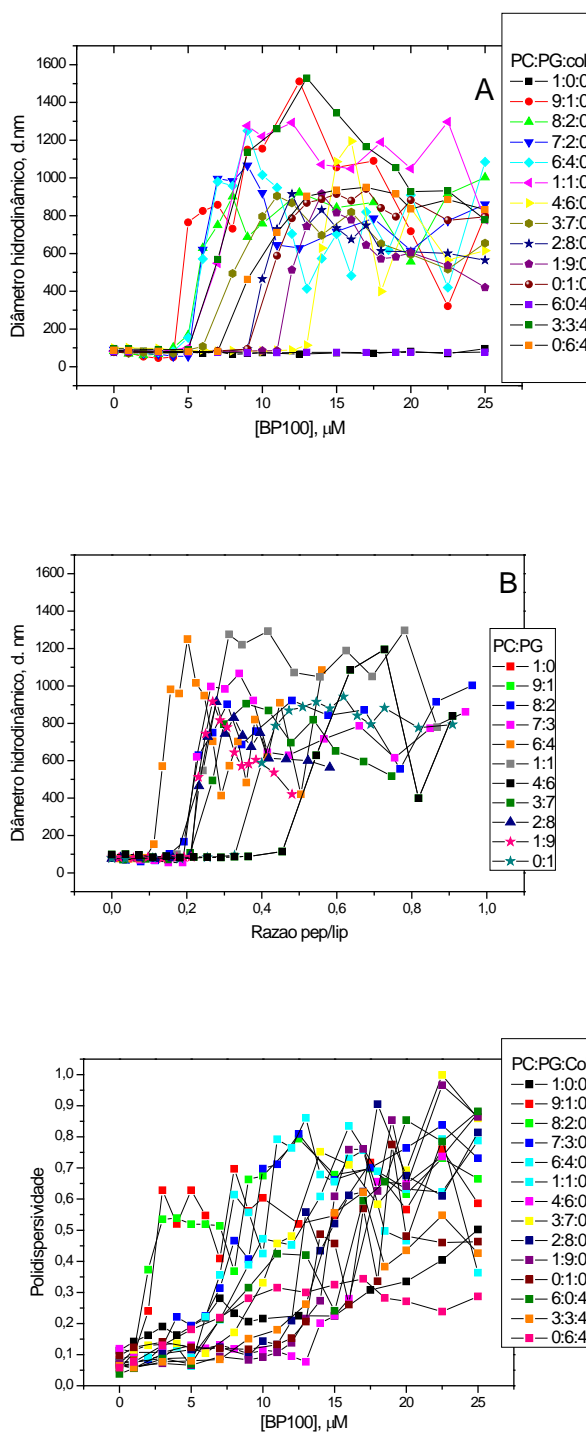


Figura 50. Efeito de BP100 no diâmetro hidrodinâmico das diversas LUVs. A) Efeito da [BP100] em 20  $\mu\text{M}$  de lipídio em Tampão Tris/HCl 0.01 M pH8. B) Efeito da razão peptídeo/lípido no diâmetro das LUVs. C) Polidispersidade das medidas de diâmetro hidrodinâmico das diversas LUVs com adição de BP100, 20  $\mu\text{M}$  de lipídio em Tampão Tris/HCl 0.01 M pH8.

#### 4.7 Microscopia Óptica de GUVs em presença do BP100

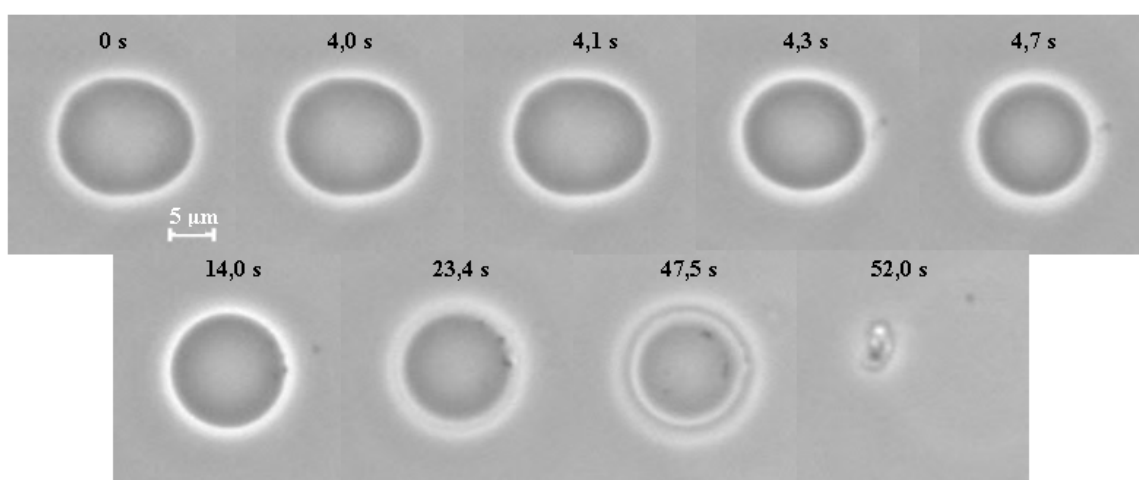
Para uma análise visual da ação que o BP100 tem nas membranas, foi feito um estudo por microscopia óptica de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) em colaboração com a Prof. Dra. Karin do A. Riske do Departamento de Biofísica da Unifesp. A visualização das GUVs em presença de peptídeos antimicrobianos permite uma melhor compreensão do mecanismo de ação destes peptídeos (Lee *et al.*, 2008 Tamba *et al.*, 2007 e 2005, Ambroggio *et al.*, 2005). As GUVs contêm inicialmente uma assimetria na distribuição de açúcares (sacarose no volume interno e glicose no meio externo), o que lhes confere um alto contraste óptico quando observadas por microscopia por contraste de fase. Isto permite que a permeabilidade da membrana à glicose e à sacarose seja diretamente visualizada: a manutenção do contraste óptico das GUVs em presença do BP100 mostra que a membrana continua impermeável aos açúcares, enquanto que a perda deste contraste indica que a membrana permite a passagem de sacarose e glicose.

Dois arranjos experimentais foram utilizados. Em um deles, uma solução de peptídeo (50-100  $\mu\text{M}$  BP100) foi injetada por uma micropipeta de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro nas vizinhanças de GUVs (Domingues *et al.*, 2010). Desta forma, foi possível observar a resposta de vesículas à injeção local de peptídeos. Entretanto, a concentração efetiva de peptídeo próxima à membrana variava com o diâmetro da micropipeta, com a distância entre micropipeta e GUVs e com a pressão de injeção. Alternativamente, uma solução de BP100 (2-50  $\mu\text{M}$ ) foi preparada na cela de observação e uma pequena alíquota de GUVs foi adicionada. Neste caso, o comportamento de diversas GUVs foi monitorado em presença de uma concentração definida de BP100, mas não tínhamos acesso à situação inicial das GUVs, na ausência de peptídeos. Em ambos os casos a concentração lipídica era



da ordem de 1  $\mu\text{M}$ . Duas composições de membrana foram testadas, POPC puro e POPC:POPG 70:30.

Os experimentos com microscopia óptica de GUVs mostram que o primeiro efeito causado pelo BP100 nas duas composições de membrana é um aumento de curvatura espontânea da membrana assim que o peptídeo é adicionado. Esse fenômeno só é visualizado em vesículas que possuem inicialmente excesso de área, em que ocorre flutuação da membrana. Assim, o acúmulo de peptídeos na monocamada externa gera uma diferença de área entre as monocamadas externa e interna, fazendo com que a membrana se curve.

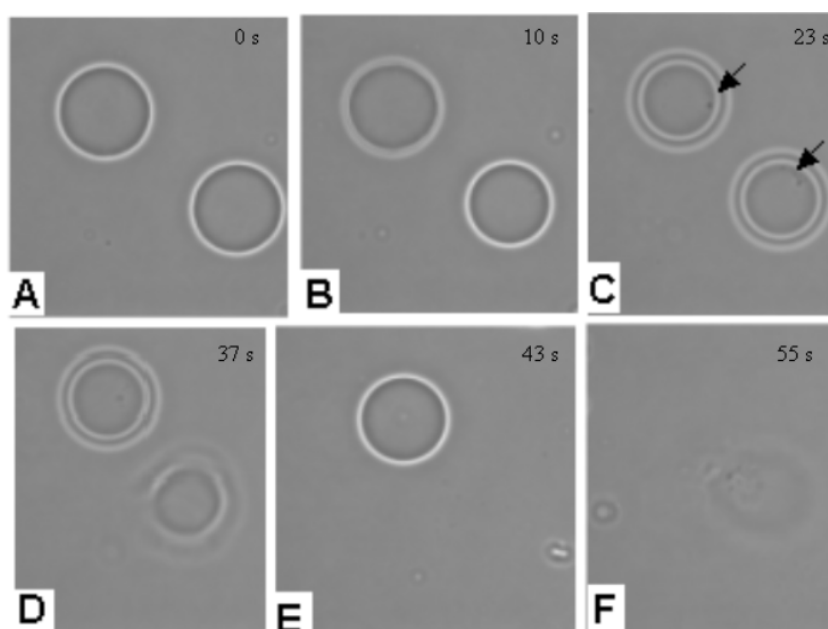


**Figura 51.** GUVs de POPC:POPG 7:3 num aumento de 63 vezes com adição de BP100 pela micropipeta com observação de 0 a 52 s. Depois de 23,4 s após do início da adição do BP100 é nítida a observação de agregados de peptídeo e lipídeo na superfície da GUV e em 52 s ocorre a ruptura da membrana.

Conseqüentemente ocorrem mudanças morfológicas, como a formação de buds. Um exemplo deste comportamento está mostrado nas primeiras fotos da Figura 51 obtidas durante injeção de BP100 em uma GUV de POPC:POPG 7:3 (veja formação de um bud do lado direito da vesícula entre 4,1 e 4,7 s).

Posteriormente, pôde-se observar a formação de regiões densas na superfície das GUVs, o que indica um acúmulo local de lipídios (fotos posteriores na

Figura 51, obtidas em 23,4 s e 47,5 s). Esse efeito parece indicar que a ligação das moléculas de peptídeo com a superfície da vesícula promove uma dobra da membrana sobre si mesma. Esse acúmulo parece ser mais marcante em GUVs de POPC:POPG 7:3 que de POPC puro. A Figura 52 mostra um exemplo semelhante obtido com injeção de BP100 em GUVs de POPC puro. Inicialmente mudanças morfológicas mostram um aumento da curvatura espontânea (10 s) com posterior formação de domínios na superfície das GUVs (23 s).

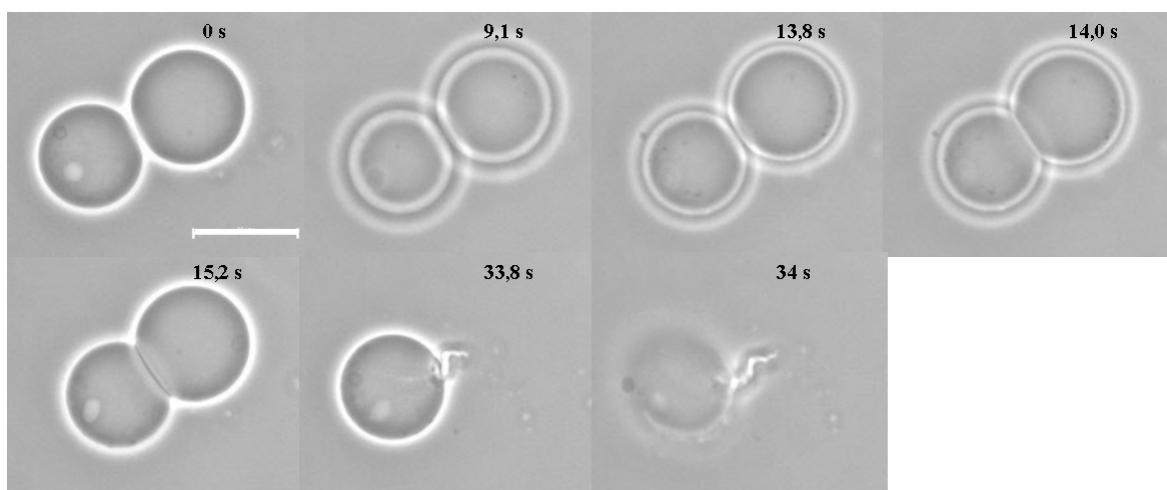


**Figura 52.** GUVs de POPC num aumento de 63 vezes com adição de 50  $\mu\text{M}$  de BP100 pela micropipeta com observação de 0 a 55 s. Depois de 23 s após do início da adição do BP100 é nítida a observação de agregados de peptídeo e lipídeo na superfície das GUVs e em 55 s ocorre a ruptura da membrana.

Os experimentos com microscopia óptica de GUVs mostram, portanto, que o primeiro efeito causado pelo BP100 em vesículas de POPC e POPC:POPG 7:3 é um aumento da curvatura espontânea devido à ligação do peptídeo à monocamada externa, seguido pela formação de agregados de peptídeo e lipídeo na superfície das GUVs que causam dobras da membrana. Em seguida, as GUVs explodem (52 s

na Figura 51 e 37-55 s na Figura 52), provavelmente devido a uma desestabilização da membrana pelo BP100. Efeito semelhante foi causado pela gomesina em GUVs (Domingues *et al.*, 2010).

Em algumas situações foi observada a agregação entre GUVs devido à presença do BP100. Esse efeito foi mais evidente em GUVs contendo POPG, como mostra o exemplo da Figura 53 a partir de 14 s depois do início da adição de BP100 pela micropipeta. No final, ambas as GUVs agregadas acabaram explodindo (após 33,8 e 34 s). De forma semelhante, experimentos de DLS mostraram a agregação de LUVs contendo PG.

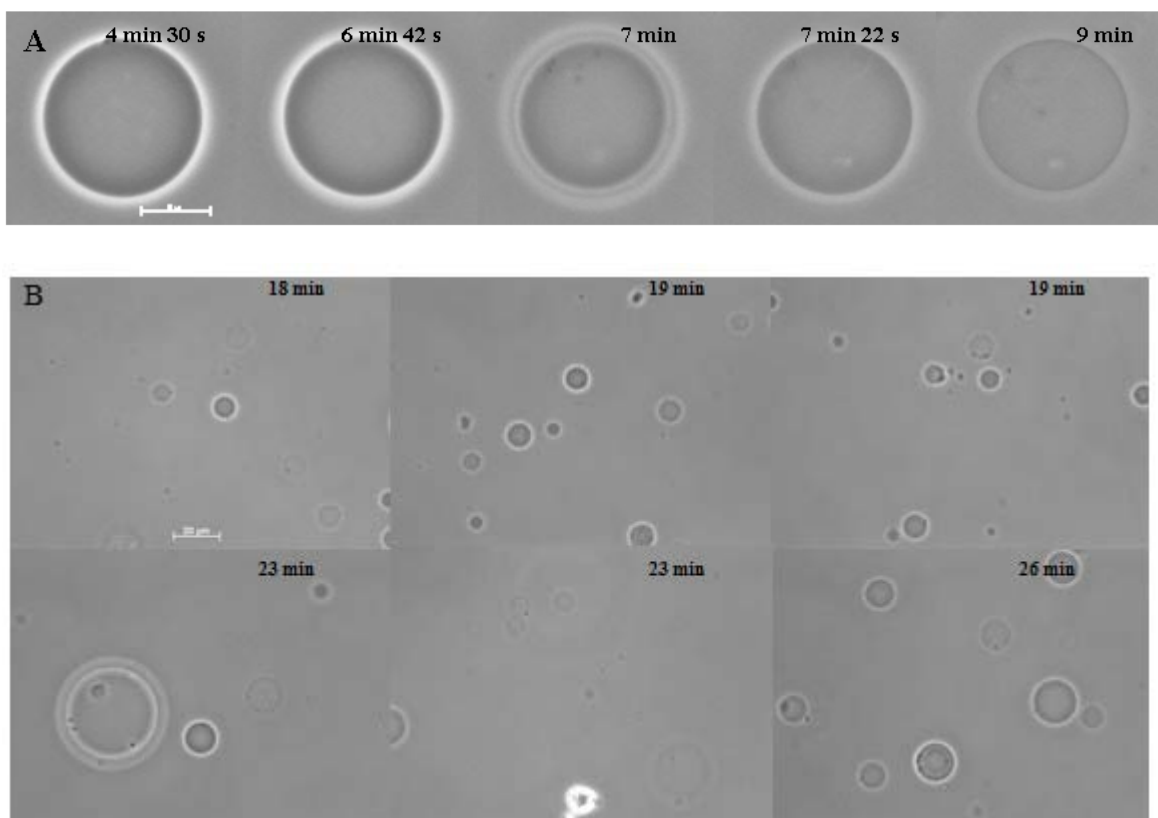


**Figura 53.** GUVs de POPC:POPG 7:3 num aumento de 63 vezes com adição de BP100 pela micropipeta com observação de 0 a 34 s, a escala representa 20µm. Em 0 s observa -se duas GUVs próximas e depois de 14,0 s ocorre a agregação das duas vesículas. Em 33,8 s ocorre o rompimento da GUV superior e em 43 s o rompimento da GUV inferior.

Entretanto, a extensão de agregação é certamente menor entre GUVs, o que provavelmente advém da menor concentração lipídica nos experimentos por microscopia e do menor coeficiente de difusão de GUVs em comparação ao de LUVs.

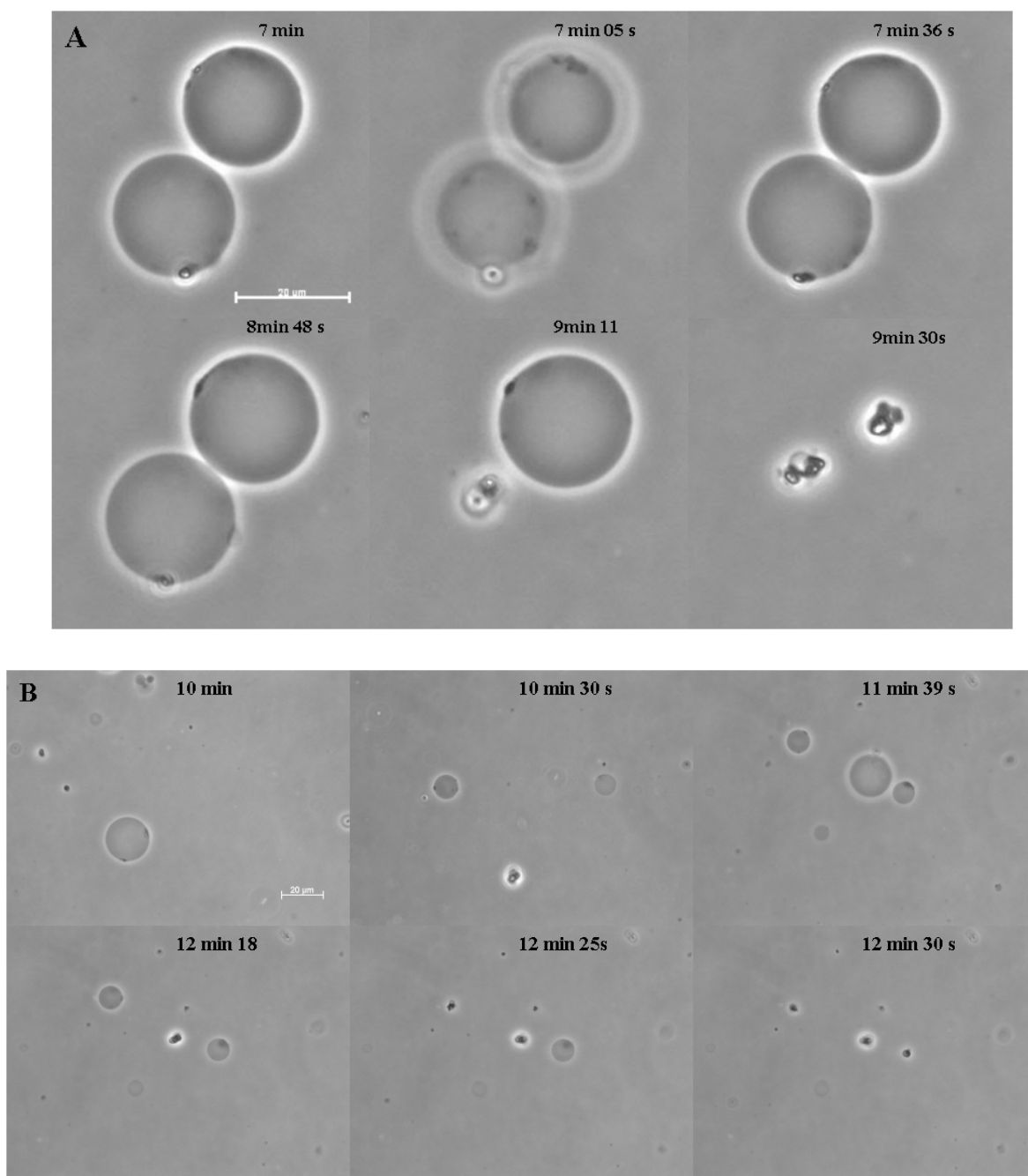
É importante ressaltar que a injeção de BP100 com uma micropipeta em GUVs individuais potencializa a explosão de GUVs, devido à distribuição não homogênea do BP100 na superfície da vesícula em decorrência da injeção local. Os experimentos obtidos com o protocolo de diluição de GUVs em uma solução de BP100 mostraram que a maioria das GUVs de POPC puro perdia a assimetria inicial de açúcares, o que era visualizado por uma diminuição do contraste óptico, significando que a membrana tornava-se permeável, mas as vesículas permaneciam íntegras. No entanto, o BP100 causou explosão de GUVs de POPC:POPG 70:30 mesmo nesse arranjo experimental, mostrando que o mecanismo de ação do BP100 parece ser modulado pela presença de lipídios negativos na membrana. Uma hipótese para explicar tal evento é que o BP100, por possuir parte da sequência de aminoácidos da melitina, tenha uma ação semelhante à deste peptídeo, causando abertura de poros e vazamento lento em vesículas com carga líquida zero e rompendo vesículas contendo POPG.

As Figuras 54 e 55 mostram exemplos de diluição de GUVs de POPC puro e POPC:POPG 70:30, respectivamente, em uma solução 50  $\mu$ M BP100. A Figura 55A mostra a perda de contraste gradual de uma GUV de POPC puro após a diluição em BP100. Além disso, é possível observar a formação de domínios na superfície da GUV (7 min) como mostrado anteriormente no protocolo de injeção. Na Figura 55B são mostradas imagens obtidas de diferentes regiões da amostra ~20 minutos após a diluição, onde se observam várias GUVs que foram permeabilizadas e que portanto perdaram o alto contraste óptico.



**Figura 54.** GUVs de POPC com 50  $\mu\text{M}$  de BP100 num aumento de 63 vezes, as escalas representam em A 10  $\mu\text{m}$  e em B 20  $\mu\text{m}$ , A. Em 7 min pôde -se observar a perda de contraste da GUV, assim como em 7 min e 22 s e 9 min, B. Várias GUVs no campo de visão do microscópio com perda de contraste até 26 minutos após adição do BP100.

A Figura 55 A mostra duas GUVs que apresentam domínios em sua superfície e que acabam rompendo-se após  $\sim 9$  min. O BP100 também causou perda de contraste em algumas GUVs de POPC:POPG 7:3, como mostram as imagens obtidas 10 min e 10 min 30 s após a diluição (Figura 55 B), mas a quantidade de eventos de bursts/rompimento foi nitidamente maior. Além disso, muitas GUVs sem contraste romperam-se, como mostra a sequência de três GUVs na Figura 55 B (de 11 min 39 s até 12 min 30 s).



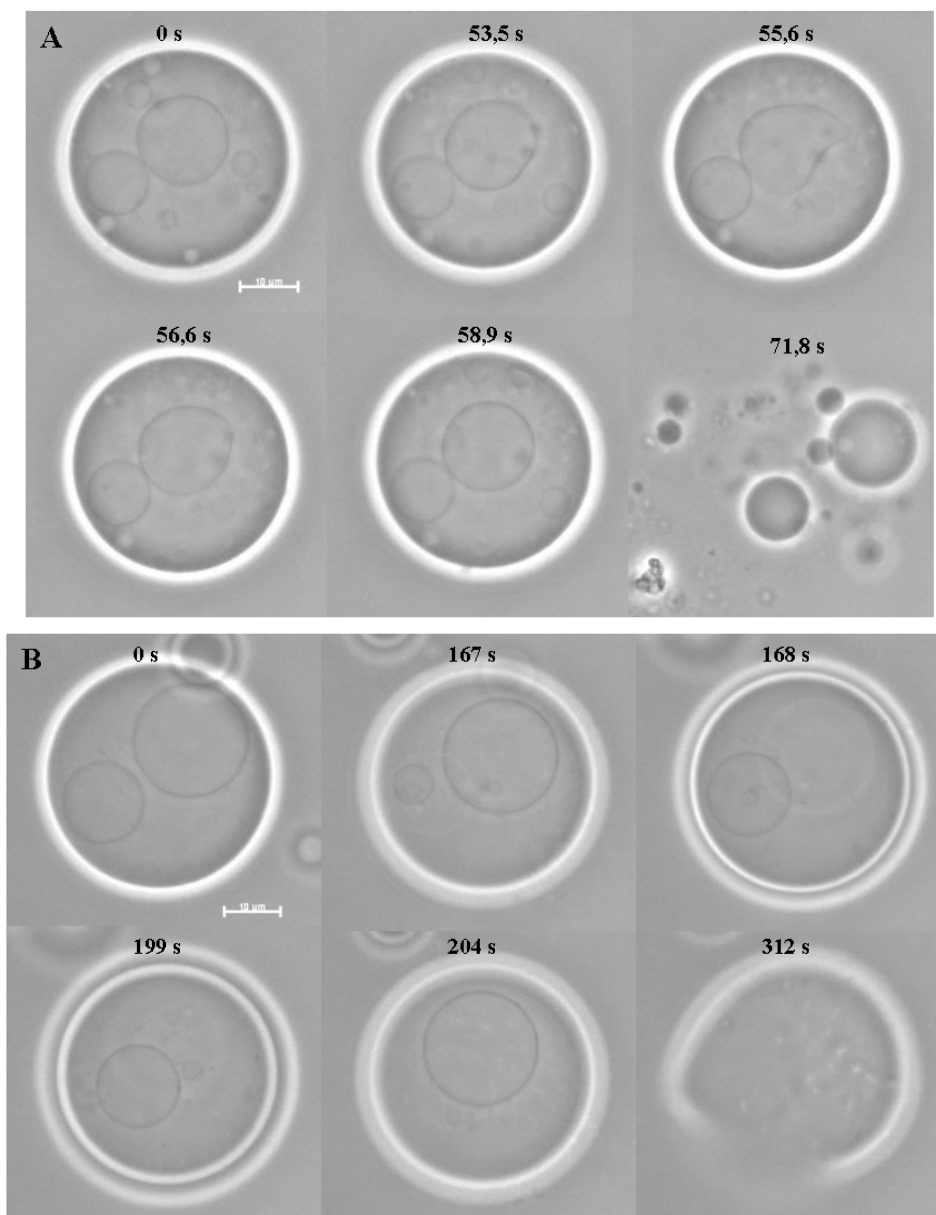
**Figura 55.** GUVs de POPC:POPG 7:3 num aumento de 63 vezes com adição prévia de 50 $\mu$ M de BP100, a escala representa 20  $\mu$ m, A. Em 7 minutos de observação, é possível ver agregados de peptídeo com lipídeo na superfície das GUVs. Em 8 min e 48 s pode-se notar a perda de contraste da GUV inferior e agregados de lipídeo com BP100, em 9 min e 11 s ocorre o rompimento da GUV inferior e em 9 min e 30 s o rompimento da GUV superior, B. Várias GUVs sem contraste de fase no mesmo vídeo.

Algumas GUVs, principalmente nas preparações de POPC puro, tinham em seu interior várias vesículas menores. A injeção de BP100 nessas GUVs mostrou que o BP100 causou mudanças morfológicas nas vesículas encapsuladas, sem que

a vesícula externa sofresse permeabilização e perda de contraste óptico. Como não foram obtidos exemplos suficientes de vesículas internalizadas em GUVs de POPC:POPG 7:3, não está claro se a penetração do BP100 ocorre somente em GUVs de POPC puro, ou também em GUVs contendo POPG.

A Fig. 56 mostra dois exemplos dessa capacidade de penetração do BP100. Na Figura 56 A são observadas mudanças morfológicas nas GUVs internas sem que haja perda de contraste (ou permeabilização) da GUV externa. Essa mudança morfológica é a mesma que ocorre na formação de buds discutida anteriormente na Figura 51. Na Figura 56 B pode-se observar que além de mudanças morfológicas ocorrem também a formação de domínios ou agregados de peptídeo e lipídeo nas GUVs internas, mesmo a membrana da GUV externa permanecendo impermeável aos açúcares.

Com os resultados dos experimentos das GUVs pode-se afirmar que o BP100 atua tanto em membranas de carga líquida zero (GUVs de POPC puro) e membranas de caráter aniônico (GUVs de POPC:POPG 7:3). A adição do peptídeo em GUVs causa inicialmente um aumento da curvatura espontânea da membrana devido à ligação com a monocamada externa, seguida da formação de domínios na superfície das vesículas, indicando uma possível dobra da membrana mediada pela ligação peptídica. Em alguns casos, a ligação ao BP100 promoveu também uma agregação entre GUVs, assim como visto extensamente em dispersões de LUVs. Posteriormente, foi observada com maior frequência a perda de contraste em GUVs de POPC puro e a explosão de GUVs de POPC:POPG 70:30, de forma semelhante à observada para a melitina (Mally *et al.*, 1768).



**Figura 56.** GUVs de POPC puro num aumento de 63 vezes com adição de BP100 pela micropipeta, a escala representa 10  $\mu\text{m}$ . A. Em 53,5 s é observado a flutuação da vesícula interna a GUV maior e em 71,8 ocorre o rompimento da GUV maior liberando as GUVs internas, B. Outra grade GUV com GUVs internas, em 312 s ocorre o rompimento.

Os resultados obtidos com as GUVs corroboram as conclusões a que chegamos com as cinéticas de vazamento de LUVs contendo CF e PTS. Os experimentos com as GUVs permitiram visualizar todos os fenômenos causados pelo BP100 detectados pelos outros métodos.

Baseados nos experimentos de microscopia óptica pode-se propor que a taxa inicial de vazamento lenta observada nas cinéticas com CF e PTS ocorra



concomitante à formação de domínios na superfície das vesículas. As cinéticas, bi ou trifásicas, indicaram que ocorre uma estruturação lenta do peptídeo na membrana que é sensível a força iônica. A alta taxa de vazamento atingida em tempos maiores indicaria a permeabilização total da membrana e/ou a explosão das vesículas.

As medidas de mobilidade eletroforética confirmaram a ligação do BP100 tanto nas membranas neutras como em LUVs contendo PG e as análises de diâmetro hidrodinâmico comprovaram a agregação de LUVs aniônicas a partir de concentrações definidas de BP100 no meio. Esta agregação foi verificada também nos experimentos de LUVs contendo PTS mas não com as LUVs contendo CF por causa da alta força iônica.

A estruturação que o BP100 sofre quando se liga às LUVs pode ser observada nos experimentos de dicroísmo circular com a mudança na estrutura secundária do BP100, de randômica em água para uma alfa-hélice com o aumento da carga negativa das LUVs.

O que se pode sugerir com estes resultados é que o BP100 em meio aquoso tem estrutura ao acaso e que o peptídeo permanece com a mesma estrutura quando em contato com LUVs de PC. Porém, ele é capaz de mudar o potencial de superfície dessas vesículas, ligando-se na bicamada lipídica, formando domínios na membrana, buds, levando ao vazamento e até rompimento da vesícula se em altas concentrações. A ausência de mudança de estrutura do peptídeo indica que ele não forma poros efetivos e assim o vazamento dessas LUVs e GUVs de PC são lentos.

Assim, em membranas de carga negativa, o BP100 atua com diferentes velocidades chegando a ter uma ação detergente como observado nos resultados de GUVs e fluorescência.

O BP100 tem sido bastante estudado por diversos pesquisadores devido às suas características antimicrobianas. Entre os trabalhos realizados com esse peptídeo destacam-se os de Ferre *et al.* Apesar de todos os trabalhos já realizados com o BP100 acreditamos que nossos estudos apresentam resultados diferentes dos obtidos em trabalhos anteriores de outros grupos.

Os experimentos de Ferre *et al.*, por exemplo, foram feitos com LUVs contendo N-NBD-PE, uma fosfolípido com uma sonda fluorescente que é incorporada na membrana lipídica, e  $\text{CoCl}_2$  como supressor. Na presença de  $\text{CoCl}_2$  apenas a fluorescência das moléculas de N-NBD-PE na face externa das LUVs é suprimida. Com a adição do BP100 e rompimento da bicamada ocorre a entrada do  $\text{CoCl}_2$  nas LUVs levando a supressão da fluorescência do N-NBD-PE. As cinéticas de vazamento, feitas em tampão 10 mM HEPES em pH 7,4 com 150 mM de NaCl, em LUVs de POPC e POPC-Col, eram hiperbólicas e em vesículas contendo PG obteve-se fluorescência máxima logo após a adição do BP100 com várias razões de peptídeo/lípido. Esses resultados são próximos dos obtidos nesta dissertação em relação ao comportamento das cinéticas e das composições lipídicas de membranas estudadas, porém aqui foram estudadas diferentes composições de LUVs em diversas razões de peptídeo:lípido. O uso de duas metodologias diferentes de fluorescência permitiu verificar o efeito de força iônica na ligação do peptídeo e mostrar a sua eficiência já que mesmo em 300 mM de NaCl, ocorre a formação de poros e lise das vesículas.

Os experimentos de agregação do Ferre, *et al.* mostram que ocorre agregação de LUVs de 100 para 1000 nm quando há uma razão de 0,12 peptídeo/lípido e nos experimentos de potencial zeta foram analisadas somente 3

razões de peptídeo e lipídeo notando-se uma mudança de carga na superfície da membrana.

Nesta dissertação a quantificação do ponto de equivalência não foi feita por causa da turvação da solução devido a agregação das vesículas. Nós observamos, entretanto, que a mobilidade eletroforetica ( $\zeta$ , portanto, o potencial zeta) muda pouco com LUVs contendo acima de 20 % de PG. Porém, mesmo assim, o BP100 se liga mais nas LUVs contendo mais PG. Isto significa que as cargas “aparecem” com a ligação do peptídeo, apesar de não contribuírem para aumentar a carga da vesícula como um todo. Este fenômeno se deve a troca iônica entre os ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Tris}/\text{H}^+$  e o BP100 que também é carregado positivamente.

A estruturação do BP100 na ligação com LUVs contendo PG foi verificada por CD pela primeira vez neste trabalho o que levou à sugestão de organização de um poro na bicamada das LUVs.

A caracterização do efeito de BP100 nas GUVs também foi essencial para mostrar que as diferentes fases das cinéticas correspondem a fenômenos de organização do peptídeo na membrana, que cada etapa tem duração diferente que depende da carga efetiva da membrana e não de sua carga residual, medida pelo potencial zeta. Por atuar em membranas negativas e apresentar baixa atividade em membranas neutras e com colesterol, O BP100 é um grande candidato a maiores estudos para verificação da sua eficácia e potência.

## 5. CONCLUSÕES

O peptídeo antimicrobiano BP100 é capaz de permeabilizar vesículas preparadas com diferentes misturas de PC:PG, mesmo em alta força iônica. O aumento da carga negativa das vesículas aumenta significativamente a atividade do peptídeo enquanto a presença de colesterol nas vesículas diminui a sua atividade.

O BP100 apresentou uma estrutura ao acaso em meio aquoso e, em presença de vesículas de PC sua estrutura não se alterou enquanto nas vesículas de PC:PG, houve a formação de estrutura típica de alfa-hélice. O BP100 altera a mobilidade eletroforética as LUVs de PC mas não leva à agregação das mesmas. Nas LUVs contendo PG observa-se agregação e alteração da mobilidade eletroforética. Estes resultados confirmam a forte ligação do BP100 às LUVs com carga negativa.

A observação direta da ação do BP100 sobre as GUVs preparadas com PC e com misturas de PC:PG, mostrou que o peptídeo forma agregados na superfície da membrana e diminui o seu diâmetro. Além disso, observou-se agregação de vesículas, formação de brotos na superfície das vesículas e, posteriormente, rompimento das mesmas com o vazamento de todo conteúdo interno. A mudança de estrutura secundária do BP100 quando da sua ligação com as LUVs foi corroborada pelos estudos de dicroísmo circular.

O conjunto dos dados obtidos até o momento é sugestivo de que o BP100 atua ligando-se às vesículas negativas formando estruturas similares a poros através dos quais o conteúdo interno extravasa. A superfície negativa das vesículas induz a formação de estrutura em  $\alpha$ -hélice no BP100 o que deve favorecer estruturação do poro.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ahyayauch, H.; Larijane, B.; Alonso, A. Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state influence of the acyl chain structure. Biochim Biophys Acta 2006; **1758**:190-196.

Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. Cur Opin Chem Biol 2004; **8**: 211-221.

Alves, C.S.; Melo, M.N.; Franguelim, H.G.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Bardaji, E.; Kowalsczyk, W.; Andreu, D.; Santos, N.C.; Fernandes, M.X.; Castanho, M.A.R.B. Escherichia coli Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR. J Biol Chem 2010; **285**:27536-27544.

Ambroggio, E.E.; Separovic, F.; Bowie, J.H.; Fidelio, G.D. and Bagatolli, L.A. Direct visualization of the lytic action of antibiotic peptides. Biophys J 2005; **89**:1874-1881.

Angelova, M.I.; Dimitrov, D.S. Liposome electroformation. Faraday Discuss Chem Soc 1986; **81**:303–311.

Archilha, N.L., Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolipídeos. Instituto de Física - Universidade de São Paulo, 2008, 87 p.

Arcidiacono, S.; Soared, J.W.; Meehan, A.M.; Merek, P.; Kirby, R. Membrane permeability and antimicrobial kinetics of cecropins P1 against Escherichia coli. Peptide Sci 2008; **15**:398-403.

Atkins, P. W., Physical Chemistry, 4<sup>th</sup> Edition, Oxford University Press, Oxford, 1990.

Avantlipids, [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com). Acesso em 10/2011.

Bergeon, J.A.; Chan, Y.N.; Charles, B.G.; Toth, I. Oral absorption enhancement of dipeptide L-Glu-L-Trp-L-OH, by lipid and Glycosyl conjugation. Biopolymers Sci 2008; **90**:633-639.

Boman, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Inter Med 2003; **254**:197–215.

Brgles, M.; Jurasin, D.; Sikiric, M.D.; Frkanec, R.; Tomasic, J. Entrapment of ovalbumin into liposomes - factors affecting entrapment efficiency, Liposome Size, and Zeta Potential. J Liposome Res 2008 **18**:235–248.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature 2005; **238**:350-353.

Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.; Hoffmann, D. D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. Dev Comp Immunol 1999; **329**:344-23.

Bulet, P.; Stöcklin, R.; Menin, L. Anti-Microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev 2004; **189**:169-184.

Bull, L.T.; Villas Boas, R.L.; Nakagawa J. Variações no balanço catiônico do solo induzidas pela adubação potássica e efeitos na cultura do alho vernalizado. Sci Agr 1998; **55**: 456-464.

Cerón, J.; Contreras-Moreno, J.; Puertollano, E.; Cienfuegos, G.A.; Puertollano, M.A.; Pablo, M.A. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. Peptides 2010; **31**:1494-1503.

Chan, W.C. e White, P.D. Fmoc solid phase peptide synthesis. Oxford University Press 2000.

Chen, R.F. and Knutson, J.R., Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. Anal Biochem 1998; **72**: 61–77.

Chen, P.S.Jr.; Toribara, T.Y. and Warner, H. Micro-determination of phosphorus. Anal Chem 1956; **28**:1756-1768

Daffre, S.; Miranda, A.; Miranda, M.T.M., Bulet, P.; Silva Jr. P.I.; Machado, A.; Fogaça, A.C.; Lorenzini, D.M.; Pereira L.S.; Fázio, M.A.; Esteves, E.; Burgierman, M.R. Peptídeos antibióticos, peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. Pesq Biotec Ciên & Desenv 2001; **23**: 48-55.

Dempsey, C.E.; Hawrani, A.; Howe, R.A.; Walsh, T.R. Amphipathic antimicrobial peptides - from biophysics to therapeutics? Protein and Peptide Lett. 2011; **17**:1334-1344.

Dimarcq, J.L.; Zachary, D.; Hoffman, J.A.; Hoffman, D. and Reichart, J. M. Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. EMBO J 1990; **9**: 2507-2515.

Domingues, T. M.; Riske, K. A.; Miranda, A. Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide gomesin by observing giant unilamellar vesicles. Langmuir 2010; **26**:11077-11084.

Durell, S. R.; Raghunathan, G. e Guy, R. Modeling the ion channel structure of cecropin. Biophys J 1992; **63**:1623-1631.

Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes, Biot Agron Soc Env 2010; **14**, 719-736.

Epand, R.M.; Epand, R.F.; Arnusch, C.J.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Wang, G.; Shai, Y. Lipid clustering by three homologous arginine-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure. Biochim Biophys Acta 2010; **1798**:1272–1280.

Falla, T.J.; D. Karunaratne, N.; and Hancock, R.E.W. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. J Biol Chem 1996; **271**:19298-19303.

Ferre, R.; Melo, M.N.; Correia, A.D.; Feliu, L.; Bardaji, E.; Planas, M.; Castanho, M. Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. Biophys J 2009; **96**:1815-1827.

Fontoura, R. Purificação parcial e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Pseudomonas aeruginosa* 4B. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 1125 p.

Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamilli, J. M.; Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. Biopolymers 1998; **47**:479-491.

Gianguaspero, A.; Sandri, L.; Tossi, A. Amphipatic alfa helical antimicrobial peptides. A systemic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. Eur J Biochem 2001. **268**:5589-5600.

Glättli, A.; Chandrasekhar, I.; Gunsteren, W.F. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. Eur Biophys J 2006. **35**:255-267.

Greenfield, N. e Fasman G. D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. Biochemistry 1969; **8**:4108-4116.

Gudmundsson, G.H.; Lidholm, D-A.; Åsling, B.; Ganl, R. e Boman, H. The Cecropin locus. J Biol Chem 1991; **18**:11510-11517.

Harris, F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms and their mechanisms of action, Cur Protein Pept Sci 2009; 10: 585-606

Hertog, A.L.; Sang, H.W.W.F.; Kraayenhof, R.; Bolscher, J.G.M.; Hof, W.W.; Veerman, E.C.I.; Amerongen, A.V.N. Interaction of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. Biochem J 2004; **379**:665-672.

Huang, H.W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. Biochemistry 2000; **39**: 8347-8352.

Ivanov, K.T.; Karelin, A.A.; Nazimov, I.V.; Pletnev, V.Z. Hemoglobin as a potential source of natural regulatory oligopeptides. Biopolymers 1997; **43**:171-188.

Janssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents, Clinic Micro Rev 2006; **19**:491-511.

Kelly, S.M.; Jess, T.J. e Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. Biochim Biophys Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 2005; **1751**:119-139.

Korolkovas, A.; Burckhalter, J.H. Química Farmacêutica, Editora Guanabara, 1982. Cap 32.



Ladokhin, A.S.; White, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim Biophys Acta* 2001; **260**: 1514-253.

Lai, R.; Zheng, Y.T.; Shen, J.H.; Liu, G.J.; Liu, H.; Lee, W.H.; Tang, S.Z.; Zhang, Y. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*, *Peptides* 2002; **23**:427-435.

Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescent Spectroscopy. Springer Science, 3<sup>th</sup> Edition, Business Media LLC 2006.

Lee, M.T.; Hung, W.C.; Chen, F.Y.; Huang, H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Nat Acad Sci USA* 2008; **105**: 5087–5092.

Lin, J.H.; Beumgaertner, A. Stability of a Melittin pore in a lipid bilayer: a molecular dynamics study, *Biophys J* 2000; **78**:1714-1724.

Lu, X.; Jin, X.; Zhu, J.; Mei, H.; Ma, Y.; Chu, F.; Wang, Y.; Li, X. Expression of the antimicrobial peptide cecropin fused with human lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot* 2010; **87**:2169-2176.

Mader, J.S.; Hoskin, D.W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment, *Expert Opin Investig Drugs*. 2006; **15**:933-946.

Mally, M.; Majhenc, J.; Svetina, S.; Zeks, B. The response of giant phospholipid vesicles to pore-forming peptide melittin. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1768**:1179–1189.

Zetasizer Nano User Manual, Mano317, issue 3.1 July 2007. Malvern Instruments Ltd. 2003, 2004, 2006, 2007.

Marassi, F.M.; Opella, S.J.; Stanley J.; Juvvadi, P.; e Merrifield, R. B. Orientation of Cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 1999; **77**: 3152–3155.

Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Cur Op Pharmacol* 2006; **6**:468-472.

Maximiano, F.A.; Silva, M.A.; Daghastanli, K.R.P.; Araujo, P.S.; Chaimovich, H. e Cuccovia, I.M. A convenient method for lecithin purification from fresh eggs, Quim. Nova. 2008; **31**:910-913.

Mihajlovic, M.; Lazaridis, T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. Biochim Biophys Acta 2010; **1798**: 1485-1493.

Mouritsen, O.G.; Zuckermann, M.J. What's so special about cholesterol? Lipids 2004; **39**:1101-1113.

Nestorovich, E.M.; Danelon, C.; Winterhalter, M.; Bezrukov, S.M. Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. PNAS 2001; **99**: 9789-9794.

Neto, M.T. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua Prevenção. Acta Pediátrica Portuguesa, 2006; **1**:23-26.

Nguyen, L.T.; Chan, D.I.; Boszhard, L.; Zaat, S.A.J.; Vogel, H.J. Structure-function studies of chemokine-derived carboxy-terminal antimicrobial peptides, Biochim Biophys Acta 2010; **1798**:1062–1072.

Padovan, L.; Scocchi, M.; Tossi, A. Structural aspects of plant antimicrobial peptide. Cur Prot Pept Sci 2010; **11**:210-219.

Pelegri, P.B.; Sarto, R.P.; Silva, O.N.; Franco, O.L.; Grossi-de-Sa, M.G. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. Biochem Res Int. 2011, 2011:1-9.

Photophysics, <http://www.photophysics.com/secondarystructure.php>, acesso em 10/2011.

Prates, M.V.; Júnior, C.B. Peptídeos Antimicrobianos: Uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. Biotec Ciência Des 2001; **23**:30-36.

Raghuraman, H.; Chattopadhyay, A.A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. Bioscience Rep 2007; **27**:189–223

Raghuraman, H. and Chattopadhyay, A. Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution, Biopolymers 2006; **83**:111–121.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. Farmacologia, 5 ed. Churchill Livingstone ELSEVIER, São Paulo 2003, Cap 44: 716-719.

Riske, K.A. and Dimova, R. Electro-deformation and -poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution, Biophys J 2005; **88**; 1143-1155.

Rouser, G.; Turner, J.D. precise quantitative lipids by thin-layer cellulose i. erythrocyte determination and column chromatography of triethylaminoethyl- human blood lipids. Anal Biochem 1970; **38**: 423-439.

Schmidt, N.W.; Mishra, A.; Lai, G.H.; Davis, M.; Sanders, L.K.; Tran, D.; Garcia, A.; Tai, K.P.; McCray, P.B.; Ouellette, A.J.; Selsted, M.E.; Wong, G.C.L. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. J Am Chem Soc 2011; **133**:6720–6727.

Schittek, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Schirle, M.; Schroeder, K.; Blin, N.; Meier, F.; Rassner, G.; Garbe, C. Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. Nat Immunol 2001; **12**:1133:1137.

Silva, P.I.; Daffre, S.; Bulet, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. J Biol Chem 2000; **275**:33464-33470.

Silvestro, L.; Weiser, J.N.; Axelsen, P.H. Antibacterial and antimembrane activities of Cecropin A in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Ch 2000; **44**:602:607.

Sforça, M.L.; Machado, A.; Figueredo, R.C.R.; Oyama Jr.S.; Silva, F.D.; Miranda, A.; Daffre, S.; Miranda, M.T.M.; Spisni, A.; Pertinhez, T.A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the  $\alpha$ -chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*, Biochemistry 2005; **44**:6440-6451.

Somkuti, G.A.; Paul, M. Enzymatic fragmentation of the antimicrobial peptides casocidin and isracidin by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. *Appl Microbiol Biot* 2009; **130**:138-136.

Stömstedt, A.A.; Wessman, P.; Ringstad, L.; Edwards, K.; Malmsten, M. Effect of Lipid headgroup composition on the interaction between melittin and lipid bilayers. *J Coll Interf Sci* 2007; **311**:59-69.

Subirus-Funosas, R.; Acosta, G.A.; El-Faham, A.; Albericio, F. Microwave irradiation and COMU: a potent combination for solid-phase peptide, synthesis. *Tetrahedron Lett* 2009; **50**: 6200-6202.

Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003; **376**, 952-965.

Tamba, Y.; Ohba, S.; Kubota, M.; Yoshioka, H.; Yoshioka, H.; Yamazaki, M. Single GUV method reveals interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid membranes. *Biophys J* 2007; **92**:3178–3194.

Tenover, F.C. Mechanisms of Antimicrobial resistance in Bacteria. *Am J Med* 2006; **119**: S3-S10.

Terra, R.M.S. Análise conformacional da melitina por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos do peptídeo na função plaquetária, Porto Alegre: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 74 p. Dissertação de mestrado.

Vuyst, L.; Leroy, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Application. *J Mol Microb Biotech* 2007; **13**:194–199.

Yearnam, M.R.; Yount, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharma Rev* 2003; **55**:27-55.

Weinstein, J. N., Yoshikama, S., Henkart, P, Blumenthal, R. Hagins, W.A. Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. 1977, *Science*; **195**: 489-492.

Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Microbiology 1987; **84**: 5449-5453.

Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R.E.W. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. J Biol Chem 2001; **276**: 35714-35722.

## **7 - SÚMULA CURRICULAR**

### **1.DADOS PESSOAIS**

Mariana Canale Manzini

Local e data de nascimento: São Paulo/SP Brasil, 11-Ago-1984.

### **2.EDUCAÇÃO**

Colégio Albert Sabin, São Paulo/SP Brasil, 1994-2002.

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP Brasil, 2008.

Farmácia.

### **3.FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

-Curso de verão, USP, 2010.

-Curso de síntese/encapsulamento de fármacos – UNICAMP

-Curso de Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Farmacêuticos de Origem Vegetal da IV semana de Química no Instituto de Química da UNICAMP –UNICAMP

-XXIV curso de Toxicologia e Toxicologia Clínica (2005) - UNICAMP

### **4.OCUPAÇÃO**

Bolsista de Mestrado CNPQ, Mar-2009 – Mar-2011.

Analista de Farmacovigilância, Bayer HealthCare Mar-2011-atual.

## **5.PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)**

Resumos em Congressos:

Manzini, M.C., Daghasanli, K.R.P., Riske, K.A., Rodrigues, M.A., Bemquerer, M.P., Cuccovia, I.M., (2011) BP100 Interaction with Membrane Models: Effects of Peptide/Lipid Ratio and Relative Interfacial Charge, XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society Foz do Iguaçu, PR, Brazil, April 30th to May 3rd, 2011.