

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Estudo da interação do peptídeo antimicrobiano BP100 e seus análogos, cíclico e alquilado, com vesículas de fosfolipídios e com micelas.

Caio Bueno Murrace

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:
Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia

São Paulo
2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)	4
1.2. Características dos AMPs antibacterianos.....	4
1.3. Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos ativos em membrana	5
1.4. Peptídeo BP100.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Peptídeos.....	10
3.2. Lipídeos	11
3.3. Dosagem peptídeos	12
3.4. Preparação lipídica	12
3.4.1. Soluções estoques	12
3.4.2. Dosagem de fosfato.....	12
3.4.3. Filmes	13
3.4.4. Micelas	13
3.4.5. LUVs (Large Unilamellar Vesicles)	13
3.5. Dicroísmo circular (CD).....	13
3.6. Fluorescência.....	14
3.7. Cálculo da constante de ligação dos peptídeos às membranas ou micelas .	14
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Estudo da interação dos peptídeos com micelas por dicroísmo circular.....	14
4.2. Estudo da interação dos peptídeos com micelas por fluorescência.....	17
4.2.1. Micelas de LPC e LPG	17
4.2.2. Micelas de HPS e DSNa.....	20
4.3. Estudo da interação dos peptídeos com vesículas de DPPC e misturas de DPPC:DMPG por dicroísmo circular.....	22
4.4. Estudo da interação dos peptídeos com vesículas de DPPC e DPPC:DMPG por fluorescência.....	24
4.5 Ligação dos peptídeos em micelas e vesículas	26
5. DISCUSSÃO	28
5.1. Estrutura dos peptídeos	28
5.2. Ligação dos peptídeos com as estruturas lipídicas	29
5.3. Fatores importantes para a ligação peptídeo-micela/vesícula	29
5.4. Observações sobre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas	30
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Antimicrobial Peptide/Peptídeo Antimicrobiano
CD	Circular Dichroism/Dicroísmo circular
CMC	Critical Micelle Concentration/Concentração Micelar Crítica
DMPG	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSNa	Dodecil sulfonato de sódio
GUVs	Giant Unilamellar Vesicles/Vesículas Unilamelares Gigantes
HPS	N-Hexadecil-N,N-dimetil-propanosulfonato
LPC	1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina
LPG	1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
LUVs	Large Unilamellar Vesicles/Vesículas Unilamelares Grandes
PG	Fosfatidilglicerol
POPC	1-Palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPG	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]

RESUMO

Murrace, C. B. **Estudo da interação do peptídeo antimicrobiano BP100 e seus análogos, cíclico e alquilado, com vesículas de fosfolipídios e com micelas.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras Chave: Peptídeos; BP100; Vesículas Lipídicas; Micelas

O BP100 (KKLFKKILKYLNH₂) é um peptídeo antimicrobiano (AMP) híbrido, sintético, formado a partir de segmentos dos AMPs naturais melitina e cecropina A, altamente catiônico, ativo contra muitas espécies de bactérias e com baixa toxicidade contra células eucarióticas. O BP100 atua se ligando e aumentando a permeabilidade da membrana e desta forma causando morte ou inibição do crescimento dos microrganismos. A interação do BP100 com membranas, especialmente as carregadas negativamente, desencadeia uma transição da estrutura secundária randômica para α-helicoidal. Estudos anteriores do nosso grupo esclareceram parte do mecanismo de ação da BP100 sobre as membranas modelo, indicando que o mecanismo de ação depende do conteúdo de lipídeos negativos e, portanto, da carga superficial da membrana lipídica, além da quantidade de peptídeo efetivamente ligado à membrana. Em vista disso, estudamos a interação de BP100 e de seus análogos, BP100-Ala-C₁₆H₃₃ e Ciclo(1-4)-cILC-BP100, com micelas e vesículas em fase gel de composição lipídica variada, do ponto de vista da ligação peptídeo-membrana (afinidade) e da estrutura secundária adotada pelos peptídeos bem como o grau de penetração dos peptídeos nas vesículas da fase gel. Observamos por dicroísmo circular (CD) e fluorescência que, em presença de micelas de 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC) e N-Hexadecil-N,N,-dimetil-propanosulfonato, HPS, e vesículas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), os peptídeos interagiram apenas com as micelas formadas por LPC e HPS, devido provavelmente a um menor grau de empacotamento dos detergentes dispostos de modo a permitir mais fácil acesso da face hidrofílica da hélice formada pelos peptídeos ao core hidrofóbico do agregado. Quando a composição das membranas modelo passou a incluir lipídeos com carga negativa (1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (LPG) e dodecil sulfonato de sódio, DSNa ou 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol, DMPG, no caso das vesículas, os peptídeos interagiram com micelas e vesículas, evidenciando a importância das forças eletrostáticas para a interação com as vesículas. Na comparação entre as vesículas em fase líquida e gel não houve diferenças significativas na estrutura adotada pelos peptídeos e no grau de afinidade dos peptídeos pelas membranas. Nesses sistemas, o aumento do conteúdo de DMPG, LPG ou DSNa de 30 para 50 % apresentou o mesmo efeito sobre a afinidade dos peptídeos, independente do estado de compactação das cadeias dos lipídeos.

ABSTRACT

Murrace, C. **Study of the interaction of the antimicrobial peptide BP100 and its cyclic and alkylated analogues with phospholipid vesicles and micelles.** Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Keywords: Peptides; BP100; Lipid vesicles; Micelles

BP100 (KKLFKKILKYL-NH₂) is a hybrid, synthetic antimicrobial peptide (AMP) formed from segments of the natural AMPs melittin and cecropin A, highly cationic, active against many species of bacteria and with low toxicity against eukaryotic cells. BP100 acts by binding and increasing membrane permeability, thus causing death or inhibition of the growth of microorganisms. The interaction of BP100 with membranes triggers a transition from the random secondary structure to an α -helical structure. Previous studies by our group have clarified part of the mechanism of action of BP100 on model membranes, indicating that the mechanism of action depends on the content of negatively charged lipids and, therefore, on the surface charge of the lipid membrane, in addition to the amount of peptide effectively bound to the membrane. Given this, we studied the interaction of BP100 and its analogs, BP100-Ala-C16H33 and Cyclo(1-4)-cILC-BP100, with micelles and gel phase bilayers of varying lipid composition from the point of view of peptide binding. -membrane (affinity), the secondary structure adopted by the peptides, and the degree of penetration of the peptides into the bilayers of the gel phase. We observed by CD and fluorescence that, in the presence of model membranes composed only of 1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (LPC) and N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-propanesulfonate, HPS, micelles or 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) vesicles, the peptides interacted only with the micelles formed by LPC or HPS, probably due to a lower degree of packaging of the lipids that are arranged in such a way as to allow easier access of the hydrophilic face of the helix formed by the peptides to the hydrophobic core of the aggregate. When the composition of the model membranes started to include lipids with a negative charge (1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (LPG) and sodium dodecyl sulfonate, DSNa or 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DMPG), the peptides were able to interact with the micelles and with the bilayers in the liquid phase and gel phase, highlighting the importance of electrostatic forces for the interaction with the bilayers. We compared the effects of the peptides on the liquid and gel phase state of the bilayers. There were no significant differences in the structure adopted by the peptides and the degree of affinity of the peptides for the membranes. In these systems, increasing the content of DMPG, LPG, or DSNa from 30 to 50% had the same effect on the affinity of the peptides regardless of the state of compaction of the acyl chains.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são uma classe de agentes antimicrobianos, presentes em diversos organismos, capazes de matar ou de inibir o crescimento de patógenos. Os AMPs fazem parte do sistema imunológico inato e atuam como antibióticos endógenos. Esses peptídeos são ativos contra uma grande variedade de microrganismos como bactérias (Gram-positivas e negativas), fungos e vírus, indicando sua importância como barreira de defesa (Jenssen *et al.*, 2006, Nguyen *et al.*, 2011).

O grupo mais estudado dos AMPs é o dos peptídeos com atividade antibacteriana e, dentro desse grupo, muitos estudos têm como foco peptídeos que atuam sobre a membrana (Jenssen *et al.*, 2006). Foi mostrada a correlação direta entre a morte bacteriana como resultado da ruptura da membrana (Figura 1 B, C e D). Os mecanismos não disruptivos da membrana são atribuídos à capacidade de certos AMPs se ligarem a alvos intracelulares e agirem na síntese de DNA, RNA e proteínas (Figura 1 A, E, F, G, H e I).

1.2. Características dos AMPs antibacterianos

A atividade antibacteriana primária dos AMPs ocorre através da interação com superfícies bacterianas aniónicas. Portanto, as principais características encontradas na maioria dos peptídeos que apresentam atividade contra bactérias são: carga líquida positiva e hidrofobicidade (índice de hidrofobicidade e momento hidrofóbico) compatíveis com a interação com a membrana bacteriana (Powers *et al.*, 2003; Yeaman *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2011).

Carga positiva: É aceito que o primeiro passo na interação peptídeo-membrana é conduzido por forças eletrostáticas entre as cadeias laterais carregadas positivamente dos resíduos de lisina e arginina com componentes carregados negativamente presentes no envelope bacteriano externo, tais como grupos fosfato, lipopolissacarídeos ou ácidos lipoteicóicos. Devido à diferença de carga superficial entre as membranas celulares bacteriana e animal, o componente eletrostático da

interação é a principal forma de seleção no mecanismo de ação dos peptídeos catiônicos (Powers *et al.*, 2003; Jenssen *et al.*, 2006, Nguyen *et al.*, 2011).

Hidrofobicidade / Anfipaticidade: Na interação com a porção hidrofóbica da membrana, os peptídeos antibacterianos equilibram a alta densidade dos grupos carregados com a presença de resíduos hidrofóbicos. Resíduos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina, conhecidos por terem uma alta afinidade com o ambiente interfacial da membrana (Killian & von Heijne, 2000), são comumente encontrados nesses peptídeos (Jenssen *et al.*, 2006). O caráter hidrofóbico/hidrofílico do peptídeo é geralmente otimizado na interação com a membrana pela aquisição de uma estrutura secundária que dá ao peptídeo uma anfipaticidade espacial, favorecendo o posicionamento da molécula na interface (Yeaman *et al.*, 2003; Jenssen *et al.*, 2006).

1.3. Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos ativos em membrana

Modelos diferentes de mecanismo de ação são usados atualmente para explicar como os AMPs que atuam sobre a membrana são capazes de desestabilizar ou romper a membrana fosfolipídica das células bacterianas para causar a morte celular (Yeaman *et al.*, 2003, Jenssen *et al.*, 2006). Embora amplamente aceitos, nenhum desses quatro mecanismos foi completamente elucidado em nível molecular.

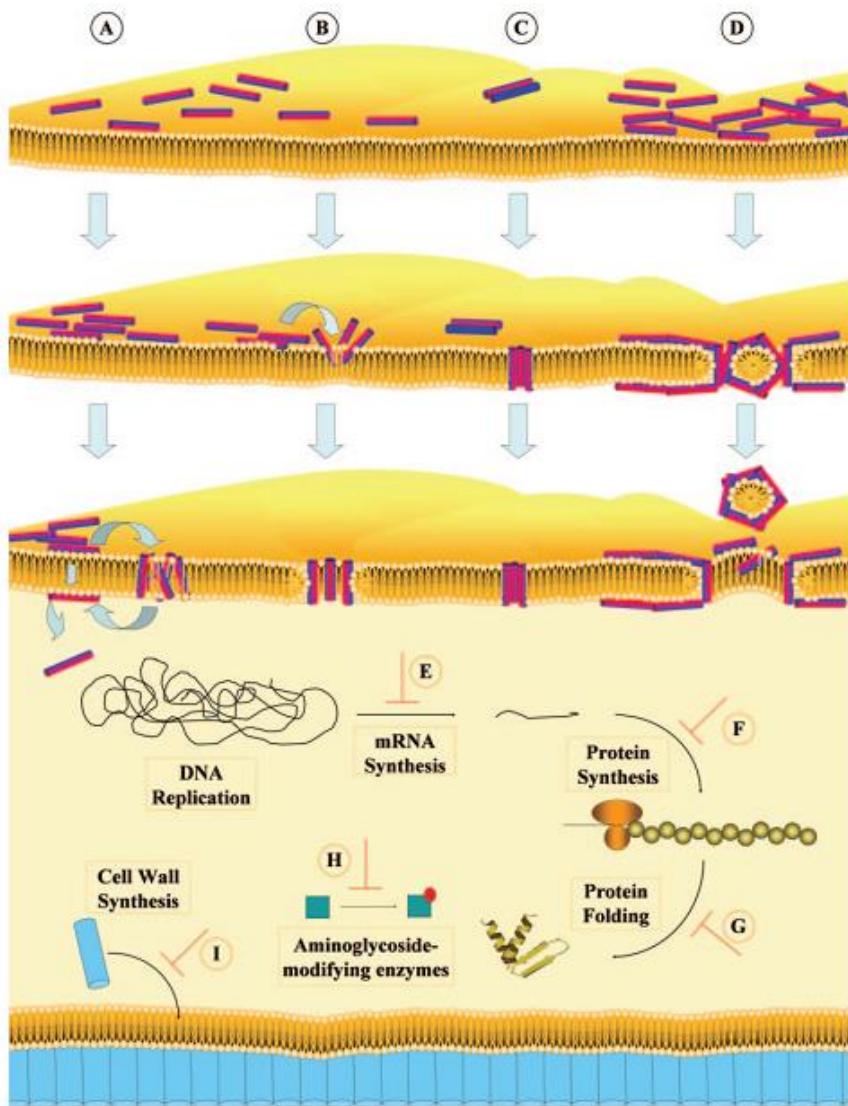


Figura 1. Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos (Jenssen *et al.*, 2006).

1. **Modelo Agregado** - Figura 1A - Os peptídeos são reorientados para atravessarem a membrana como um agregado com complexos de lipídeos e peptídeos semelhantes a micelas, mas sem adotarem qualquer particularidade.
2. **Poro Toroidal** - Figura 1B - Os peptídeos formam uma estrutura transmembrana semelhante a um canal com o núcleo formado não apenas pelos monômeros dos peptídeos, mas também pelos grupos de cabeças polares dos lipídeos dispostos em curvatura positiva na região dos poros.
3. **Poro de bastão** - Figura 1C - Monômeros do peptídeo são inseridos na membrana e interagem uns com os outros formando lateralmente um canal (ou poro) que atravessa a bicamada lipídica.

4. Carpete - Figura 1D - Peptídeos se ligam à membrana bacteriana por interação eletrostática em grande quantidade para cobrir completamente uma área da bicamada até provocar uma desestabilização na membrana, aumentando sua permeabilidade. A natureza anfipática dos peptídeos os torna capazes de solubilizar a membrana e remover partes dela na forma de micelas.

1.4. Peptídeo BP100

Badosa e colaboradores projetaram uma série de peptídeos híbridos com o objetivo de identificar um ou mais potentes contra microrganismos patogênicos e com baixa toxicidade (Badosa *et al.*, 2007). O undecapeptídeo BP100 (KKLFKKILKYLNH₂), um híbrido combinando características de dois AMPs, melitina e cecropina A, mostrou-se ativo inibindo o crescimento das bactérias testadas, apresentando alto índice terapêutico e baixa susceptibilidade à degradação por protease (Ferre *et al.*, 2009).

BP100 é altamente catiônico em pH fisiológico, apresentando 5 resíduos de lisina e o grupo carboxila terminal amidado, além da presença de resíduos hidrofóbicos de leucina, isoleucina e fenilalanina. Essas características indicam que o BP100 atua sobre a membrana bacteriana, provavelmente se ligando a ela e aumentando sua permeabilidade.

O BP100 se liga a vesículas fosfolipídicas com forte seletividade para modelos de membranas bacterianas aniônicas em comparação com modelos de membrana de mamíferos contendo colesterol e lipídeos neutros (Ferre *et al.*, 2009; Torcato *et al.*, 2013). As propriedades de ligação são diretamente correlacionadas com outros eventos que ocorrem na interação peptídeo-membrana, como permeabilização e agregação de vesículas, e eletro neutralidade de membrana (Ferre *et al.*, 2009).

Estudos de dicroísmo circular (CD) (Torcato *et al.*, 2013; Manzini *et al.*, 2014; Wadhwani *et al.*, 2014) confirmaram a análise *in silico* da estrutura secundária do BP100, mostrando que a forma ligada à membrana do peptídeo possui um conteúdo de α-hélice de 61%. A aquisição de uma estrutura secundária helicoidal resulta em uma estrutura anfipática perfeita, com os resíduos carregados positivamente em uma face da hélice, enquanto os resíduos hidrofóbicos estão na face oposta. A estrutura

helicoidal anfipática é compatível com a necessidade do peptídeo de interagir com as bicamadas lipídicas com carga aniônica bacteriana.

Nosso grupo relatou que o mecanismo de ação da BP100 nas membranas modelos é dependente da relação peptídeo/lipídeo e do conteúdo de vesículas de fosfatidilglicerol, PG, com carga negativa (Manzini *et al.*, 2014). Em baixas razões peptídeo/lipídeo e/ou baixo teor de PG, uma menor quantidade do peptídeo é ligada à membrana e os mecanismos sugeridos são aqueles que apresentam permeabilização gradual das vesículas (formação de poros ou afinamento da membrana). Em alta razão peptídeo/lipídeo e/ou alto teor de PG, os resultados indicam uma permeabilização abrupta dos lipossomas, indicando um mecanismo de ação similar ao detergente (Manzini *et al.*, 2014). Nessa condição, a alta quantidade de peptídeo ligado solubilizaria parte da membrana. Embora realizados em diferentes condições, ensaios de vazamento de carboxifluoresceína a partir de grandes vesículas unilamelares (LUVs) e estudos com vesículas unilamelares gigantes (GUVs) observáveis por técnicas de microscopia óptica corroboram a existência de dois mecanismos de ação da BP100 e sua dependência da quantidade de peptídeo ligado.

Com relação à investigação de análogos, o BP100 foi conjugado com grupos com diferentes propriedades, como caudas hidrofóbicas, outras sequências peptídicas bioativas e outros grupos orgânicos, com o objetivo de explorar outras funcionalidades como atividade antitumoral e de penetração celular, com considerável sucesso (Eggenberger *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2017, Carretero *et al.*, 2018). As substituições de aminoácidos também foram relatadas como uma alternativa para obter peptídeos com atividade antimicrobiana melhorada e maior índice terapêutico (Torcato *et al.*, 2013).

Mais recentemente, foi demonstrado por estudos de dinâmica molecular computacional que o peptídeo BP100, ao ligar-se a membranas contendo uma mistura de lipídeos zwitteriônicos e com carga negativa, estabelece uma interação inicial de caráter eletrostático com a superfície da membrana, recruta os lipídeos com carga. Essa interação induz a agregação desses lipídeos na região ao redor do peptídeo e,

nesse ponto, a hélice formada pelo peptídeo rotaciona ao redor de seu eixo e a face hidrofóbica da hélice se enterra no core hidrofóbico da bicamada (Park *et al.*, 2019).

Para estudarmos o efeito da estrutura do agregado e sua interação com os peptídeos utilizaremos compostos anfifílicos que formam micelas como o 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (LPG) (Figura 4), e suas misturas, e também as micelas de N-Hexadecil-N,N,-dimetil-propanosulfonato (HPS) e suas misturas com o dodecil sulfonato de sódio (DSNa) (Figura 4). Note-se que o LPC e o HPS possuem dipolos invertidos sendo que no LPC a carga negativa do grupo fosfato está mais próximo da cadeia alquílica do detergente enquanto no HPS o grupo com carga negativa, o sulfonato, está mais distante da interface hidrofóbica da micela.

Estudaremos também a interação dos peptídeos com vesículas preparadas com fosfolipídios com duas cadeias acila saturadas, carregados negativamente ou zwitteriônicas, que em temperatura ambiente formam vesículas em fase gel. Para estes estudos utilizaremos o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG) e suas misturas.

2. OBJETIVOS

Estudar o efeito de diferentes agregados, micelas e vesículas, formados com lipídeos com cadeias alquílicas de diferentes comprimentos e presença ou não de carga, na interação do peptídeo BP100 e seus análogos. Utilizaremos na composição das membranas modelo lipídeos com duas cadeias acila saturadas, carregados negativamente ou zwitteriônicas, que em temperatura ambiente formam vesículas em fase gel, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG).

Estudaremos o efeito de micelas preparadas com detergentes zwitteriônicos, e outros com carga negativa, e suas misturas, para verificarmos o efeito de agregados com diferentes compactações das cadeias alquílicas na interação com os peptídeos.

Pretendemos contribuir para a elucidação do mecanismo de seleção e ação dos peptídeos e dos fenômenos relevantes relacionados.

Objetivos específicos:

- Medir a afinidade dos peptídeos com a membrana de vesículas, com composição lipídica variável, por fluorescência e CD.
- Determinar a estrutura secundária dos peptídeos em solução por espectroscopia de CD e investigar as mudanças conformacionais ocorridas na presença de micelas e vesículas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peptídeos

O peptídeo BP100 e seus análogos, Tabela 1, foram sintetizados pelo Dr. Marcelo Porto Bemquerer, da EMBRAPA de Brasília, e a Dra. Magali Aparecida Rodrigues.

Tabela 1. Peptídeos derivados do BP100

Peptídeo	Sequência	Massa molar (Da)
BP100	KKLFKKILKYL-NH ₂	1421,0
BP100-Ala-C ₁₆ H ₃₃	KKLFKKILKYLA-C ₁₆ H ₃₃	1853,2
Ciclo(1-4)-cILC-BP100	cILCKKLFKKILKYL-NH ₂	1716,3

Os peptídeos estudados são derivados de BP100 sendo o BP100-Ala-C₁₆H₃₃ o derivado contendo uma alanina e cadeia alquílica de 16 carbonos no amino terminal do BP100 e o Ciclo(1-4)-cILC-BP100, que contém uma estrutura cíclica no grupo carboxi-terminal do BP100 (Tabela 1 e Figura 2).

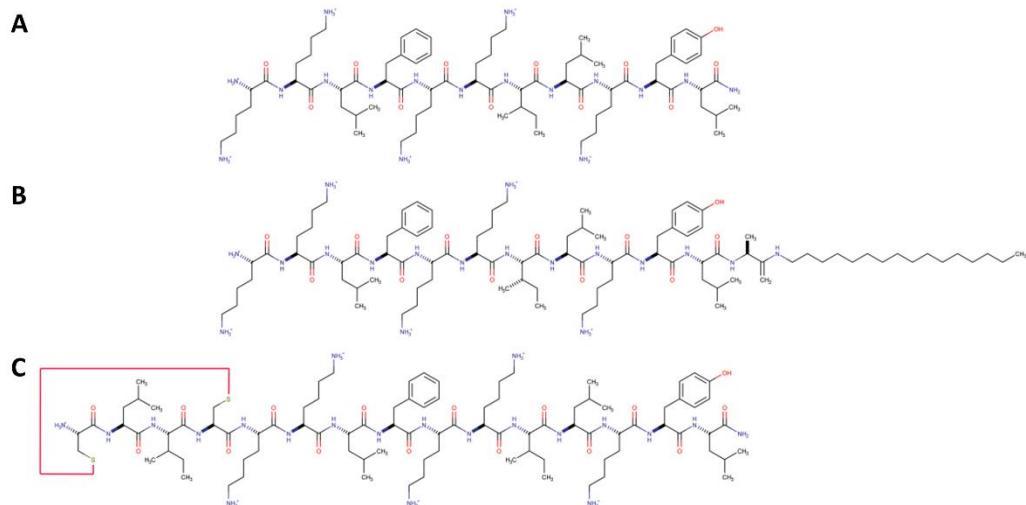


Figura 2. Estruturas de: (A) BP100, (B) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ e (C) Cyclo(1-4)-cILC-BP100.

3.2. Lipídeos

Para a preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) serão utilizados, na composição das membranas, os fosfolipídeos com duas cadeias acila. Serão utilizados os lipídeos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, DPPC, e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol, DMPG. Os lipídeos foram obtidos da Avanti Polar Lipids.

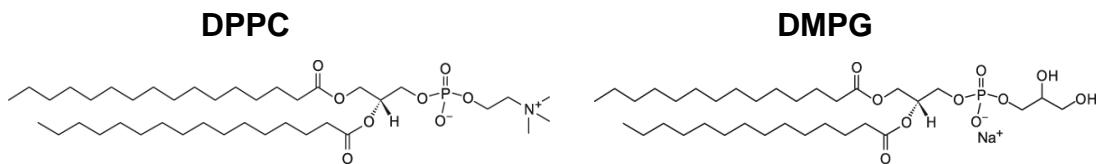


Figura 3. Estrutura dos fosfolipídios: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG).

Os fosfolipídios com apenas uma cadeia alquílica, o 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (LPG) foram obtidos da Avanti Polar lipids (Figura 4). Os detergentes N-Hexadecil-N,N,-dimetil-propanosulfonato, HPS, e Dodecil-sulfonato de sódio DSNa, Figura 4, foram obtidos da Merck. O HPS e o DSNa foram recristalizados de metanol/acetona.

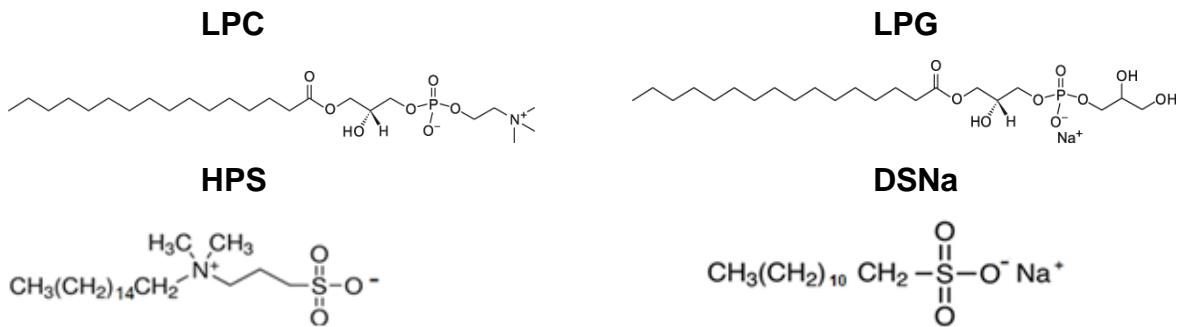


Figura 4. Estrutura dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (LPG). Estrutura dos detergentes N-Hexadecil-N,N,-dimetil-propanosulfonato, HPS, e Dodecil sulfonato de sódio, DSNa.

3.3. Dosagem peptídeos

A dosagem das soluções dos peptídeos foi feita utilizando-se o equipamento Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific) para fazer a leitura da absorbância a 276 nm. Considerando o valor de (ϵ) para a tirosina 1450 L·mol⁻¹·cm⁻¹ e o caminho óptico (**b**) de 0,1 cm, foi possível determinar a concentração das soluções utilizando a equação da Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

onde **A** corresponde à absorbância, ϵ é o coeficiente de absorção molar do peptídeo e **c** à concentração em mol/L. A concentração estoque de peptídeo era da ordem de 0.5 mM.

3.4. Preparação lipídica

3.4.1. Soluções estoques

Os estoques dos lipídeos DPPC e DMPC foram preparados pela pesagem da massa dos lipídeos em balança analítica, seguida da dissolução em clorofórmio.

3.4.2. Dosagem de fosfato

As soluções estoques foram quantificadas pela dosagem de fosfato seguindo o método descrito em Rouser *et al.*, 1970. Para esse procedimento, uma curva de

calibração foi preparada utilizando-se um padrão de fosfato de concentração conhecida. As amostras dos estoques lipídicos foram preparadas em tubos de ensaio e secas em estufa a 120 °C. Após a secagem, os lipídeos foram digeridos com ácido perclórico, por uma hora a 180 °C. Em seguida água e molibdato de amônio foram adicionados a cada um dos tubos, sob agitação. Adicionou-se então ácido ascórbico a cada um dos tubos. Após nova agitação, os tubos da curva padrão e da amostra foram mantidos em um banho a 100 °C. Por fim, a leitura foi feita em um espectrofotômetro a 797 nm.

3.4.3. Filmes

Para a preparação dos filmes lipídicos, alíquotas das soluções estoques foram adicionadas a um tubo de ensaio e, em seguida, sob um fluxo de nitrogênio, evaporou-se o solvente. Para eliminar quaisquer traços restantes do solvente, os filmes foram secos sob vácuo, por no mínimo uma hora. As composições dos filmes utilizados para estudos com vesículas de fase gel foram DPPC, DPPC:DMPG (70:30), DPPC:DMPG (50:50) e DPPC:DMPG (30:70).

3.4.4. Micelas

As micelas foram preparadas adicionando-se um volume pré-determinado de água à massa pesada de cada detergente.

3.4.5. LUVs (Large Unilamellar Vesicles)

As LUVs para estudo da fase gel foram obtidas pela ressuspensão do filme lipídico seco pela adição de volume previamente calculado de água seguida pela extrusão sob aquecimento por membranas de policarbonato de tamanho de poro de 100 nm (Nuclepore, Maidstone, Reino Unido) por um número ímpar de vezes (em geral 11). A concentração estoque de LUVs era cerca de 20 mM.

3.5. Dicroísmo circular (CD)

A estrutura secundária dos peptídeos foi estudada por CD em solução e na presença de membranas modelo com composição lipídica variada. As medidas de CD foram realizadas em um spectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco, Japão) usando

células de quartzo de comprimento óptico de 1,00 mm. Os espectros foram coletados na faixa entre 190 a 260 nm. A concentração final de peptídeo era da ordem de 20 μM . A concentração inicial das vesículas era 20 mM. O espectro final foi a média de 6 acumulações, após a subtração do espectro obtido nas mesmas condições de uma amostra sem peptídeo. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

3.6. Fluorescência

A afinidade dos peptídeos com as diferentes membranas modelo foi investigada por meio de espectroscopia de fluorescência. Os espectros de fluorescência de tirosina foram obtidos num espectrofluorímetro Hitachi F-7000 (Hitachi, Japão) excitando as amostras a 280 nm e registrando a emissão de 285 a 400 nm. A concentração final de peptídeo utilizada foi da ordem de 20 μM e a concentração estoque de lipídeos era 20 mM em água. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

3.7. Cálculo da constante de ligação dos peptídeos às membranas ou micelas

Ligação dos peptídeos às membranas de composição variável de lipídeos foi medida por CD e fluorescência considerando o modelo de dois estados (peptídeo livre e ligado). A isoterma de ligação foi obtida através do gráfico da emissão de fluorescência da tirosina a 305,2 nm ou a porcentagem de estrutura secundária em α -hélice (medida pelo valor de $[\theta]$ a 222 nm) em função da concentração de lipídeos. A equação de Hill foi usada para determinar a fração de peptídeo ligado, a concentração de lipídeo onde 50 % do peptídeo está ligada e a constante aparente de ligação (K_B , M^{-1}).

$$\text{Fração de peptídeo ligada} = [\text{Lipídeo}]^n / (1/K_B)^n + [\text{Lipídeo}]^n$$

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da interação dos peptídeos com micelas por dicroísmo circular

Inicialmente verificamos o efeito de micelas de LPC no espectro de CD do BP100. Na Figura 5 estão os espectros de CD do BP100 em água e em diferentes concentrações de LPC. Como se pode observar, a interação do BP100 com as micelas de LPC leva a uma mudança do espectro de CD indicando assim sua interação com

as micelas. A concentrações muito altas de LPC o espectro de CD não muda indicando a completa associação do BP100 com as micelas.

Conforme a concentração de LPC aumentou, o BP100 passou de um estado sem conformação definida em solução para um de estrutura secundária de alfa hélice, caracterizada pelo aumento na intensidade de bandas negativas em 208 e 222 nm e na banda positiva entre 195 e 200 nm.

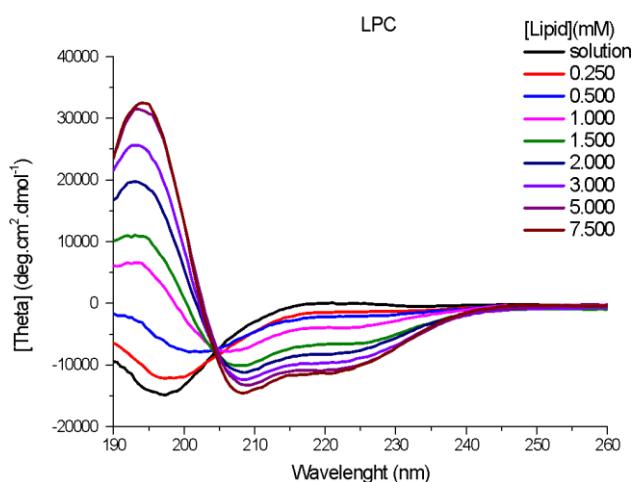


Figura 5. Espectro CD do peptídeo **BP100** em solução aquosa na presença de diferentes concentrações de micelas de LPC. Água, $[BP100] = 25 \mu M$.

Os espectros de CD foram repetidos para misturas de LPC:LPG em proporções diferentes e as curvas de ligação, na Figura 6A, evidenciam uma maior afinidade dos peptídeos pelas micelas contendo LPG, sendo que em relação às micelas compostas de LPC:LPG (70:30) e LPC:LPG (50:50) os peptídeos apresentam similar afinidade. Na Figura 6B são apresentados os gráficos da fração ligada de BP100 em função da concentração total de lipídeo e em diferentes razões de LPC:LPG.

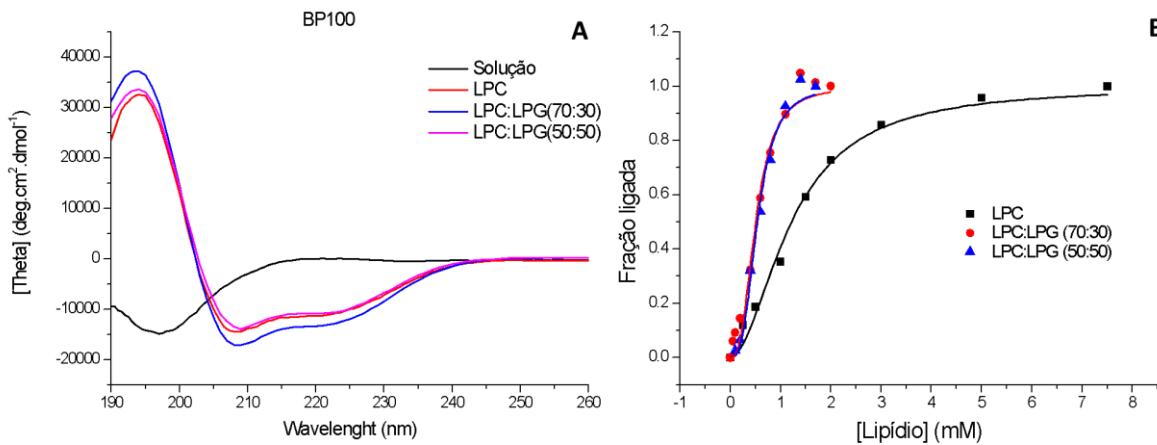


Figura 6. (A) Espectros CD do peptídeo **BP100** em solução aquosa e em presença de micelas de composições lipídicas variadas: LPC (7 mM), LPC:LPG (70:30) (2 mM), LPC:LPG (50:50) (1,7 mM). (B) Curvas de ligação do BP100 em micelas de variadas composições lipídicas. Água, $[BP100] = 17 \mu M$.

Na Figura 7 são apresentados os gráficos de CD dos peptídeos BP100-C16 e na Figura 8 os espectros de CD do Cyclo-BP100 nas mesmas condições dos experimentos feitos com o BP100.

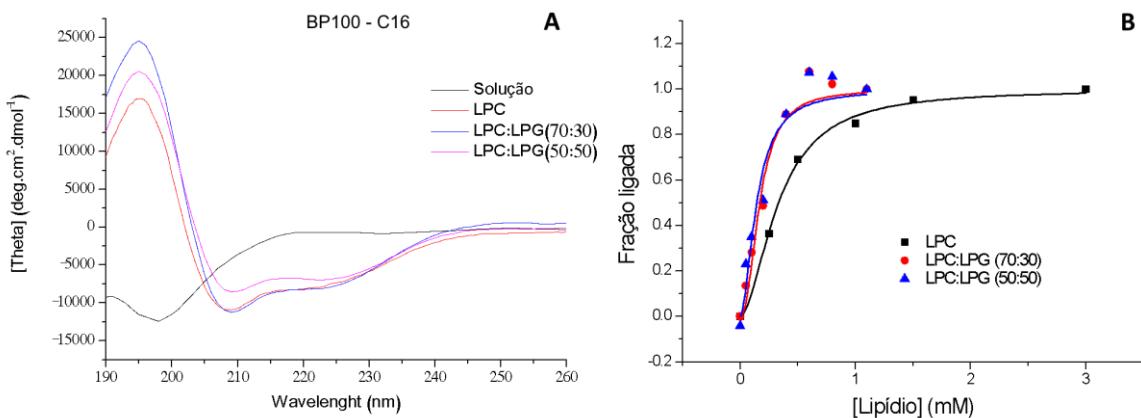


Figura 7. (A) Espectros CD do peptídeo **BP100-C16** em solução aquosa (não ligado) e em presença de micelas (completamente ligado) de composições lipídicas variadas: LPC (3 mM), LPC:LPG (70:30) (1,1 mM), LPC:LPG (50:50) (1,1 mM). (B) Curvas de ligação do C16 em sistemas de composição lipídica variada. Água, $[BP100-C16] = 25 \mu M$.

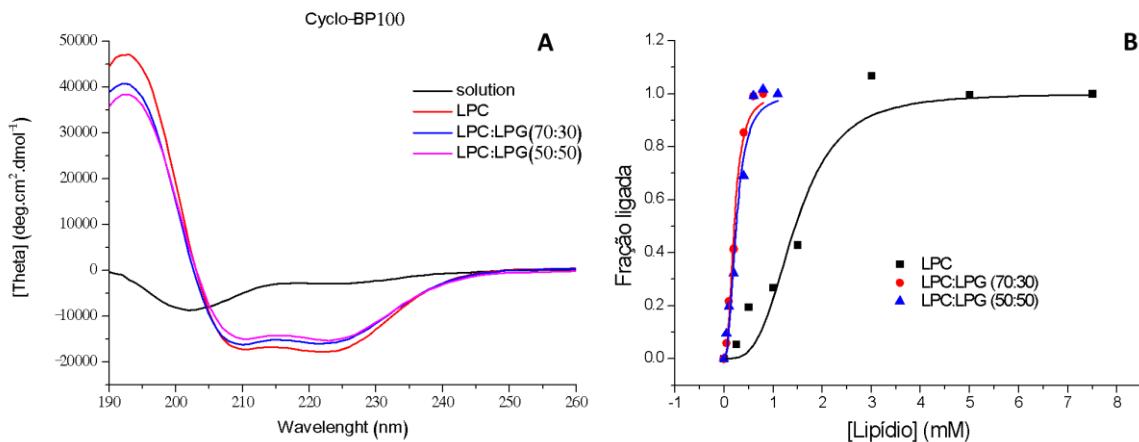


Figura 8. (A) Espectros CD do peptídeo **Cyclo-BP100** em solução aquosa (não ligado) e em presença de micelas (completamente ligado) de composições lipídicas variadas: LPC (1,5 mM), LPC:LPG (70:30) (0,8 mM), LPC:LPG (50:50) (1,1 mM). (B) Curvas de ligação do Cyclo-BP100 em sistemas de composição lipídica variada. Água, $[Cyclo-BP100] = 25 \mu M$.

Como se pode observar nas Figuras 7 e 8 a presença do LPG aumenta muito a eficiência de ligação do peptídeo quando comparado com as micelas contendo apenas o LPC. Como a porcentagem de LPG é muito alta nas duas misturas de LPC:LPG, é difícil diferenciar o efeito da ligação dos peptídeos em função da razão LPC:LPG.

4.2. Estudo da interação dos peptídeos com micelas por fluorescência

4.2.1. Micelas de LPC e LPG

A interação dos peptídeos com os lipídeos das micelas também foi estudada medindo-se a fluorescência da Tirosina do BP100. Como se pode observar na Figura 9, a passagem do resíduo fluorescente da Tirosina para um ambiente de menor polaridade, aumenta a intensidade da fluorescência da tirosina a 305,2 nm, de acordo com o aumento da concentração lipídica no sistema.

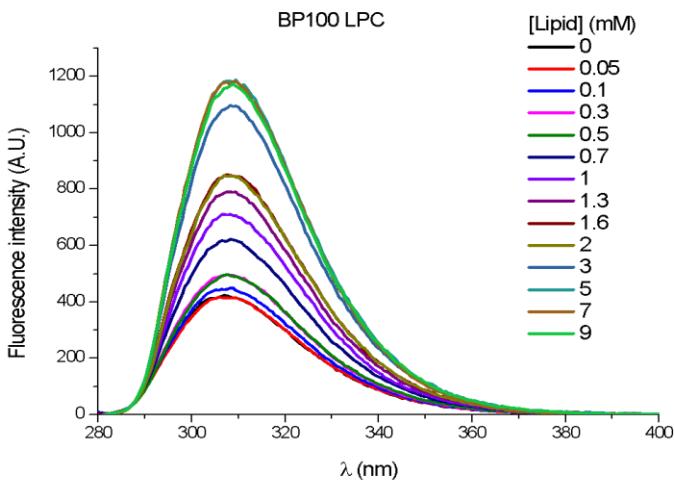


Figura 9. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo **BP100** em solução aquosa na presença de diferentes concentrações de micelas de LPC. Água, $[BP100] = 17 \mu M$.

As curvas de ligação, determinadas por fluorescência, do BP100, BP100-C16 e Cyclo-BP100 às micelas de LPC e misturas com LPG podem ser vistas na Figura 10. Elas evidenciam uma maior afinidade dos peptídeos pelas micelas que contenham uma parcela de LPG, assim como as curvas feitas a partir do estudo por CD. No entanto, observou-se que a afinidade dos peptídeos pelas micelas de composição LPC:LPG (70:30) era maior do que para as de composição LPC:LPG (50:50), enquanto que no estudo por CD apresentaram-se similares.

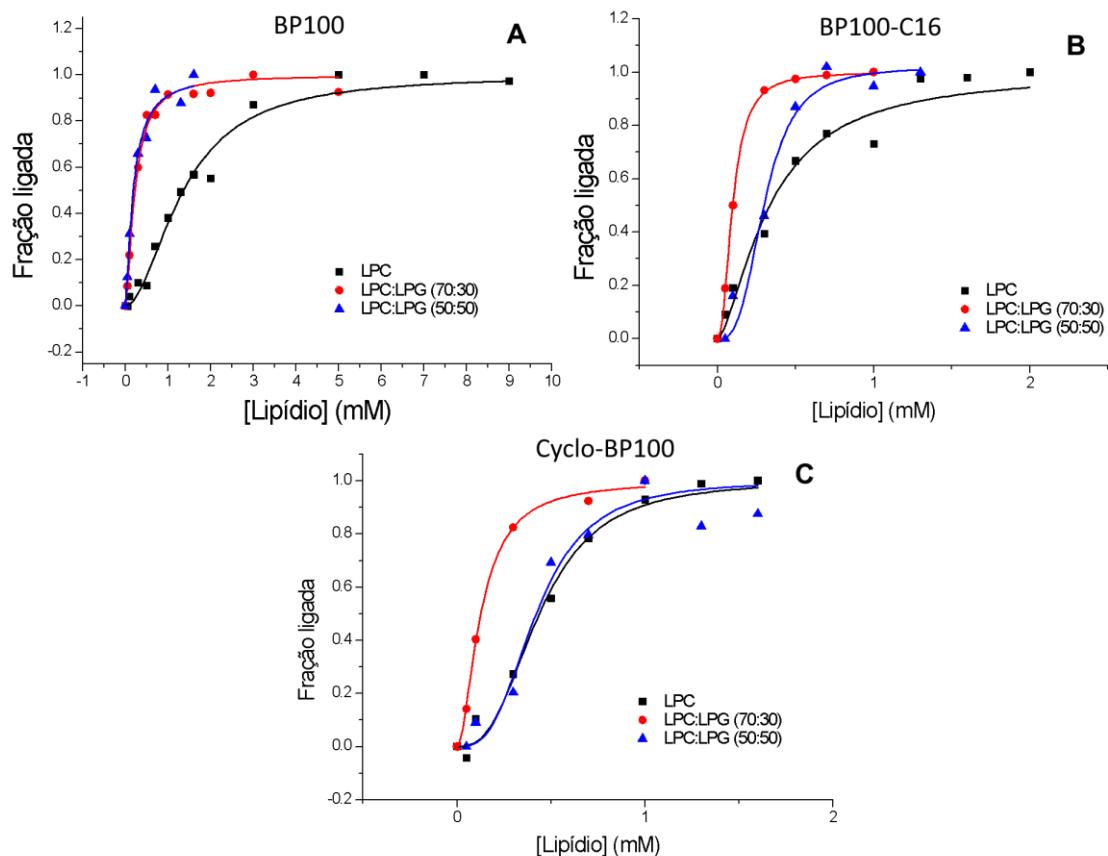


Figura 10. Curvas de ligação dos peptídeos em sistemas micelares de composições lipídicas variadas: (A) **BP100** (B) **BP100-C16** (C) **Cyclo-BP100** Água, [Peptídeo] = 17 μM .

Os valores de K_B obtidos através das duas técnicas foram compilados na Tabela 2, abaixo. O que se percebe é que há tendências similares para os valores de K_B para ambos procedimentos. Para todos os peptídeos em estudo, verifica-se que há maior afinidade (representada por K_B) dos peptídeos pelas micelas que possuem em sua composição ao menos uma parcela de LPG, o fosfolipídio com carga. Nota-se também que os valores de K_B para o BP100, na primeira linha, são todos menores se comparados com os valores obtidos para os análogos.

Tabela 2. Constantes de ligação aparente obtidas por Fluorescência e CD ($K_B \times 10^{-3} M^{-1}$) dos peptídeos em micelas de composição lipídica variada em água.

Peptídeo	Fluorescência ($K_B \times 10^{-3} M^{-1}$)			CD ($K_B \times 10^{-3} M^{-1}$)		
	LPC	LPC:LPG (70:30)	LPC:LPG (50:50)	LPC	LPC:LPG (70:30)	LPC:LPG (50:50)
BP100	0.73	4.5	2.5	0.7	1.9	1.8
C16	2.9	10.2	3.3	2.9	5.3	6.7
Cyclo	2.4	8.3	2.4	3.3	4.9	3.9

4.2.2. Micelas de HPS e DSNa

O efeito de micelas de HPS no espectro de fluorescência do BP100 foi estudado e observou-se que a fluorescência do peptídeo aumentou significativamente com a adição de HPS até obter-se 100 % do peptídeo ligado, Figura 11A. No gráfico da fração ligada do BP100 vs [HPS], Figura 11B, observou-se uma curva sigmoidal onde se pode observar uma inflexão a concentração baixa de detergente que pode ser resultado da CMC do HPS que é $2.8 \times 10^{-5} M$ (Graciani *et al.*, 2005). Nas concentrações abaixo da CMC do detergente existem apenas monômeros, mas os peptídeos podem induzir pre-agregação.

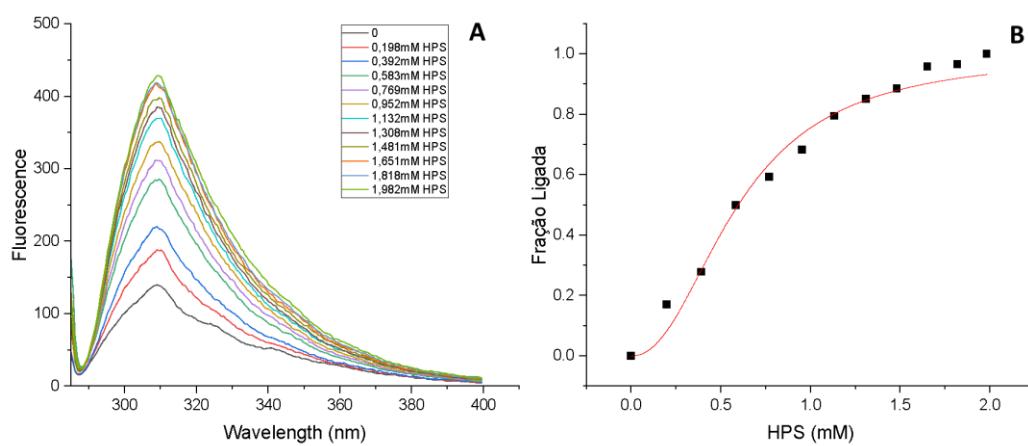


Figura 11. (A) Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo **BP100** na presença de diferentes concentrações de micelas de HPS. (B) Curvas de ligação do **BP100** com micelas de HPS. Água, $[BP100] = 20 \mu M$.

Quando dos ensaios da ligação do BP100 com micelas da mistura de HPS e DSNa, nas proporções 70:30 e 50:50, verificou-se que 100% do peptídeo ligou-se já nas primeiras adições feitas das micelas (Figura 12). Desta forma, não foi possível determinar as constantes de ligação nesses cenários, uma vez que foram obtidos poucos pontos no meio da curva. Assim existe a necessidade de novos experimentos para determinação dessas constantes, utilizando-se soluções mais diluídas dos detergentes. Mesmo assim, ficou claro o efeito de contribuição da carga dos lipídeos para a ligação das micelas com o peptídeo.

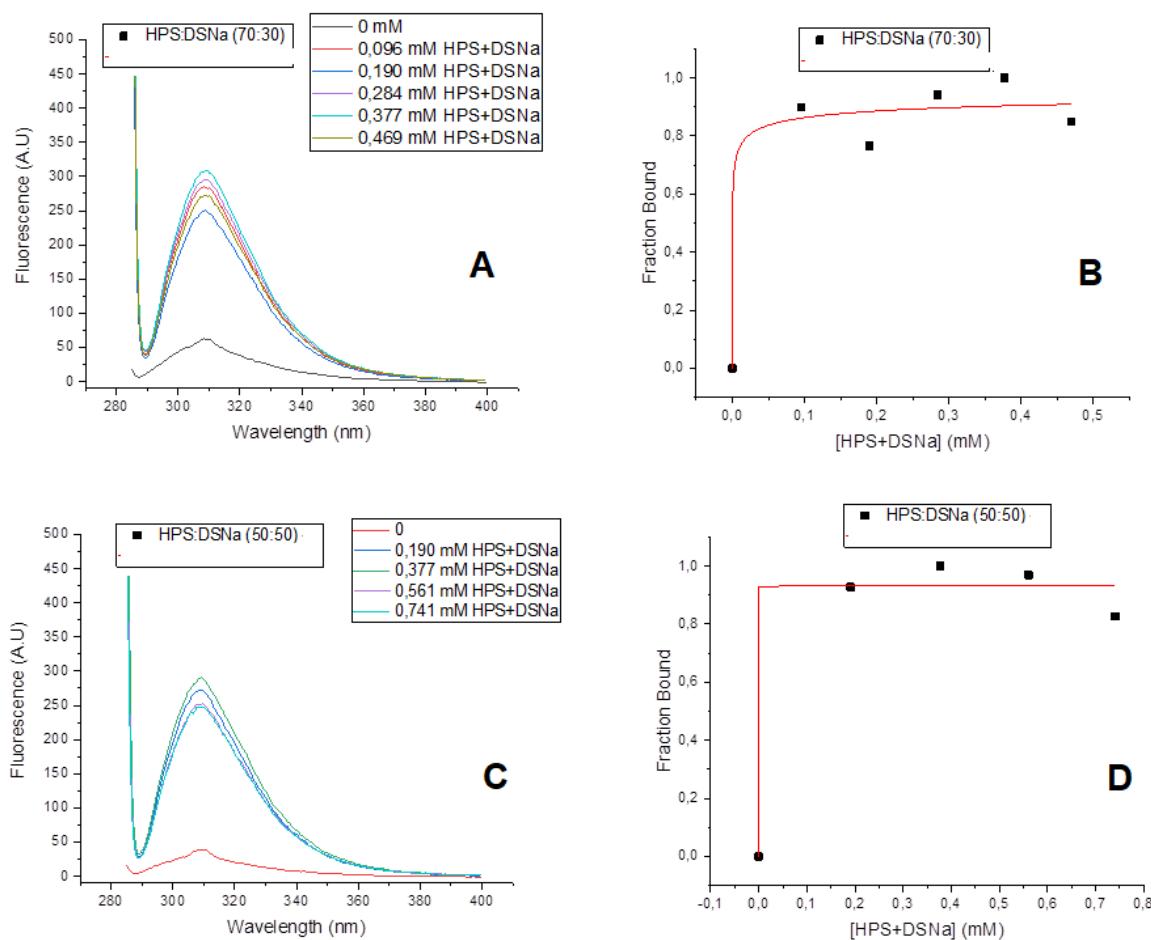


Figura 12. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo **BP100** na presença de diferentes concentrações de micelas de HPS:DSNa (70:30) (A) e (50:50) (C). Curvas de ligação do **BP100** com micelas de HPS:DSNa (70:30) (B) e (50:50) (D). Água, $[BP100] = 20 \mu M$.

4.3. Estudo da interação dos peptídeos com vesículas de DPPC e misturas de DPPC:DMPG por dicroísmo circular.

O BP100, assim como seus análogos, ligou-se a vesículas em fase gel contendo ao menos 30% de DMPG, um fosfolipídio com carga, em sua composição. Na Figura 13, fica evidente a mudança do espectro de CD do peptídeo Cyclo-BP100 com o aumento da concentração de LUVs de DPPC:DMPG (50:50), indicando interação peptídeo-vesícula. O aumento da intensidade de bandas negativas em 208 e 222 nm e na banda positiva entre 195 e 200 nm apontam a mudança de conformação dos peptídeos de um estado de conformação randômica para um estado de estrutura secundária em alfa hélice.

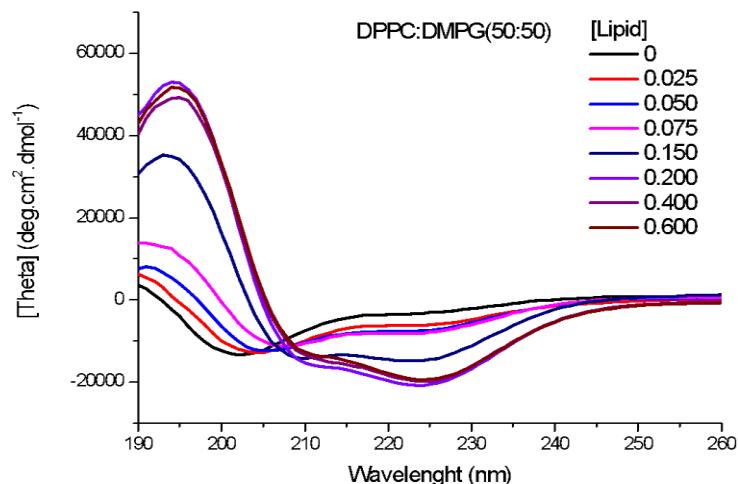


Figura 13. Espectro CD do peptídeo Cyclo-BP100 em solução aquosa na presença de diferentes concentrações de vesículas de DPPC:DMPG (50:50). Água, [Cyclo-BP100] = 17 μ M.

Os espectros de CD e as curvas de ligação dos peptídeos BP100, BP100-C16 e Ciclo-BP100 — Figuras 14, 15 e 16 — demonstram que não houve alteração nas estruturas dos peptídeos com as vesículas compostas apenas por DPPC, um fosfolipídio sem carga, indicando que não ocorre interação com as membranas e os peptídeos permanecem em solução. A temperatura de transição (T_m) do DPPC é da ordem de 41,6 °C em água pura e as T_m das misturas de DPPC:DMPG 70:30 e 50:50

são 35 °C e cerca de 28 °C, respectivamente. Portanto, na temperatura na qual foram feitos os experimentos (25 °C) as LUVs se encontram na fase gel (Garidel *et al.*, 1997). Além disso, é possível observar que a ligação entre o peptídeo-vesícula ocorre em maior extensão quando a proporção de DMPG presente na composição lipídica é de 50% para os três peptídeos estudados, Figuras 14, 15 e 16.

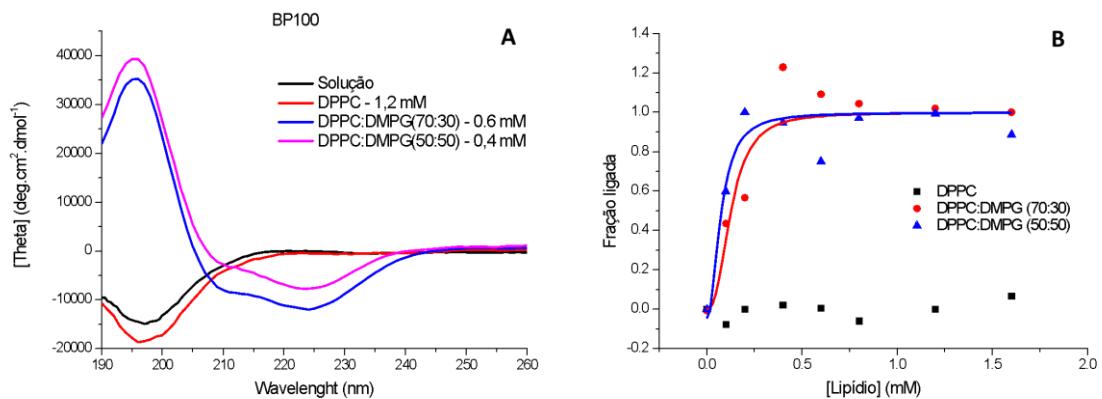


Figura 14. (A) Espectros CD do peptídeo **BP100** em solução aquosa (não ligado) e em presença de vesículas em fase gel de composições lipídicas variadas: DPPC (1,2 mM), DPPC:DMPG (70:30) (0,6 mM), DPPC:DMPG (50:50) (0,4 mM). (B) Curvas de ligação do BP100 em sistemas de variadas composições lipídicas. Água, [BP100] = 17 µM.

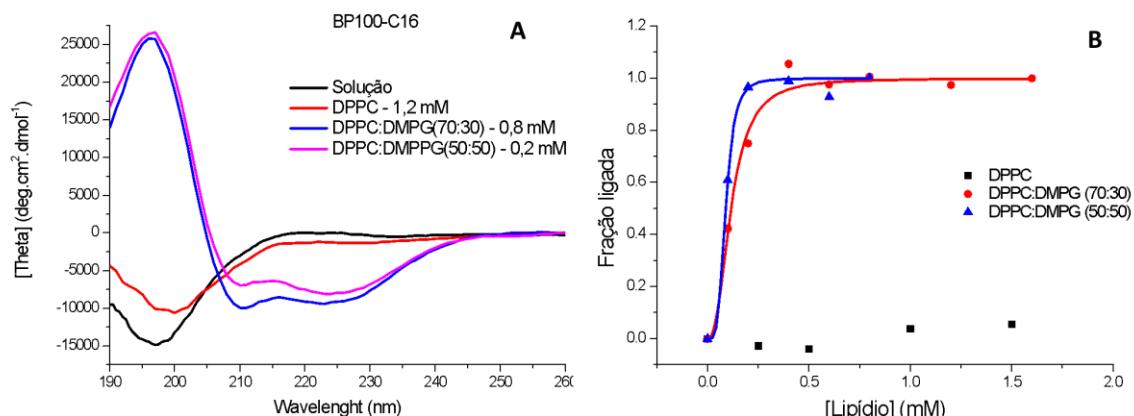


Figura 15. (A) Espectros CD do peptídeo **BP100-C16** em solução aquosa (não ligado) e em presença de vesículas em fase gel de composições lipídicas variadas: DPPC

(1,2 mM), DPPC:DMPG (70:30) (0,8 mM), DPPC:DMPG (50:50) (0,2 mM). (B) Curvas de ligação do C16 em sistemas de composição lipídica variada. Água, [BP100-C16] = 17 μ M.

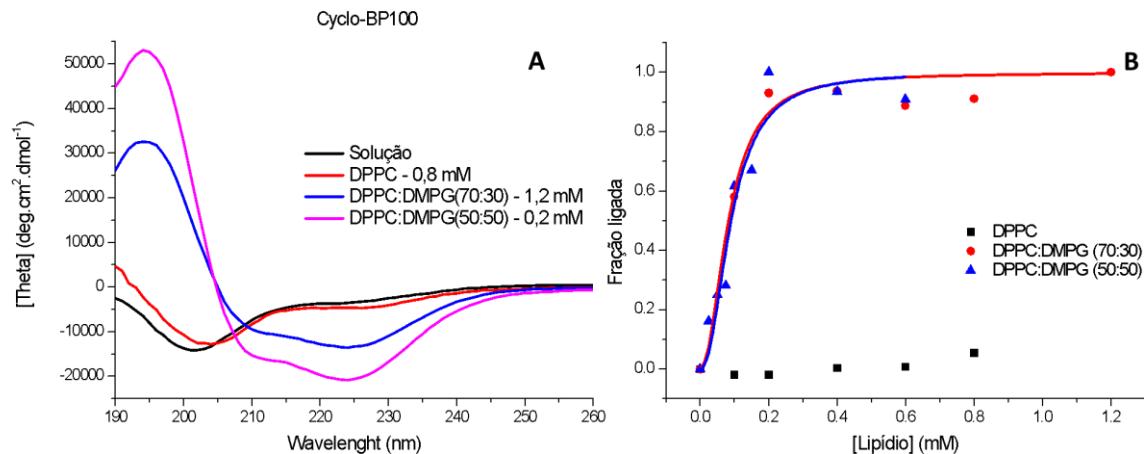


Figura 16. (A) Espectros CD do peptídeo **Cyclo-BP100** em solução aquosa (não ligado) e em presença de vesículas em fase gel de composições lipídicas variadas: DPPC (0,8 mM), DPPC:DMPG (70:30) (1,2 mM), DPPC:DMPG (50:50) (0,2 mM). (B) Curvas de ligação do Cyclo-BP100 em sistemas de composição lipídica variada. Água, [Cyclo-BP100] = 17 μ M.

4.4. Estudo da interação dos peptídeos com vesículas de DPPC e DPPC:DMPG por fluorescência

Assim como para a interação com micelas, a interação dos peptídeos com os lipídeos formadores de vesículas resulta na passagem do resíduo fluorescente para um ambiente de menor polaridade. Dessa forma, a intensidade da fluorescência da tirosina a 305,2 nm aumenta, de acordo com o aumento da concentração lipídica no sistema, como pode ser visto na Figura 17, para a interação do peptídeo BP100-C16 com LUVs de DPPC:DMPG (70:30).

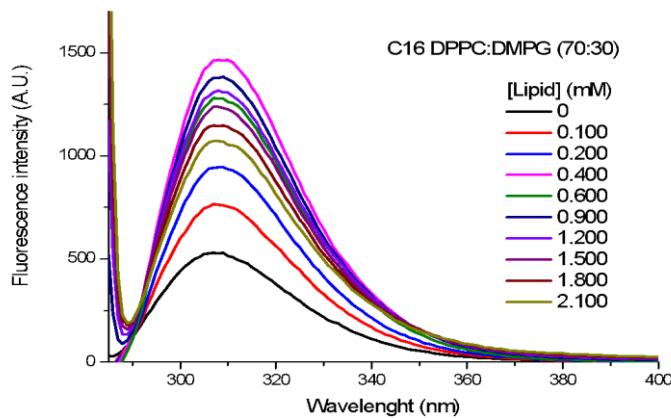


Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo BP100-C16 em solução aquosa na presença de diferentes concentrações de vesículas de DPPC:DMPG (70:30). Água, $[BP100] = 17 \mu M$.

Bem como mostrado nos estudos feitos por CD (Figuras 14, 15 e 16), os peptídeos análogos apresentaram maior afinidade pelas membranas-modelo quando a porcentagem de DMPG presente é de 50%, o que está demonstrado nos gráficos da Figura 18. Não houve ligação do peptídeo com vesículas compostas apenas por DPPC, o que também se verificou pela técnica de CD. Não foi feita a curva da fração ligada do BP100 em presença de vesículas de composição DPPC:DMPG (50:50).

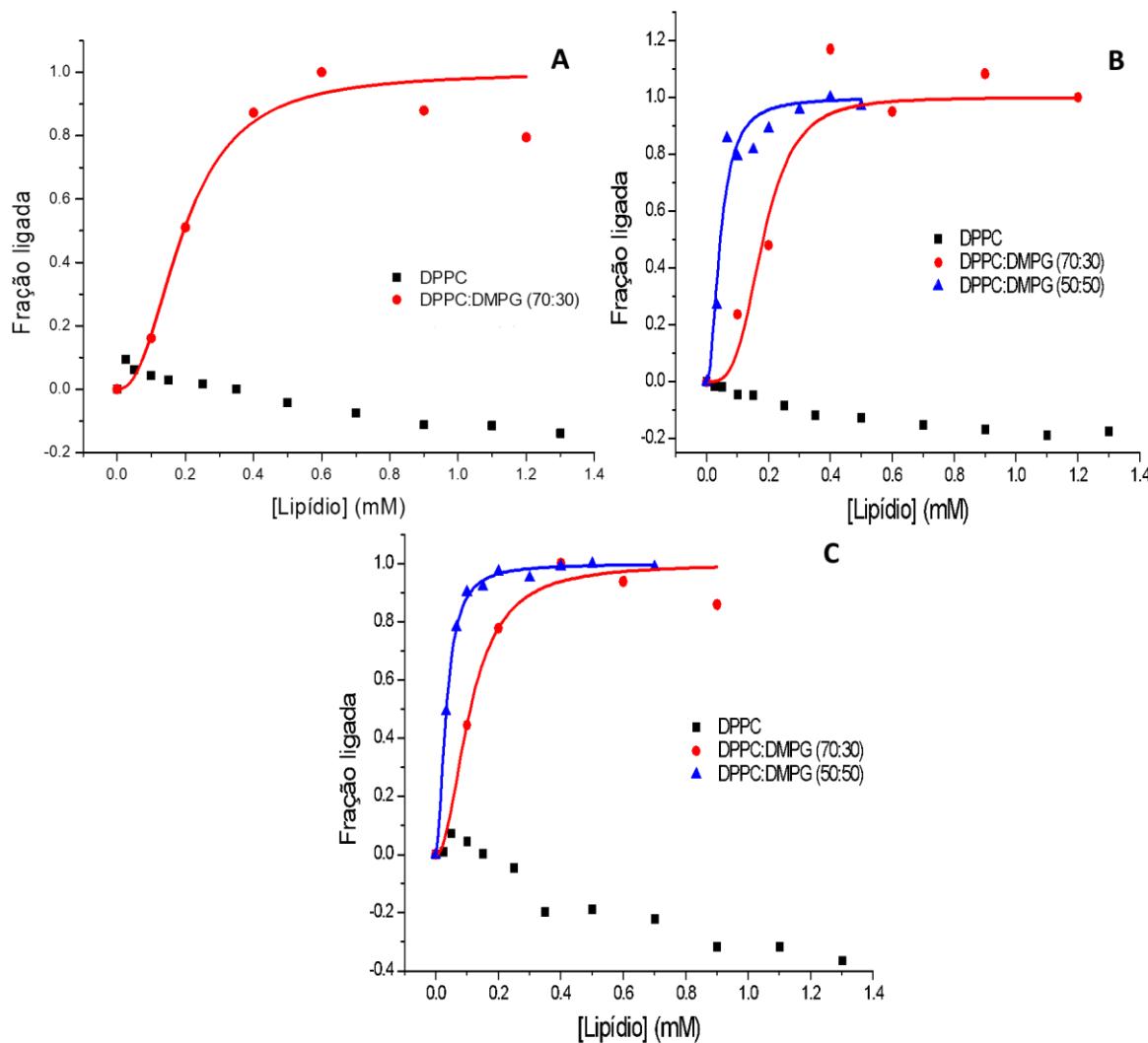


Figura 18. Curvas de ligação dos peptídeos em sistemas de vesículas em fase gel de composições lipídicas variadas: (A) **BP100** (B) **BP100-C16** (C) **Cyclo-BP100**
Água, [Peptídeo] = 17 μ M.

4.5 Ligação dos peptídeos em micelas e vesículas

A partir das curvas de ligação apresentadas anteriormente foi possível determinar os valores das constantes de ligação aparente para cada sistema (Tabela 3).

Tabela 3. Constantes de ligação aparente obtidas por Fluorescência e CD dos peptídeos em membranas modelo (micelas e vesículas em fase líquida e fase gel) de composição lipídica variada.

	(K _B × 10 ⁻³) Fluorescência			(K _B × 10 ⁻³) CD		
	BP100	BP100-C16	Cyclo-BP100	BP100	BP100-C16	Cyclo-BP100
LPC	0,7	2,9	2,4	0,7	2,9	3,3
LPC:LPG (70:30)	4,5	10,2	8,3	1,9	5,3	4,9
LPC:LPG (50:50)	2,5	3,3	2,4	1,8	6,7	3,9
LPC:LPG (30:70)	6,7	9,6	2,7	4,1	6,4	6,1
HPS	0,60	*	*	*	*	*
*POPC:POPG (70:30)	3,4	6,1	12,0	2,9	7,3	9,3
*POPC:POPG (50:50)	9,8	11,4	19,7	8,0	11,5	13,2
DPPC	***	***	***	***	***	***
DPPC:DMPG (70:30)	5,1	5,5	10,1	7,9	8,6	12,2
DPPC:DMPG (50:50)	*	22,4	30,0	11,2	16,3	11,1

*K_B não foi calculada; **Carretero *et al.*, 2018; ***não houve ligação

Quando em presença de vesículas, houve aumento de afinidade pelos lipídeos conforme a proporção de lipídeos com carga, o POPG (Carretero *et al.*, 2018) e DMPG (este trabalho), foi aumentada de 30 para 50%, evidenciando uma contribuição do efeito eletrostático para a interação peptídeo-vesícula.

Tanto para vesículas em fase gel, DPPC, quanto para vesículas em fase líquida, POPC, os peptídeos não interagiram com as LUVs formadas por POPC ou DPPC somente, reforçando a importância das interações eletrostáticas para a

interação (Carretero *et al.*, 2018). Quando comparamos as constantes de ligação dos peptídeos obtidas com vesículas em fase gel e fase líquido-cristalina, os valores e tendências em função da concentração de fosfatidilglicerol são semelhantes, indicando que o grau de empacotamento das cadeias acila dos lipídeos das vesículas exerce pouca influência na afinidade entre peptídeo e vesícula.

Nos estudos com micelas, a diferença entre os valores de constante de ligação obtidos pela técnica de fluorescência e por CD é menor em relação à diferença entre as constantes, obtidas pelas mesmas técnicas nos estudos de sistemas de vesículas (líquidas ou da fase gel). A isso pode se atribuir o fato de as micelas possuírem menor tamanho frente a vesículas gerando menor espalhamento de luz e, por conseguinte uma maior relação sinal/ruído e menor variação nos resultados.

É possível observar que, tanto para os sistemas micelares quanto para aqueles de vesículas da fase líquida com lipídeos com carga negativa, os resultados encontrados através de ambas as técnicas estão em conformidade. Ou seja, ao observarmos as constantes para uma mesma fase observa-se uma tendência semelhante entre as técnicas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estrutura dos peptídeos

Em estudos anteriores de nosso grupo, constatou-se que o BP100 e o BP100-C16 em solução aquosa possuem espectros CD bastante similares. Essa similaridade pode ser atribuída ao fato de que a cauda linear, presente no BP100-C16, tende a interagir com as cadeias alquílicas dos lipídeos da micela, exercendo efeito desprezível sobre as ligações peptídicas entre os resíduos do BP100-C16, não interferindo em sua conformação.

O Cyclo-BP100, por outro lado, apresenta diferença perceptível no espectro quando comparado aos outros dois peptídeos. Quando em solução aquosa, o Cyclo-BP100 apresenta, no espectro, certa intensidade nas regiões de 208 e 222 nm, o que não se verifica para os outros peptídeos em estudo. Um fator que ajuda a explicar isso é a presença do grupo cíclico no peptídeo, que possui conformação de dobra

beta, e contribui no espectro com intensidades negativas ao redor de 222 nm e positivas ao redor de 195 nm. Nos espectros do peptídeo ligados às membranas essa mesma contribuição é perceptível.

5.2. Ligação dos peptídeos com as estruturas lipídicas

Como apresentado na parte dos resultados, todos os peptídeos em estudo ligaram-se a ao menos um tipo de micela (dependendo da composição desta). Com o gradual aumento da concentração lipídica no sistema, a população de peptídeos com estrutura randômica foi se reduzindo e a de peptídeos em conformação alfa-helicoidal aumentando.

5.3. Fatores importantes para a ligação peptídeo-micela/vesícula

Elementos como a carga dos peptídeos e dos lipídeos, interações hidrofóbicas e o nível de empacotamento dos lipídeos influenciam diretamente a afinidade dos peptídeos pelas micelas e vesículas.

A carga dos lipídeos determina a intensidade da interação eletrostática com os peptídeos, que possuem carga positiva. As interações hidrofóbicas, por sua vez, ocorrem entre as cadeias lineares dos lipídeos e as cadeias laterais hidrofóbicas dos resíduos dos peptídeos (no caso do análogo alquilado, há também a interação com a alquila). A isso soma-se a forma como os lipídeos se dispõe (seja em vesículas ou micelas), o que determina a exposição das cadeias lineares dos lipídeos ao meio aquoso. No caso das micelas, aqui em estudo, o nível de exposição é maior se comparado ao das membranas de vesícula, de forma que a penetração do peptídeo na porção hidrofóbica é facilitada.

Tal diferença na forma e fluidez da região hidrofóbica do agregado é o que determina a interação de BP100 e análogos com micelas sem carga superficial, compostas somente por LPC, enquanto a ligação dos peptídeos em vesículas sem carga superficial de POPC (Carretero *et al.*, 2018) e DPPC não ocorre.

Verificou-se que os elementos acima descritos se combinam para determinar se, e com qual intensidade, a ligação peptídeo-micela/vesícula ocorre. Como apresentado na parte dos resultados, quando a composição de lipídeos de carga

negativa foi aumentada no meio, houve aumento da afinidade dos peptídeos pelas micelas e vesículas. Esse aumento se deu pelo aumento da intensidade das interações eletrostáticas entre os lipídeos e o peptídeo.

No entanto, o aumento de 30 para 50% de lipídeos de carga negativa na composição das micelas resultou numa redução da afinidade, o que não se verificou nos sistemas de vesículas. Para explicar essa discrepância, nossa hipótese é que as vesículas são capazes de estabilizar melhor do que as micelas o aumento da carga superficial decorrente da maior parcela de lipídeos carregados negativamente. A estrutura das micelas sofrendo maior desestabilização, pode então levar a anteriormente verificada diminuição da afinidade.

5.4. Observações sobre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas

Mesmo sendo ambas as técnicas adequadas para se estudar a interação entre os peptídeos e as membranas modelo, é possível notar que as diferenças dos resultados obtidos pelas duas técnicas são menos expressivas no caso das micelas se comparadas com as diferenças observadas nos sistemas de vesículas. Isso pode ser explicado ao se considerar que as micelas possuem tamanho menor em relação às vesículas, desencadeando menor espalhamento de luz e, portanto, menor interferência nas medidas.

Os estudos feitos com vesículas da fase gel, bem como aqueles feitos com micelas, apresentaram uma tendência nos resultados obtidos por CD em conformidade com aquilo que se verificou por fluorescência. Nos estudos das vesículas em fase gel, diferentemente do que se verificou com as outras duas condições, parece haver certa discordância entre os resultados.

6. CONCLUSÃO

Pelos ensaios realizados, pode-se perceber que, em sistemas compostos por micelas e vesículas (fase líquida e fase gel), há divergências no comportamento de variação da afinidade dos peptídeos pelas membranas modelo. Nos sistemas com presença de vesículas, não se observou ligação entre os peptídeos e as membranas

compostas apenas por lipídeos sem carga (DPPC e POPC), fato que aponta para a importância do efeito eletrostático para que a interação ocorra.

No caso das micelas, por outro lado, nos sistemas composto apenas por lipídeos sem carga, foram verificados indícios de ligação nas técnicas utilizadas. Isto demonstra que o menor grau de empacotamento dos lipídeos nesses agregados compensa a ausência do efeito eletrostático que é essencial para a interação no caso das vesículas.

Ainda em relação aos sistemas micelares, concluímos que o aumento da carga favorece a ligação até certo ponto. Quando o aumento de LPG na composição foi de 30 para 50%, houve redução na afinidade dos peptídeos pelas membranas, causada provavelmente pela desestabilização na estrutura das micelas, sendo essa provocada pela alta carga superficial das micelas.

Em contrapartida, nos estudos com as vesículas de fase gel, o aumento de lipídeos com carga na composição das membranas se mostrou como facilitador da interação com os peptídeos.

7. REFERÊNCIAS

- E. Badosa, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Besalu, J. Cabrefiga, E. Bardají, E. Montesinos, A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria, *Peptides* 28 (2007) 2276–2285.
- G.P.B. Carretero, G.K.V. Saraiva, A.C.G. Cauz, M.A. Rodrigues, S. Kiyota, K.A. Riske, A.A. Dos Santos, M.F. Pinatto-Botelho, M.P. Bemquerer, F.J. Gueiros-Filho, H. Chaimovich, S. Schreier, I.M. Cuccovia. Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide, *Biochim. Biophys. Acta* 2018 doi: 10.1016/j.bbamem.2018.05.003.
- K. Eggenberger, C. Mink, P. Wadhwani, A.S. Ulrich, P. Nick. Using the Peptide Bp100 as a Cell-Penetrating Tool for the Chemical Engineering of Actin Filaments within Living Plant Cells, *ChemBioChem* 12 (2011), 132-137.

- R. Ferre, M.N., Melo, A.D. Correia, L. Feliu, E. Bardají, M. Planas, M. Castanho, Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100, *Biophys. J.* 96 (2009) 1815–1827.
- P. Garidel, C. Johan, L. Mennicke, A. Blume, The mixing behavior of pseudobinary phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and chain length. *Eur. Biophys. J.* 26 (1997) 447-459.
- M.M., Graciani, A. Rodriguez, M, Munhoz, M.L. Moya, Micellar Solutions of Sulfobetaine Surfactants in Water-Ethylene Glycol Mixtures: Surface Tension, Fluorescence, Spectroscopic, Conductometric, and Kinetic Studies, *Langmuir* 2005, 21, 7161-7169).
- H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 491–511.
- J.A. Killian, G. von Heijne, How proteins adapt to a membrane-water interface, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 429–434.
- M.C. Manzini, K.R. Perez, K.A. Riske, J.C. Bozelli Jr., T.L. Santos, M.A. da Silva, G.K. Saraiva, M.J. Politi, A.P. Valente, F.C. Almeida, H. Chaimovich, M.A. Rodrigues, M.P. Bemquerer, S. Schreier, I.M. Cuccovia, Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies, *Biochim. Biophys. Acta* 2014 (1838) 1985–1999.
- L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 464–472.
- P. Park, L. Franco, H. Chaimovich, K. Coutinho, I. Cuccovia, F.S. Lima, Binding and Flip as Initial Steps for BP-100 Antimicrobial Actions, *Sci. Rep.* 9 (2019) 8622. [Doi.org/10.1038/s41598-019-45075-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45075-5).
- J.P. Powers, R.E.W. Hancock, The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides* 24 (2003) 1681–1691.
- G. Rouser, S. Fleicher, A. Yamamoto, Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots, *Lipids* 5 (1970) 494–496.

- I.M. Torcato, Y. Huang, H.G. Franquelim, D. Gaspar, D.J. Craik, M.A.R.B. Castanho, S.T. Henriques, Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 944–955.
- P. Wadhwani, E. Strandberg, J. van den Berg, C. Mink, J. Bürcka, R.A.M. Ciriello, A.S. Ulrich, Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 940–949.
- M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 27-55.
- B. Zhang, H. Gu, W. Shi, H. Li, G. Ma, X. Chen, H. Qian, H. Lin, W. Huang, L. Ge. Synthesis and biological evaluation of novel aliphatic acid-conjugated antimicrobial peptides as potential agents with anti-tumor, multidrug resistance-reversing activity and enhanced stability, *Amino Acids* (2017) doi: 10.1007/s00726-017-2482-6.

17/10/2023 Caro Murace

Data e assinatura do Aluno

17/10/2023 Tolani

Data e Assinatura da Orientadora