

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ÉRICA AZZOLINO MONTANHA

Efeitos da dimerização e modificações na porção N-terminal do peptídeo antimicrobiano Aureína 1.2 em sua interação com filmes de Langmuir e atividade biológica

São Carlos
2016

ÉRICA AZZOLINO MONTANHA

Efeitos da dimerização e modificações na porção N-terminal do peptídeo antimicrobiano Aureína 1.2 em sua interação com filmes de Langmuir e atividade biológica

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, obtenção de título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior.

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Montanha, Érica Azzolino

Efeitos da dimerização e modificações na porção N-terminal do peptídeo antimicrobiano Aureína 1.2 em sua interação com filmes de Langmuir e atividade biológica / Érica Azzolino Montanha; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior - versão corrigida -- São Carlos, 2016.

72 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Monocamadas de Langmuir. 2. Peptídeo antimicrobiano. 3. Membrana celular. I. Oliveira Junior, Osvaldo Novais de, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, pelo carinho e paciência.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (Chu) por ter acreditado no meu potencial desde o início da minha Graduação e me incentivado sempre.

À Thaty e ao Esteban pelo companheirismo e dedicação. Sem vocês não teria sido possível.

Aos técnicos do Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” e aos funcionários da Biblioteca do IFSC, pela disposição e competência.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

RESUMO

MONTANHA, E .A. **Efeitos da dimerização e modificações na porção N-terminal do peptídeo antimicrobiano Aureína 1.2 em sua interação com filmes de Langmuir e atividade biológica.** 2016. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Filmes de Langmuir são usados como modelos simplificados de membranas celulares, cujas propriedades podem ser correlacionadas com efeitos fisiológicos de moléculas de interesse biológico, como os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Nesta dissertação investigamos a interação do peptídeo Aureína 1.2, na forma de monômero (AU), dímero ((AU)₂K) e com variações na porção N-terminal (KAU e DAU), com filmes de Langmuir obtidos do extrato lipídico da bactéria *Escherichia coli*. Todos os peptídeos injetados em concentrações de 20 a 200nM se incorporaram ao filme de Langmuir, causando expansão nas isotermas de pressão superficial, que foi significativamente maior para o dímero. O módulo de compressibilidade do filme de *E. coli* à pressão superficial correspondente à de uma membrana real praticamente dobrou, de cerca de 40mN/m para 80nM/m para o dímero, ao passo que para os outros peptídeos a alteração não foi significativa. Dos espectros de reflexão e absorção no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS), observou-se que todos os peptídeos interagiram tanto com as caudas quanto com as cabeças polares das moléculas do extrato de *E. coli* no filme de Langmuir. Diferentemente dos resultados de pressão e compressibilidade, não há tendência de um peptídeo ter interação mais relevante do que os outros. O maior efeito do dímero na expansão e compressibilidade do filme de Langmuir não se refletiu numa maior atividade bactericida contra *E. coli*, pois sabe-se da literatura que a atividade é maior para a Aureína 1.2 (AU). Provavelmente porque essa atividade deve depender da camada externa de lipopolissacarídeos de uma bactéria Gram-negativa.

Palavras-chave: Monocamadas de Langmuir. Peptídeo antimicrobiano. Membrana celular.

ABSTRACT

MONTANHA, E. A. **Effects of dimerization and modifications in the N-terminal portion of the antimicrobial peptide Aurein 1.2 in its interaction with Langmuir monolayers and in its biological activity.** 2016. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Langmuir films are used as simplified cell membrane models whose properties can be correlated with physiological effects of molecules of biological interest, such as antimicrobial peptides (AMPs). In this dissertation we report on the interaction of Aurein 1.2 peptide as monomer (AU), dimer ((AU)₂K) and modified peptide in the N-terminal portion (KAU and SAD), with Langmuir films obtained from a lipid extract of *Escherichia coli*. All peptides injected at concentrations from 20 to 200nM were incorporated into the Langmuir film, causing the surface pressure isotherm to expand, particularly for the dimer. The compressibility modulus of the *E. coli* Langmuir film at the surface pressure corresponding to an actual membrane nearly doubled, from about 40mN/m to 80nM/m for the dimer, whereas for the other peptides the change was not significant. From the polarization-modulated infrared reflection - absorption spectra (PM-IRRAS), we observed that all peptides interacted with both tails and polar heads of the molecules of *E. coli* extract in the Langmuir film. Unlike the results of pressure and compressibility, there was no tendency of a peptide having more relevant interaction than the others. The larger effect of the dimer in the expansion and compressibility of the Langmuir film was not reflected in a higher bactericidal activity against *E. coli*, since it is known from literature that the activity is higher for Aurein 1.2 (AU). Probably because this activity should depend on the outer layer of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria.

Keywords: Langmuir monolayers. Antimicrobial peptides. Cell membrane.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Parede celular de bactéria gram-negativa.19
- Figura 2 - *E. coli* em imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura.....20
- Figura 3 - Representação esquemática dos modelos de mecanismo de ação dos PAMs. A) Atração eletrostática pela superfície aniônica da membrana, B) passagem através da membrana externa e/ou parede celular, C) atração eletrostática pelos fosfolípidos aniônicos da membrana citoplasmática, D) estruturação, inserção na membrana e acumulação, E) formação de poro pelo modelo toroidal, F) permeabilização da membrana pelo mecanismo de tapete e G) formação de poro pelo modelo do barril.22
- Figura 4 - Representação “helical wheel” da Aureína 1.2. Estão representados os resíduos hidrofílicos como círculos, resíduos hidrofóbicos como losangos, potencialmente carregados negativamente como triângulos, e potencialmente carregados negativamente como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores: o resíduo mais hidrofóbico é verde e a quantidade de verde vai diminuindo proporcionalmente à hidrofobicidade, com a hidrofobicidade zero representada em amarelo. Os resíduos hidrofílicos são vermelhos, com o vermelho puro sendo o resíduo mais hidrofílico (não carregado), e a quantidade de vermelho vai diminuindo proporcionalmente à hidrofobicidade. Os resíduos potencialmente carregados são de cor azul claro.....24
- Figura 5 - Representação de Filme de Langmuir numa Cuba de Langmuir.....27
- Figura 6 - Representação da técnica utilizada na medida da pressão superficial de Filmes de Langmuir.29
- Figura 7 - Representação esquematizada das fases de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme, em uma isoterma de pressão superficial por área molecular.30

Figura 8 - Estrutura molecular dos componentes do extrato total de <i>E. coli</i> (100500P): a) L- α -fosfatidiletanolamina (PE); b) L- α -fosfatidilglicerol (PG) e c) cardiolipina (CA).	33
Figura 9 - Esquema de síntese de peptídeos em fase sólida.	35
Figura 10 - Cuba de Langmuir.	36
Figura 11 - Equipamento de PM-IRRAS acoplado à Cuba de Langmuir.	38
Figura 12 - Cinética de adsorção do peptídeo Aureína 1.2 (monômero) em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	42
Figura 13 - Cinética de adsorção do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	43
Figura 14 - Cinética de adsorção do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	43
Figura 15 - Cinética de adsorção do dímero (AU) ₂ K em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	44
Figura 16 – Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo Aureína 1.2 (AU) em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	46
Figura 17 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	47
Figura 18 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	48
Figura 19 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do dímero (AU) ₂ K em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	48
Figura 20 - Isotermas de pressão superficial por área molecular para os quatro peptídeos (AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i>	49

Figura 21 – Variação da área por molécula do extrato lipídico de <i>E. coli</i> em função da concentração dos peptídeos (AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU), para uma pressão superficial de 30mN/m.	50
Figura 22 – Módulo de compressão por área molecular do peptídeo AU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	51
Figura 23 - Módulo de compressão por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	52
Figura 24 - Módulo de compressão por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	52
Figura 25 - Módulo de compressão por área molecular do dímero (AU) ₂ K em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	53
Figura 26 – Módulo de compressão por área molecular para os quatro peptídeos (AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i>	54
Figura 27 - Módulo de compressão por pressão superficial do monômero AU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	55
Figura 28 - Módulo de compressão por pressão superficial do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	56
Figura 29 - Módulo de compressão por pressão superficial do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	56
Figura 30 - Módulo de compressão por pressão superficial do dímero (AU) ₂ K em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i> . As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.	57
Figura 31 - Módulo de compressão por pressão superficial para os quatro peptídeos (AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de <i>E. coli</i>	58

Figura 32 - Espectros de PM-IRRAS, para a pressão superficial de 30mN/m, na região que compreende 2800-3000cm ⁻¹ para filmes de Langmuir de <i>E. coli</i> , na ausência e presença de 100nM dos peptídeos AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU.....	59
Figura 33 - Espectros de PM-IRRAS, para a pressão superficial de 30mN/m, na região que compreende 1500-1800cm ⁻¹ para filmes de Langmuir de <i>E. coli</i> , na ausência e presença de 100nM dos peptídeos AU, (AU) ₂ K, DAU e KAU.....	61
Figura A1 - Perfis cromatográficos do peptídeo Aureína (AU).....	71
Figura A2 - Perfis cromatográficos do dímero (AU) ₂ K	71
Figura A3 - Perfis cromatográficos do peptídeo DAU	72
Figura A4 - Perfis cromatográficos do peptídeo KAU	72

SUMÁRIO

1	OBJETIVOS.....	15
2	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Membranas de bactérias	18
2.2	<i>E. coli</i>	19
2.3	Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	21
2.4	Aureína 1.2 (AU)	23
2.4.1	Possíveis modificações para Aureína 1.2.....	24
2.5	Sistemas miméticos de membrana celular	26
2.6	Filmes de Langmuir	27
2.6.1	Filmes de Langmuir - Técnicas de caracterização	28
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
3.1	Reagentes.....	33
3.2	Filmes de Langmuir.....	36
3.2.1	Filmes de Langmuir - Técnicas de caracterização	37
3.2.1.1	Isotermas de pressão superficial.....	37
3.2.1.2	Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS).....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Peptídeos utilizados e sua atividade contra <i>E. coli</i>	41
4.2	Cinéticas de adsorção	41
4.3	Isotermas de pressão superficial	45
4.4	Compressibilidade	50
4.5	Espectros de PM-IRRAS	58
5	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	63

REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – Perfis cromatográficos dos peptídeos	71

1 OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido nesta dissertação visa a compreender a interação entre o peptídeo antimicrobiano (PAM) Aureína 1.2, na forma de monômero, dímero e com variações de carga na extremidade N-terminal (adição de uma lisina ou um aspartato), com modelos de membrana celular, constituídos por filmes de Langmuir.

Objetivos específicos:

- Determinar como os compostos afetam as propriedades dos filmes de Langmuir, constituídos de extratos lipídicos reais da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*.
- Caracterizar os filmes de Langmuir correspondentes através de isotermas de pressão superficial e espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS);
- Verificar o efeito das modificações no monômero da Aureína 1.2.

2 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ação de fármacos e drogas depende de sua interação com a membrana celular, cujos mecanismos em nível molecular só podem ser estudados com a tecnologia atual empregando-se modelos de membrana. Os modelos mais empregados são os filmes de Langmuir (1) e os lipossomos ou vesículas (2), com os quais pode-se obter informação sobre efeitos na compactação da membrana, possibilidade de ruptura e até mesmo verificar os grupos químicos envolvidos na interação. Os filmes de Langmuir, em particular, são considerados como miméticos de metade da membrana celular, com a subfase aquosa desempenhando o papel dos meios intra ou extracelular. (3) São muito variados os tipos de moléculas investigadas com filmes de Langmuir (4), desde fármacos constituídos por pequenas moléculas como os peptídeos (5) até macromoléculas, como polissacarídeos (6), enzimas (7) e outras proteínas. (8)

Uma das classes de moléculas de interesse para este trabalho de mestrado é a de fármacos e antibióticos. Sua interação deve depender do tipo de membrana, se típica de mamíferos ou de micro-organismos. Um antibiótico, por exemplo, deve idealmente ter pouco efeito na membrana de mamíferos, mas efeito muito maior na membrana de bactérias. Isso explica, em parte, porque a maioria dos antibióticos é composta por moléculas positivamente carregadas em meio fisiológico, pois têm maior interação com as membranas de bactérias carregadas negativamente (9) do que com as membranas predominantemente neutras (10) dos mamíferos. Ressalte-se, também, que muitas vezes a ação farmacológica depende da interação com receptores na membrana, o que obviamente dificulta a correlação entre propriedades com modelos de membrana e a ação fisiológica. Neste contexto, a análise do fenômeno de resistência de bactérias a antibióticos é interessante, pois a resistência se desenvolve a partir da inativação de receptores da membrana.

Por razões óbvias de saúde pública, tem havido grande interesse em encontrar novos compostos antimicrobianos, principalmente aqueles com poucas propriedades indutoras de resistência. Uma possível linha de pesquisa para tal busca é a de encontrar antibióticos que matem bactérias sem necessidade de interação com receptores, o que pode ser alcançado se a membrana bacteriana for destruída, ou se forem formados poros que causem vazamento de conteúdo intracelular. Alguns dos compostos mais promissores para essa finalidade são peptídeos

antimicrobianos (PAMs) (11-13), os quais acredita-se agir diretamente na membrana bacteriana. A maioria dos PAMs tem como características comuns a baixa massa molecular, carga positiva e caráter anfipático. Em conjunto, estas características determinam o mecanismo de ação dos PAMs que envolve principalmente a membrana plasmática de micro-organismos. (14)

Neste trabalho foi investigada a interação do PAM Aureína 1.2, e de alguns análogos, com filmes de Langmuir constituídos de extratos lipídicos da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, com o objetivo de identificar seus mecanismos de ação. A seguir será apresentada uma revisão sobre os principais tópicos relevantes a este estudo.

2.1 Membranas de bactérias

Organismos procariotos e eucariotos são quimicamente similares, no sentido de que ambos contêm ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. A estrutura das paredes celulares e membranas e a ausência de organelas (estruturas celulares especializadas que possuem funções específicas) distinguem procariotos de eucariotos. As bactérias, que são organismos procariotos, existem em diversos tamanhos (entre 0,2 e 2,0 μ m de diâmetro) e formas (esféricas, bastões e espirais). A parede celular de uma célula bacteriana é uma estrutura complexa, semirrígida, responsável pela forma da célula e pela proteção da membrana plasmática e seu interior das alterações adversas no ambiente externo. Sua composição química é usada para diferenciar os principais tipos de bactérias. A parede celular é importante para a ação de fármacos e drogas, pois está ligada à capacidade de algumas espécies causarem doenças e também por ser o local de ação de alguns antibióticos.

A parede celular bacteriana é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicana, que consiste em um dissacarídeo repetitivo ligado por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege toda a célula, isoladamente ou em combinação com outras substâncias. Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular apresenta muitas camadas de peptidoglicana, sendo espessa e rígida, enquanto as paredes celulares de gram-negativas contêm somente uma camada fina de peptidoglicana e uma membrana externa. A

membrana externa da célula gram-negativa consiste de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolípidios, e possui várias funções especializadas. Sua grande carga negativa é importante para contornar as defesas do hospedeiro (evasão da fagocitose) e para causar lise de células e promover a fagocitose.

Uma ilustração esquemática da membrana de uma bactéria gram-negativa é mostrada na Figura 1. A membrana externa também representa uma barreira para alguns antibióticos, mas não para todas as substâncias no ambiente, pois o metabolismo celular depende de nutrientes que devem atravessá-la. (15)

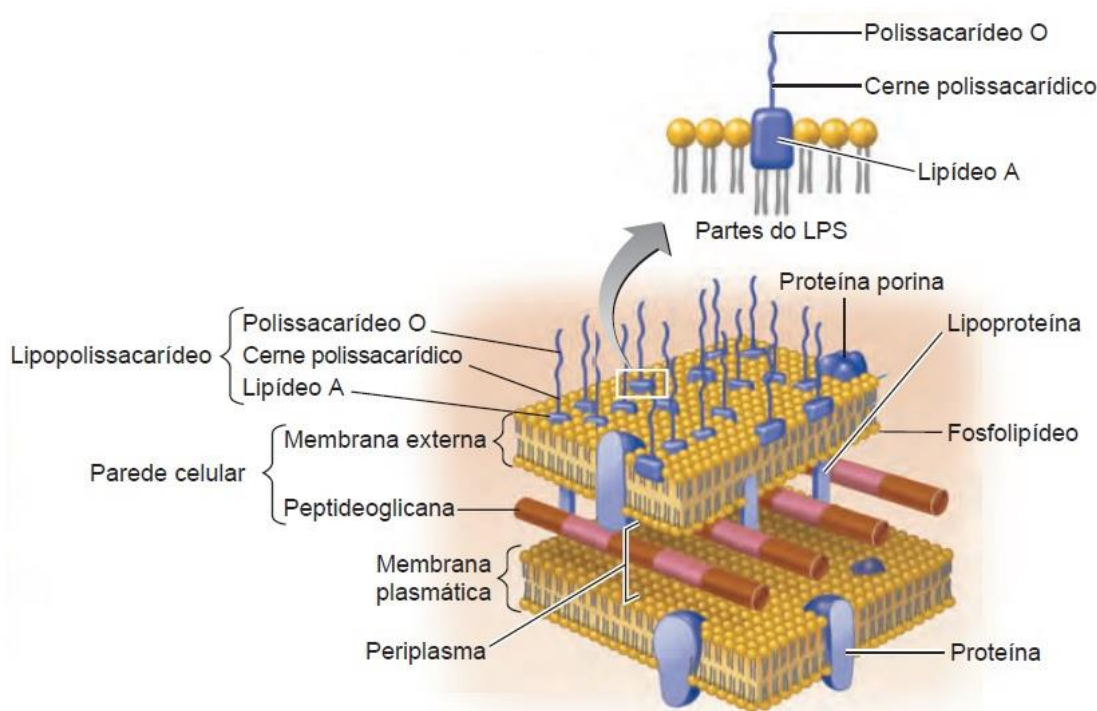


Figura 1 - Parede celular de bactéria gram-negativa.
Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE. (15)

2.2 *E. coli*

Organismo descoberto em 1885 pelo pediatra germano-austríaco Theodor Escherich, foi isolado nas fezes de indivíduos saudáveis. Foi inicialmente batizado de *Bacterium coli commune*, por ser encontrado no cólon, e mais tarde renomeado como *Escherichia coli*, em homenagem ao seu descobridor. (16) A ascensão meteórica e o “status” elevado da *E. coli* na biologia vêm da facilidade de encontrar e trabalhar com ela. Cepas robustas, não patogênicas e versáteis que crescem rapidamente em vários nutrientes, podem ser isoladas a partir de praticamente

qualquer humano. Estas características fizeram da *E. coli* um pilar nos acervos dos laboratórios de ensino de microbiologia. Assim, quando microbiologistas no início do século XX procuraram por um organismo modelo, a *E. coli* foi uma das opções preferidas. Sua utilização em muitos estudos fundamentais gerou conhecimento suficiente para torná-la a bactéria modelo para investigações da biologia molecular, na década de 1950. Por isso, foi o primeiro organismo a ter seus aspectos básicos estudados, como o código genético, transcrição, tradução e replicação. (17)

E. coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, normalmente encontrada no intestino grosso de organismos endotérmicos. (18) Uma imagem de um microscópio eletrônico da *E. coli* é mostrada na Figura 2. A maioria de suas cepas é inofensiva, mas algumas podem causar séria intoxicação alimentar, e ocasionalmente são responsáveis por *recalls* de produtos devido à contaminação de alimentos. (19) As cepas inofensivas podem desempenhar papel nutricional no trato intestinal, através de síntese de vitaminas, como a vitamina K. Por sua natureza aeróbia facultativa, auxilia também no consumo de oxigênio, impedindo a colonização do intestino por bactérias patogênicas. (20)

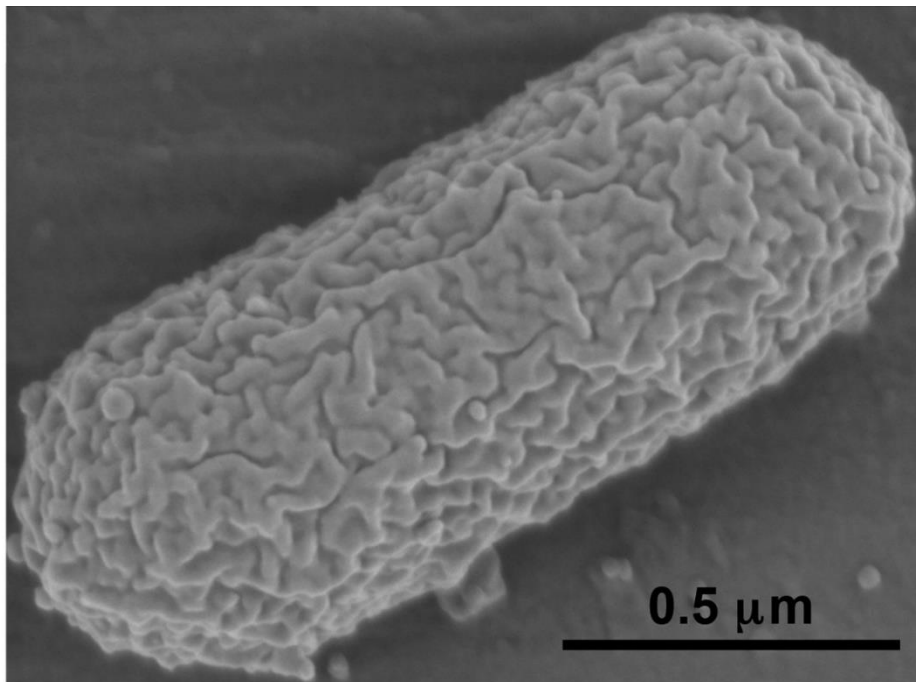


Figura 2 - *E. coli* em imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura.
Fonte: BLOUNT. (17)

2.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem sido um problema de alto impacto no mundo todo. (21) Esta situação leva à procura de novos compostos antimicrobianos, principalmente aqueles que atuam mediante mecanismos aos quais os micro-organismos dificilmente desenvolvem resistência. (22) Alguns dos compostos mais promissores são os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (23). Os PAMs são parte vital do sistema de defesa de muitas formas de vida e podem ser encontrados em microrganismos, insetos, plantas, anfíbios e mamíferos. (24) Alguns destes PAMs matam os agentes patogênicos por permeabilização de sua membrana plasmática através de um mecanismo específico, mas não mediado por receptores. (25) O grande potencial dessas moléculas origina de seu amplo espectro de atividade, rápida ação microbicida e possibilidade de uso combinado com outros antibióticos. (26)

A maioria das PAMs tem as seguintes características em comum: baixa massa molecular, carga positiva e caráter anfipático. Estas características - em conjunto - determinam seu mecanismo de ação. (27) Por possuírem, em sua maioria, cargas positivas, os peptídeos se ligam preferencialmente às membranas com cargas negativas, o que explica a especificidade de sua ação contra as bactérias. Pois bactérias e outros micro-organismos têm membranas compostas por moléculas aniônicas, ao passo que membranas celulares dos mamíferos apresentam em sua maioria lipídios neutros (*zwitterionic*). (28)

Três mecanismos foram propostos para descrever o processo de permeação da membrana fosfolipídica por PAMs: formação de uma estrutura em formato de um barril ("*barrel-stave*"), de um poro toroidal ("*toroidal-pore*") e estrutura como um tapete ("*carpet-like*"). A Figura 3 mostra os três mecanismos de maneira esquemática. No mecanismo de ação do tipo de barril, os peptídeos ligados à membrana reconhecem uns aos outros, se oligomerizam e formam poros que atravessam a membrana. Teoricamente, tais poros podem ser formados a partir de poucas moléculas, cerca de três. (29) Nesse modelo, a face hidrofóbica do peptídeo interage com as caudas apolares dos fosfolipídios da membrana, enquanto a face hidrofílica permanece voltada para o interior do poro. No mecanismo de poro toroidal, baseado também na formação de poros, a agregação dos peptídeos associados às cabeças polares dos fosfolipídios faz com que a membrana se afine,

induzindo uma curvatura na bicamada lipídica, gerando um poro. Esse modelo difere do modelo do barril, pois além dos peptídeos, as cabeças polares dos lipídios fazem parte do interior polar do poro. (30) No mecanismo com formação de um tapete (“*carpet-like*”), as moléculas peptídicas acumulam-se paralelamente à superfície da membrana provocando desagregação por meio da ação detergente dos peptídeos, solubilizando a membrana. O processo de solubilização inicia-se quando um limiar de concentração (*threshold*) de peptídeos na superfície da membrana é atingido, levando à formação de agregados micelares. (31)

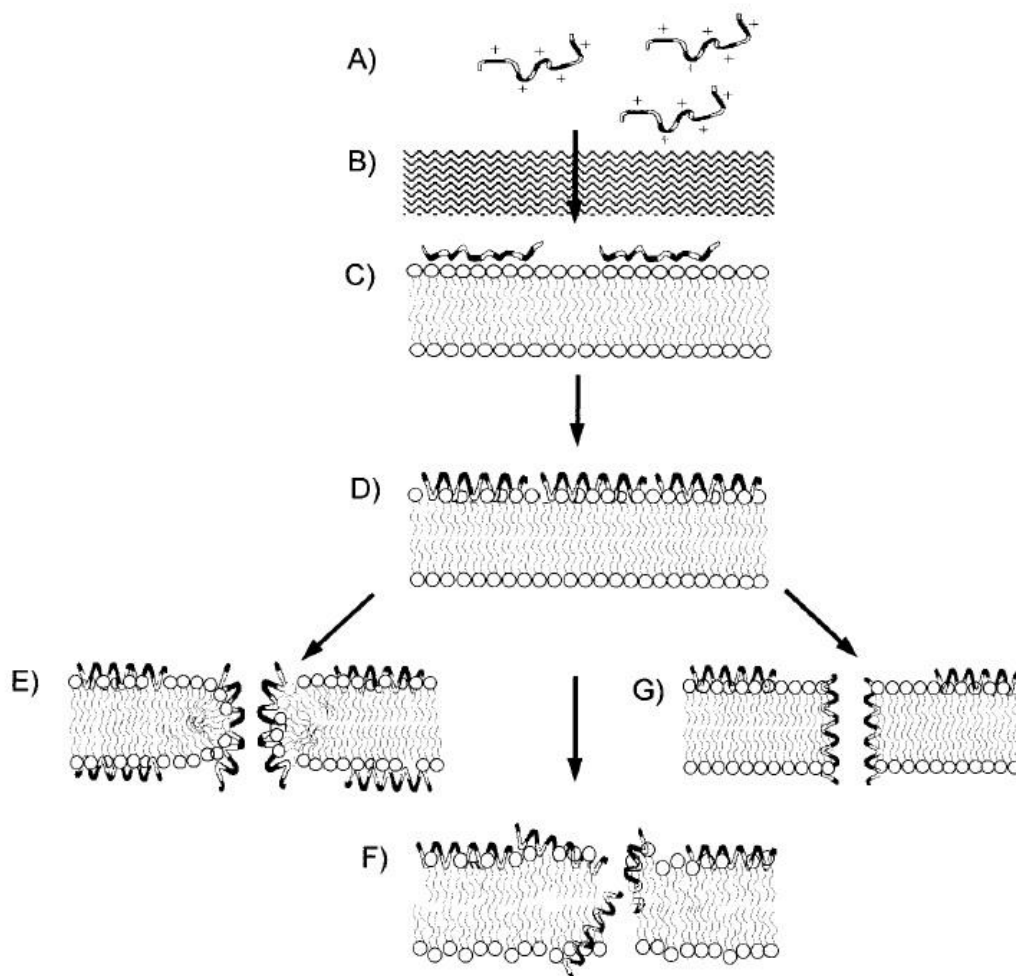


Figura 3 - Representação esquemática dos modelos de mecanismo de ação dos PAMs. A) Atração eletrostática pela superfície aniónica da membrana, B) passagem através da membrana externa e/ou parede celular, C) atração eletrostática pelos fosfolípidos aniónicos da membrana citoplasmática, D) estruturação, inserção na membrana e acumulação, E) formação de poro pelo modelo toroidal, F) permeabilização da membrana pelo mecanismo de tapete e G) formação de poro pelo modelo do barril.

Fonte: Adaptada de TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO. (30)

2.4 Aureína 1.2 (AU)

Aureína 1.2 é um peptídeo de 13 aminoácidos (GLFDIIKKIAESF-NH₂), com massa molecular de 1480g/mol, originalmente isolado das rãs australianas *Litoria aurea* e *Litoria raniformis* (32), sendo o menor PAM secretado por vertebrados. Sabe-se que a Aureína 1.2, representada na Figura 4, interage especificamente com lipídios carregados negativamente, o que acredita-se ser um mecanismo de direcionamento para alvos bacterianos. (29) Sua atividade antimicrobiana, avaliada em termos da concentração inibitória mínima (CIM), para *Escherichia coli* é de 16µmol/L. (33)

Com relação à sua estrutura secundária, o peptídeo não mostra estrutura definida em solução aquosa, mas adota conformação de α -hélice quando incorporado às membranas lipídicas. (34) Seu mecanismo de ação proposto é o do modelo de tapete. (35)

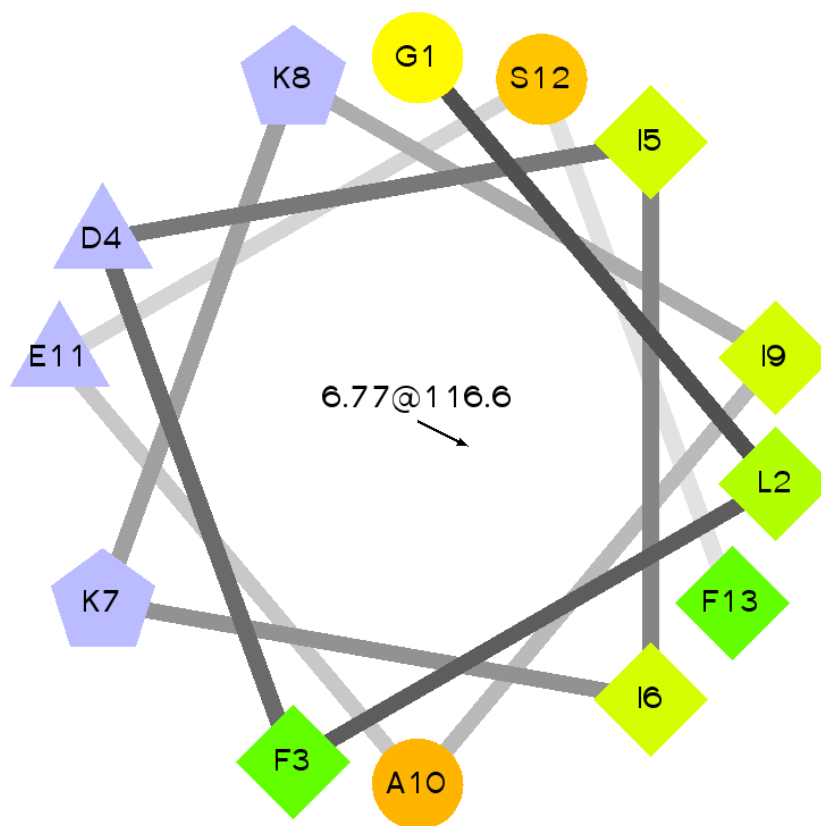


Figura 4 - Representação “helical wheel” da Aureína 1.2. Estão representados os resíduos hidrofílicos como círculos, resíduos hidrofóbicos como losangos, potencialmente carregados negativamente como triângulos, e potencialmente carregados negativamente como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores: o resíduo mais hidrofóbico é verde e a quantidade de verde vai diminuindo proporcionalmente à hidrofobicidade, com a hidrofobicidade zero representada em amarelo. Os resíduos hidrofílicos são vermelhos, com o vermelho puro sendo o resíduo mais hidrofílico (não carregado), e a quantidade de vermelho vai diminuindo proporcionalmente à hidrofilicidade. Os resíduos potencialmente carregados são de cor azul claro.

Fonte: HELICAL... (36)

Além de possuir atividade antimicrobiana, a aureína 1.2 não apresenta toxicidade contra hemácias em suas concentrações biologicamente ativas (37), características que fazem do peptídeo um modelo interessante a partir do qual diferentes análogos têm sido desenhados. (31)

2.4.1 Possíveis modificações para Aureína 1.2

A maioria dos PAMs apresenta baixa biodisponibilidade e seletividade, o que pode limitar sua utilização terapêutica. Por esta razão, modificações em sua estrutura têm sido feitas para aumentar sua atividade antimicrobiana. (38) Tais modificações incluem adição de resíduos carregados, substituição de L-aminoácidos

por D-aminoácidos, adição de resíduos hidrofóbicos, além de outras modificações específicas. (39-41) A carga líquida de PAMs conhecidos, que é a soma de todas as cargas de grupos ionizáveis do peptídeo, pode ser positiva ou negativa. Este é o principal fator para a interação inicial com membranas celulares carregadas negativamente. Ao alterar a carga líquida de um PAM, suas atividades antimicrobiana e hemolítica podem ser alteradas para alcançar maior seletividade de micróbios, mas com efeitos minimizados nas células do hospedeiro. (42)

A redução da helicidade, que é a capacidade de um PAM formar estrutura helicoidal, através da incorporação de D-aminoácidos na sequência primária de PAMs, pode ocasionar redução no efeito hemolítico, mantendo o efeito antimicrobiano. (43) Por exemplo, Papo et al. (44) modificaram alguns peptídeos α -helicoidais substituindo 35% dos L-aminoácidos por D-aminoácidos e descobriram que esta modificação eliminava a atividade hemolítica. Além disso, alguns destes PAMs modificados não eram sensíveis a proteases. Portanto, incorporando D-aminoácidos para alterar helicidade é uma estratégia útil para a concepção de novos peptídeos sintéticos com menos atividade hemolítica e maior estabilidade contra clivagem proteolítica.

Independentemente do tipo de modificação, a posição desta modificação na estrutura primária do peptídeo se mostra particularmente importante. Estudos recentes mostraram que a região N-terminal de vários PAMs é determinante para sua estrutura e, conseqüentemente, para sua atividade. (45) Como a atividade biológica dos PAMs é normalmente associada ao número de cargas positivas da molécula, incluindo o grupo N-terminal, modificações na carga desta região podem alterar sua atividade. Pesquisas mostram que peptídeos com modificação na porção N-terminal têm atividade hemolítica semelhante (relacionada à toxicidade), mas diferem na atividade antimicrobiana, comparados à estrutura peptídica não-modificada. (46) Para análogos de PAMs com adição de um aspartato (D) na posição N-terminal, resultados sugerem que em pH fisiológico a carga negativa na cadeia lateral deste aminoácido poderia neutralizar parcialmente a carga positiva na posição N-terminal, aumentando a hidrofobicidade da molécula. Porém, este tipo de modificação pouco altera atividade biológica, em comparação com a molécula nativa. Por outro lado, o PAM Hylin-a1, por exemplo, modificado pela adição de uma lisina (K), passando a conter mais uma carga positiva na porção N-terminal, mostrou maior atividade antimicrobiana do que a molécula nativa. Este fato pode ser

explicado pelo aumento da carga positiva na porção N-terminal e pelo alto caráter hidrofílico da molécula. Estes resultados mostraram que há uma correlação entre a atividade antimicrobiana e hidrofiliçidade. (46)

Outra modificação interessante é a dimerização dos peptídeos. Sendo a oligomerização um pré-requisito para a atividade dos PAMs, a ligação de duas moléculas para formar dímeros tem sido alvo de estudos recentes. Em alguns casos, a dimerização leva a moléculas mais ativas. (47) No entanto, os efeitos desta alteração na atividade dos PAMs ainda são pouco compreendidos, pois algumas versões diméricas apresentaram redução de atividade antimicrobiana ou aumento de toxicidade. (48,49) Uma estratégia de dimerização consiste de uma ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína. Para o peptídeo magainina 2, estes resíduos foram adicionados à região C-terminal do peptídeo. Quando testados contra as bactérias gram-negativas *Stenotrophomonas maltophilia* e *Escherichia coli*, o dímero mostrou maior atividade antimicrobiana do que o monômero. Isso foi particularmente acentuado em concentrações baixas de peptídeos. (50)

Outra estratégia de dimerização foi feita para o peptídeo Aureína 1.2 (AU), onde um resíduo de lisina (K) foi utilizado como ligante entre as duas cadeias de AU, dando origem ao $(AU)_2K$. A lisina tem dois grupos amino a partir dos quais se pode realizar a elongação de cadeias peptídicas, e desta forma obter moléculas diméricas. Dos dados com o dímero $(AU)_2K$, fica claro que a dimerização do peptídeo reduz a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* e *Cândida albicans*, mas não a capacidade de permeabilizar miméticos de membrana. (33) Estes fatos estariam relacionados com a interação dos dímeros com componentes da parede celular dos microrganismos. Analogamente, a perda de atividade antibacteriana poderia também estar relacionada à interação dos dímeros com componentes da membrana, como lipopolissacarídeos. (33)

2.5 Sistemas miméticos de membrana celular

Tendo em vista que muitos dos PAMs têm como principal alvo as membranas dos microrganismos e que muitos estudos, por questões práticas, são impossíveis de serem realizados com os alvos de ação em si, diferentes sistemas que mimetizam as membranas destes são utilizados. (29,51) Lipossomos e vesículas unilamelares de diversos tamanhos são alguns dos modelos usados, que mimetizam

as bicamadas de uma membrana. (52) Como alternativa aos sistemas compostos por bicamadas, há as monocamadas de Langmuir (1), que mimetizam metade da membrana. Algumas vantagens deste sistema são: controle da composição das membranas, do estado de compactação e da estruturação da monocamada, e a planaridade, que se aproxima melhor ao formato de uma superfície celular do que os lipossomos, por exemplo, que têm grande curvatura. (53)

2.6 Filmes de Langmuir

Monocamadas de Langmuir, como a ilustrada esquematicamente na Figura 5, são formadas ao se espalhar um material anfifílico (tenso-ativo) na interface ar-água. (54) Quando uma quantidade pequena de material é utilizada formam-se filmes com espessura monomolecular, comprimidos por barreiras móveis, que regulam a área disponível por molécula. Variando-se o grau de compactação da monocamada, certas propriedades superficiais podem ser medidas. Filmes de Langmuir podem ser transferidos da superfície da água para substratos sólidos, o que é conseguido pela imersão e emersão sucessiva deste último através da interface, sendo então chamados de Filmes Langmuir-Blodgett (LB). A repetição dos processos de imersão e emersão permite deposição de multicamadas, que podem ser altamente organizadas. (55)

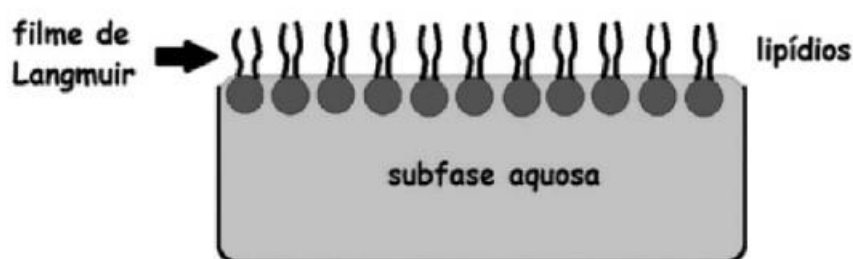


Figura 5 - Representação de Filme de Langmuir numa Cuba de Langmuir.
Fonte: FERREIRA et al. (56)

Há relatos de filmes interfaciais sendo utilizados desde a pré-história para previsão do futuro (povos babilônicos) (57) ou para “acalmar” a superfície da água (Benjamin Franklin). (58) Uma menção especial deve ser feita aos estudos da jovem alemã Agnes Pockels, que desenvolveu protótipos do que hoje são as cubas de

Langmuir, cerca de 30 anos antes de Langmuir e Blodgett, estudando filmes interfaciais na cozinha de sua casa. (59) As monocamadas de Langmuir têm sido estudadas desde as primeiras décadas do século 20 pelo americano Irving Langmuir, que descreveu em detalhe sua estrutura em nível molecular, recebendo o prêmio Nobel em 1932 pelos trabalhos na área de química de superfícies. (54) Os filmes LB foram desenvolvidos por Katharine Blodgett em parceria com Langmuir. (60)

2.6.1 Filmes de Langmuir – Técnicas de caracterização

Uma grande variedade de técnicas experimentais tem sido empregada no estudo de filmes de Langmuir; a mais clássica delas é a pressão superficial (π). Esta é a variação da tensão superficial da solução aquosa devido ao filme, ou seja: $\pi = \gamma_0 - \gamma$, onde γ é a tensão superficial com o filme, e γ_0 é a tensão superficial da solução aquosa. Esta pressão pode ser obtida pelo método da placa de Wilhelmy, no qual uma eletrobalaça mede a força exercida pelo filme (tensão de superfície) sobre uma pequena placa (sensor), mais comumente um papel filtro, de perímetro conhecido. O sensor é imerso parcialmente na subfase, atravessando o filme de Langmuir. Considerando que a água molha completamente a placa de papel de filtro, o ângulo de contato com a subfase aquosa é nulo. Para uma placa em posição estacionária, a pressão superficial é obtida pela variação da força medida pela eletrobalaça dividida pelo perímetro do sensor que toca a interface. O esquema de compressão de uma monocamada e medida de pressão superficial é mostrado na Figura 6.

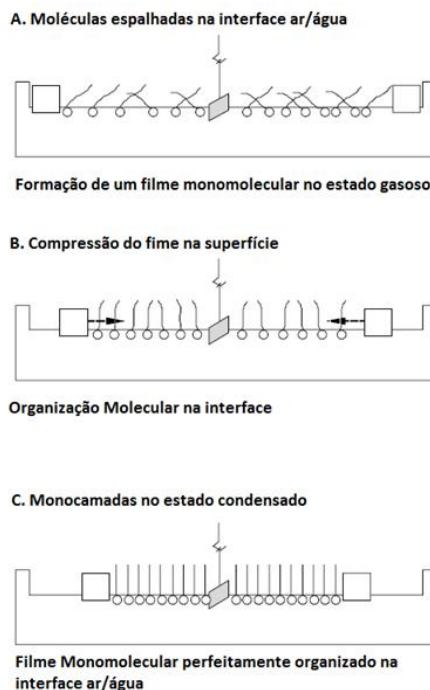


Figura 6 - Representação da técnica utilizada na medida da pressão superficial de Filmes de Langmuir.

Fonte: Adaptada de GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM. (61)

Uma curva de pressão superficial versus área por molécula é o análogo bidimensional de uma isoterma pressão-volume. Um exemplo de curva é mostrado na Figura 7. Podem ser definidas várias fases para a monocamada. Para áreas superficiais extensas, as moléculas encontram-se na fase gasosa (G). A fase líquida (L) ocorre quando as moléculas se aproximam umas das outras e a área por molécula diminui. Dependendo da molécula a ser estudada, podem estar presentes as fases líquido-expandida (LE) e/ou a líquido-condensada (LC). (62)

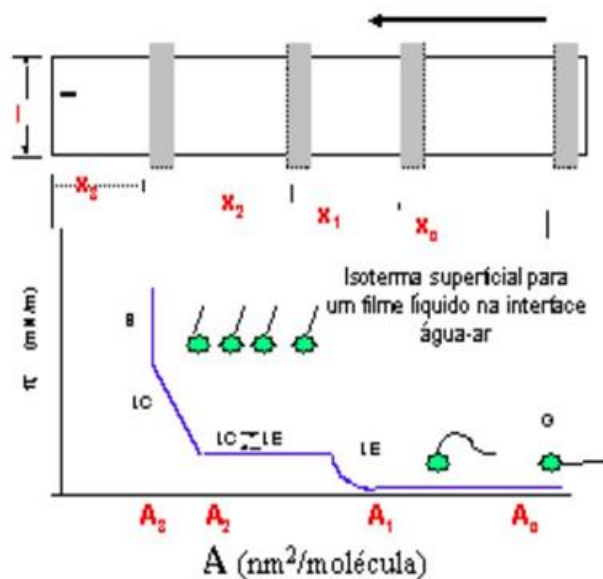


Figura 7 - Representação esquematizada das fases de uma monocamada de Langmuir com as diferentes regiões de compressão do filme, em uma isoterma de pressão superficial por área molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra técnica de medida útil para os filmes de Langmuir é a espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), pois torna possível determinar interações de grupamentos químicos no nível molecular. Sua antecessora mais simples, a espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho (IRRAS), permite caracterizar a conformação da cadeia e da estrutura de grupos, além de fornecer informações sobre a orientação molecular. Esta técnica apresenta a vantagem de a luz perpendicularmente (p) polarizada ser preferencialmente absorvida na reflexão, enquanto a luz paralelamente (s) polarizada não é absorvida. Entretanto, a técnica IRRAS não apresenta boa sensibilidade para filmes de Langmuir, pois qualquer diferença entre os sinais da luz paralela e da perpendicularmente polarizada pode ser atribuída à absorção específica da superfície. (63)

A utilização da modulação por polarização (PM) em conjunto com a espectroscopia de infravermelho, onde a luz incidente é continuamente modulada em alta frequências entre polarizações s e p , melhora significativamente a sensibilidade da técnica, pois permite a medida simultânea de modo eficiente do espectro das duas polarizações. A diferença fornece a informação específica de superfície e a soma fornece o espectro de referência. (64) A técnica de PM-IRRAS foi aplicada pela primeira vez a filmes de Langmuir no início dos anos 1990 por

Daniel Blaudez. (65) Para filmes na interface ar-água é possível estimar a orientação relativa de grupos químicos componentes das moléculas a partir da refletividade diferencial, dada pela Equação 1, onde R_p e R_s são as refletividades para polarizações p e s, respectivamente.

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (1)$$

Ressalte-se que, de acordo com a Equação 1, as bandas em um espectro de PM-IRRAS podem ser positivas ou negativas. Ou seja, acima ou abaixo de uma linha de base, dependendo se a componente R_p é maior ou menor do que R_s .

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Reagentes

O extrato lipídico total de *E. coli* foi comprado da Avanti Polar Lipids Inc. (100500P), tendo em sua composição 57,5% de L- α -fosfatidiletanolamina (PE), 15,1% de L- α -fosfatidilglicerol (PG), 9,8% de cardiolipina (CA) e 17,6% desconhecido. As estruturas químicas dos compostos majoritários são mostradas na figura 8.

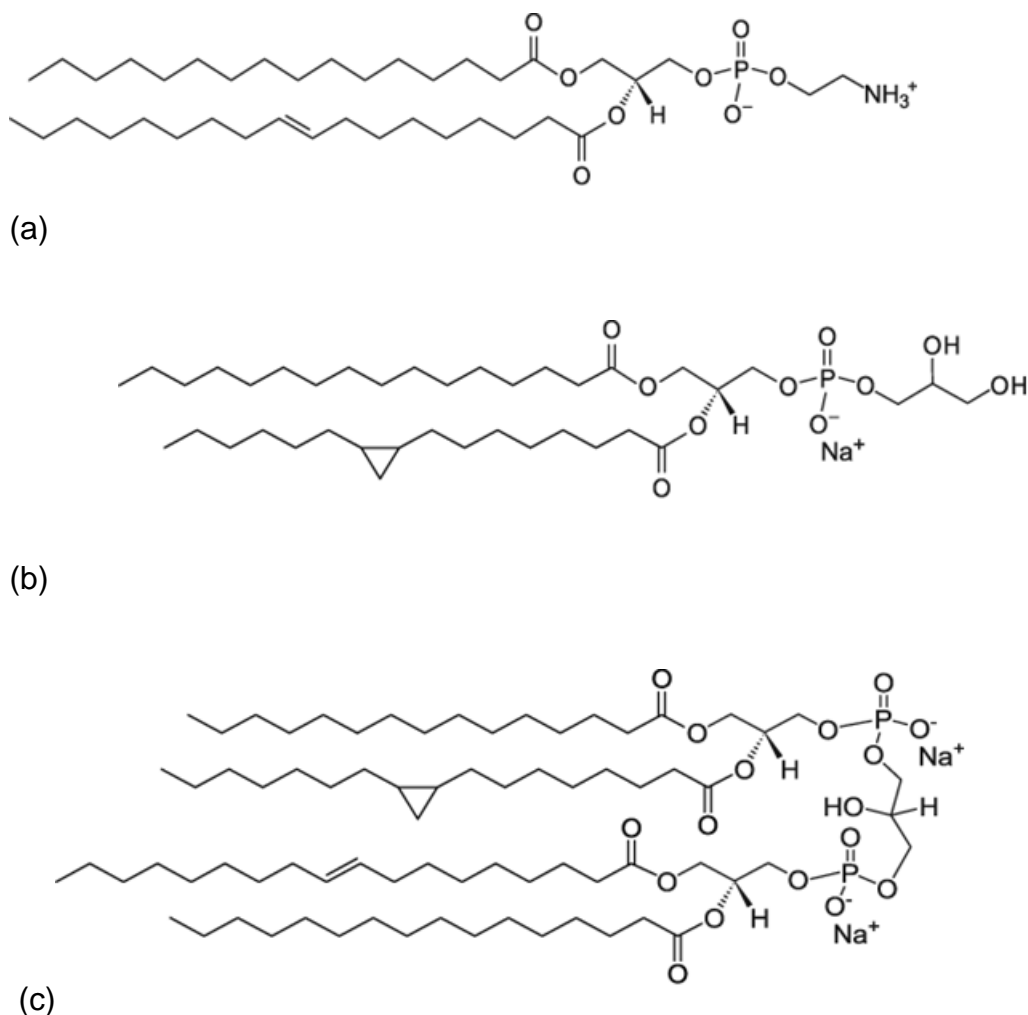


Figura 8 - Estrutura molecular dos componentes do extrato total de *E. coli* (100500P): a) L- α -fosfatidiletanolamina (PE); b) L- α -fosfatidilglicerol (PG) e c) cardiolipina (CA).

Fonte: PHOSPOLIPIDS... (66)

Os peptídeos AU (GLFDIHKKIAESF) (Massa Molar: 1.480,8g/mol), K-AU (KGLFDIHKKIAESF) (Massa Molar: 1.607,9g/mol), D-AU (DGLFDIHKKIAESF) (Massa

Molar: 1.594,9g/mol) foram sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS) (68), utilizando o protocolo padrão 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) sobre uma resina amida MBHA (0,6mmol/g). O peptídeo dimérico (AU)₂K (Massa Molar: 3.070,2g/mol) foi sintetizado de acordo Lorenzon. (31)

Para todas as sínteses, os aminoácidos (excesso de duas vezes em relação aos sítios ativos da resina) foram acoplados utilizando diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt) em 50% (v/v) de DCM (cloro de metileno)/DMF (N, N-dimetilformamida) como agentes de acoplamento. Os passos de desproteção do grupo α-amino foram realizados com uma solução 20% de piperidina em DMF durante 1 e 20 min. A clivagem do peptídeo da resina e remoção dos grupos protetores das cadeias laterais foram realizadas simultaneamente com 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de água, e 2,5% de triisopropil silano, durante 2 h. Após este procedimento, os peptídeos foram precipitados com éter etílico anidro, separados do material não-peptídico por centrifugação, extraídos com 5% de solvente B (0,036% (v/v) de TFA/acetonitrila) e 95% de solvente A (0,045% (v/v) de TFA/H₂O) e liofilizados. Os peptídeos brutos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa num cromatógrafo Beckman System Gold utilizando uma coluna C18 de fase inversa. A homogeneidade dos peptídeos foi verificada por CLAE analítica usando uma coluna C18 de fase inversa num sistema Shimadzu. Os solventes utilizados foram A e B com um gradiente linear de 5-95% (v/v) de solvente B durante 30 minutos, a um fluxo de 1,0mL/min e detecção UV a 220nm. As análises por CLAE das frações puras mostraram que as purificações foram eficientes, atingindo, para os três peptídeos, porcentagens de pureza maiores que 98%. A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro AmaZon SL (Bruker) com ionização por eletrospray e detecção em modo positivo. Este equipamento está localizado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP. A síntese e caracterização dos peptídeos foi obtida sob supervisão dos Profs. Drs. Esteban N. Lorenzón e Eduardo M. Cilli.

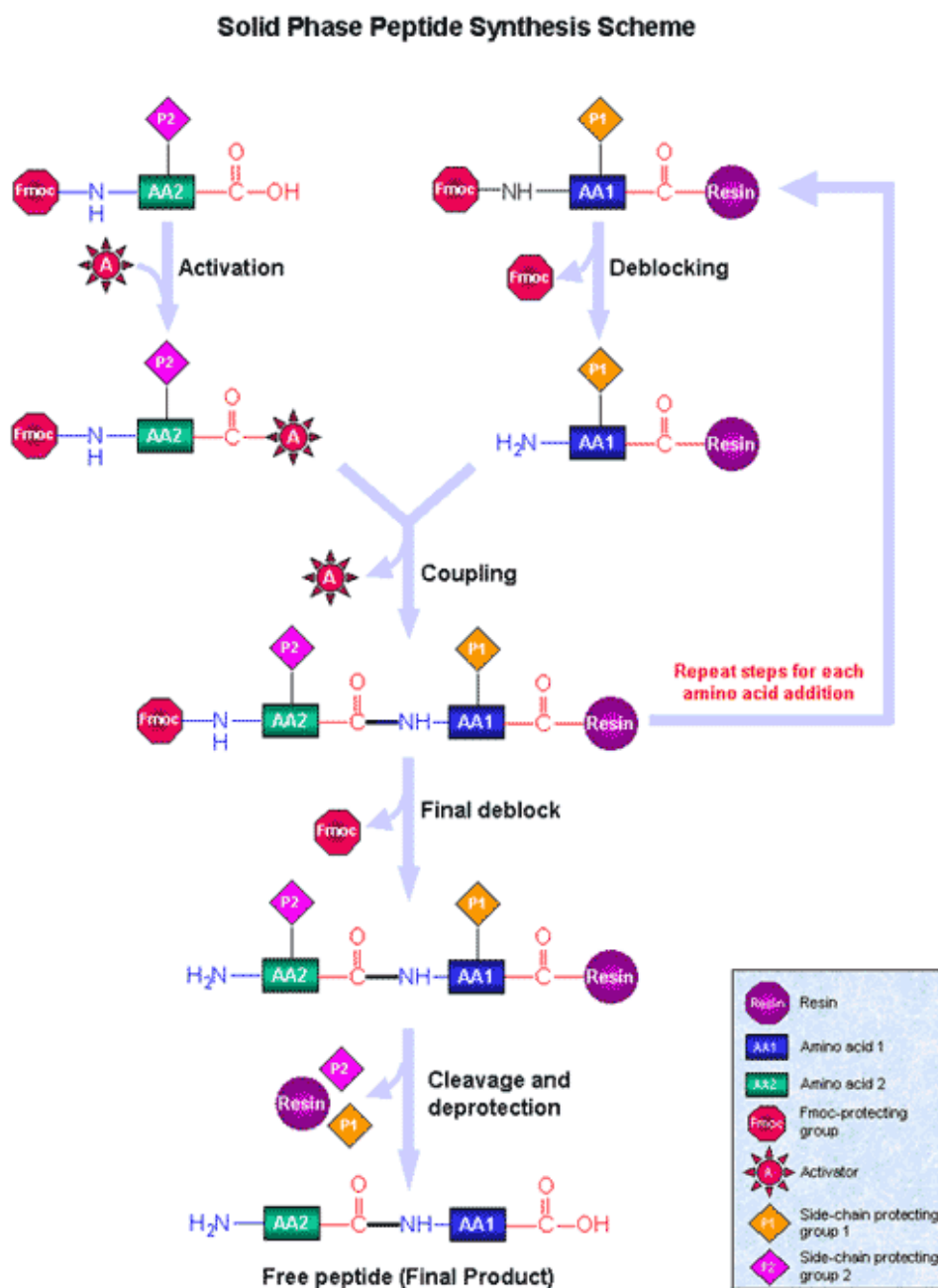


Figura 9 - Esquema de síntese de peptídeos em fase sólida.
Fonte: SOLID...(68)

Outros reagentes, como os fosfatos monossódico monohidratado e dissódico heptahidratado, usados para preparação de tampão, e clorofórmio, para dissolução dos lipídios foram obtidos da Panreac.

3.2 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram produzidos em cubas de Langmuir da empresa KSV Instruments (Finlândia), alocadas em uma sala limpa classe 10.000 com temperatura controlada em $23\pm 1^\circ\text{C}$, e equipadas com prova de Wilhelmy para medir a pressão superficial. Um esquema da cuba é mostrado na Figura 9. A subfase utilizada para as medidas foi solução tampão Fosfato-Salino (PBS) pH 7,4 com força iônica de 0,1 M (fosfato monossódico monohidratado e fosfato dissódico heptahidratado). A água usada na preparação do tampão, com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ e pH 6, foi fornecida por um purificador Milli-RO acoplado a outro purificador Milli-Q (Millipore).

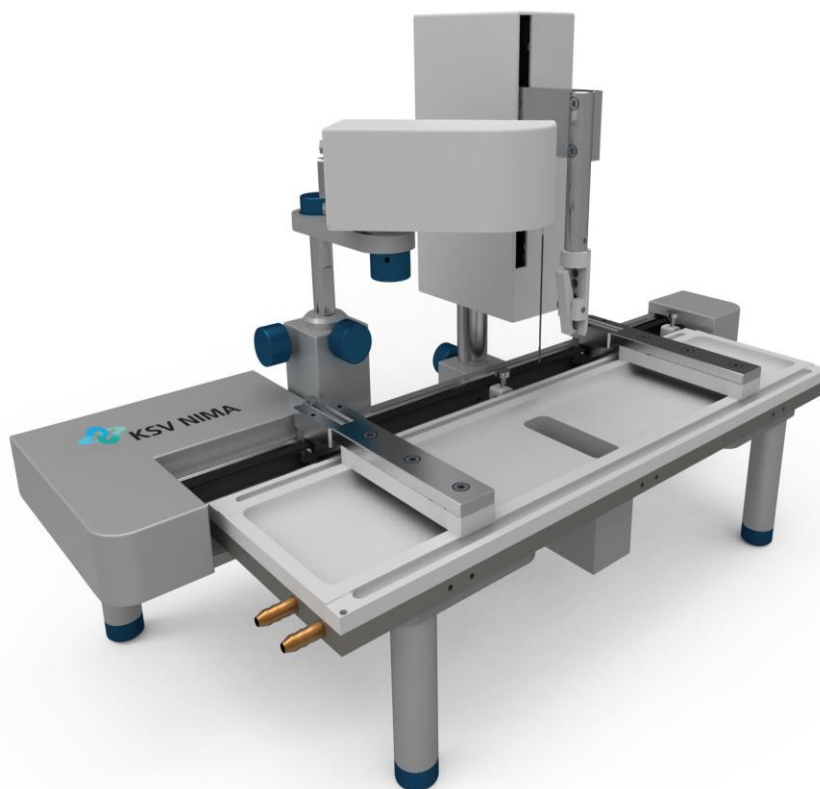


Figura 10 - Cuba de Langmuir.
Fonte: KSV... (69)

3.2.1 Filmes de Langmuir – Técnicas de caracterização

3.2.1.1 Isotermas de pressão superficial

Nestes experimentos, os filmes de Langmuir foram produzidos em uma cuba de Langmuir da empresa KSV Instruments (Finlândia) modelo Micro minitrough (área superficial de 15.900mm² e volume de 70mL). O procedimento para a obtenção dos mesmos consistiu do espalhamento de 12µL da solução orgânica do extrato lipídico de *E. coli* (1,0mg/mL) na superfície da subfase aquosa. Esperou-se 15 minutos para a completa evaporação do solvente orgânico (clorofórmio). As amostras dos peptídeos foram diluídas em água para uma concentração final de 0,2mg/mL e injetadas na subfase após a formação do filme de Langmuir ($\pi = 0$ mN/m) em volumes escolhidos de modo a conseguir concentrações finais de peptídeo na subfase entre 20 e 200nM. Avaliou-se a cinética de adsorção dos peptídeos nas diversas concentrações estudadas, monitorando-se a pressão superficial em função do tempo, de modo a garantir que o sistema estivesse em equilíbrio. Então, os filmes de Langmuir foram comprimidos simetricamente pelas barreiras móveis da cuba com a velocidade de 10mm/min.

As propriedades mecânicas dos filmes de Langmuir podem ser avaliadas através de medidas de elasticidade. Em regime estático, o módulo de compressão (C_s^{-1}), que é o inverso do fator de compressibilidade (C_s), pode ser calculado a partir das isotermas de pressão superficial, e sua unidade é mN/m. É calculada pela Equação 2, onde A representa a área por molécula e π a pressão superficial.

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (2)$$

Isotermas de módulo de compressão, que podem ser traçadas em função da área por molécula ou da pressão superficial, são empregadas no estudo das fases da isoterma de um composto e suas regiões de transição.

3.2.1.2 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

As medidas de PM-IRRAS foram feitas em equipamento modelo PMI550 da KSV Instruments (Finlândia), mostrado esquematicamente na Figura 10. O equipamento conta com lâmpada de carbeto de silício (Globar) como fonte de luz IR, um modulador de polarização fotoelástico composto por um cristal de ZnSe, e um detector de HgCdTe (MCT) modelo PCI-3TE-10.6 com área ativa de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Todas as medidas foram realizadas com ângulo de luz incidente de 80° e à temperatura de $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A cuba de Langmuir onde as medidas foram realizadas possui área superficial de 24.300 mm^2 e volume de 290 mL .

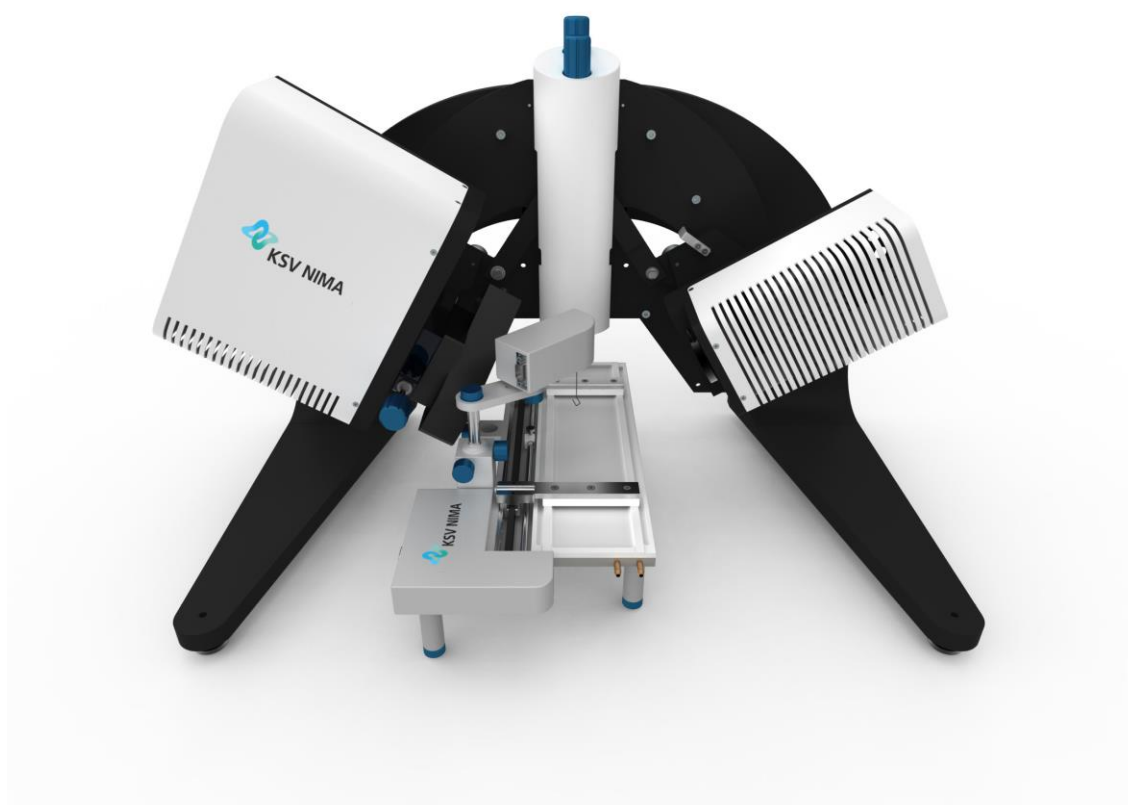


Figura 11 - Equipamento de PM-IRRAS acoplado à Cuba de Langmuir.
Fonte: KSV... (69)

O procedimento para a obtenção dos filmes de Langmuir foi o mesmo descrito anteriormente, com exceção de que 19 μ L da solução do extrato lipídico de *E. coli* foram espalhados em função da área da cuba. As soluções das amostras dos peptídeos foram injetadas na subfase em volumes escolhidos de modo a conseguir a concentração final na subfase de 100nM. Os espectros de PM-IRRAS foram obtidos para diferentes valores de pressão superficial. Para tal, a compressão da isoterma parava no valor de pressão superficial estabelecido com as barreiras, mantendo o valor através de ligeiras compressões/descompressões do filme, durante 10 minutos, que é o tempo de aquisição dos espectros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peptídeos utilizados e sua atividade contra *E. coli*

Os quatro peptídeos empregados neste trabalho de mestrado, denominados AU, DAU, KAU e (AU)₂K, foram sintetizados pelo Dr. Esteban Nicolás Lorenzón. (32) Os resultados de cromatografia são mostrados no Anexo A, enquanto os dados de massa e atividade contra *E. coli*, extraídos da ref. 31, são apresentados na Tabela 1. Observa-se que a maior atividade ocorre para o peptídeo AU, sendo que para o dímero (AU)₂K a atividade é consideravelmente reduzida.

Tabela 1 - Estrutura primária e características físico-químicas dos peptídeos estudados.

Peptídeo	Sequência	Peso Molecular ^a (g/mol)	Carga	Atividade Biológica (concentração inibitória mínima) contra <i>E. coli</i> ($\mu\text{mol/mL}$)
AU	GLFDIHKKIAESF	1479.9/1479.8	+1	16
KAU	KGLFDIHKKIAESF	1608.0/1607.9	+2	-
DAU	DGLFDIHKKIAESF	1594.0/1594.8	0	-
(AU) ₂ K	(GLFDIHKKIAESF) ₂ K	3070.7/3070.2	+2	128

^a Observado/calculado

Fonte: Cedido pelo Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón.

Conforme mostrado na Tabela 1, a dimerização diminui a atividade antimicrobiana da Aureína 1.2. Assim, a proposta deste projeto foi investigar se tal resultado está relacionado com a interação dos peptídeos com a membrana interna da bactéria. Já os peptídeos KAU e DAU, para os quais não foi possível obter a atividade biológica, foram sintetizados de modo a avaliar o efeito da carga na extremidade N-terminal do peptídeo. No pH de trabalho, o K-análogo possui uma carga positiva a mais, o que, em princípio, pode favorecer a interação com as cabeças negativas dos lipídios da membrana interna de *E. coli*.

4.2 Cinéticas de Adsorção

Foram realizadas primeiramente as cinéticas de adsorção dos peptídeos na monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. Cada peptídeo foi injetado na subfase em

diferentes concentrações, com a monocamada em baixo grau de compactação (pressão superficial $\pi = 0\text{mN/m}$), e o valor de π monitorado em função do tempo. A Figura 12 mostra as curvas para a Aureína 1.2 (AU), em que se observa atividade praticamente nula para a concentração de 50nM, que aumenta consideravelmente com o aumento da concentração. Para 200nM, por exemplo, a pressão de superfície chega a quase 9mN/m, sem indicação de que a adsorção esteja saturada. Ou seja, o equilíbrio no processo de adsorção/dessorção do peptídeo AU na interface ainda não foi atingido.

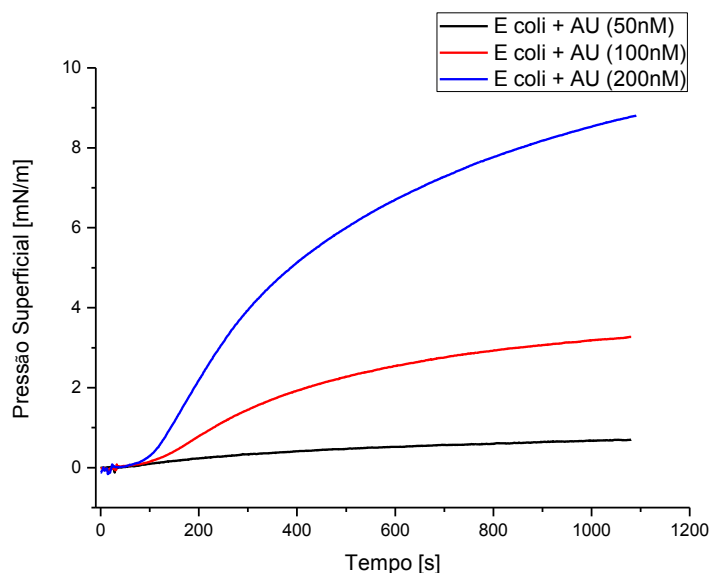


Figura 12 - Cinética de adsorção do peptídeo Aureína 1.2 (monômero) em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

As cinéticas de adsorção dos peptídeos DAU e KAU (análogos da Aureína 1.2 contendo o resíduo de aspartato e lisina, respectivamente, na região N-terminal), são mostradas nas Figuras 13 e 14, respectivamente. São semelhantes ao comportamento observado para o monômero AU, ou seja, só se mede alteração significativa na pressão superficial a partir de concentrações em torno de 100nM.

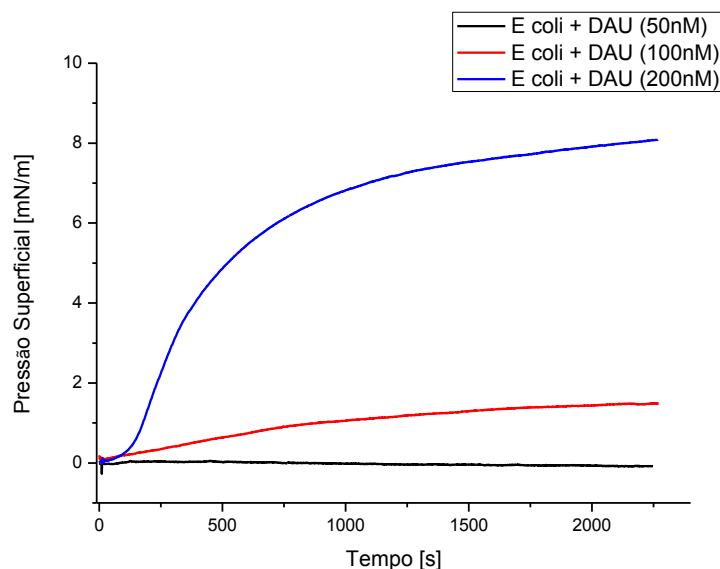


Figura 13 - Cinética de adsorção do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

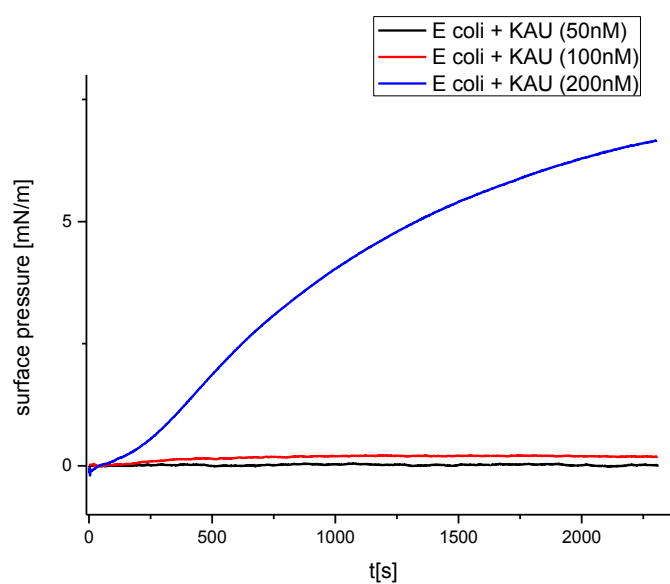


Figura 14 - Cinética de adsorção do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o dímero $(AU)_2K$, a atividade superficial aparece em concentrações consideravelmente mais baixas do que para o monômero e análogos, como se pode ver nas curvas de cinética de adsorção da Figura 15. Atinge-se o valor de pressão superficial superior a 10mN/m para concentração de 100nM, ao passo que para AU

a máxima pressão atingida foi cerca de 3mN/m para a mesma concentração. Da mesma forma, a concentração para a qual a atividade superficial começa a ser significativa é muito menor do que a observada para o monômero AU.

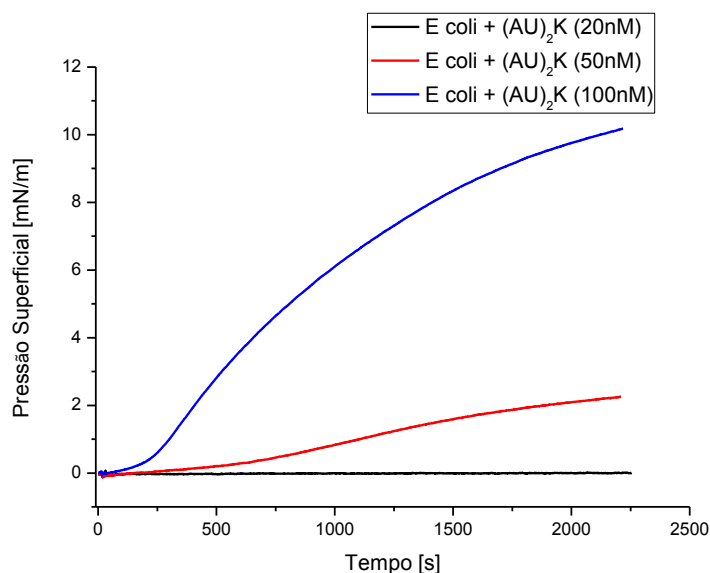


Figura 15 - Cinética de adsorção do dímero (AU)₂K em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em suma, dos peptídeos estudados, o dímero (AU)₂K apresentou atividade superior aos demais peptídeos ao passo que os monômeros apresentaram comportamento similar. A maior atividade superficial do dímero (AU)₂K pode ser explicada em função da maior anfipaticidade desta molécula, visto que esta contém maior quantidade de resíduos hidrofóbicos em sua cadeia (mesmo que a razão entre os resíduos polares e apolares se mantenha constante entre monômeros e dímero). Já avaliando o comportamento do monômero e seus análogos, podemos concluir que a modificação na região N-terminal da molécula, seja pela adição de uma carga positiva em KAU ou de uma carga negativa em DAU, não afeta significativamente a atividade superficial dos peptídeos, sugerindo que a adsorção na interface (em baixo empacotamento lipídico) não ocorra através desta região da molécula.

4.3 Isotermas de pressão superficial

Após o equilíbrio de adsorção ser atingido, foram obtidas as isotermas de pressão superficial. As Figuras 16-19 mostram isotermas para filmes de Langmuir do extrato lipídico de *E. coli*, incluindo aquelas em que diferentes concentrações dos peptídeos foram usadas na subfase de tampão. Para todos os casos, a inserção de peptídeo causa expansão na isoterma, que aumenta com a concentração do peptídeo.

Na Figura 16, observa-se que a presença do peptídeo AU (nas duas concentrações mais baixas estudadas) resultam em um incremento de aproximadamente 25\AA^2 cada na área ocupada pelas moléculas do extrato lipídico, na pressão de 30mN/m , correspondente ao empacotamento de uma biomembrana. (70) Para a concentração mais alta, de 200nM , nota-se uma expansão da isoterma de pressão superficial muito maior, de aproximadamente 120\AA^2 . Ressalte-se que a pressão de colapso da monocamada parece ter diminuído em função do aumento da concentração de AU. Ainda é interessante notar que a curva para a maior concentração apresenta um platô quando comprimida acima de 30mN/m , e não fica claro se este platô se deve ao colapso da monocamada de fato ou a uma transição de fase.

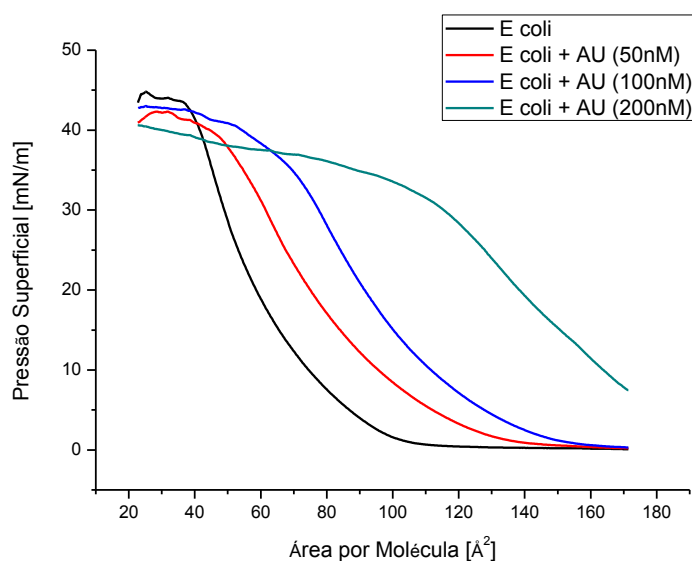


Figura 16 – Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo Aureína 1.2 (AU) em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

As isotermas de pressão superficial para o extrato lipídico de *E. coli* na presença do peptídeo DAU estão apresentadas na Figura 17. Para este análogo, observa-se comportamento semelhante ao do monômero, com expansão da monocamada com o aumento da concentração de DAU. A maior diferença observada ocorre para a maior concentração de DAU que, diferentemente de AU, não apresenta o platô acima de 30mN/m, e sim o colapso bem definido a 43mN/m.

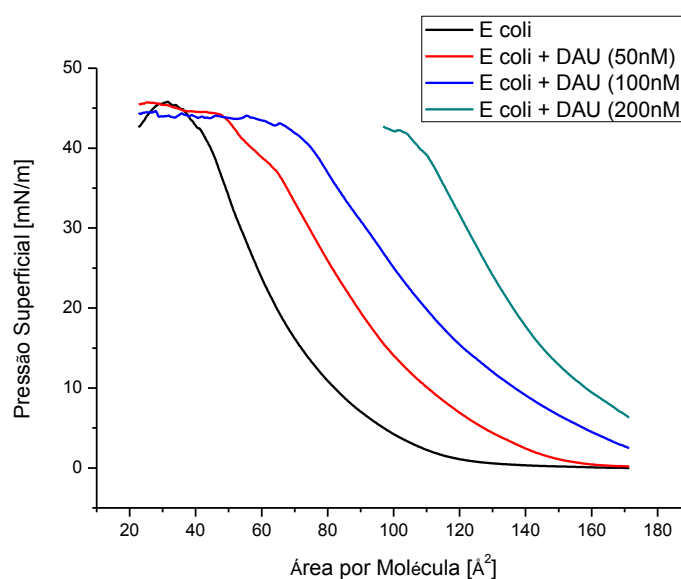


Figura 17 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A incorporação de um resíduo lisina na molécula de Aureína 1.2 (KAU) provoca alterações no comportamento da isoterma se comparado à molécula de referência (AU). Pelas curvas da Figura 18 observa-se que o padrão da compressão é bastante diferente abaixo e acima de 30mN/m. Para maiores valores de π observa-se uma mudança no perfil da isoterma, onde a diminuição da área por molécula ocorre em taxas muito maiores do que abaixo de 30mN/m. Diferentemente do mencionado para a concentração de 200nM de AU, para as isotermas de KAU o colapso aparece bem definido, e acima dessa região de transição. O aparecimento de um platô nas isotermas de pressão superficial já foi relatado para outros peptídeos interagindo com monocamadas lipídicas. (4) Entretanto, diferentes fenômenos podem estar associados ao patamar na curva, como colapso (71), deslocamento de umas das moléculas para a subfase (72, 73), ou ainda mudança de orientação ou conformação do peptídeo. (74) No caso do peptídeo KAU, apenas os dados de isoterma de pressão superficial não permitem concluir qual destes eventos deve estar ocorrendo; outras análises são necessárias.

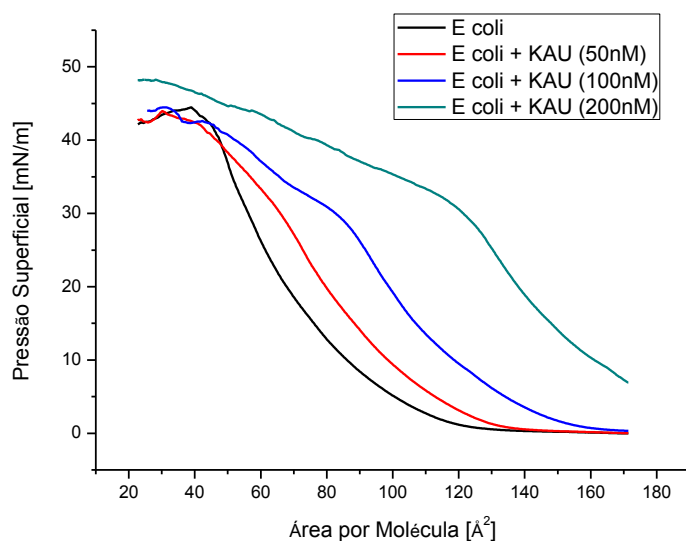


Figura 18 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

As isotermas de pressão superficial para o peptídeo dimérico estão na Figura 19. As curvas também estão deslocadas para maiores valores de área, indicando a incorporação do peptídeo $(AU)_2K$ nas concentrações estudadas.

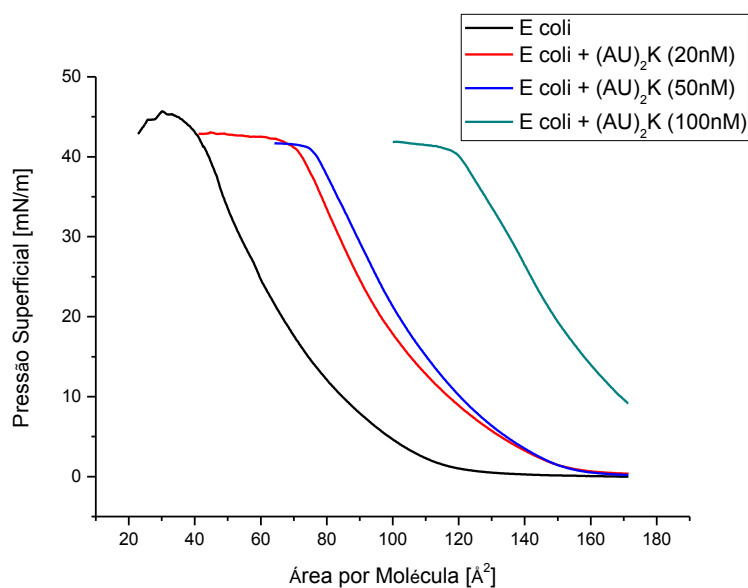


Figura 19 - Isoterma de pressão superficial por área molecular do dímero $(AU)_2K$ em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 20 mostra as isotermas de pressão superficial para os quatro peptídeos na concentração de 100nM, para comparação. É clara a transição provocada pelo peptídeo KAU, que ocorre em valores de pressão superficial correspondentes ao da biomembrana, sugerindo que esta seja uma estratégia para incorporação de KAU. Já o peptídeo DAU provoca maiores expansões na monocamada do que o monômero AU. Considerando que DAU possui uma carga negativa em sua cadeia lateral, esta poderia neutralizar a carga positiva da região N-terminal, tornando a molécula mais hidrofóbica, e facilitando sua maior incorporação ao filme. Finalmente, para o peptídeo dimérico $(AU)_2K$, as expansões provocadas na monocamada são bastante pronunciadas, sugerindo que as duas cadeias de Aureína 1.2 da molécula devem estar incorporadas ao filme.

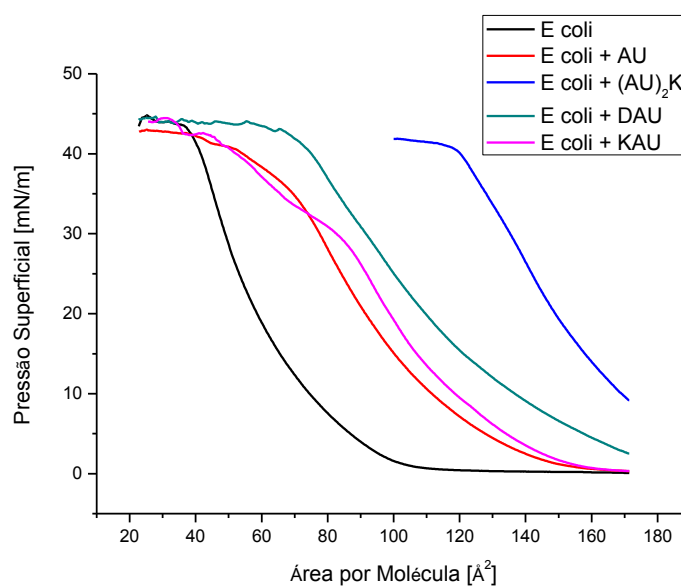


Figura 20 - Isotermas de pressão superficial por área molecular para os quatro peptídeos (AU, $(AU)_2K$, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para mais bem quantificar a incorporação dos peptídeos ao filme, a Figura 21 mostra a variação da área por molécula do extrato lipídico de *E. coli* em função da concentração dos peptídeos, para uma pressão superficial de 30mN/m. Nota-se que

a expansão provocada pelo dímero $(AU)_2K$ chega a ser de três a quatro vezes maior que para os outros peptídeos. Este dado sugere que o peptídeo dimérico deve assumir uma configuração mais “aberta” na interface. A Figura também mostra que, apesar das diferenças no formato das isotermas de pressão superficial, a expansão na monocamada provocada pelos peptídeos AU e KAU é praticamente a mesma. Considerando que DAU apresentou maior interação com o filme de *E. coli*, estes resultados sugerem preliminarmente que a carga positiva na posição N-terminal não resulta em maior incorporação do peptídeo ao filme, e sim o contrário para a Aureína 1.2. Além disso, não se observa saturação com a concentração para nenhuma das monocamadas. Isso implica que deve ser possível incorporar concentrações ainda maiores dos peptídeos.

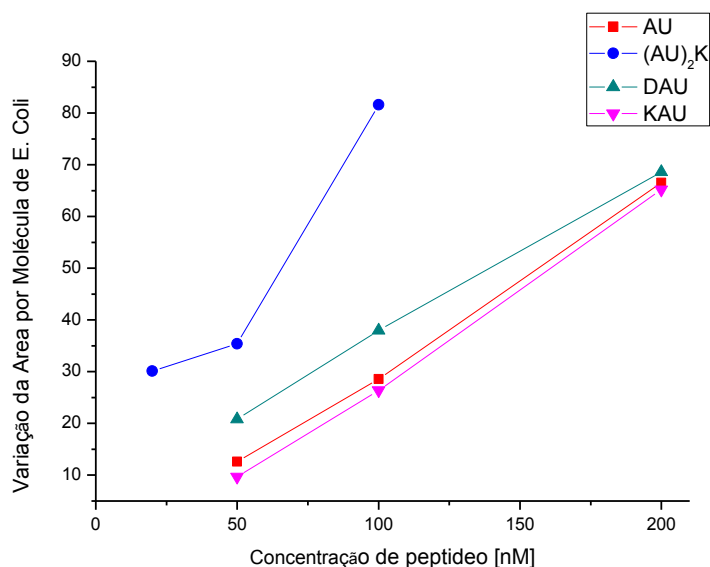


Figura 21 – Variação da área por molécula do extrato lipídico de *E. coli* em função da concentração dos peptídeos (AU, $(AU)_2K$, DAU e KAU), para uma pressão superficial de 30mN/m.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Compressibilidade

A compressibilidade pode ser um fator essencial para a ação de fármacos e drogas em membranas, pois sua alteração pode estar associada à facilidade com que uma membrana é rompida ou que se provoque vazamento. A Figura 22 mostra que a incorporação de AU não trouxe alterações significativas na dependência do

módulo de compressão com a área por molécula, a não ser pelo óbvio deslocamento das curvas para maiores áreas devido à expansão observada nas isotermas de pressão. O valor máximo do módulo de compressão, por exemplo, é praticamente o mesmo para todas as curvas.

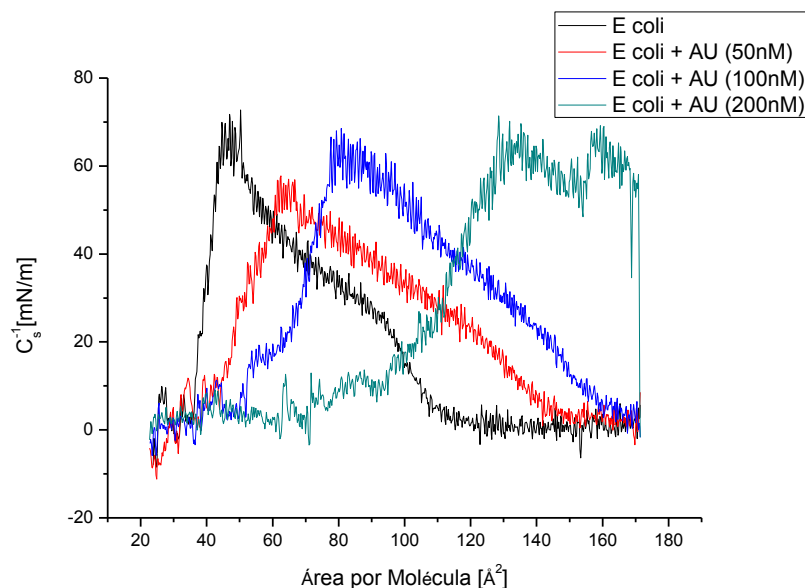


Figura 22 – Módulo de compressão por área molecular do peptídeo AU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o peptídeo modificado DAU, novamente as curvas de módulo de compressão da Figura 23 são deslocadas para maiores áreas com a concentração, em virtude da expansão já mencionada para o AU. O valor máximo do módulo de compressão só se altera significativamente para a maior concentração usada, 200nM, em que o módulo atinge cerca de 100mN/m, comparado com cerca de 60mN/m para o AU.

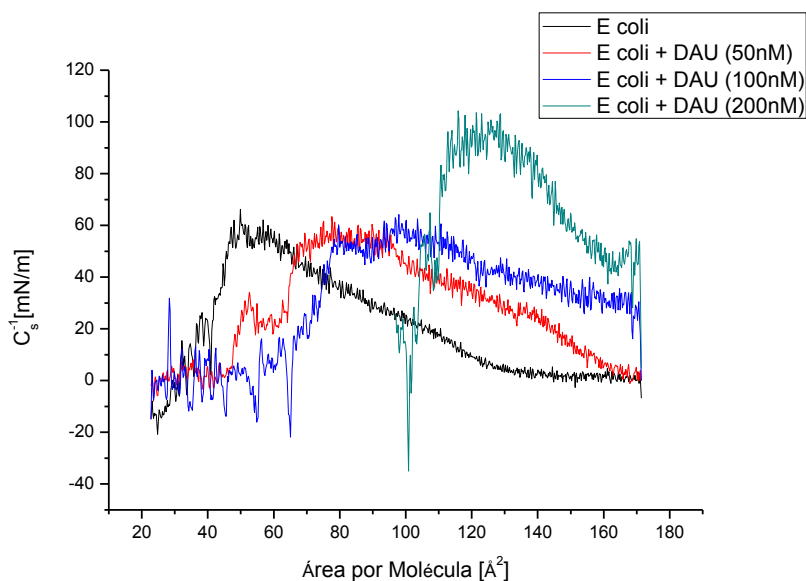


Figura 23 - Módulo de compressão por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento para o KAU na Figura 24 é semelhante ao do DAU, inclusive com aumento significativo para o máximo módulo de compressão para a maior concentração, de 200nM.

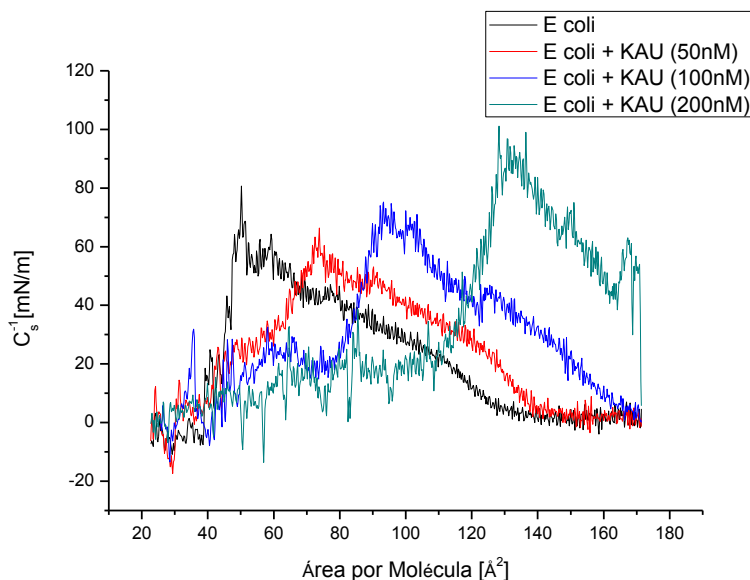


Figura 24 - Módulo de compressão por área molecular do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o dímero $(AU)_2K$, já há na Figura 25 aumento no máximo do módulo de compressão a partir de 20nM, que se acentua com o aumento da concentração. Para 100nM, em particular, não só o máximo módulo aumenta significativamente, mas mesmo o formato da curva se altera.

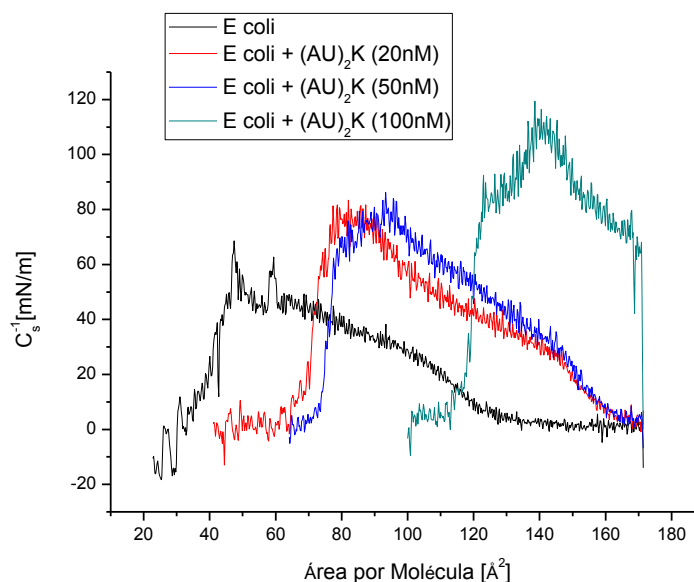


Figura 25 - Módulo de compressão por área molecular do dímero $(AU)_2K$ em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A comparação do efeito dos quatro peptídeos é mostrada na Figura 26 para uma concentração de 100nM. Nota-se que o máximo módulo de compressão é essencialmente o mesmo para AU, DAU e KAU, mas significativamente maior para o dímero $(AU)_2K$. Isso indica um aumento considerável na rigidez da membrana do extrato de *E. coli* com a incorporação do dímero, o que não ocorre para os demais peptídeos na concentração de 100nM.

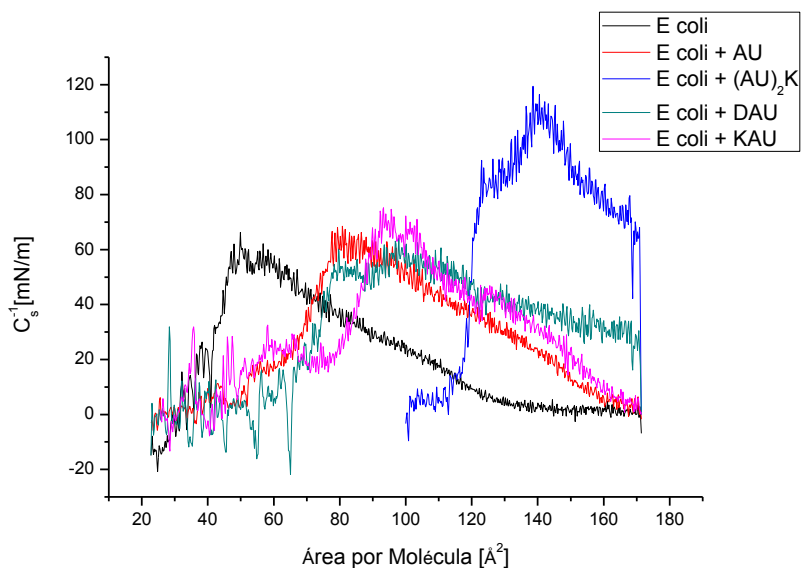


Figura 26 – Módulo de compressão por área molecular para os quatro peptídeos (AU, (AU)₂K, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para que a correlação com fenômenos fisiológicos seja mais direta, os dados de módulo de compressão são colocados em gráfico tendo a pressão superficial na abscissa. Especial atenção é dada agora ao valor do módulo de compressão para a pressão de 30mN/m, que se acredita corresponder ao empacotamento de uma membrana real. Como esperado dos resultados com variação da área, a Figura 27 indica que o módulo de compressibilidade a 30mN/m não é afetado de maneira significativa pela incorporação de diferentes concentrações de AU.

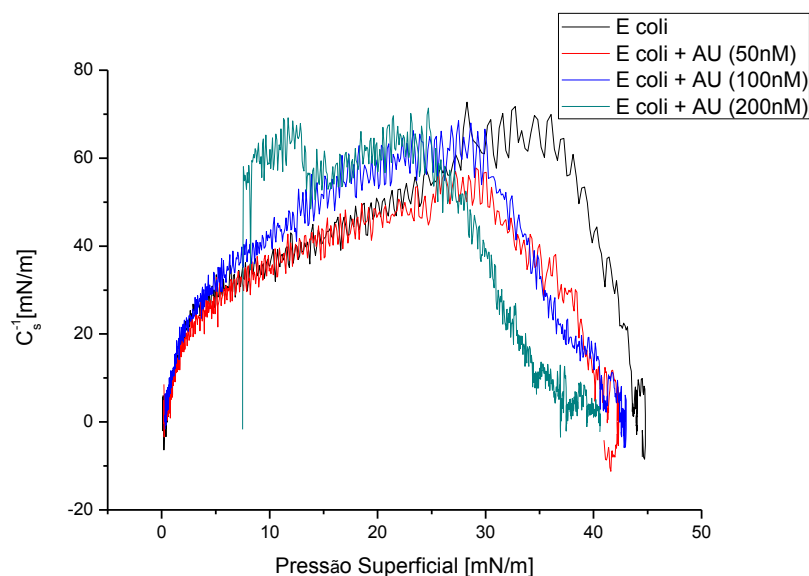


Figura 27 - Módulo de compressão por pressão superficial do monômero AU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o peptídeo DAU, um aumento significativo no módulo de compressibilidade foi observado para a maior concentração (200nM), como se nota na Figura 28. Para as outras concentrações de DAU, a dependência do módulo com a pressão era praticamente indistinguível da observada para o filme de *E. coli*, sem peptídeo, inclusive na pressão de 30mN/m.

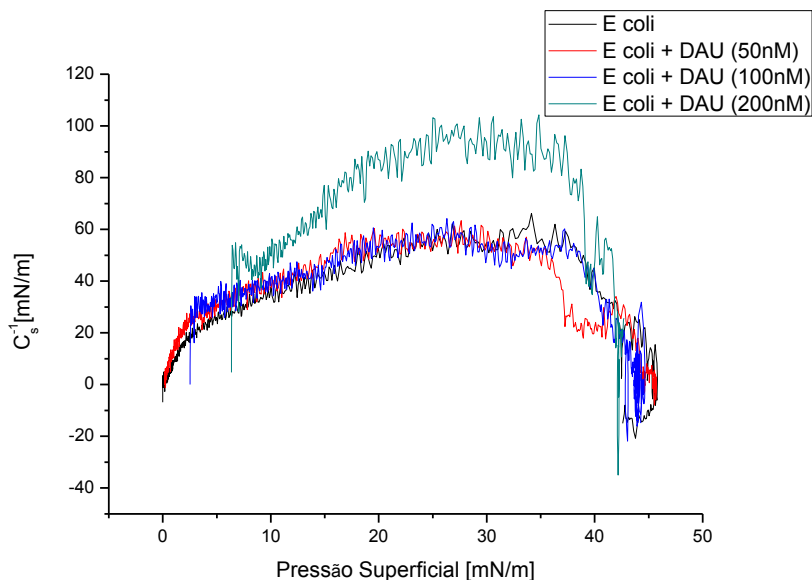


Figura 28 - Módulo de compressão por pressão superficial do peptídeo DAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 29 mostra que para o KAU, a incorporação no filme de Langmuir de *E. coli* gerou algumas diferenças nas curvas. O módulo de compressibilidade em 30mN/m, entretanto, teve pequenas variações.

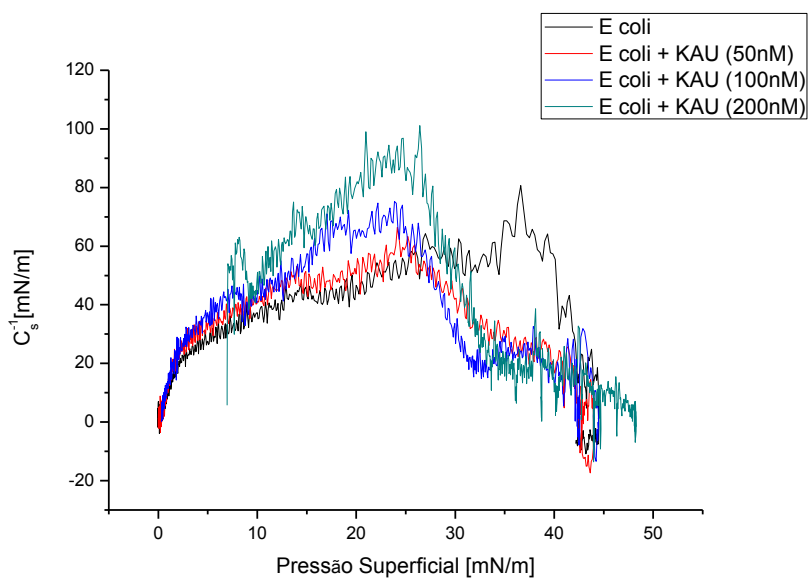


Figura 29 - Módulo de compressão por pressão superficial do peptídeo KAU em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Já a incorporação do dímero causou alterações significativas no módulo de compressão em 30mN/m, como se nota da Figura 30. Para 100nM de $(AU)_2K$, por exemplo, o módulo de compressibilidade é praticamente o dobro do valor correspondente ao filme de *E. coli*.

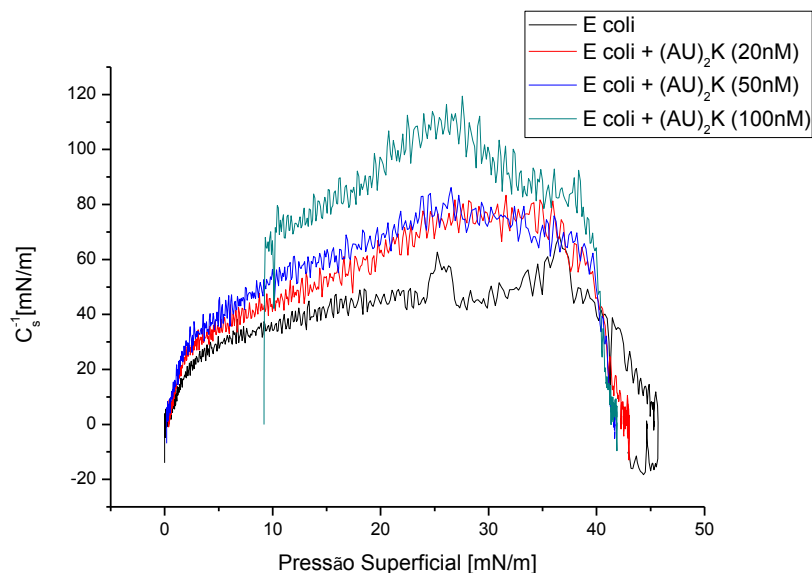


Figura 30 - Módulo de compressão por pressão superficial do dímero $(AU)_2K$ em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*. As concentrações do peptídeo estão destacadas no encarte da figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma análise comparativa pode ser feita com as curvas para 100nM de todos os peptídeos, na Figura 31. Ressalta-se o aumento do módulo de compressão para o dímero. Há também um decréscimo perceptível para o KAU.

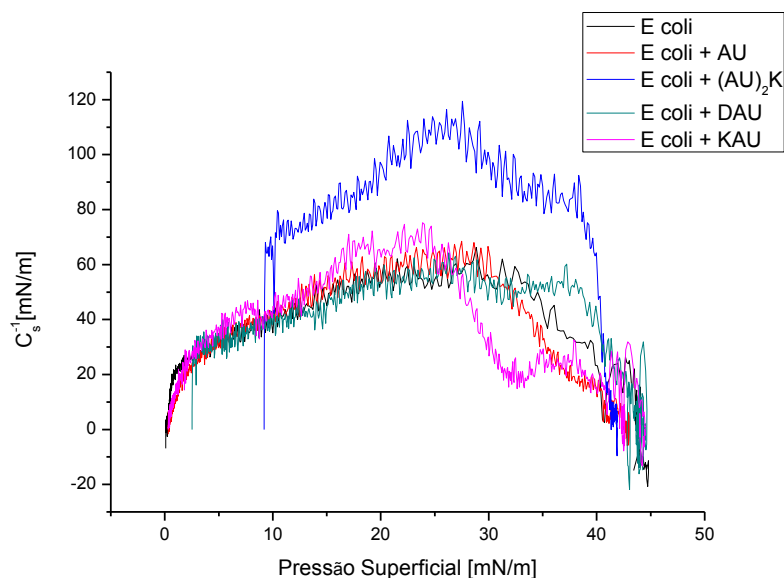


Figura 31 - Módulo de compressão por pressão superficial para os quatro peptídeos (AU, $(AU)_2K$, DAU e KAU) na concentração de 100nM em monocamada de extrato lipídico de *E. coli*.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Espectros de PM-IRRAS

Os espectros de PM-IRRAS para o extrato lipídico de *E. coli* puro e na presença dos diferentes peptídeos são apresentados na Figura 32, para a região que compreende $2800-3000\text{cm}^{-1}$. Nesta região encontram-se as vibrações referentes aos diferentes estiramentos C-H, permitindo inferir informações principalmente sobre os grupos apolares dos lipídios na interface. (75) Alguns valores de referência estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Bandas de absorção de IR na região que compreende $2800-3000\text{cm}^{-1}$.

Número de onda (cm^{-1})	Grupo Funcional
2827	CH_3 alceno
2983	CH_2 alceno
2913	CH_2 alceno
2852 - 2868	CH_2 simétrico
2905	CH_2 assimétrico

Fonte: Adaptada de STUART. (75)

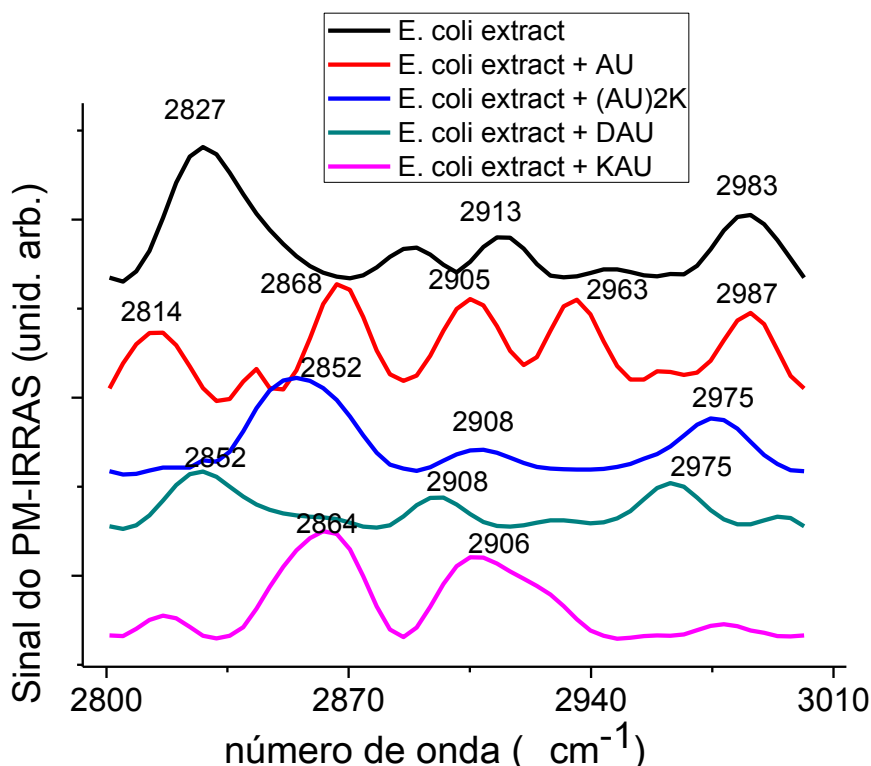


Figura 32 - Espectros de PM-IRRAS, para a pressão superficial de 30mN/m, na região que compreende 2800-3000cm⁻¹ para filmes de Langmuir de *E. coli*, na ausência e presença de 100nM dos peptídeos AU, (AU)₂K, DAU e KAU.
Fonte: Elaborada pela autora.

Não existem dados na literatura sobre PM-IRRAS para extrato lipídico de *E. coli*. Além disso, o fato de este conter uma mistura de diversos lipídios, bem como uma porcentagem de compostos desconhecidos, dificulta a análise do espectro. De qualquer forma, algumas informações relevantes sobre o filme são bastante claras: as bandas em 2827cm⁻¹ e 2983cm⁻¹ correspondem, respectivamente, aos estiramentos dos grupos CH₃ e CH₂ em alcenos. A banda em 2913cm⁻¹ corresponde ao estiramento CH₂ em alcanos, e aparece com baixa intensidade. Esta banda também indica a alta quantidade de lipídios insaturados e reflete a elevada fluidez da monocamada. De fato, o valor máximo de compressibilidade para esta monocamada foi de 60mN/m, sugerindo seu caráter mais fluido.

A presença do peptídeo AU afeta as bandas para o extrato lipídico, com a intensificação das bandas em 2868cm⁻¹ e 2905cm⁻¹, referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do CH₂, respectivamente. O aparecimento destas bandas indica que AU provoca certa organização do filme, como regiões da monocamada com maior ordenamento. O mesmo acontece na presença de (AU)₂K, onde o

destaque é para a banda em 2852cm^{-1} também atribuída ao estiramento simétrico do CH_2 , sugerindo menor ordenamento relativo, quando comparado ao observado para AU. O peptídeo DAU não afetou drasticamente o espectro de PM-IRRAS para o extrato lipídico de *E. coli*, onde as bandas predominantes são atribuídas aos estiramentos CH_2 e CH de alcenos. O peptídeo KAU, que apresenta um resíduo de lisina na posição N-terminal, apresentou espectro similar ao dímero, entretanto com a banda atribuída ao estiramento CH_2 com maior intensidade, sugerindo maior ordenamento do filme.

Os espectros foram também avaliados na região que compreende $1500\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ (apresentados na Figura 33), onde informações sobre a estrutura secundária do peptídeo (quando interagindo com a monocamada) pode ser obtida através da atribuição das bandas de amida I e II. De forma geral, as estruturas secundárias apresentam as seguintes atribuições: i) hélice-alfa: banda de amida I entre $1645\text{-}1655\text{cm}^{-1}$ e banda de amida II entre $1540\text{-}1560\text{cm}^{-1}$; ii) folha-beta banda de amida I entre $1615\text{-}1640\text{cm}^{-1}$ e banda de amida II $1500\text{-}1530\text{cm}^{-1}$ iii) estrutura aleatória: banda de amida I entre $1655\text{-}1660\text{cm}^{-1}$ (ou acima) e banda de amida II entre $1530\text{-}1540\text{cm}^{-1}$. O espectro para o extrato lipídico de *E. coli*, surpreendentemente, apresentou diversas bandas nesta região. De fato, a partir do método de extração da membrana, e, posteriormente confirmado pela empresa fornecedora, na porcentagem de material desconhecido pode conter lipoproteínas, ou proteínas de membrana, explicando a presença dessas bandas no espectro.

Tabela 3 – Bandas de absorção de IR na região que compreende $1500\text{-}1800\text{cm}^{-1}$.

Estrutura Secundária	Banda de amida I (cm^{-1})	Banda de amida II (cm^{-1})
Hélice α	1645 - 1655	1540 - 1560
Folha β	1615 - 1640	1500 - 1530
Aleatória	1655 - 1660	1530 - 1540

Fonte: Adaptada de STUART. (75)

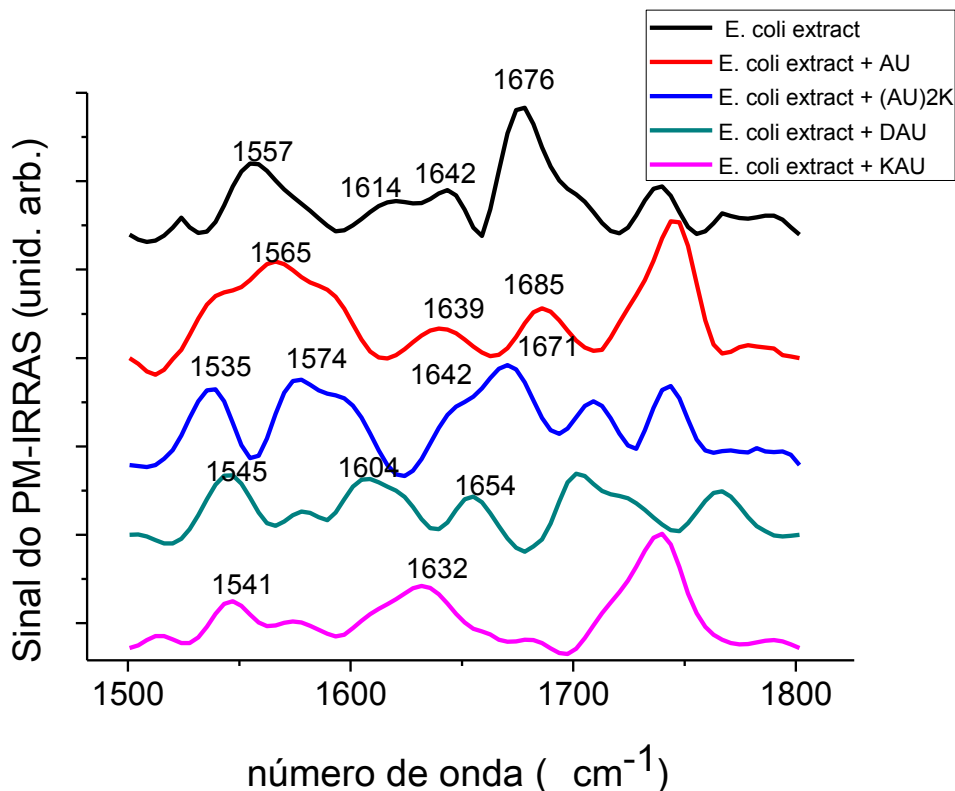


Figura 33 - Espectros de PM-IRRAS, para a pressão superficial de 30mN/m, na região que compreende 1500-1800cm⁻¹ para filmes de Langmuir de *E. coli*, na ausência e presença de 100nM dos peptídeos AU, (AU)₂K, DAU e KAU.

Fonte: Elaborada pela autora.

A presença do peptídeo AU resulta em uma banda forte em 1639cm⁻¹, indicando uma estrutura secundária do tipo folha-beta. Para o peptídeo (AU)₂K, a banda de amida II centrada em 1535cm⁻¹ também indica que o peptídeo adquire uma estrutura do tipo folha-beta. O mesmo acontece para o peptídeo KAU, com bandas centradas em 1541 e 1632cm⁻¹, indicando estrutura secundária em folha-beta. Diferentemente, o peptídeo DAU apresenta bandas indicativas de estrutura alfa-hélice, centradas em 1545 e 1645cm⁻¹.

Dos espectros de PM-IRRAS, tanto na região típica das cadeias quanto na região em que se obtém informação da estrutura secundária, observam-se efeitos marcantes de todos os peptídeos sobre as propriedades dos filmes de Langmuir do extrato de *E. coli*. A expansão causada pelos peptídeos nas isotermas de pressão é indicativa de incorporação nas cadeias, o que pode alterar o espectro vibracional das cadeias. Embora não se possa quantificar o efeito, aparentemente o ordenamento das cadeias foi afetado. Não é possível, entretanto, afirmar se algum dos peptídeos teve efeito maior do que os outros, pois em todos os casos houve

grandes mudanças no espectro do filme de *E. coli*. Igualmente para a região típica de estrutura secundária, os efeitos da inserção dos peptídeos foram grandes em todos os casos, sem que se possa identificar um efeito predominante para nenhum dos peptídeos.

Em suma, os resultados de PM-IRRAS confirmaram a grande interação dos peptídeos com o filme de Langmuir de *E. coli*. Mas, ao contrário dos dados de pressão de superfície e compressibilidade, não foi possível determinar se algum peptídeo tem maior ação nas propriedades espectroscópicas do filme do extrato de *E. coli*.

5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

O peptídeo Aureína 1.2 (AU) e seus derivados KAU, DAU e o dímero (AU)₂K apresentaram atividade superficial, com incorporação no filme de Langmuir obtido com um extrato de *E. coli*, de acordo com a cinética de adsorção para um filme à pressão superficial zero. O destaque nesses resultados foi a atividade significativamente maior do dímero. Como esperado, essa atividade superficial se refletiu em modificações nas isotermas de pressão do filme de Langmuir. De fato, todos os peptídeos causaram expansão nas isotermas de pressão do filme de Langmuir de extrato de *E. coli*, com o efeito sendo particularmente grande para o dímero. A expansão deve ser indicativa de penetração na região hidrofóbica da camada lipídica do extrato. Assim como nos resultados de pressão de superfície, a compressibilidade do filme de *E. coli* foi mais afetada pelo dímero, ao passo que os outros peptídeos não causaram grande alteração no módulo de compressibilidade em 30 mN/m, que corresponde ao empacotamento de uma membrana real.

A interação dos peptídeos com o filme de Langmuir de *E. coli* também gerou alterações significativas nos espectros de PM-IRRAS, confirmando a existência de interações no nível molecular, tanto na região das caudas dos lipídios quanto na estrutura secundária dos peptídeos e de componentes do extrato. Com a expansão causada pelos peptídeos, provavelmente o ordenamento molecular no filme de Langmuir também foi alterado. Ao contrário dos resultados de pressão e compressibilidade, nenhum destaque ocorreu entre os peptídeos. Ou seja, as mudanças induzidas pelo dímero não foram maiores do que as dos outros peptídeos.

Considerando que a atividade bactericida contra *E. coli* é menor para o dímero do que para o peptídeo AU, conclui-se que esta atividade não depende da interação com a membrana plasmática, simulada nos experimentos de filmes de Langmuir com o extrato. É provável que a atividade bactericida esteja relacionada à interação ou, principalmente, à permeabilização da membrana externa, formada majoritariamente por lipopolissacarídeos em sua porção exterior. Isto significa que a membrana externa atua como uma barreira para o dímero, que não consegue permear a membrana externa para então atingir a membrana interna.

Como trabalho futuro, prevê-se, portanto, realizar experimentos com filmes de Langmuir constituídos de LPS, de modo a simular a membrana externa da bactéria. O estudo comparativo será semelhante ao realizado neste trabalho de mestrado.

REFERÊNCIAS

- 1 BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 100, p. 563-584, 2003. doi: 10.1016/S0001-8686(02)00071-4.
- 2 TSAI, W-C.; RIZVI, S. SH. Liposomal microencapsulation using the conventional methods and novel supercritical fluid processes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 61-71, 2016. doi: 10.1016/j.tifs.2016.06.012.
- 3 BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current opinion in structural biology**, v. 9, n. 4, p. 438-443, 1999.
- 4 NOBRE, T. M. et al. Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models. **Thin Solid Films**, v. 593, p. 158-188, 2015. . doi: 10.1016/j.tsf.2015.09.047.
- 5 MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 109-140, 1999.
- 6 DE BRITO, A. K.; CASELI, L.; NORDI, C. S. Interaction of algal polysaccharide with lipid Langmuir monolayers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 8, p. 1857-1860, 2011.
- 7 CASELI, L. et al. Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. **Langmuir**, v. 21, n. 9, p. 4090-4095, 2005.
- 8 SUGÁR, I. P.; BROCKMAN, H. L. Model of peripheral protein adsorption to the water/lipid interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 16, p. 4073-4081, 2007.
- 9 EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : biomembranes**, v. 1788, n. 1, p. 289-294, 2009.
- 10 YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.
- 11 FLEITAS, O.; AGBALE, C. M.; FRANCO, O. L. Bacterial resistance to antimicrobial peptides: an evolving phenomenon. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1013-1038, 2015.
- 12 LI, W. et al. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. **Amino Acids**, v. 46, n. 10, p. 2287-2294, 2014.

- 13 COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins : a viable alternative to antibiotics?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.
- 14 DUNN, B. M. (Ed.). **Peptide chemistry and drug design**. New York: John Wiley & Sons, 2015.
- 15 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 16 SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 2007.
- 17 BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of E. coli. **eLife**, v. 4, p. e05826, 2015. doi: 10.7554/eLife.05826.
- 18 SINGLETON, P. **Bacteria in biology, biotechnology and medicine**. 5th ed. Chichester: John Wiley, 1999.
- 19 SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.
- 20 MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2010**, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44425/1/9789241564069_eng.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2016.
- 22 RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 293-297, 2013.
- 23 FLEITAS, O.; AGBALE, C.M.; FRANCO, O.L. Bacterial resistance to antimicrobial peptides: an evolving phenomenon. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1013-1038, 2015. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/2016/v21/af/4438/fulltext.php?bframe=PDF>>. Acesso em: 30 ago. 2016.
- 24 ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Peptide Science**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.
- 25 LUDTKE, S.; HE, K.; HUANG, H. Membrane thinning caused by magainin 2. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16764-16769, 1995.
- 26 SEO, M. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

27 EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**: biomembranes, v. 1462, n. 1, p. 11-28, 1999.

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

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

30 TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 55, n. 1, p. 4-30, 2000.

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

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

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

34 WANG, G. S.; LI, Y. F.; LI, X. Correlation of three-dimensional structures with the antibacterial activity of a group of peptides designed based on a nontoxic bacterial membrane anchor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.7, p. 5803–5811, 2005.

35 GEHMAN, J. D. et al. Effect of antimicrobial peptides from Australian tree frogs on anionic phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 47, n. 33, p. 8557-8565, 2008.

36 HELICAL Wheel Projections. Disponível em: <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi?sequence=GLFDIIKKIAESF&indexaa=&phe=&theta=&xsiz%20e=&ysize=¢erx=¢ery=&w=&r=&fontsize=&d=&fontsize2=&hmscale=&disp_hm_angle=on&hmdisp=&submit=Submit&.cgifields=reverse_helix&.cgifields=wo_color&.cgifields=disp_hm_angle>. Acesso em: 20 ago. 2016.

37 GIACOMETTI, A. et al. In vitro activity of aurein 1.2 alone and in combination with antibiotics against gram-positive nosocomial cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1494-1496, 2007.

38 VLIEGHE, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1, p. 40-56, 2010.

39 JIANG, Z. et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 90, n. 3, p. 369-383, 2008.

40 CESPEDES, G. F. et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 6, p. 596-603, 2012.

41 ROSENFELD, Y.; LEV, N.; SHAI, Y. Effect of the hydrophobicity to net positive charge ratio on antibacterial and anti-endotoxin activities of structurally similar antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 853-861, 2010.

42 BAHAR A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.

43 OREN, Z.; SHAI, Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 303-310, 1996.

44 PAPO, N. et al. The consequence of sequence alteration of an amphipathic α -helical antimicrobial peptide and its diastereomers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33913–33921, 2002.

45 JAHNSEN, R. O. et al. End group modification: efficient tool for improving activity of antimicrobial peptide analogues towards Gram-positive bacteria. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, pt. A, p. 40-46, 2015. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.01.013.

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

47 LORENZON, E. N. et al. C-terminal Lysine-linked magainin 2 with increased activity against multidrug-resistant bacteria. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, n. 8, p. 738-747, 2016.

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

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

50 DEMPSEY, C. E.; UENO, S.; AVISON, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 402-409, 2003.

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

52 PETTY, H. R. **Molecular biology of membranes: structure and function**. New York: Plenum Press, 1993.

53 PAVINATTO, F.J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)**. 2010. 161p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

54 LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.

55 PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett films: an introduction**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

56 FERREIRA, M. et al. **Nanoestruturas: coleção nanociência e nanotecnologia: princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. v.1.

57 TABOR, D. Babylonian Lecanomancy: an ancient text on the Spreading of oil on water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 1, p. 240-245, 1980.

58 WANG, D-N. et. Al. Benjamin Franklin, Philadelphia's favorite son, was a membrane biophysicist. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 2, p. 287-291, 2013.

59 POCKELS, A. On the relative contamination of the water-surface by equal quantities of different substances. **Nature**, v. 46, p. 418-419, 1892. doi:10.1038/046418e0.

60 BLODGETT, K. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 57, n.6, p. 1007-1022, 1935. doi: 10.1021/ja01309a011.

61 GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. J. Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 116, n. 1-3, p. 205-225, 2005.

62 FERREIRA, M. et al. Characterization techniques to investigate molecular-level interactions in Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films. **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 502-510, 2005.

63 CERIDORIO, L. F. **Síntese de azopolímero e preparação de misturas para aplicações em optoeletrônicos**. 2011. 155p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

64 DICKO, A.; BOURQUE, H.; PEZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 125-139, 1998.

65 BLAUDEZ, D. et al. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.

66 PHOSPOLIPIDS: avanti polar lipids. Disponível em: <<https://avantilipids.com/product-category/products/phospholipids/>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

67 MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide, **Journal of American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

68 SOLID phase synthesis. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learning-center/solid-phase-synthesis.html>>. Acesso em: 16 set. 2016

69 KSV NIMA Products. Biolin scientific. Disponível em: <<http://www.biolinscientific.com/ksvnima/products/>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

70 JANMEY, P. A.; KINNUNEN, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 538-546, 2006.

71 GOTO, T. E. et al. Monolayer collapse regulating process of adsorption-desorption of palladium nanoparticles at fatty acid monolayers at the air-water interface. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2667-2675, 2011.

72 DYCK, M.; LÖSCHE, M. Interaction of the neurotransmitter, neuropeptide Y, with phospholipid membranes: film balance and fluorescence microscopy studies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 44, p. 22143-22151, 2006.

73 DYCK, M. et al. Interaction of the neurotransmitter, neuropeptide Y, with phospholipid membranes: infrared spectroscopic characterization at the air/water interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 44, p. 22152-22159, 2006.

74 VICENTE, E. F. et al. Dynamic and conformational changes of the human dihydroorotate dehydrogenase n-terminal peptide in model membranes. **Journal of Peptide Science**, v. 20, p. S184-S185, 2014.

75 STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. New York: John Wiley, 2004

ANEXO A – Perfis cromatográficos dos peptídeos

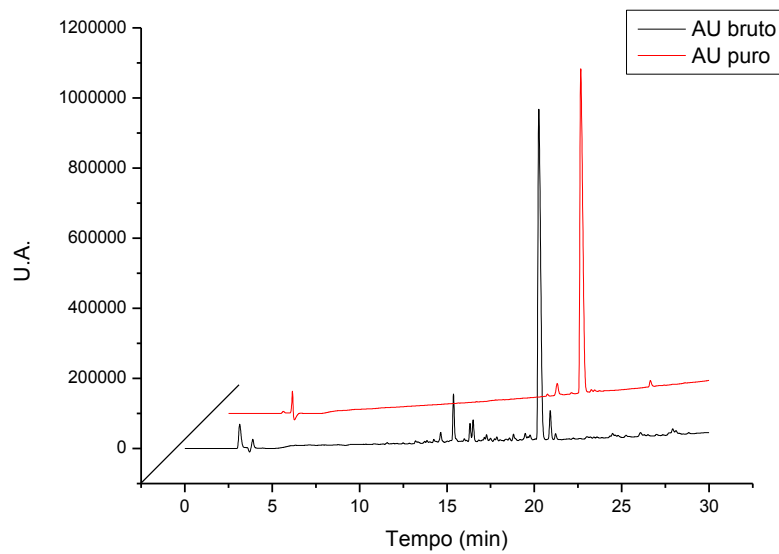


Figura A 1 – Perfis cromatográficos do peptídeo Aureína 1.2 (AU).
Fonte: Cedida pelo Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón.

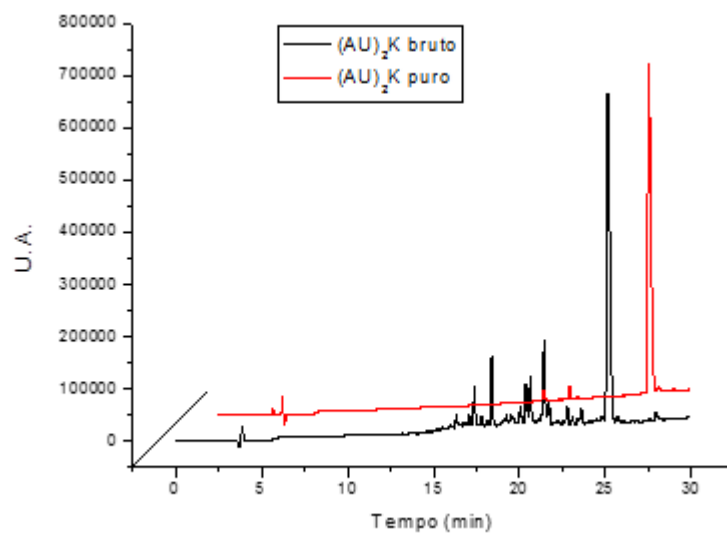


Figura A 2 - Perfis cromatográficos do dímero (AU)₂K.
Fonte: Cedida pelo Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón.

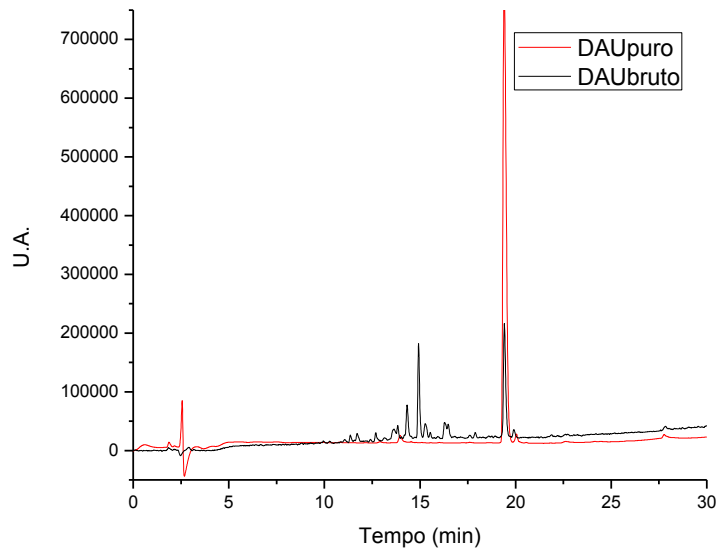


Figura A 3 - Perfis cromatográficos do peptídeo DAU.
Fonte: Cedida pelo Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón.

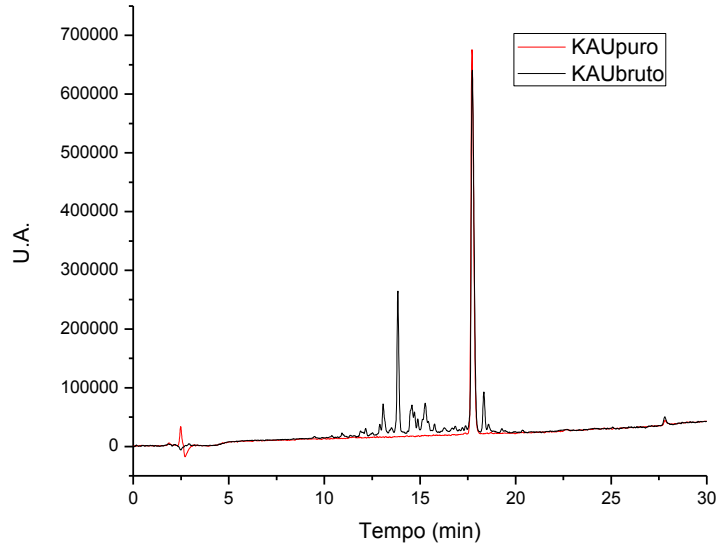


Figura A 4 - Perfis cromatográficos do peptídeo KAU.
Fonte: Cedida pelo Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón.