

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

**INTERAÇÕES DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BP100 e
NAFTALIMIDA-BP100 COM MEMBRANAS MODELO E
CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Giovanna Reis Pinto

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

Orientador:

Dr. Gustavo Penteado Blettesini
Carretero

São Paulo

2022

SUMÁRIO

| | Pág. |
|-----------------------|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 3 |
| RESUMO | 4 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 5. DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÃO | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| AMP | Peptídeos antimicrobianos (Antimicrobial peptides) |
| CD | Dicroísmo circular (Circular Dichroism) |
| CF | 5(6)-Carboxifluoresceína |
| Chol | Colesterol |
| DLS | Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering) |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| FDA | U.S. Food and Drug Administration |
| GUV | Vesículas unilamelares gigantes (Giant unilamellar vesicles) |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes (Large unilamellar vesicles) |
| MLV | Vesículas multilamelares (Multilamellar vesicles) |
| MIC | Concentração inibitória mínima (Minimum Inhibitory Concentration) |
| Naft | 1,8-Naftalimida |
| POPC | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina |
| POPG | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) |
| POPE | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina |
| SM | Esfingomielina |
| SS-NMR | Ressonância magnética nuclear de estado sólido |
| TOCL | Tetra-oleil cardiolipina |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |

RESUMO

PINTO, G. R.. Interações dos Peptídeos Antimicrobianos BP100 e Naftalimida-BP100 com Membranas Modelo e Correlação com Atividade Biológica. 2022. no. f.47. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Naftalimida. Análogos de BP100. Permeabilização.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são uma classe de moléculas amplamente presente na natureza, inclusive no sistema imune inato humano, que atuam como defesa primária contra diversos patógenos. Seu mecanismo de ação se baseia na permeabilização seletiva de membranas negativamente carregadas, características de fungos e bactérias, levando à ação microbiostática/microbicida. Um exemplo de AMP muito estudado é o BP100 (KKLFKKILKYL-NH₂), um peptídeo sintético formado de segmentos dos AMPs naturais melitina e cecropina A, com resíduos hidrofóbicos e com carga positiva, que atua formando uma hélice anfipática e levando à permeabilização de membranas lipídicas. Recentemente, trabalhos do laboratório de sistemas biomiméticos (IQ-USP) desenvolveram o análogo Naftalimida-BP100 que mostrou-se mais eficiente contra bactérias Gram-negativas e positivas em comparação ao BP100.

O objetivo do presente projeto consiste em estudar a estrutura secundária, por meio de espectroscopia de dicroísmo circular, dos peptídeos Naft-BP100 e BP100 em solução e interagindo com membranas modelo miméticas de bactérias Gram-positivas e negativas e eritrócitos, bem como avaliar sua atividade por meio de experimentos de vazamento e espalhamento de luz dinâmico além de afinidade e toxicidade em experimentos de fluorescência e dicroísmo circular. Assim, correlacionando os estudos biofísicos com a atividade biológica dos peptídeos.

Os dados indicaram que a adição dos resíduos de alanina e da naftalimida no peptídeo BP100, formando o Naft-BP100 não altera o modo de ação do AMP e resulta no aumento da afinidade para com as membranas miméticas, reduzindo a dependência de cargas negativas. Embora o Naft-BP100 tenha maior atividade contra miméticos de eritrócitos, a maior afinidade por modelos de células bacterianas indica que a modificação proposta possa ser vantajosa para o desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos contra bactérias Gram-positivas e negativas.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o uso indevido de antibióticos, o surgimento de cepas resistentes às moléculas mais convencionais, conhecidas por seus amplos espectros de ação, tem se tornado um problema de saúde pública (Yan, et al., 2013). Dessa forma, visando escapar dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos patógenos, faz-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos.

Embora a maior parte dos mecanismos de ação de antibióticos sintéticos não seja a interação com membranas lipídicas, esta é a estratégia prevalente encontrada na natureza (Steinbuch e Fridman, 2016, Cauz et al., 2019) e é apresentada por diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs são uma classe de compostos que fazem parte do sistema imune inato de praticamente todos os organismos vivos, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica/fungicida, antiparasitária e anticancerígena (Kang et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de medicamentos a partir de moléculas que apresentem esse modo de ação, se mostra vantajoso principalmente por agir contra estruturas relativamente conservadas, dificultando o escape por resistência, cujo rompimento levaria a uma rápida ação bactericida (Steinbuch e Fridman, 2016, Mojsoska et al., 2017).

1. Peptídeos antimicrobianos

Conhecidos há várias décadas, o primeiro AMP foi identificado em 1939 com a extração da gramicidina de *Bacillus brevis* (Dubos, 1939) seguida do isolamento de cecropinas e magaininas na década de 1980 (Kang et al., 2017). A maioria deles (~ 90%) possui menos de 50 resíduos de aminoácidos (Wang, 2017) mas muitos apresentam biossínteses complexas, procedendo de uma proteína precursora que é processada para gerar o peptídeo maduro ainda sujeito a outras modificações pós-traducionais (Martin et al, 1995; Wang, 2012). Estas modificações podem ser de vários tipos, como a proteção “capping” do lado terminal, substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos, formação de pontes dissulfeto e tioéter, amidação, ciclização e entre outros, conferindo as atividades desejadas e estabilidade química aos AMPs finais (Wang, 2012). Também devido ao seu amplo espectro, seletividade e baixa toxicidade,

atualmente são considerados como boas alternativas aos antibióticos convencionais.

1.1 AMPs e suas características

Carga positiva

A maioria dos AMPs são catiônicos, com carga líquida entre +2 e +6 em pH neutro, e anfifílicos, podendo adquirir diversas estruturas secundárias, em especial a α -hélice anfipática com uma face hidrofóbica e uma face hidrofílica (Wang, 2017). Por sua carga positiva, são capazes de interagir e causar perturbação da membrana celular bacteriana, rica em lipídios negativos (Martin *et al.*, 1995; Hancock, 1997). Tal ação característica faz com que esta classe de peptídeos apresente a vantagem de dificilmente induzir resistência por parte dos micro-organismos, devido a necessidade de modificação dos componentes lipídicos da membrana (Hancock, 1997).

Hidrofobicidade / Anfipaticidade

A efetividade da interação dos AMPs com as cadeias acila dos lipídios que formam a membrana celular também está relacionada à sua hidrofobicidade. Aminoácidos como o triptofano, tirosina e fenilalanina contribuem para a afinidade, facilitando a interação com a bicamada lipídica das paredes celulares e membrana plasmática (Killian & von Heijne, 2000; Mattila *et al.*, 2008; Haney *et al.*, 2012).

Os AMPs podem adquirir estrutura secundária de modo a separar espacialmente uma face hidrofóbica contendo os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais apolares (hidrofóbicas) e uma face hidrofílica contendo os resíduos de aminoácidos polares e/ou carregados positivamente como a arginina e lisina. Essa propriedade é essencial para interação desses peptídeos que se ligam ao ambiente de interface hidrofóbica/hidrofílica da membrana fosfolipídica e é observada especialmente em peptídeos com estrutura secundária α -hélice (Martin *et al.*, 1995; Hancock, 1997).

1.2 AMPs como novos candidatos a antibióticos

No Brasil, a ocorrência de resistência a antimicrobianos, por exemplo em patógenos do gênero *Candida*, é maior do que a descrita nos países europeus e Estados Unidos, sendo documentada principalmente em pacientes cirúrgicos em todos os hospitais brasileiros (Colombo *et al.*, 2007). Portanto, faz-se necessário buscar, desenhar, estudar e definir o modo de ação de outros tipos de antibióticos, diferentes dos convencionais, mais efetivos e menos tóxicos, criando alternativas tanto para uso humano quanto veterinário e agrícola.

Estudos mostram que os AMPs podem ser considerados uma boa alternativa aos compostos convencionais pela sua capacidade de inibir o crescimento e levar à morte de fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, algumas multidroga-resistentes (Chileveru *et al.*, 2015). Uma grande vantagem a ser explorada é a diferença entre o mecanismo de ação dos AMPs e dos antibióticos atualmente usados, em que os últimos frequentemente têm proteínas como alvos, o que facilita a indução de resistência por pequena mutação nos genes que as codificam. Já o modo de ação dos AMPs frente aos micro-organismos patogênicos consiste na perturbação da estrutura da bicamada lipídica da membrana celular, cujos componentes dificilmente poderiam ser modificados (Steinbuch & Fridman, 2016).

1.3 Modos de ação dos peptídeos sobre a membrana celular

Os AMPs atuam na permeabilização e/ou danificação da membrana celular de microrganismos levando à sua morte. Vários modelos explicam esse mecanismo de ação, sendo os mais clássicos (Jenssen *et al.*, 2006):

a) Poro toroidal: os peptídeos agregam-se e ligam-se à membrana celular dobrando a monocamada lipídica de forma contínua, fazendo com que os lipídios adquiram uma curvatura positiva. Em consequência, o poro é formado tanto pelas moléculas de peptídeo quanto pelos lipídios alinhados a eles (Mihajlovic & Lazaridis, 2010, Ros *et al.*, 2019).

b) "Barrel-stave": os peptídeos inserem-se na membrana celular em conformação α -helicoidal de forma alinhada e paralela às caudas hidrofóbicas

dos fosfolipídios da bicamada lipídica formando um poro na forma de barril. Através dele, há o vazamento de material citoplasmático, causando a morte celular (Oren & Shai, 1998).

c) Carpete: os lipídeos da membrana celular carregados negativamente entram em contato com uma concentração elevada de AMPs formando agregados de densidade alta, semelhante a um carpete. Neste caso, os peptídeos interferem na estrutura da bicamada lipídica solubilizando a membrana celular do microrganismo em estruturas micelares e causando seu rompimento (Bechinger & Lohner, 2006).

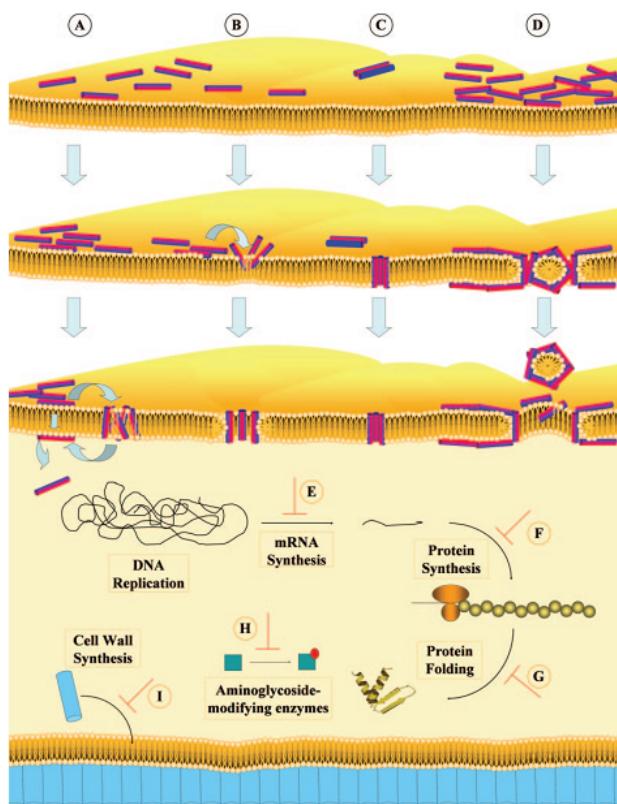


Figura 1. Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos. Em A, demonstração do mecanismo de translocação em que a inserção do peptídeo na membrana plasmática, seguida da translocação, interfere na síntese de biomoléculas sem focar especificamente na permeabilização da membrana lipídica. O mecanismo de formação de poro toroidal é retratado em B, mostrando a alternância entre peptídeos e lipídios, enquanto em C, o poro formado é composto apenas pelos peptídeos, na conformação de barrel-stave. Em D, os agregados de AMPs semelhantes a carpetes solubilizam a membrana, levando ao rompimento. (Jenssen *et al.*, 2006)

1.4 Peptídeo BP100

Na procura e estudo de novos AMPs como promissores antibióticos, Bardají e colaboradores (2006) desenharam undecapeptídeos híbridos misturando a sequência de resíduos de aminoácidos dos peptídeos Cecropina A e Melitina, que inibiram o crescimento *in vitro* das bactérias patogênicas de plantas ornamentais. Dentre todos os propostos, o peptídeo amidado de sequência KKLFKKILKYL-NH₂, chamado de BP100, mostrou ter maior atividade antimicrobiana quando comparado aos demais peptídeos análogos, sendo apenas menos efetivo quando comparado à estreptomicina (Badosa *et al.*, 2007). Estudos posteriores sobre o efeito permeabilizante do BP100 em modelos de membranas bacterianas e de mamíferos mostraram uma maior seletividade de BP100 em relação aos modelos de membrana aniónica bacteriana (Ferre *et al.*, 2009).

O BP100 é altamente catiônico em pH fisiológico, com uma carga líquida de +6. Essa alta densidade de carga positiva é acompanhada por resíduos hidrofóbicos, características que permitem a interação do peptídeo com as membranas bacterianas, aumentando sua permeabilidade e causando morte celular. Estudos sobre a ação do BP100 na estrutura da membrana celular em bactérias Gram-negativas, com medidas do potencial zeta em *Escherichia coli* incubadas com concentrações crescentes de BP100, permitiram estabelecer uma correlação entre a MIC e a neutralização da carga superficial da membrana celular de *E. coli*. Sua ação também foi reforçada em ensaios feitos usando técnicas de microscopia de força atômica que permitiram visualizar o efeito estrutural do AMP no envelope da célula de *E. coli* (Alves *et al.*, 2010).

Em estudos estruturais *in silico* de BP100 em modelos de membrana com fosfatidilcolina (PC), observou-se que o BP100 adota uma conformação helicoidal quando confinado na membrana, resultados confirmados mediante análise de espectros de dicroísmo circular (CD) (Torcato *et al.*, 2013; Manzini *et al.*, 2014; Carretero *et al.*, 2018). A conformação em hélice resulta em uma estrutura espacialmente anfipática, compatível com a interação do peptídeo com bicamadas lipídicas carregadas negativamente. Tal caráter anfipático parece determinar sua orientação no ambiente da membrana.

Resultados obtidos pelo laboratório de sistemas biomiméticos (IQ-USP) mostram que após a ligação eletrostática inicial, o BP100 se acomoda na interface inserindo o lado hidrofóbico na membrana (Park *et al.*, 2019).

O grupo também mostrou que o mecanismo de ação do BP100 sobre membranas modelo é dependente da relação peptídeo/lipídio e do conteúdo POPG na composição das membranas (Manzini *et al.*, 2014). Com baixas proporções peptídeo/lipídio, uma quantidade menor do peptídeo se liga à membrana e os mecanismos sugeridos pelos resultados são os de formação de poros ou de afinamento da membrana, que resultam na permeabilização gradual das vesículas. Com alta proporção peptídeo/lipídio, os resultados indicam uma permeabilização abrupta dos lipossomos, indicando um mecanismo de ação do tipo detergente (Manzini *et al.*, 2014). Também foi visto que a força iônica da solução também interfere com a interação eletrostática do BP100 com os modelos de membrana.

1.5 Naftalimida e seus derivados ligados ao BP100

A naftalimida (1H-benzo[de]isoquinolina-1,3-(2H)-diona) e seus derivados formam uma classe de moléculas capazes de se ligar ao DNA e exercer atividade antitumoral contra uma variedade de linhagens celulares (Braña & Ramos, 2001, Ingrassia *et al.*, 2009). Os mecanismos de ação consistem na ligação ao DNA dupla fita gerando quebra de uma ou ambas as fitas, ou ainda por ligação DNA-proteína em uma reação mediada pela topoisomerase II (Braña & Ramos, 2001, Andersson *et al.*, 1987). Mais recentemente, avanços na síntese de análogos permitiram explorar derivados como mono-naftalimidas, di-naftalimidas e naftalimidas conjugadas com outros compostos heterocíclicos, que acabaram por exibir diferentes graus dessa atividade dependendo das modificações atribuídas (Braña & Ramos, 2001, Lv *et al.*, 2009).

O grupo do laboratório de sistemas biomiméticos (IQ-USP) reportou na literatura as propriedades biofísicas e biológicas de um análogo de BP100 ligado pela extremidade N-terminal à naftalimida chamado Naft-BP100. Tal peptídeo mostrou-se mais eficiente em comparação ao BP100 contra bactérias Gram-positivas e negativas, além de ter se verificado a interação peptídeo-DNA

(Carretero *et al.*, 2021). Em vista dos promissores resultados, propõe-se neste projeto a expansão das investigações de propriedades do Naft-BP100.

1.6 Modelos de membranas biológicas

As membranas biológicas são uma mistura de diversos lipídios que contribuem na estabilidade, fluidez e carga das membranas (Goldfine, 1984). De maneira semelhante, os modelos miméticos são sistemas simplificados também compostos por diferentes lipídios amplamente utilizados para o estudo de interações com AMPs (Hollmann *et al.*, 2018). Sua constituição simplificada, permite trazer as características mais importantes da membrana celular, evitando a complexidade da própria célula que poderiam interferir nos resultados. Assim, é possível ter um maior controle do ambiente experimental junto com a facilidade de modelagem das vesículas, permitindo a mimetização de diferentes tipos de membrana (Hollmann *et al.*, 2018).

As bactérias Gram-negativas são compostas por uma membrana externa constituída por uma bicamada assimétrica, cuja camada externa é rica em lipopolissacarídeo e a interna em fosfolipídios, e uma membrana citoplasmática interna (Goldfine, 1984). Já as Gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática única com uma espessa camada de ácido lipoteicoico que, juntamente com peptideoglicano, forma a parede celular. (Epand e Epand, 2010). Quanto à composição das membranas citoplasmáticas, Muitas membranas bacterianas têm o fosfatidiletanolamina (PE) como o fosfolipídio mais prevalente e os lipídios negativos, como o fosfatidilglicerol (PG) e a cardiolipina (CL), mas as Gram-positivas e negativas diferem, como pode-se observar nos exemplos da Tabela 1. De maneira geral, as Gram-negativas possuem o PE em maior quantidade, enquanto as Gram-positivas contém mais PG (Epand e Epand, 2010).

| Espécies | CL (%) | PG (%) | PE (%) |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|
| Bactérias Gram-negativas (com PE) | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 15 | 80 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 | 21 | 74 |

| | | | |
|-----------------------------------|----|----|----|
| <i>Yersinia kristensenii</i> | 20 | 20 | 60 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 5 | 10 | 80 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6 | 5 | 82 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 | 21 | 60 |
| Bactérias Gram-positivas (sem PE) | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 42 | 58 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 50 | 50 | 0 |
| Bactérias Gram-positivas (com PE) | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 17 | 40 | 43 |
| <i>Bacillus polymyxa</i> | 8 | 3 | 60 |

Tabela 1. Composição lipídica de membranas de bactérias Gram-positivas e negativas. Adaptado de Epand & Epand (2010).

A variação na composição da membrana citoplasmática das Gram-positivas e negativas permite a criação de modelos miméticos de composição variada e correspondente que permitem estudos de ligação e afinidade e, assim, a comparação entre os prováveis comportamentos dos organismos reais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é estudar os efeitos do BP100 e seu derivado contendo naftalimida em sistemas de membranas modelo e correlacionar os estudos biofísicos com a atividade biológica dos peptídeos.

1.1 Objetivos específicos:

- Medir a afinidade dos peptídeos BP100 e Naft-BP100 com membranas modelo (bicamadas) de composição lipídica variável por fluorescência;
- Estudar a atividade biológica dos peptídeos em relação a modelos miméticos de eritrócitos humanos para avaliação da toxicidade e seletividade por fluorescência e espalhamento de luz dinâmico;

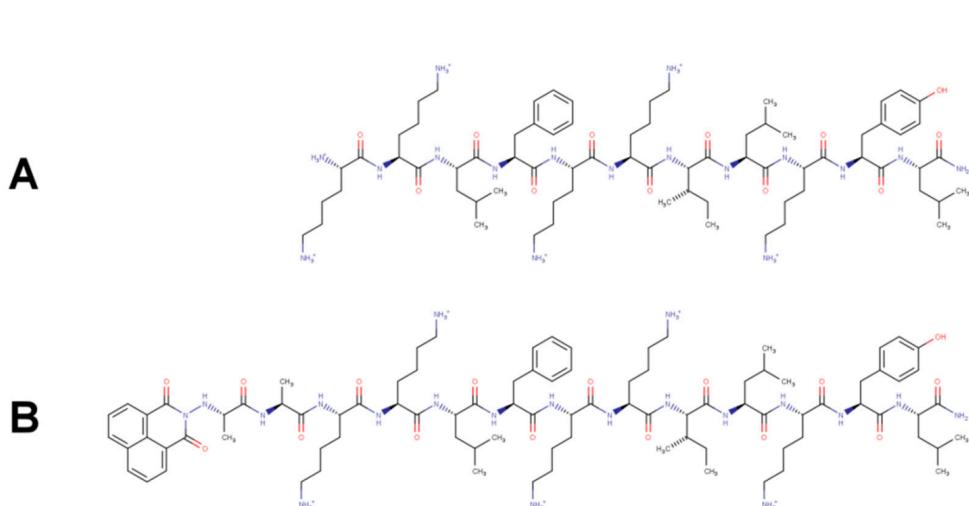
- Verificar o efeito dos peptídeos na permeabilização de LUVs por experimentos de vazamento usando carboxifluoresceína como sonda fluorescente;
- Determinar a estrutura secundária dos peptídeos em solução por espectroscopia de CD e investigar as mudanças conformacionais ocorridas após a interação com as membranas modelo;
- Estudar a atividade permeabilizante do BP100 e Naft-BP100 em vesículas unilamelares grandes (LUV) de composição lipídica variável e correlacionar os dados obtidos com os estudos de ligação.
- Correlacionar as observações gerais da interação entre peptídeo e membranas modelo com dados de atividade biológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Peptídeos

Os peptídeos BP100 e Naft-BP100 utilizados no projeto estão listados abaixo e foram obtidos em colaboração com o Dr. Marcelo Porto Bemquerer da EMBRAPA de Brasília.

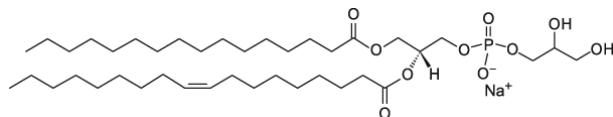


A: BP100 (KKLFKKILKYL-NH₂) B: Naft-BP100 (Naft-AAKKLFKKILKYL-NH₂)

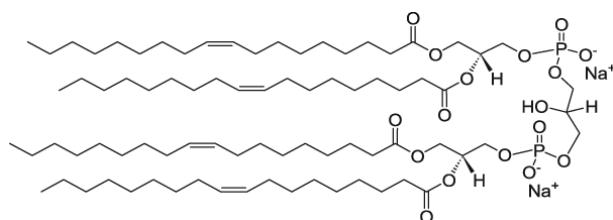
3.1.2 Lipídios

Os lipídios utilizados na formação de membranas foram:

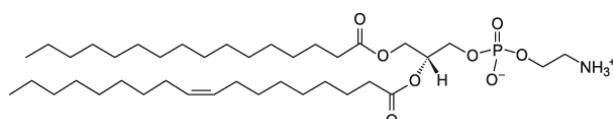
POPG: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol);



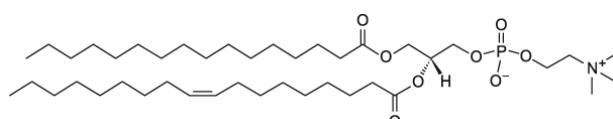
Cardiolipina: 1',3'-bis[1,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo]-glicerol;



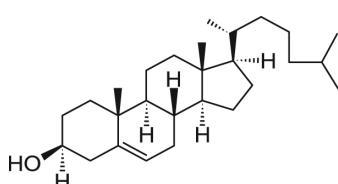
POPE: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina;



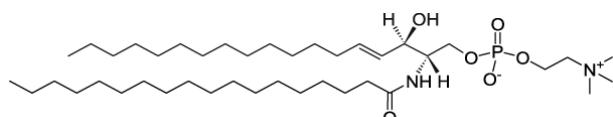
POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina;



Colesterol;



Esfingomielina: N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina.



De acordo com o pesquisado na literatura (Epand & Epand, 2010, Virtanen *et al.*, 1998), as seguintes composições lipídicas foram definidas como as representantes dos três modelos miméticos de membranas biológicas:

Gram-positiva: POPG:TOCL (58:42)

Gram-negativa: POPE:POPG:TOCL (75:15:10)

Eritrócitos humanos: POPC:POPE:SM:Chol (25:20:25:30)

3.2 Métodos

3.2.1 Predição de estrutura secundária e modelagem molecular

A conformação dos peptídeos foi estudada utilizando o software PEPFOLD, disponível online em: <https://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>. A partir da sequência de aminoácidos de BP100 e do segmento AA-BP100 o software gerou uma representação gráfica do perfil de previsão da estrutura secundária local ao longo da cadeia. Para cada peptídeo, também foram obtidos modelos estruturais tridimensionais que tiveram suas características investigadas, entre outras formas, pela sobreposição e análise da consistência estrutural do conjunto de modelos.

Os modelos obtidos pelo PEPFOLD foram sobrepostos utilizando o software UCSF Chimera e a visualização dos modelos e geração das representações gráficas foram realizadas utilizando o software PyMOL.

3.2.2 Preparação das vesículas lipídicas

As soluções estoque dos lipídios listados em 3.2 foram preparadas em clorofórmio e tiveram suas concentrações frequentemente aferidas pelo método de quantificação descrito em Rouser *et al.*, 1970.

Seguindo o método de preparação descrito em Farkuh *et al.*, 2019, alíquotas de volume determinado foram misturadas em tubos de ensaio e secas em fluxo de nitrogênio para obtenção de filme lipídicos com a quantidade e proporções desejadas dos lipídios para formação de vesículas mimetizando a composição lipídica natural de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de eritrócitos humanos. Os filmes secos foram colocados em um dessecador sob vácuo durante duas horas para remoção de traços do solvente orgânico.

Os filmes secos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4 para obtenção de vesículas multilamelares (MLV). Estas foram posteriormente extrusadas em um extrusor contendo membrana de policarbonato com tamanho de poro de 100 nm de diâmetro (Nuclepore, Maidstone, Reino Unido) em um total de 11 passagens. Com isso, foi possível obter vesículas unilamelares grandes (LUV) com diâmetro uniforme em torno de 100 nm.

Para o experimento de vazamento de carboxifluoresceína (CF, 3.2.8), os filmes lipídicos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4 contendo 50 mM de CF. A suspensão das LUVs contendo CF foi passada por uma coluna de 10 cm (10 mL) de Sephadex G-25 para separar as vesículas com a CF encapsulada da CF livre na solução aquosa. As vesículas foram eluídas pela coluna utilizando-se tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM como eluente, para equilibrar força iônica dentro e fora das vesículas.

3.2.3 Soluções estoques dos peptídeos

As soluções estoques dos peptídeos BP100 e Naft-BP100 foram preparadas por meio da pesagem do peptídeo em pó e dissolução em água MilliQ. Pesou-se entre 1,4 e 1,8 mg de cada peptídeo que foram dissolvidas em 1,0 mL de água MilliQ para uma concentração final de aproximadamente 1,0 mM.

As soluções estoques foram quantificadas por espectrofotometria de absorção de luz no ultravioleta em um espectrofotômetro Nanodrop N-1000 (Fisher Scientific). Para BP100, considerou-se como cromóforo o resíduo de tirosina, com máximo de absorção em 275 nm e absorvidade molar de 1400 M⁻¹.cm⁻¹; no peptídeo Naft-BP100 o cromóforo considerado foi o grupo naftalimida com máximo de absorção em 342 nm e absorvidade molar de 12900 M⁻¹.cm⁻¹.

3.2.4 Fluorescência

A interação dos peptídeos com as membranas modelo foi estudada por meio da emissão de fluorescência da tirosina e da naftalimida dos peptídeos. As amostras com BP100 foram excitadas em 275 nm e tiveram os espectros de

emissão de fluorescência registrados entre 280 e 450 nm, utilizando-se slits de excitação e de emissão de 5,0 e 2,5 nm, respectivamente. As amostras do peptídeo Naft-BP100 foram excitadas em 342 nm e tiveram os espectros de emissão de fluorescência registrados entre 350 e 550 nm, utilizando-se slits de excitação e de emissão de 5,0 e 2,5 nm, respectivamente.

Os peptídeos em solução tampão foram colocados em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico em uma concentração de 20 μ M e o espectro de emissão dos peptídeos em solução foi registrado. Em seguida, foram realizadas adições sequenciais de volumes determinados da suspensão lipídica na forma de LUV e concentração total de lipídios de 20 mM. Os espectros de emissão dos respectivos fluoróforos foram registrados a cada adição.

3.2.5 Análise da afinidade entre peptídeo e bicamada.

A afinidade dos peptídeos com cada composição lipídica estudada foi investigada assumindo um modelo de dois estados do peptídeo (livre em solução e ligado às LUV). A variação do máximo de emissão de fluorescência de cada um dos peptídeos foi normalizada entre 0 (para o peptídeo em solução) e 1 (para as formas completamente ligada do peptídeo), de modo a refletir a fração de peptídeo ligada às LUV em cada ponto da adição das LUV na amostra com os peptídeos. Para tanto, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Fração ligada} = (I_L - I_0) / (I_{MAX} - I_0)$$

em que I_0 , I_L e I_{MAX} são as intensidades de emissão de fluorescência de tirosina em 305 nm, ou da naftalimida em 400 nm, em solução tampão (I_0), em determinada concentração de lipídio (I_L) e na concentração de saturação da ligação (I_{MAX}) no experimento, respectivamente.

A fluorescência normalizada para cada ponto de adição das LUV foi investigada em função da relação lipídio/peptídeo de cada amostra; por meio do ajuste de uma equação de Hill, a relação lipídio/peptídeo em que 50% do peptídeo encontra-se ligado às LUV (L/P_{50}) foi calculada para estimativa e comparação da afinidade de cada um dos peptídeos aos diferentes modelos de membrana.

$$\text{Fração Ligada} = P_B/P_T = [L/P]^n / (L/P50^n + [L/P]^n)$$

em que: P_B e P_T são as quantidades de peptídeo ligada e total, $[L/P]$ é razão lipídio/peptídeo, variável independente (eixo x), e n é o coeficiente de cooperatividade.

3.2.6 Dicroísmo Circular

Espectros de dicroísmo circular (CD) dos peptídeos em solução e na presença de LUV da composição lipídica variável foram obtidos em um spectropolarímetro Jasco-J720 (Jasco, Japão). Os espectros de CD no UV-distante foram coletados entre 190 e 260 nm, a uma velocidade de 50 nm/min, tempo de resposta de 4 segundos e abertura de slit 2,0 nm. As amostras foram colocadas em celas circulares de quartzo 1,00 mm de caminho óptico e, para cada amostra, foram realizadas seis acumulações, de modo a otimizar a relação sinal/ruído.

A concentração de peptídeo em cada amostra foi de 20 μM ; foram coletados espectros dos peptídeos em solução e, em seguida, na presença de uma concentração fixa de lipídios determinada pela composição e afinidade dos peptídeos pelos diferentes modelos de membrana biológica. Também foram obtidos espectros de CD das suspensões lipídicas em tampão para subtração dos respectivos espectros dos peptídeos.

As intensidades de elipticidade (θ , mdeg) foram normalizadas para elipticidade molar ($[\theta]$, deg.cm².dmol⁻¹) para eliminar a dependência espectral do comprimento óptico, concentração de peptídeos e número de resíduos.

$$[\theta] = \theta / (10 \times C \times l \times N)$$

onde C é a concentração de peptídeo em mol/L, N é o número de resíduos e l é o comprimento óptico da célula em cm.

Os espectros de CD foram deconvoluídos utilizando-se o software BeStSel (Beta Structure Selection) disponível on-line em <https://bestsel.elte.hu/index.php>.

3.2.7 Espalhamento de luz dinâmico

O raio hidrodinâmico (D_h), potencial zeta (ζ) e mobilidade eletroforética (μ) de LUV mimetizando as membranas biológicas desejadas foram medidos a

25 °C usando um aparelho Zetasizer Nano equipado com um laser de 633 nm da Malvern (Worcestershire, Reino Unido). O potencial Zeta (ζ) foi calculado a partir da mobilidade eletroforética (μ) usando a equação de Henry com aproximação de Smoluchovski:

$$\mu = 2 \cdot \varepsilon \cdot Z \cdot f(ka) \cdot 3\eta$$

$$\zeta = \eta \cdot \mu \cdot \varepsilon$$

onde ε é a constante dielétrica da água, $f(ka)$ é a função de Henry e η é a viscosidade média. A concentração de lipídios nas amostras foi fixada em 100 μM , e a concentração de peptídeos variou de 0 a 32 μM . As amostras foram preparadas em tampão Tris-HF 10 mM, pH 7,4.

A variação das propriedades das LUV medidas por DLS foram investigadas em função da concentração de peptídeo e da relação entre peptídeo e lipídio nas amostras.

3.2.8 Ensaio de permeabilização de membrana modelo

De acordo com Carretero *et al.*, 2018, em uma placa preta de 96 poços, diluições seriadas dos peptídeos foram realizadas de modo a variar as concentrações dos peptídeos entre 0,0125 a 32 μM em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 300 mM para um volume final de 75 μL em cada poço. Em seguida, 75 μL da suspensão de LUV contendo CF foram adicionados a cada poço para uma concentração final de 20 μM de lipídio. A emissão de fluorescência de CF foi monitorada a 520 nm, excitando a amostra a 490 nm em um Leitor de Microplacas Bio-Tek Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, VT). Uma solução de polidocanol 10% (1,5 μL) foi adicionada aos poços, no tempo desejado, para obter 100% de lise e foi utilizada como controle positivo; tampão foi usado como controle negativo. A porcentagem total de vazamento de CF após 60 minutos foi calculada usando equação:

$$\% \text{ Vazamento} = 100 \cdot (F_p - F_0) / (F_{\text{MAX}} - F_0)$$

onde F_p é a intensidade de emissão de fluorescência da amostra com peptídeo após 60 min; F_{MAX} e F_0 são as intensidades de emissão de fluorescência de controles positivos e negativos, respectivamente.

A porcentagem de vazamento foi analisada em função da concentração de peptídeo [P] e possibilitou o ajuste de uma equação de Hill aos dados

experimentais, cálculo da concentração de peptídeos necessária para lisar 50% das LUV (C50), e estimativa da cooperatividade do processo (n).

$$\% \text{ Vazamento} = [P]^n / (C50^n + [P]^n)$$

4. RESULTADOS

4.1 Predição de estrutura secundária e modelagem molecular

Para predição da estrutura secundária dos peptídeos estudados, foi utilizado o software PEPFOLD que, a partir da sequência primária dos peptídeos, realiza até duzentas simulações para obter os cinco melhores modelos estruturais. Nos resultados apresentados a seguir, a coloração vermelha representa a conformação helicoidal, enquanto o azul representa estrutura randômica e o verde, estendida. A partir da sobreposição dos modelos fornecidos pelo PEPFOLD, representações gráficas foram geradas pelo software PyMOL.

Os resíduos do peptídeo BP100 apresentaram-se predominantemente em estrutura helicoidal, com baixa chance do mesmo estar em conformação randômica e praticamente nenhuma em estrutura estendida (Figura 2). Assim, com a utilização do UCSF Chimera e PyMOL, foi possível observar a estrutura em hélice. Principalmente no item B, nota-se a estrutura anfipática característica (Figura 3).

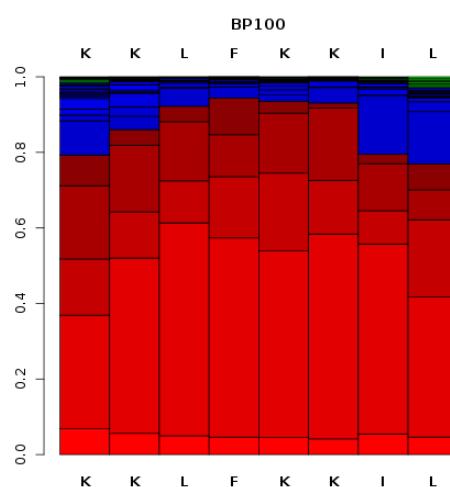


Figura 2. Perfil de previsão de estrutura secundária do peptídeo BP100. Fornecido pelo software PEPFOLD.

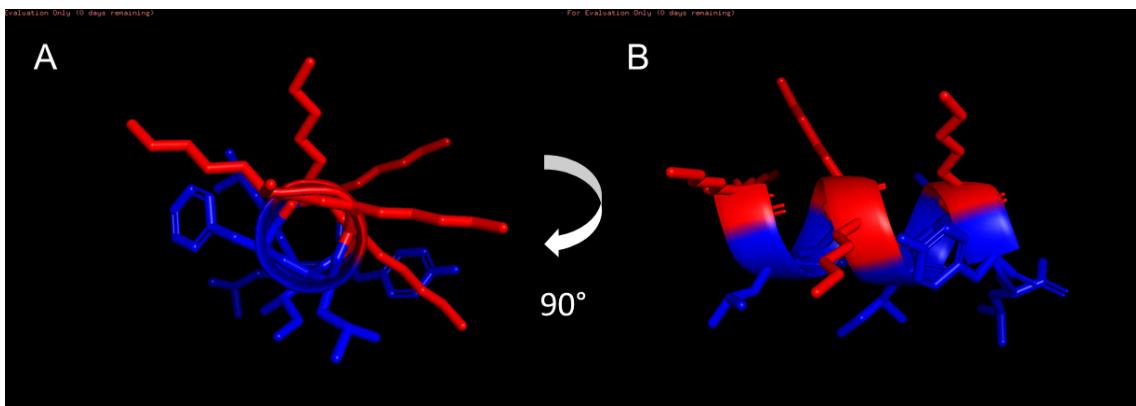


Figura 3. Estrutura tridimensional do peptídeo BP100. Apresentada nas projeções (A) helicoidal e (B) vista lateral no sentido N terminal para C terminal. Fornecida pelo software PyMOL.

Assim como o BP100, a sequência peptídica de Naft-BP100 (AA-BP100) apresentou-se de forma predominantemente helicoidal. Também com probabilidade reduzidas de conformação randômica e ainda menor estendidas (Figura 4). A estrutura tridimensional fornecida pelo PyMOL evidencia a anfipaticidade da estrutura helicoidal prevista (Figura 5).

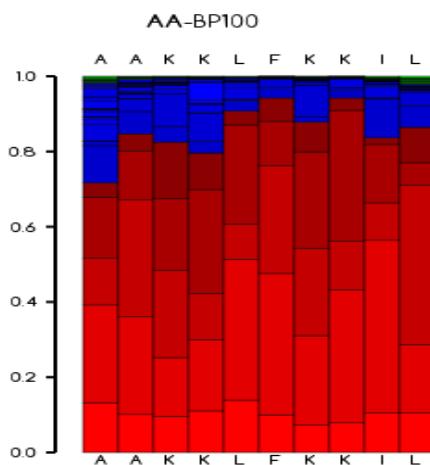


Figura 4. Perfil de previsão de estrutura secundária da sequência AA-BP100 do peptídeo Naft-BP100. Fornecido pelo software PEPFOLD.

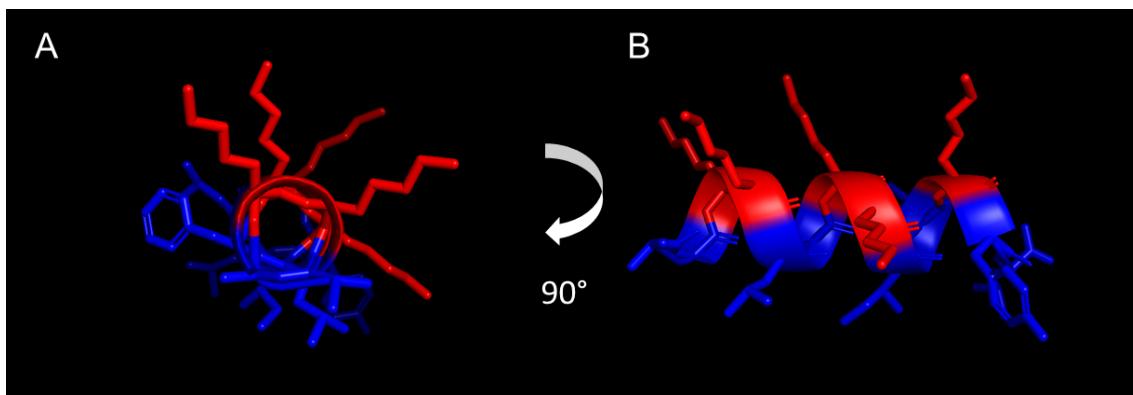


Figura 5. Estrutura tridimensional da sequência AA-BP100 do peptídeo Naft-BP100. Apresentada nas projeções (A) helicoidal e (B) vista lateral no sentido N terminal para C terminal. Fornecida pelo software PyMOL.

4.2 Fluorescência

A fluorescência dos resíduos de tirosina e naftalimida dos peptídeos BP100 e Naft-BP100, respectivamente, foram o ponto de partida para o estudo das afinidades dos mesmos com as membranas modelo.

O espectro da tirosina do BP100, excitada em 275 nm, apresenta uma banda com máximo de emissão em 305 nm (Figuras 6, 8 e 10). A adição das LUV contendo lipídios com carga negativa, mimetizando a membrana bacteriana de espécies Gram-positivas ou Gram-negativas, deflagrou um aumento da intensidade de emissão do fluoróforo sem alterar o comprimento de onda de máxima emissão (Figuras 6 e 8).

O espectro do grupo naftalimida de Naft-BP100, excitado em 342 nm, apresenta dois picos de emissão em 385 e 400 nm. (Figuras 12, 14 e 16). A adição das LUV contendo lipídios com carga negativa, mimetizando a membrana bacteriana de espécies Gram-positivas ou Gram-negativas, e de membranas miméticas da composição lipídica de eritrócitos, resultou em uma diminuição da intensidade de emissão do fluoróforo e um deslocamento do máximo de emissão de aproximadamente 10 nm para comprimentos de onda menores (Figuras 12, 14 e 16).

Mediante os dados obtidos dos espectros e relacionando a intensidade de emissão com a concentração lipídica, foi possível obter curvas de ligação baseadas na proporção lipídio/peptídeo. Com a normalização da intensidade de fluorescência para representação da fração ligada, foi possível comparar as

afinidades dos peptídeos BP100 e Naft-BP100 mesmo com as diferenças de comportamento dos espectros, sendo que para o primeiro peptídeo, a emissão de fluorescência aumenta com a adição das vesículas e para o segundo diminui. Assim, foi considerado que os peptídeos poderiam estar em duas condições: ligados às LUV ou livres em solução, sendo que, para tirosina, na intensidade máxima, e para naftalimida na intensidade mínima, considerou-se 100% dos peptídeos estando ligados às vesículas.

A partir das curvas de ligação, calculou-se a relação lipídio/peptídeo em 50% dos peptídeos encontram-se ligados às LUV, e analisou-se o inverso dessa relação, portanto P/L50, para de forma direta comparar os valores e relacioná-los com a afinidade peptídeo-membrana.

O espectro obtido da interação do BP100 com adições de membranas miméticas de bactérias Gram-positivas mostrou o aumento da emissão da tirosina com o aumento da concentração lipídica. A emissão máxima foi obtida a partir de 0,075 mM, sendo que as posteriores adições de lipídios não levaram à mudanças no espectro, indicando que os peptídeos estavam completamente ligados aos lipídios (Figura 6). A curva de ligação indica a saturação da ligação em uma relação de 5 lipídios por peptídeo aproximadamente (Figura 7).

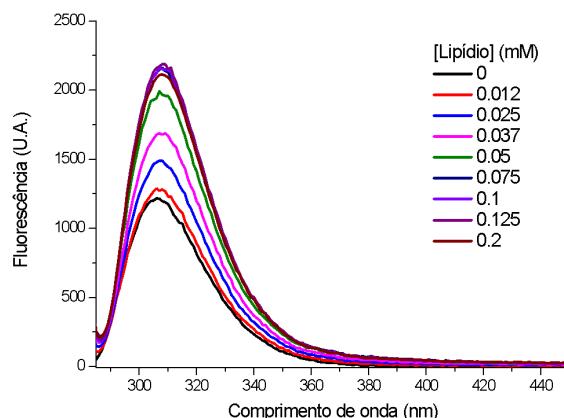


Figura 6. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas Gram-positivas.

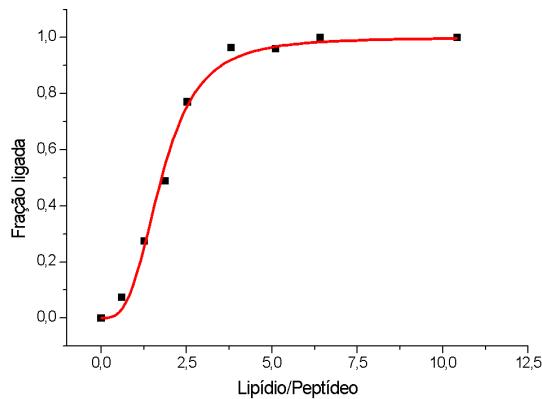


Figura 7. Gráfico de ligação do peptídeo BP100 à LUVs miméticas de membranas Gram-positivas em relação à proporção lipídio/peptídeo.

Já em relação aos miméticos de Gram-negativas, a emissão máxima da tirosina foi obtida em uma concentração lipídica de 0,5 mM (Figura 8). O gráfico de fração ligada indica que a saturação da interação ocorre numa relação lipídio/peptídeo ao redor de 20, indicando uma menor afinidade do BP100 com tais miméticos. (Figura 9).

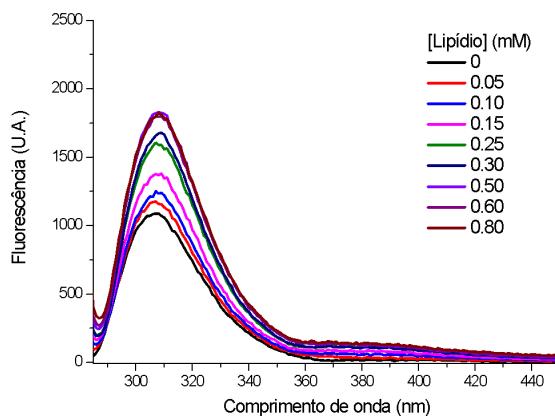


Figura 8. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas Gram-negativas.

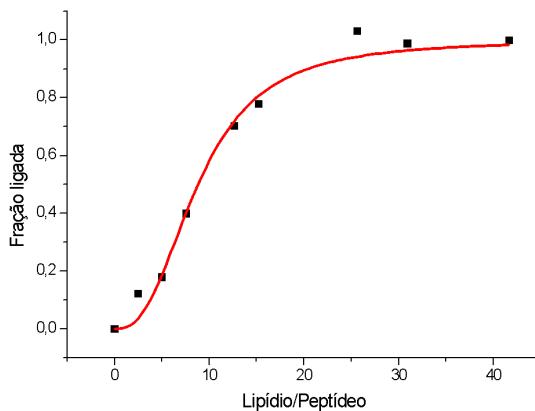


Figura 9. Gráfico de ligação do peptídeo BP100 à LUVs miméticas de membranas Gram-negativas em relação à proporção lipídio/peptídeo.

Diferentemente dos miméticos de bactérias, espera-se que os AMPs apresentem pouca afinidade com os miméticos de eritrócitos, visando baixa toxicidade. A adição de LUV mimetizando eritrócitos na solução de BP100 causou uma diminuição da intensidade de fluorescência da tirosina sugerindo que o peptídeo não interage com as vesículas e que a diminuição da emissão ocorra devido ao espalhamento da luz emitida conforme a concentração lipídica é aumentada (Figura 10).

Assim, os resultados obtidos pelo gráfico de ligação indicam um aumento do espalhamento e de forma geral nenhuma interação (Figura 11).

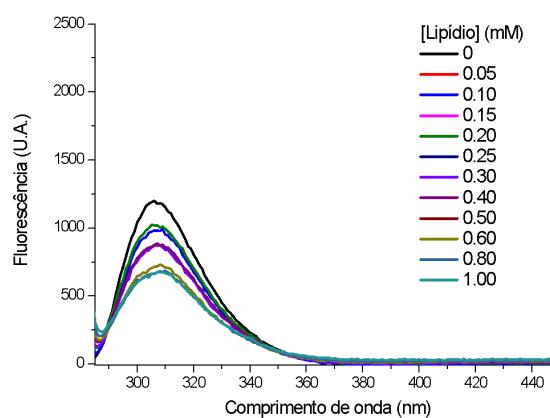


Figura 10. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina do peptídeo BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas de eritrócitos.

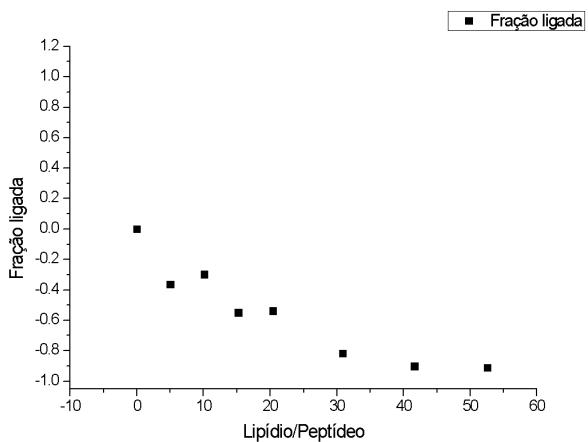


Figura 11. Gráfico de ligação do peptídeo BP100 à LUVs miméticas de membranas de eritrócitos em relação à proporção lipídio/peptídeo.

O espectro de emissão da naftalimida apresentou picos em 385 e 400 nm. Como citado anteriormente, a naftalimida do Naft-BP100 mostra um comportamento oposto ao da tirosina do BP100. Enquanto a última aumenta a emissão quando em contato com as vesículas, as maiores emissões da naftalimida são apresentadas quando o peptídeo encontra-se livre em solução. Esse comportamento decorre da transferência da 1,8-naftalimida não substituída para um ambiente mais hidrofóbico. Assim, já após a primeira adição, a intensidade de emissão foi consideravelmente reduzida e assim progressivamente até não mais mudar, indicando a saturação (Figuras 12 e 14).

Observando o gráfico de ligação feito com base no espectro de fluorescência da naftalimida com adições de vesículas miméticas de bactérias Gram positivas (Figura 12), é possível observar que a saturação foi atingida em uma relação lipídio/peptídeo de 2, enquanto a totalidade de ligação foi obtida com uma proporção de 4 (Figura 13), indicando alta afinidade.

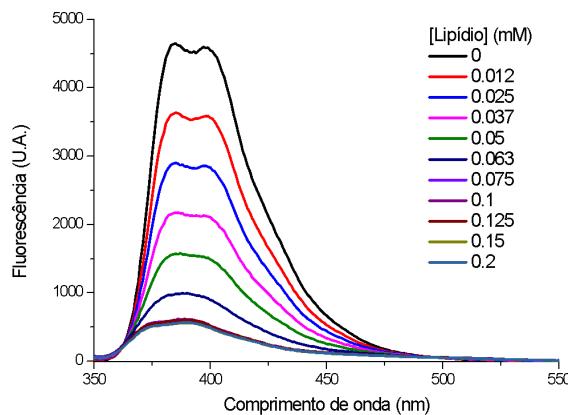


Figura 12. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de naftalimida do peptídeo Naft-BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas de Gram-positivas.

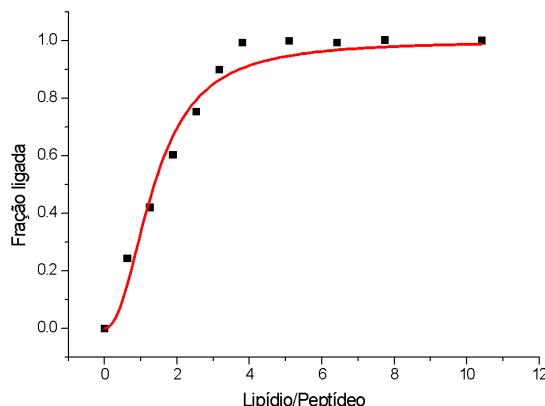


Figura 13. Gráfico de ligação do peptídeo Naft-BP100 à LUVs miméticas de membranas de Gram-positivas em relação à proporção lipídio/peptídeo.

Já em relação às adições de vesículas miméticas de Gram-negativas, tendo como base os dados do espectro (Figura 14), o gráfico mostrou um L/P_{50} em torno de 10 e os peptídeos estavam completamente ligados em uma proporção de 15 (Figura 15).

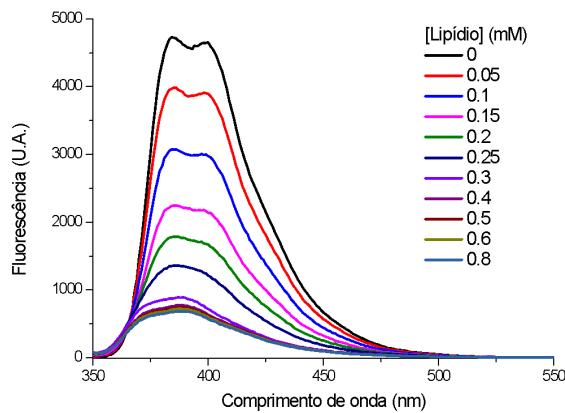


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de naftalimida do peptídeo Naft-BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas de Gram-negativas.

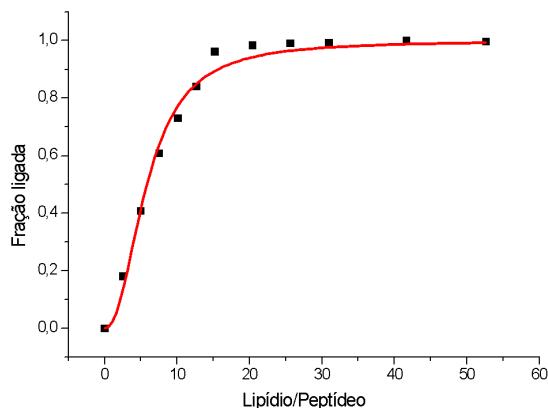


Figura 15. Gráfico de ligação do peptídeo Naft-BP100 à LUVs miméticas de membranas de Gram-negativas em relação à proporção lipídio/peptídeo.

Em relação aos miméticos de eritrócitos, a emissão de fluorescência reduziu-se de maneira muito gradual (Figura 16). Assim, a L/P_{50} foi atingida em proporções de cerca de 80 (Figura 17).

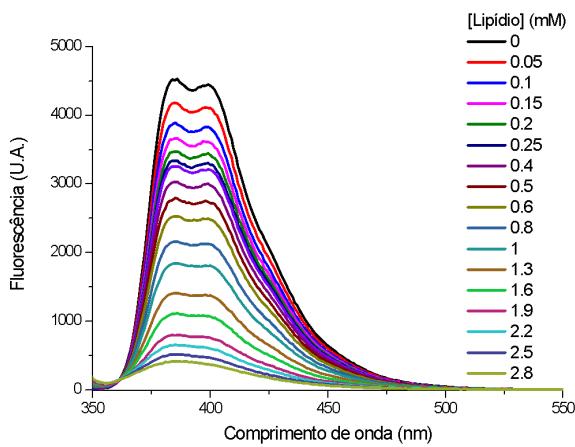


Figura 16. Espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de naftalimida do peptídeo Naft-BP100 em solução na presença de diferentes concentrações de LUVs miméticas de membranas de eritrócitos.

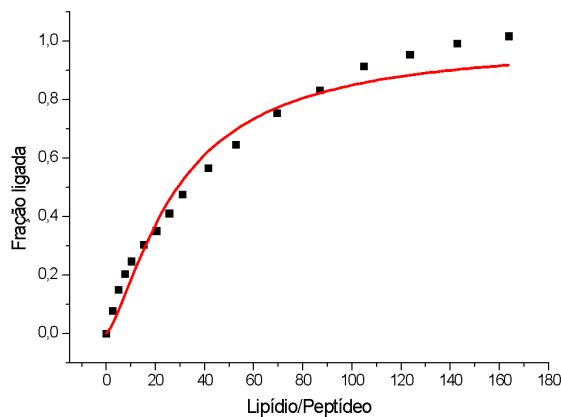


Figura 17. Gráfico de ligação do peptídeo Naft-BP100 à LUVs miméticas de membranas de eritrócitos em relação à proporção lipídio/peptídeo.

Os dados de P/L_{50} estão apresentados na Tabela 2, e como comentado caso a caso, indicam em geral maior afinidade de Naft-BP100 às LUV quando comparado ao BP100. Os peptídeos ligaram-se com maior afinidade pelo modelo Gram-positivo, seguido pelo modelo Gram-negativo, e com menor afinidade às LUV mimetizando eritrócitos. No caso dos eritrócitos, o Naft-BP100 ligou-se com baixa afinidade enquanto BP100 não interagiu com as LUV.

Racionalizando as interações em função da carga superficial das vesículas, é clara a relação direta entre a afinidade peptídeo-membrana e o conteúdo de POPG e/ou TOCL, lipídios com carga negativa.

| | Gram-positiva | Gram-negativa | Eritrócitos |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| BP100 | 0,56 | 0,11 | Sem interação |
| Naft-BP100 | 0,73 | 0,17 | 0,03 |

Tabela 2. Tabela comparativa entre as relações P/L₅₀ calculadas a partir das curvas de ligação dos peptídeos BP100 e Naft-BP100 e as respectivas LUVs miméticas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e eritrócitos

4.3 Dicroísmo Circular (CD)

Foram obtidos os espectros de CD de ambos os peptídeos estudados para avaliar a estrutura secundária em solução, confrontando com o previsto pelos software PEPFOLD, e também quando ligados às vesículas de interesse, tendo como base os dados obtidos em fluorescência.

O BP100, como esperado, apresentou espectro de CD com uma banda negativa ao redor de 198 nm, correspondendo à uma estrutura randômica quando em solução. Um espectro similar ocorreu na presença de miméticos de eritrócitos, sugerindo neste caso uma não-interação e corroborando as observações dos experimentos de fluorescência (Figura 18).

Na presença dos miméticos de Gram-positivas e Gram-negativas, o espectro de CD de BP100 apresenta bandas negativas ao redor de 222 e 208 nm, e uma banda positiva ao redor de 195 nm, características de conformação helicoidal, em conformidade com os modos de ação previstos para os AMPs em membranas, evidenciando sua característica anfipática (Figura 18).

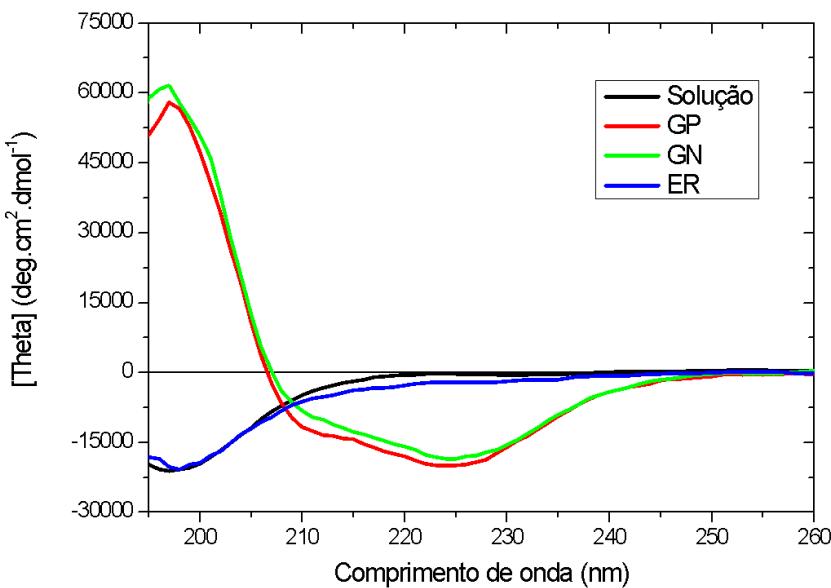


Figura 18. Espectro de CD do peptídeo BP100 em solução na presença de miméticos de bactérias Gram-positivas (vermelho), Gram-negativa (verde) e eritrócitos (azul) e em solução (preto).

O espectro de CD de Naft-BP100 quando em solução apresenta um pico negativo em 198 nm e uma banda negativa de baixa intensidade centrada em torno de 230 nm, indicando que o peptídeo estava essencialmente em uma estrutura randômica com um baixo grau de estrutura secundária, possivelmente por conta da presença da naftalamida. Entretanto, quando na presença de miméticos de eritrócitos, também apresentou uma tendência helicoidal, mediante à grande quantidade de lipídio adicionada. Sua característica anfipática também foi destacada quando em ligação com os miméticos de Gram-positiva e Gram-negativa, apresentando um espectro compatível à estrutura helicoidal com pico positivo em 195 nm e duas bandas negativas em 208 e 222 nm, características de uma estrutura secundária em α -hélice (Figura 19).

Os dados obtidos concordam com resultados anteriores de SS-NMR com BP100 que mostraram que o mesmo, assim como seus análogos, adotam uma estrutura secundária helicoidal, independentemente da carga líquida da superfície da membrana (MISIEWICZ *et. al.*, 2015).

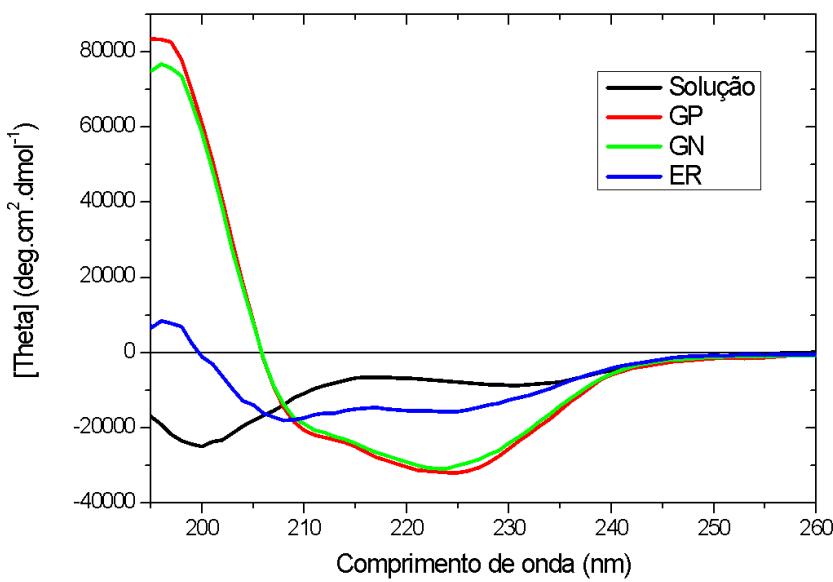


Figura 19. Espectro de CD do peptídeo Naft-BP100 em solução na presença de miméticos de bactérias Gram-positivas (vermelho), Gram-negativa (verde) e eritrócitos (azul) e em solução (preto).

Os espectros de CD foram deconvoluídos utilizando o software BestSel para análise quantitativa do conteúdo estrutural nas diferentes condições (livre em solução e ligado à membrana) (Tabela 3). Para representar a forma ligada às membranas, foram selecionados os espectros obtidos nas amostras com LUV mimetizando bactérias Gram-positivas.

| | | α -hélice | Folha- β | Randômica |
|------------|------------------------|------------------|----------------|-----------|
| BP100 | Solução | 6% | 0% | 94% |
| | Membrana Gram-positiva | 70% | 8% | 22% |
| Naft-BP100 | Solução | 18% | 0% | 82% |
| | Membrana Gram-positiva | 75% | 13% | 12% |

Tabela 3. Porcentagem de estrutura secundária de BP100 e Naft-BP100 em solução e ligados em membranas mimetizando a composição lipídica natural de bactérias Gram-positivas.

Pelos valores tabelados, fica claro que ambos peptídeos sofrem uma transição de conformação randômica para helicoidal ao interagir com as LUVs. Em ambos os casos, as formas ligadas dos peptídeos apresentam conteúdo helicoidal maior ou igual a 70%, Também evidencia-se certa pré-estruturação de Naft-BP100 que apresenta 18% de sua sequência na conformação helicoidal quando ainda em solução.

4.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os ensaios com DLS foram utilizados para avaliar o efeito dos peptídeos no tamanho dos lipossomos e carga superficial ao avaliar o raio hidrodinâmico médio (média calculada pela intensidade de espalhamento, de Souza *et al.*, 2021), distribuição de tamanhos (Pdl) e o potencial zeta. As formas nas quais os peptídeos alteram tais propriedades dos lipossomos podem ser relacionadas aos mecanismos de ação adotados.

Vesículas mimetizando as membranas de bactérias Gram-positivas apresentam potencial Zeta de aproximadamente - 38 mV, e tamanho médio de 127 nm quando extrusadas (Figuras 20 e 21).

A adição de BP100 ou Naft-BP100 às LUV não altera em grande extensão as propriedades medidas. A baixa variação do Pdl reforça a manutenção das propriedades dos lipossomos (Figuras 20 e 21).

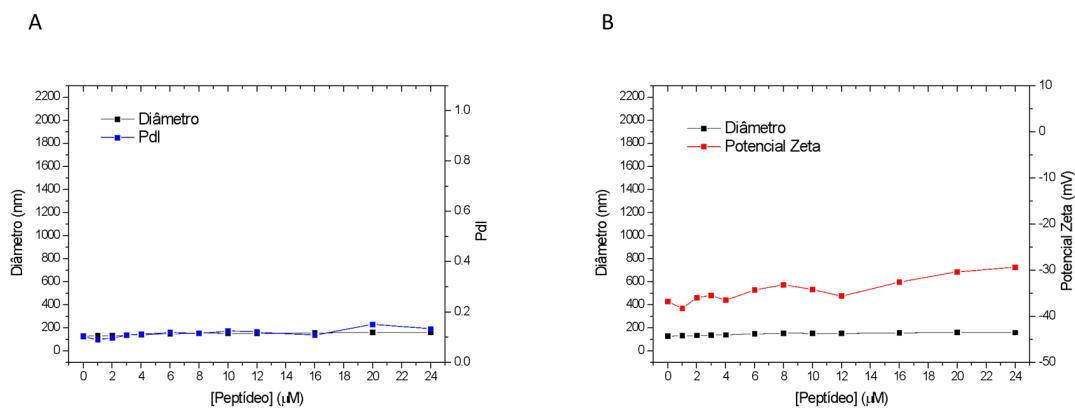


Figura 20. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Gram-positiva em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Gram-positiva em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. [Lipídio] = 100 μM.

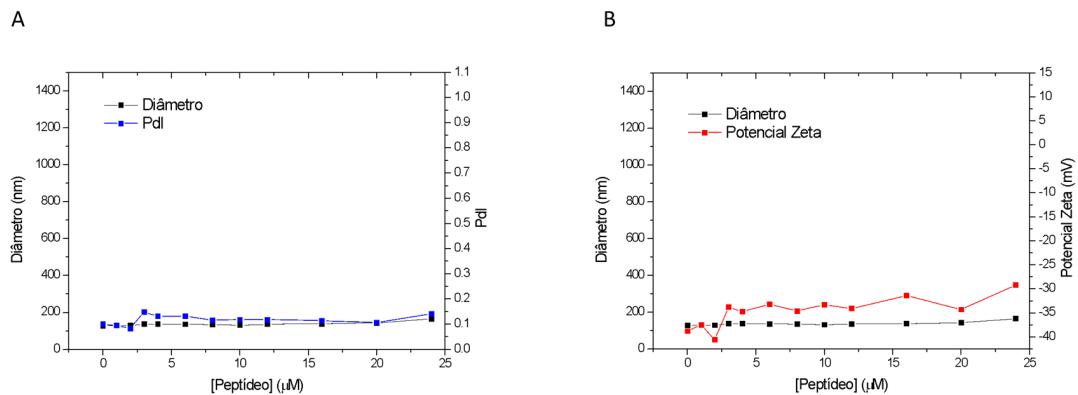


Figura 21. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Gram-positiva em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Gram-positiva em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. [Lipídio] = 100 μ M.

As LUV mimetizando bactérias Gram-negativas também apresentam potencial Zeta negativo, no caso, na faixa de -40 mV. O tamanho médio das LUV é de 137 nm e índice de polidispersidade baixo, de aproximadamente 0,120. A adição dos peptídeos, acima de 6 μ M, causou um aumento no potencial Zeta para valores próximos de zero. Nessa faixa, a repulsão entre as LUV diminui e os lipossomos agregam, fenômeno evidenciado pelo aumento de tamanho e do Pdl.

Enquanto BP100, aparentemente não liga às LUV com potencial Zeta próximo de zero, a adição de Naft-BP100 nas LUV nessa condição causam a inversão do potencial para valores positivos (Figuras 22 e 23).

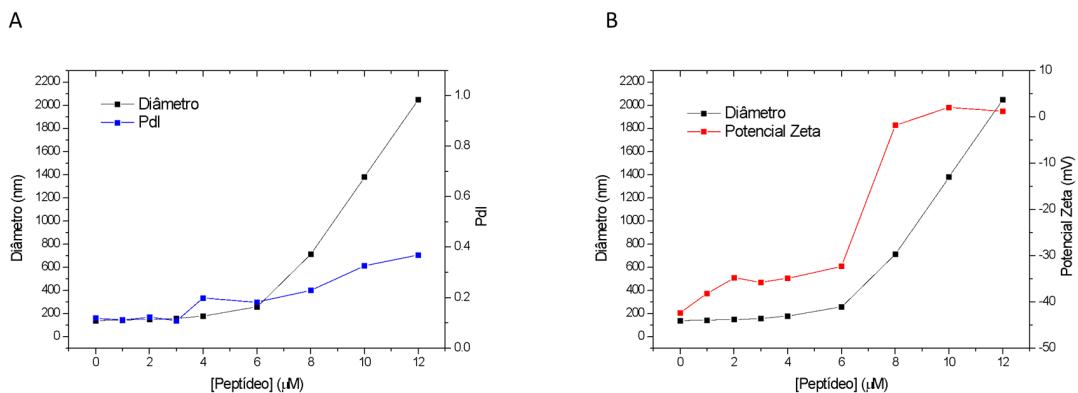


Figura 22. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Gram-negativa em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Gram-negativa em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. [Lipídio] = 100 μ M.

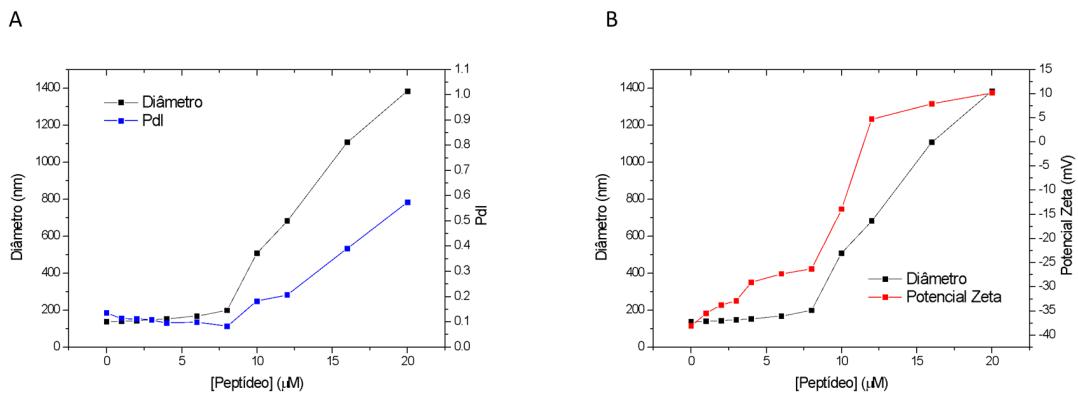


Figura 23. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Gram-negativa em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Gram-negativa em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. [Lipídio] = 100 μ M.

LUV mimetizando eritrócitos, devido à sua composição lipídica, apresentam potencial Zeta próximo de -10 mV. Quando extrusadas, apresentam tamanho médio de 141 nm e Pdl de 0,088. A adição de BP100, acima de 10 μ M, causa um aumento do potencial Zeta para valores mais próximos de zero, seguido de agregação das LUV. A alta concentração de BP100 necessária para alterar as LUV indica, e confirma, a baixa interação peptídeo-membrana (Figura 24). Naft-BP100, em concentrações de 1 μ M, foi capaz de ligar-se às LUV, neutralizar a superfície da bicamada, gerando um aumento de tamanho. Naft-BP100 ligou-se, invertendo o potencial Zeta para valores positivos, desagregando as LUV (Figura 25).

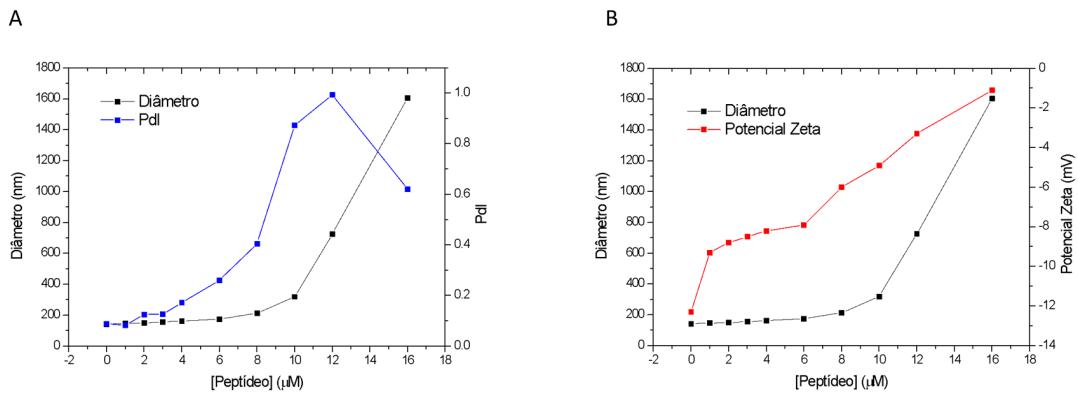


Figura 24. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Eritrócitos em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Eritrócitos em solução e na presença de diferentes concentrações de BP100. [Lipídio] = 100 μ M.

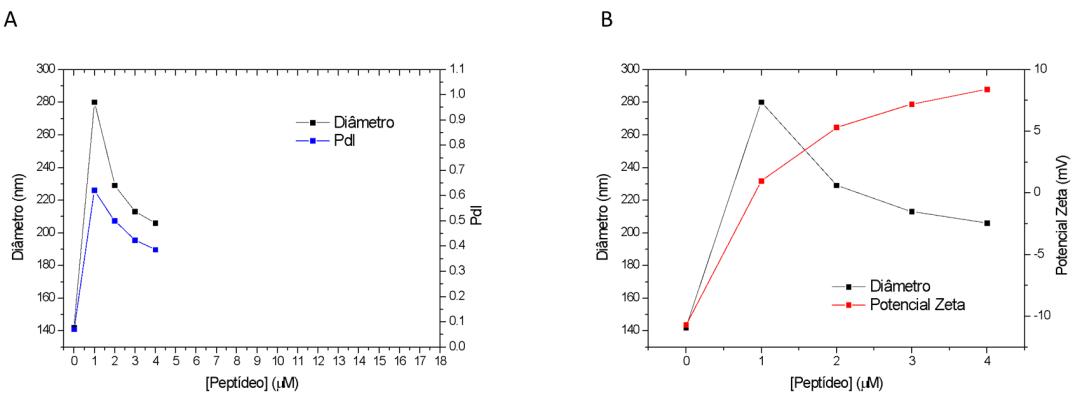


Figura 25. (A) Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl de LUV de Eritrócitos em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. (B) Diâmetro hidrodinâmico médio e Potencial Zeta de LUV de Eritrócitos em solução e na presença de diferentes concentrações de Naft-BP100. [Lipídio] = 100 μ M.

4.5 Ensaio de permeabilização de membrana modelo com carboxifluoresceína

Utilizando a carboxifluoresceína como sonda, estudamos a permeabilização das LUV contendo este fluoróforo encapsulado. Em alta concentração dentro dos lipossomos, a CF auto-suprime sua fluorescência. A permeabilização dos lipossomos pelos peptídeos causa o vazamento da sonda, sua diluição no meio aquoso e aumento da intensidade de emissão de fluorescência.

Ambos os peptídeos ligaram-se e permeabilizaram as LUV de Gram-positivas com alta eficiência (Figura 26). As C_{50} foram de 2,63 e 1,70 para BP100 e Naft-BP100, respectivamente (Tabela 4); essas C_{50} correspondem a uma relação lipídio/peptídeo de aproximadamente 10.

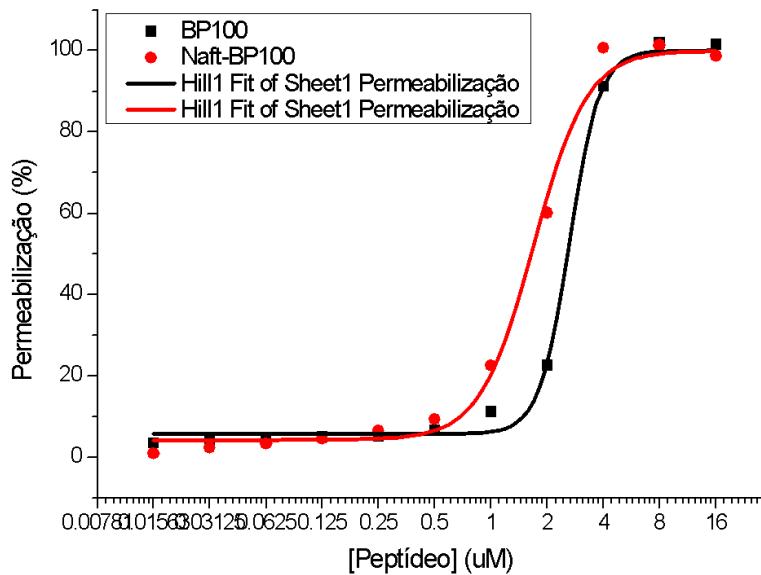


Figura 26. Gráfico de porcentagem de LUVs miméticas de Gram-positivas permeabilizadas por concentração de peptídeo BP100 (preto) e Naft-BP100 (vermelho).

Em LUVs mimetizando a membrana de bactérias Gram-negativas, Naft-BP100, assim como para Gram-positivas, manteve-se eficiente ($C_{50} = 1,26 \mu\text{M}$) e BP100 demonstrou menor eficiência ($C_{50} = 11 \mu\text{M}$) (Figura 27, Tabela 3).

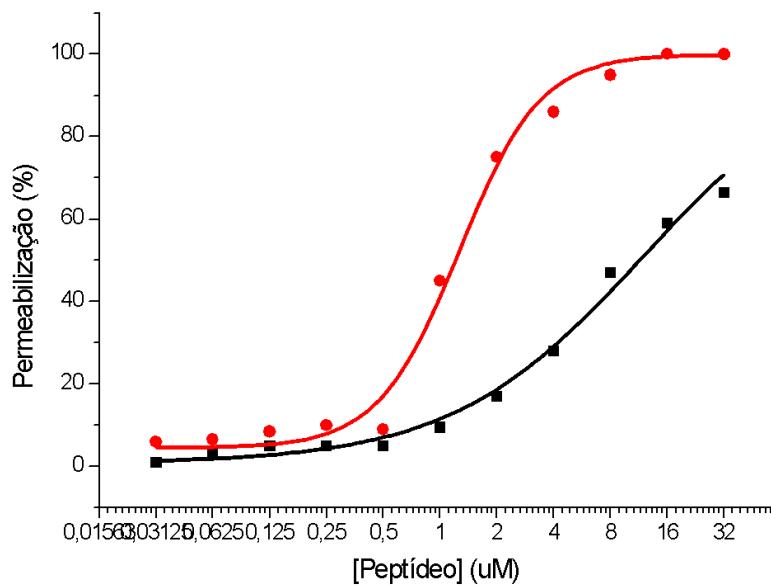


Figura 27. Gráfico de porcentagem de LUVs miméticas de Gram-negativas permeabilizadas por concentração de peptídeo BP100 (preto) e Naft-BP100 (vermelho).

Enquanto Naft-BP100 manteve-se eficiente em permeabilizar LUV mimetizando a membrana de eritrócitos ($C_{50} = 0,55 \mu\text{M}$), BP100 demonstrou baixa eficiência de atividade contra esse modelo ($C_{50} = 72 \mu\text{M}$, valor projetado pelo ajuste da equação de Hill) (Figura 28, tabela 3). Nesse caso, uma menor atividade é desejada no sentido que, para este modelo de membrana, a atividade se correlacionaria à toxicidade dos peptídeos.

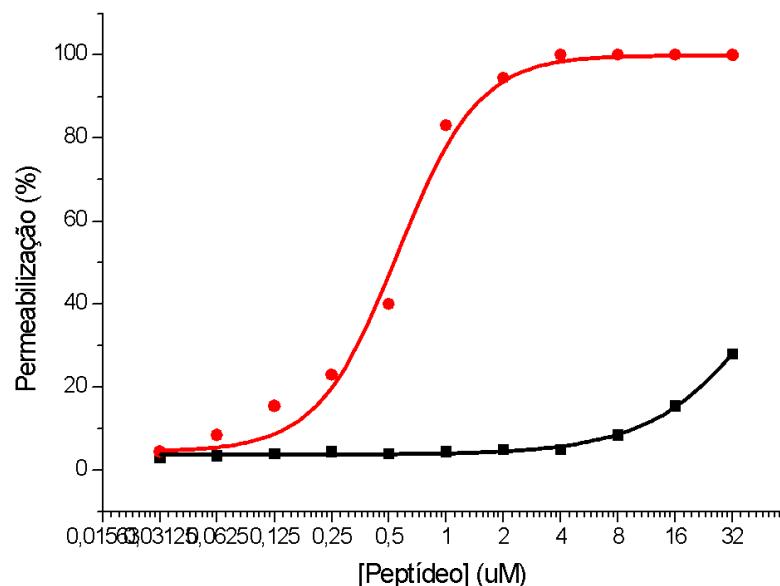


Figura 28. Gráfico de porcentagem de LUVs miméticas de eritrócitos permeabilizadas por concentração de peptídeo BP100 (preto) e Naft-BP100 (vermelho).

| | Gram-positiva | | Gram-negativa | | Eritróцитos | |
|------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| | C_{50} | n | C_{50} | n | C_{50} | n |
| BP100 | 2,63 μM | 5,4 | 11 μM | 0,9 | 72 μM^* | 1,3 |
| Naft-BP100 | 1,70 μM | 3,1 | 1,26 μM | 2,0 | 0,55 μM | 2,1 |

Tabela 4. Tabela comparativa entre as L/P_{50} e coeficientes de cooperatividade (n) dos peptídeos e as respectivas vesículas miméticas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e eritrócitos. * Valor projetado pelo ajuste da equação.

Dessa forma, é possível comparar a ação do BP100 com Naft-BP100. As evidências mostram que os resíduos adicionais de alanina e naftalimida aumentaram a eficácia de permeabilização do Naft-BP100 e diminuíram a dependência do conteúdo de POPG e TOCL para ligação e permeabilização.

5. DISCUSSÃO

O estudo de peptídeos antimicrobianos, em especial do BP100 e seus análogos, é de grande interesse e demonstra potencial para o futuro dos tratamentos contra infecções bacterianas. Assim, a comparação entre o Naft-BP100 e o próprio BP100 serve como direcionamento para futuros análogos e estudos sobre o tema. No presente trabalho, a interação do Naft-BP100 foi extensivamente estudada utilizando técnicas de fluorescência, dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico, permitindo a comparação com o BP100, um peptídeo mais conhecido e utilizado como referência no estudo das modificações propostas.

A estrutura de ambos os peptídeos quando em solução mostrou-se essencialmente randômica, enquanto as formas ligadas às membranas, adotam uma conformação em α -hélice assim como prevista pelo software PEPFOLD (Figuras 2 a 5) e confirmadas pelos espectros de CD (Figuras 19 e 20).

Os estudos *in silico* indicam uma baixa influência do segmento Naft-AA na estrutura secundária do segmento que contém a sequência do BP100, uma vez que, nos dois peptídeos, este apresenta comportamento semelhante. A adição do segmento Naft-AA, como observado no modelo tridimensional de Naft-BP100, também não altera a anfipaticidade espacial da hélice adotada pelo peptídeo, característica fundamental para ação de peptídeos que atuam em membranas.

Tais estruturas adotadas pelos peptídeos são compatíveis com o modo de ação proposto na literatura (Mihajlovic & Lazaridis, 2010, Oren & Shai, 1998 e Bechinger & Lohner, 2006) que indica que a interação entre os AMPs e as LUVs se dá em primeiro momento pelas interações eletrostáticas entre os lipídios POPG ou TOCL negativamente carregados e os resíduos de lisina com cargas positivas presentes nas cadeias laterais dos peptídeos. Em seguida, os AMPs adquirem as conformações anfipáticas permitindo a interação via poro toroidal, "Barrel-stave" ou carpete (Figura 1).

A afinidade entre os peptídeos e as vesículas foi medida a partir dos espectros de emissão de fluorescência de seus respectivos fluoróforos. Assim, correlacionando a proporção lipídio/peptídeo com a fração de peptídeo ligada,

assumindo um equilíbrio entre as populações livre e ligada, foi possível a comparação entre eles apesar dos diferentes comportamento dos fluoróforos.

BP100 interagiu e permeabilizou as membranas modelo de forma dependente o conteúdo de lipídios negativos na membrana, demonstrou maior efeito contra membranas de Gram-positivas, efeito intermediário contra membranas Gram-negativas, e baixo efeito contra miméticos de eritrócitos. Para os três diferentes modelos, no caso de BP100, os estudos de ligação correlacionam com os ensaios de atividade de forma muito satisfatória.

Naft-BP100 interagiu e permeabilizou com alta eficiência os três modelos de membranas estudados. Nesse caso, a carga da superfície das membranas não parece determinar a extensão da ação permeabilizante de Naft-BP100, embora determine a afinidade entre peptídeo e membrana como medido nos ensaios de fluorescência.

Os estudos de DLS mostraram menor efeito dos peptídeos em LUV de Gram-positivas, provavelmente devido ao fato dessas membranas, compostas somente por lipídios de carga negativa, manterem um potencial Zeta suficientemente negativo ao longo da titulação com os peptídeos catiônicos.

As membranas mimetizando bactérias Gram-negativas, compostas por 30 mol% de lipídios negativos, a certas relações lipídio/peptídeo, têm suas cargas negativas totalmente neutralizadas, diminuindo a repulsão entre as vesículas e causando agregação, indicada pelo aumento do diâmetro médio e do Pdl.

Os resultados de DLS das membranas mimetizando eritrócitos confirmam a baixa interação e efeito de BP100 sobre essas membranas, além de indicar a considerável extensão de ligação e efeito de Naft-BP100 nesse modelo.

Em comparação com os estudos de MIC e de hemólise publicados para os peptídeos BP100 e Naft-BP100 (Tabela 5, Carretero *et al.*, 2021), os estudos utilizando membranas modelo mimetizando a composição lipídica de membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e eritrócitos humanos foram capazes de indicar a forma e extensão dos efeitos em concordância com os ensaios com as respectivas células.

Ambos os peptídeos interagem e permeabilizam membranas modelo mimetizando as composição lipídica de membranas bacterianas. Assim como

nos ensaios de MIC (Carretero *et al.*, 2021), o Naft-BP100 mostrou maior atividade. Também foi possível correlacionar a atividade/toxicidade contra modelos de membrana mimetizando a composição lipídica de eritrócitos e ensaios com hemácias; nesse caso, BP100 demonstra baixa ligação e permeabilização das membranas assim como uma baixa extensão de hemólise no ensaio com células. Naft-BP100, por outro lado, liga-se e permeabiliza as membranas modelo assim como é capaz de agir sobre as hemácias (Tabela 5).

| | BP100 | Naft-BP100 |
|-------------------------------|-------|------------|
| C ₅₀ Hemólise (μM) | 163* | 23 |
| MIC (μM): | | |
| <i>E. coli</i> | 2 | 1 |
| <i>S. aureus</i> | 2 | 1 |
| <i>B. subtilis</i> | 2 | 1 |

Tabela 5. Valores de MIC e C₅₀ de hemólise dos peptídeos BP100 e Naft-BP100. Adaptado de Carretero *et al.*, 2021. *Valor projetado pelo ajuste da equação de Hill.

Buscando a segurança para o uso e baixa toxicidade, candidatos à antibióticos cuja ação se dá pela interação com lipídios de membrana devem ter especificidade para com células de bactérias Gram-positivas e negativas em detrimento de células humanas, principalmente para aqueles visados para uso sistêmico (STEINBUCH, FRIDMAN, 2016). Assim, busca-se baixa afinidade com as LUVs miméticas de eritrócitos aqui representados como um dos tipos celulares que teriam potencial para serem alvos de AMPs. Segundo os dados obtidos, ambos os peptídeos demonstraram afinidade muito baixa a tais membranas distantes de potenciais faixas terapêuticas, embora Naft-BP100 permeabiliza LUV de eritrócitos com considerável eficiência. (Tabela 2).

6. CONCLUSÃO

Como demonstrado, as técnicas *in silico* de predição de estrutura secundária se mostraram adequadas estudos da conformação de BP100 e

Naft-BP100. Os dados obtidos informaram a predominância da estrutura helicoidal evidenciando o caráter anfipático desses AMPs. Tais previsões foram confirmadas nos estudos de dicroísmo circular, em que ambos apresentaram-se com estruturas randômicas quando livres em solução e em α -hélice quando ligados a qualquer uma das LUV contendo lipídios com carga negativa, mimetizando membranas bacterianas.

Essa estrutura secundária anfipática é fundamental para a atividade de permeabilização das LUVs, estudada nos experimentos de vazamento de CF. Comparativamente, o Naft-BP100 se mostrou mais ativo que o BP100, levando à maior porcentagem de permeabilização por concentração de peptídeo em todos os casos.

Foi possível estabelecer uma boa correlação entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas e formas de análise da interação peptídeo-membrana. Ainda, o uso de lipossomos mimetizando a composição lipídica de membranas biológicas de interesse apresentou resultados em concordância com dados já publicados da ação desses peptídeos em ensaios biológicos de determinação das MIC e de hemólise. Esse paralelo entre estudos com lipossomos e células valida tal proposta de estudos biofísicos em sistemas miméticos de menor complexidade e permite extrapolar determinadas observações para outras condições de estudo.

Por fim, a partir dos dados obtidos, conclui-se que a adição dos resíduos de alanina e da naftalimida no peptídeo BP100 não altera a conformação helicoidal de interação do peptídeo com as membranas e mantém sua atividade, avaliada por experimentos de ligação e permeabilização. O mesmo também leva a um aumento da afinidade dos AMPs para com as membranas, diminuindo a dependência de lipídios negativos. Embora tenha demonstrado maior atividade contra modelos de eritrócitos, a maior ligação e atividade de Naft-BP100 em modelos de células bacterianas indica que a modificação proposta possa ser vantajosa para o desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos contra bactérias Gram-positivas e negativas e outras alternativas de aplicação possam ser consideradas, como por exemplo, o uso tópico.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, C.S., MELO, M.N., FRANQUELIM, H.G., PLANAS, R.M., FELIU, L., BARDAJI, E., KOWASLCZYK, W., ANDREU, D., SANTOS, N.C., FERNANDES, M.X., CASTANHO, M.A.R.B. *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR, **J. Biol. Chem.**, 2010 285: 27536–27544.
- ANDERSSON, B.S., BERAN, M., BAKIC, M., SILBERMAN, L.E., NEWMAN, R.A., ZWELLING, L.A., In vitro toxicity and DNA cleaving capacity of benzisoquinolinedione (nafidimide; NSC 308847) in human leukemia. **Cancer Res.** 1987 47: 1040-1044.
- BADOSA E., FERRE R., PLANAS M., FELIU L., BESALU E., CABREFIGA J., BARDAJÍ E., MONTESINOS E., A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria, **Peptides** 2007 28: 2276–2285.
- BARDAJÍ, E., MONTESINOS, E., BADOSA, E., FELIU, L., PLANAS, M., FERRE, R. Antimicrobial linear peptides. **Oficina Española de Patentes y Marcas.** 2006 P200601098
- BECHINGER, B., LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta** 2006 1758: 1529–1539.
- BRAÑA, M.F., RAMOS, A., Naphthalimides as Anticancer Agents: Synthesis and Biological Activity, **Curr. Med. Chem.** 2001 1:237-255.
- CARRETERO, G.P.B., SARAIVA, G.K.V., CAUZ, A.C.G., RODRIGUES, M.A., KIYOTA, S., RISKE, K.A., DOS SANTOS, A.A., PINATTO-BOTELHO, M.F., BEMQUERER, M.P., GUEIROS-FILHO, F.J., CHAIMOVICH, H., SCHREIER, S., CUCCOVIA, I.M. Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide, **Biochim. Biophys. Acta**, 2018 1860(8):1502-1516.
- CARRETERO, G.P.B., VICENTE, E.F., CILLI, E.M., ALVAREZ, C.M., JENSSSEN, H., SCHREIER, S. Dissecting the mechanism of action of actinoporins. Role of the N-terminal amphipathic α -helix in membrane binding and pore activity of sticholysins I and II. **PLoS One** 2018 13(8): e0202981.
- CARRETERO, G.P.B., SARAIVA, G.K.V., RODRIGUES, M.A., KIYOTA, S., BEMQUERER, M.P., CHAIMOVICH, H., CUCCOVIA, I.M.. Naphthalimide-Containing BP100 Leads to Higher Model Membranes Interactions and Antimicrobial Activity. **Biomolecules**, 2021 11(4), 542.

CAUZ, A.C.G., CARRETERO, G.P.B., SARAIVA, G.K.V., PARK, P., MORTARA, L., CUCCOVIA, I.M., BROCCHI, M., GUEIROS-FILHO, F.J. Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria. **ACS Infect Dis.** 2019 12;5(4): 539-549.

CHILEVERU, H.R., LIM, S.A., CHAIRATANA, P., WOMMACK, A.J., CHIANG, I.L., NOLAN, E.M. Visualizing attack of Escherichia coli by the antimicrobial peptide human defensin 5. **Biochemistry**, 2015 10;54(9):1767-77.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T., SILVA, L.R.B.F., MONFARDINI, L.P.A., CUNHA, A.K.B., RADY, P., ALVES, T., ROSAS, R. 2007. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology and predictors of mortality. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 2007 28(5):570-6.

DUBOS, R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: I. preparation of the agent. Its activity in vitro. **J. Exp. Med.**, 1939 70: 1–10.

EPAND, R.M.; EPAND, R.F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **Journal of Peptide Science**, 2010 17(5): 298-305.

FARKUH, L., HENNIES, P.T., NUNES, C., REIS, S., BARREIROS, L., SEGUNDO, M.A., OSELIERO FILHO, P.L., OLIVEIRA, C.L.P., CASSAGO, A., PORTUGAL, R.V., MURAMOTO, R.A., CARRETERO, G.P.B., SCHREIER, S., CHAIMOVICH, H., CUCCOVIA, I.M. Characterization of phospholipid vesicles containing lauric acid: physicochemical basis for process and product development. **Heliyon** 2019 10: e02648.

FERRE R., MELO M.N., CORREIA A.D., FELIU L., BARDAJÍ E., PLANAS M., CASTANHO M., Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100, **Biophys. J.** 2009 96: 1815–1827.

GOLDFINE, H. Bacterial membranes and lipid packing theory. **Journal of Lipid Research**, 1984 25(13): 1501-1507

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, 1997 349(9049): 418–422.

HANEY, E.F., NGUYEN, L.T., SCHIBLI, D.J., VOGEL, H.J. Design of a novel tryptophan-rich membrane-active antimicrobial peptide from the membrane-proximal region of the HIV glycoprotein, gp41. **Beilstein J Org Chem.**, 2012 8: 1172-84.

HOLLMANN, A.; MARTINEZ, M.; MATORANA, P.; SEMORILE, K.C.; MAFFIA, P.C. Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes And Synergism With Chemical Antibiotics. **Frontiers in Chemistry**, 2018 6 (204)

INGRASSIA, L., LEFRANC, F., KISS, R., MIJATOVIC, T., Naphthalimides and Azonafides as Promising Anti-Cancer Agents, **Curr. Med. Chem.** 2009 10: 1192-1213.

KANG, H.K., KIM, C., SEO, C.H., PARK, Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **J Microbiol**, 2017 55(1):1-12.

KILLIAN J.A., VON HEIJNE G., How proteins adapt to a membrane-water interface, **Trends Biochem Sci.** 2000 25: 429–434.

LV M., XU H., Overview of Naphthalimide Analogs as Anticancer Agents, **Curr. Med. Chem.** 2009 16: 4797-4813.

MANZINI M.C., PEREZ K.R., RISKE K.A., BOZELLI JR. J.C., SANTOS T.L., DA SILVA M.A., SARAIVA G.K., POLITI M.J., VALENTE A.P., ALMEIDA F.C., CHAIMOVICH H., RODRIGUES M.A., BEMQUERER M.P., SCHREIER S., CUCCOVIA I.M., 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.

MARTIN, E., GANZ, T., LEHRER, R.I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. **J. Leukoc. Biol.**, 1995 58(2): 128–136.

MATTILA, J.-P., SABATINI, K., KINNUNEN, P. K. J. Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, 2008 1778(10): 2041–2050.

MIHAJLOVIC, M., LAZARIDIS, T. Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. **Biochim. Biophys. Acta** 2010 1798: 1494–1502.

MISIEWICZ, J.; AFONIN, S.; GRAGE, S.L.; BERG, J.V.D.; STRANDBERG, E.; WADHWANI, P.; ULRICH, A.S. Action of the multifunctional peptide BP100 on native biomembranes examined by solid-state NMR. **J. Biomol.** 2015 61: 287–298.

MOJSOSKA, B., CARRETERO, G., LARSEN, S., MATEIU, R.V., JENSSSEN, H. Peptoids successfully inhibit the growth of gram negative *E. coli* causing substantial membrane damage. **Sci. Rep.** 2017 7: e42332.

OREN, Z., SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Peptide Sci.** 1998 47: 451–463.

PARK, P.; FRANCO, L.R.; CHAIMOVICH, H.; COUTINHO, K.; CUCCOVIA, I.M.; LIMA, F.S. Binding and Flip as Initial Steps for BP-100 Antimicrobial Actions. **Sci. Rep.** 2019, 9, 8622.

ROS, U., CARRETERO, G.P.B., PAULINO, J., CRUSCA, E JR, PAZOS, F., CILLI, E.M., LANIO, M.E., SCHREIER, S., ALVAREZ, C. Self-association and folding in membrane determine the mode of action of peptides from the lytic segment of sticholysins. **Biochimie** 2019 156: 109-117.

ROUSER, G., FLEICHER, S., YAMAMOTO A., Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots, **Lipids** 1970 5: 494–496.

DE SOUZA, V.V., CARRETERO, G.B.P., VITALE, P.A.M., TODESCHINI, I., KOTANI, P.O., SARAIVA, G.K.V., GUZZO, C.R., CHAIMOVICH, H., FLORENZANO, F.H., CUCCOVIA, I.M. Stimuli-responsive polymersomes of poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]-b-polystyrene. **Polym. Bull.** 2021 79: 785–805.

STEINBUCH, K.B., FRIDMAN, M. Mechanisms of resistance to membrane-disrupting antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Med. Chem. Commun.**, 2016 7(1): 86–102.

TORCATO I.M., HUANG Y., FRANQUELIM H.G., GASPAR D., CRAIK D.J., CASTANHO M.A.R.B., HENRIQUES S.T., Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, **Biochim. Biophys. Acta** 2013 1828: 944–955.

VIRTANEN, J.A.; CHENG, K.H., SOMERHARJU, P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 1998 95(9): 4964-4969.

WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R.E., Agar and broth dilution methods to determine minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, **Nat. Protoc.** 2008 2: 163–175.

WANG, G. Post-Translational Modifications of Natural Antimicrobial Peptides and Strategies for Peptide Engineering. **Curr. Biotechnol.**, 2012 1(1): 72–79.

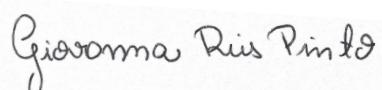
WANG, G. "Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies" (2nd version) **CABI**, England. 2017.

YAN J, WANG K, DANG W, CHEN R, XIE J, ZHANG B, SONG J, WANG R Two Hits Are Better than One: Membrane-Active and DNA Binding-Related Double-Action Mechanism of NK-18, a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013 57(1): p. 220 –228

YAP, M.-N. F. The double life of Antibiotics. **Missouri medicine**, 2013 110(4): 320–324.

ZHANG, B., GU, H., SHI, W., LI, H., MA, G., CHEN, X., QIAN, H., LIN, H., HUANG, W., GE, L. 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 49(11): 1831-1841.

São Paulo, 20 de maio de 2022.



Data e assinatura do aluno(a)

São Paulo, 20 de maio de 2022.



Data e assinatura do orientador(a)