

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CAROLINA SILVA FERREIRA

**ESTUDOS DO MODO DE INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM
MEIOS BIOMIMÉTICOS**

Diamantina, MG

2018

CAROLINA SILVA FERREIRA

**ESTUDOS DO MODO DE INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM
MEIOS BIOMIMÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
Stricto Sensu da Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito
para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly

Coorientador: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado
de Magalhães

Diamantina, MG

2018

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383e

Ferreira, Carolina Silva

Estudos do modo de interação de peptídeos bioativos com meios biomiméticos / Carolina Silva Ferreira, 2018.

107 p. : il.

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

Coorientadora: Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Peptídeos. 2. Antimicrobianos. 3. Schistocina-2. 4. Fenilseptina.
I. Verly, Rodrigo Moreira. II. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 540


CAROLINA SILVA FERREIRA

**ESTUDOS DO MODO DE INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS COM
MEIOS BIOMIMÉTICOS**

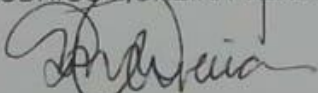
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM QUÍMICA, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA
EM QUÍMICA

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo
Moreira Verly

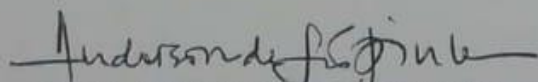
Data da aprovação : 14/12/2018



Prof.Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY - UFVJM



Prof.Dr.ª PATRICIA MACHADO DE OLIVEIRA - UFVJM



Prof.Dr. ANDERSON DE SÁ PINHEIRO - UFRJ



Prof.Dr.ª HELEN RODRIGUES MARTINS - UFVJM

*Aos meus pais, Marco e Carla,
e meus irmãos, Hugo e Lucas,
com todo carinho.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** agradeço por iluminar meu caminho e minhas escolhas. Por me dar sabedoria e força nos momentos em que me senti incapaz de prosseguir.

Dedico também essa e todas as outras conquistas da minha vida, aos **meus pais**, que nunca mediram esforços para meus estudos, que sempre me apoiaram em todas as decisões, nunca me deixaram sozinha nos momentos de dificuldades e desespero e que sempre acreditaram em mim e no meu potencial. Meu amor e agradecimento são imensuráveis.

Meus irmãos, **Hugo e Lucas**, que são meus melhores amigos. Neles também sempre encontrei apoio e carinho. Além disso, sempre que solicitei qualquer tipo de ajuda durante meu mestrado, eles não hesitaram em me ajudar.

Ao **Víctor**, pela paciência por todas as vezes que me deixei levar pelo estresse e ansiedade, e pelo incentivo constante. Não posso deixar de agradecer pelo seu companheirismo, até mesmo de subir para o campus aos sábados para me ajudar a preparar vesículas. Obrigada também por tanto carinho dedicado a mim. Você fez tudo ficar mais fácil e agradável.

Quero agradecer também a **todas as amizades** que fiz em Diamantina, que me proporcionaram momentos de descontração e felicidade, também cruciais para que eu tenha chegado até aqui.

Não posso esquecer das “Bojos”, **Lívia, Mainara e Nara**, que foram amigas de trabalho e de vida. Que dividiram comigo os momentos de alegria, mas também os de desespero e frustrações.

O meu muito obrigada a **Márcia** por me ajudar a enfrentar meus medos, escutar minhas dúvidas e receios, por me mostrar uma maneira diferente de enxergar e enfrentar os problemas e, principalmente, por me ajudar a injetar o otimismo em minha vida. Seu acompanhamento e apoio foram essenciais para essa conquista.

Aos **amigos do LASEB**. Eu não poderia querer um ambiente melhor para trabalhar, onde todos se ajudam com boa vontade, trabalham com seriedade, mas também deixam o dia a dia descontraído e divertido. Em especial ao **Kelton e Lúcio**, que mesmo apertados com suas qualificações, me ajudaram muito na análise de RMN.

Aos **mestrandos e professores do departamento de Farmácia** da UFVJM, que sempre me receberam muito bem quando fui realizar os experimentos e pela companhia e conversas nos dias intermináveis no Potencial Zeta.

Agradeço ao **LIPq da UFMG**, Laboratório de Multiusuário de Proteômica (**LMProt**) e a **Adriana Raabe**, técnica, pela disponibilidade dos equipamentos para minhas análises e por todo suporte.

Manifesto aqui também a minha enorme gratidão ao Professor **Victor Munhoz** e a **Talita**, que tanto me ajudaram neste trabalho.

Ao meu orientador, **Rodrigo Verly**, pelo enorme entusiasmo pela pesquisa que contagia qualquer um, por todos os ensinamentos e conselhos, tanto acadêmicos quanto de vida, que com certeza me amadureceram como pesquisadora e como pessoa. Obrigada por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer. Por ser um orientador sempre tão presente e paciente, e que sempre se mostrou amigo de todos nós. Você é um exemplo de profissional pra mim.

Agradeço também a Professora **Mariana Quezado**, da UFMG, minha co-orientadora, que mesmo de longe me deu todo o suporte e orientações necessárias. Também foi um pilar essencial para a realização e conclusão deste trabalho.

“Tudo que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite que isso é possível.”

RESUMO

FERREIRA, C.S. **Estudos do modo de interação de peptídeos bioativos com meios biomiméticos**. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2018.

Os peptídeos bioativos, devido ao amplo espectro de atividade, tem resultado em um aumento significativo nos estudos dessas moléculas, como alternativas estratégicas para enfrentar problemas como a resistência aos antibióticos convencionais. O mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos em grande parte ocorre pela interação com a membrana do microrganismo, causando uma perturbação da organização da bicamada lipídica, podendo ocasionar a lise celular. Entretanto, os detalhes desta interação ainda não são totalmente conhecidos e, portanto, estudos da interação peptídeo-membrana com meios biomiméticos fazem-se necessários. O presente trabalho descreve a síntese e caracterização dos peptídeos antimicrobianos, D-fenilseptina (D-Phes), L-fenilseptina (L-Phes) e um potencial peptídeo bioativo desenhado a partir da sequência primária da proteína SmKI-1, denominado de peptídeo Schistocina-2, para estudos da interação peptídeo-membrana. Assim, foram empregadas como ferramentas principais de investigação a Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), o espalhamento de luz dinâmico (DLS) e medidas de Potencial Zeta. Todos os experimentos foram desenvolvidos em meios que mimetizam os ambientes de membranas, tais como micelas e vesículas fosfolipídicas. Para as fenilseptinas, foi observado que a diferença estereoquímica do segundo resíduo de fenilalanina (F-2) da região *N*-terminal altera a atividade frente a bactérias, sendo a D-Phes mais ativa contra as bactérias testadas. Segundo estudo por RMN, foi identificado que D-Phes possui um maior momento hidrofóbico, sugerindo que, por isso, poderia se inserir mais na superfície da membrana e interagir de maneira mais efetiva do que L-Phes. Esse dado pôde ser confirmado por estudos de ITC, DLS e Potencial Zeta que mostraram também a maior interação de D-Phes em relação ao seu epímero. Além disso, foi comprovado que este peptídeo também possui maior atividade antifúngica e também citotóxica, quando testado em células metastáticas de câncer de mama, com relação a L-Phes. A segunda parte deste trabalho apresenta os estudos realizados com um novo peptídeo, Schistocina-2, desenhado a partir de uma proteína, com o objetivo de obter um novo agente antimicrobiano. As

análises de CD e RMN mostraram que esse peptídeo se estrutura em α -hélice quando em contato com meios miméticos de membrana. Além disso, estudos de ITC, DLS e Potencial Zeta mostraram que a interação de Schistocina-2 é efetiva, perturbando a membrana fosfolipídica e alterando a carga superficial da mesma. Portanto, é apresentado um peptídeo inédito com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Peptídeos; antimicrobianos; interação; membrana; fenilseptina; Schistocina-2; SmKI-1.

ABSTRACT

FERREIRA, C.S. **Studies of the mode of interaction of bioactive peptide with biomimetic media.** Dissertation Stricto Sensu Post-Graduate Program in Chemistry. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2018.

Bioactive peptides, due to the broad spectrum of activity, have resulted in a significant increase in the studies of these molecules as strategic alternatives to tackle problems such as resistance to conventional antibiotics. The mechanism of action of antimicrobial peptides largely occurs through interaction with the membrane of the microorganism, causing a disturbance of the organization of the lipid bilayer, which can lead to cell lysis. However, the details of this interaction are not yet fully understood and, therefore, membrane-peptide interaction studies with biomimetic media are necessary. The present work describes the synthesis and characterization of antimicrobial peptides, D-phenylseptin (D-Phes), L-phenylseptin (L-Phes) and a potential bioactive peptide designed from the primary sequence of the SmKI-1 protein, known as the Schistocine-2 peptide, for studies of membrane-peptide interaction. Thus, we used as main research tools Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Circular Dichroism Spectroscopy (CD), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential Measurements. All experiments were developed in media that mimic membrane environments, such as micelles and phospholipid vesicles. For the phenylseptin, it was observed that the stereochemical difference of the second phenylalanine residue (F-2) of the *N*-terminal region changes the activity against bacteria, being D-Phes more active against the bacteria tested. According to the study by NMR, it was identified that D-Phes has a higher hydrophobic moment, suggesting that, therefore, it could be inserted more on the surface of the membrane and interact more effectively than L-Phes. This data could be confirmed by studies of ITC, DLS and Potential Zeta that also showed the greater interaction of D-Phes with respect to its epimer. In addition, it has been proven that this peptide also has higher antifungal and also cytotoxic activity, when tested in metastatic breast cancer cells, in relation to L-Phes. The second part of this work presents the studies carried out with a new peptide, Schistocin-2, designed from a protein, with the aim of obtaining a new antimicrobial agent. CD and NMR analyzes showed that this peptide is α -helix-structured when in contact with membrane mimetic media. In addition, studies of ITC, DLS and Potential

Zeta showed that the interaction of Schistocin-2 is effective, disturbing the phospholipid membrane and altering the surface charge of the same. Therefore, an unpublished peptide with biotechnological potential is presented.

Key words: Peptides; antimicrobial; interaction; membrane; phenylseptin; Schistocin-2; SmKI-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico de discos da distribuição em função da atividade biológica de peptídeos isolados de fontes naturais (total 2983) depositados APD.....	19
Figura 2: Estruturas secundárias mais comuns dos peptídeos. (A) a magainina em α -hélice, (B) a defensina humana em β -folha e (C) indolicidina desenovelada.....	21
Figura 3: Possibilidades de orientações da interação inicial do peptídeo com a bicamada fosfolipídica: paralela, em diagonal ou perpendicular à superfície.....	24
Figura 4: Esquema de três modelos de interação peptídeo-membrana propostos na literatura. Modelo Barril, poro-toroidal e tapete.....	25
Figura 5: Espectro modelo para a análise de diferentes estruturas dos peptídeos em meios biomiméticos de membrana.....	28
Figura 6: Esquema representativo dos sistemas de spin com os respectivos deslocamentos químicos para os resíduos de aminoácidos.....	32
Figura 7: Representação dos NOE de estrutura secundária em α -hélice. Possíveis correlações intraresiduais (A) e interresiduais (B) de núcleos de hidrogênio.....	33
Figura 8: Representação em fita das estruturas de menor energia em presença de misturas de SDS-d25 dos peptídeos: (A) Ocellatina-PIG16 e (B) Hyliina.....	34
Figura 9: Estrutura química dos ativadores do grupo carboxila. DIC (A) e HOBt (B), DCM (C), IPA (D) e DMF (E).....	37
Figura 10: Esquema representativo do Teste de Kaiser	38
Figura 11: Estrutura química da resina polimérica utilizada na SPFS, via estratégia Fmoc. Resina Rink Amide.....	39
Figura 12: Esquema do princípio da SPFS via estratégia Fmoc.....	40
Figura 13: Mecanismo de remoção do grupo amino protetor Fmoc.....	41
Figura 14: Estrutura química dos fosfolipídios utilizados para o preparo de vesículas unilamelares e suas respectivas massas molares. (A) POPC e (B) POPG.....	43
Figura 15: Esquema da preparação de vesículas unilamelares (LUV).....	44
Figura 16: Estrutura química do DPC e a massa molar correspondente.....	45
Figura 17: Estrutura química do SDS e a massa molar correspondente.....	46
Figura 18: Imagem do anuro da espécie <i>Hypsiboas punctatus</i> (à esquerda), sequências primárias dos epímeros da fenilseptina (à direita) e representação estrutural dos	

enantiômeros da fenilalanina.....	51
Figura 19: Sobreposição das estruturas de menor energia das fenilseptinas em 60% TFE.....	52
Figura 20: Alinhamentos possíveis para L-Phes (A) e D-Phes (B).....	53
Figura 21: Perfil cromatográfico das amostras brutas do peptídeo fenilseptina. (A) D-Phes e (B) L-Phes.....	56
Figura 22: Ionograma da amostra bruta dos peptídeos fenilseptina. (A) D-Phes e (B) L-Phes.....	57
Figura 23: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de DPC. (A) D-Phes e (B) L-Phes.....	58
Figura 24: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de POPC:POPG. (A) D-Phes e (B) L-Phes.....	58
Figura 25: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de POPC. (A) D-Phes e (B) L-Phes.....	59
Figura 26: Isotermas de fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica para D-phes.....	61
Figura 27: Gráfico de fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica para L-Phes.....	63
Figura 28: Gráfico da variação do diâmetro hidrodinâmico de LUV de POPC e POPC:POPG (500 μ M) para a titulação de D-Phes. (A e B) e L-Phes (C e D).....	66
Figura 29: Gráficos da variação do potencial Zeta de LUV de POPC e POPC:POPG (500 μ M) para a titulação de D-Phes (A e B) e L-Phes (C e D).....	68
Figura 30: Foto retirada do ensaio de MTT realizado no Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX) no ICB da UFMG para os peptídeos D-Phes e L-Phes.....	70
Figura 31: Avaliação do efeito citotóxico nas células MDA-MB-231 dos peptídeos D-Phes e L-Phes em diferentes concentrações, após 60 minutos.....	71
Figura 32: Sequência primária da proteína SmKI-1 e representação esquemática dos domínios da proteína SmKI-1, mostrando o domínio <i>Kunitz</i> com as três ligações dissulfeto.....	74
Figura 33: Sequência primária da proteína SmKI-1 e em azul a sequência primária do peptídeo Schistocina-2 destacado na proteína.....	75
Figura 34: Similaridade da sequência de Schistocina-2 com o banco de dados de peptídeos e aminoácidos.....	76

Figura 35: Perfil cromatográfico da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2.....	79
Figura 36: Espectro de massa da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2.....	79
Figura 37: Espectro de CD da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2 em POPC:POPG e micelas de SDS.....	80
Figura 38: Fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica.....	82
Figura 39: Resultados obtidos do estudo de Potencial Zeta da titulação do peptídeo Schistocina-2 em vesículas de (A)POPC e (B) POPC:POPG.....	84
Figura 40: Resultados obtidos do estudo de Espalhamento de Luz Dinâmico da titulação do peptídeo Schistocina-2 em vesículas de (A)POPC e (B)POPC:POPG.....	85
Figura 41: Ampliação da região amídica dos espectros unidimensionais ¹ H em SDS-d25 (200 mM) do peptídeo Schistocina-2.....	86
Figura 42: Ampliação da região amídica do mapa de contorno ¹ H ¹ H-TOCSY (500 MHz) de Schistocina-2.....	87
Figura 43: Ampliação do mapa de contorno NOESY da região de interações intraresiduais do tipo $d_{NV}(i,i+1)$ e $d_{NV}(i,i+2)$	89
Figura 44: Ampliação da região amídica do mapa de contorno NOESY (500 MHz) de Schistocina-2.....	90
Figura 45: Estrutura de menor energia obtida por RMN na presença de micelas de SDS-d25 para o peptídeo Schistocina-2.....	91
Figura 46: Sobreposição das 10 estruturas de menor energia calculadas para o peptídeo Schistocina-2 em micelas de SDS-d25. Em A a vista lateral da sobreposição das estruturas, e em B a vista frontal.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo D-fenilseptina.....	54
Tabela 2: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo L-fenilseptina	55
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em D-Phes (24 µM) a 25 °C	61
Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em L-Phes (24 µM) a 25 °C	63
Tabela 5: Valores da concentração inibitória mínima para diferentes espécies de <i>Candida spp.</i> no tratamento com D-Phes e L-Phes	72
Tabela 6: Estudo de similaridade de peptídeos bioativos, já publicados no banco de dados, com o peptídeo em estudo Schistocina-2.....	77
Tabela 7: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo Schistocina-2	78
Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em Schistocina-2 (150 µM) a 25 °C	82

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ACN	Acetonitrila
APD	<i>Antimicrobial Peptide Database</i>
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CHCA	alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima, do inglês <i>Minimal inhibitory concentration</i> (MIC)
COSY	espectroscopia de correlação, do inglês <i>correlation spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico, em inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPC	dodecilfosfocolina
EM	Espectrometria de massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
eV	elétron-volt
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
H	Porcentagem de hélice ou teor de helicidade
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HOBt	1- hidroxibenzotriazol
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPA	álcool isopropílico
ITC	Titulação Calorimétrica Isotérmica, do inglês <i>Isothermal calorimetric titration</i>
KCN	cianeto de potássio
LPS	lipopolisacarídeo
LUV	vesículas grandes unilamelares, do inglês <i>large unilamellar vesicles</i>
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltriazol-2il)-2,5-difenil] tetrazólio

m/z	Razão entre a massa e carga
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser spectroscopy</i>
PAM	Peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i>
PIPE	4-metilpiperidina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-fosfoetanolamina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
PS	fosfatidilserina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPFS	Síntese de peptídeo em fase sólida
TBI	<i>Triple resonance broadband inverse</i>
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropilsilano
t _r	tempo de retenção
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
ToF	Tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
Tris	tris-hidroxiaminometilmetano

LISTA DE SÍMBOLOS

θ Eipticidade molar

ζ Potencial Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Peptídeos antimicrobianos	19
2.2 Relação estrutura e atividade antimicrobiana e mecanismos de ação	22
2.3 Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)	26
2.4 Dicroísmo Circular (CD)	27
2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)	29
2.6 Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)	30
2.7 Estudos da estrutura e modo de interação do peptídeo com meios miméticos de membrana	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Síntese dos peptídeos D-Phes, L-Phes e Schistocina-2	36
3.2 Teste de Kaiser	37
3.3 Preparação da resina para SPFS	38
3.4 Etapa de acoplamento	39
3.5 Etapa de desproteção	41
3.6 Reação de clivagem do peptídeo	42
3.7 Purificação dos Peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	42
3.8 Caracterização por Espectrometria de Massa	42
3.9 Preparação de LUV	43
3.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	44
3.11 Dicroísmo Circular (CD)	45
3.12 Espalhamento de Luz (DLS) e potencial Zeta(ζ)	45
3.13 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
3.14 Ensaio biológicos	48
3.14.1 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais	48
3.14.2 Atividade antifúngica	49
CAPÍTULO 1	
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

4.2.1 Síntese e caracterização dos peptídeos D-Phes e L-Phes	54
4.2.2 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular	58
4.2.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica	60
4.2.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)	65
4.2.5 Ensaio biológicos	69
4.2.5.1 Ensaio de viabilidade celular	70
4.2.5.2 Atividade antifúngica	72

CAPÍTULO 2

5.1 INTRODUÇÃO	74
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.2.1 Schistocina-2	75
5.2.2 Síntese e caracterização do peptídeo Schistocina-2	77
5.2.3 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular do peptídeo Schistocina-2	80
5.2.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	81
5.2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)	83
5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)	86
CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

O interesse no estudo de peptídeos bioativos tem aumentado ao longo dos anos, principalmente devido ao seu amplo espectro de atividade (antibiótico, anti-inflamatório, antiviral, antitumoral, imunomodulatório, entre outros) contra patógenos (ex. bactérias, fungos, vírus etc.). Além disso, esses compostos, em grande parte, apresentam mecanismos de ação direta na membrana de microorganismos, mostrando-se menos propensos ao desenvolvimento de resistência (SATO & FEIX, 2006). Devido aos problemas crescentes de risco da saúde humana relacionados à resistência a antibióticos convencionais (WORLD ECONOMIC FORUM, 2018) surge a necessidade do desenvolvimento de novos compostos ativos, menos propensos ao desenvolvimento de resistência. Com isso, os peptídeos antimicrobianos se tornaram uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas drogas que utilizam moléculas biologicamente ativas (LEE *et al.*, 2016; FJELL *et al.*, 2012). Estes peptídeos possuem algumas características estruturais em comum como, por exemplo, o caráter catiônico que favorece a interação com as cabeças fosfolipídicas de caráter aniônicas das membranas celulares, dentre outras características como estruturas anfipáticas dos peptídeos. Essa interação causa uma perturbação da bicamada lipídica, podendo levar a lise celular (SATO & FEIX, 2006; CHANG *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2018).

Os antibióticos convencionais atuam em inibições enzimáticas. Já os peptídeos possuem um mecanismo de ação diferente, pois atuam diretamente na membrana, perturbando-a e podendo levar a lise celular. O efeito pode ocorrer rapidamente, apenas alguns minutos após a exposição, o que dificulta o surgimento de resistência dos microorganismos aos peptídeos (TOSSI *et al.*, 1997). A velocidade de ação dos peptídeos na membrana está em contraste com os antibióticos convencionais, que podem demorar dias para ser eficaz (LEE *et al.*, 2016).

Vários modelos para explicar a interação do peptídeo com a membrana já foram propostos na literatura, porém três deles são mais aceitos e comumente utilizados para tentar explicar o modo de ação dos peptídeos na membrana, são eles: (a) barril, (b) poro-toroidal e (c) carpete (KUMAR & SANIL, 2017; SATO & FEIX, 2006; SANDERSON, 2005; LEE *et al.*, 2016). Desta forma, estudos da interação peptídeo-membrana com meios biomiméticos são necessários para auxiliar na interpretação do mecanismo de ação de peptídeos quando na presença das células bacterianas. O desenvolvimento de um novo agente antimicrobiano, potencial antibiótico, exige a

descrição do seu modo de ação para que o mesmo seja biotecnologicamente relevante (FJELL *et al.*, 2012; KOSIKOWSKA & LESNER, 2016; LEE *et al.*, 2016).

Neste sentido, o interesse do nosso grupo de pesquisa reside no entendimento desta interação para o possível desenvolvimento e otimização de moléculas bioativas que possam ser futuramente utilizadas como fármacos. Diante disso, neste trabalho foram propostos os estudos da interação peptídeo-membrana dos peptídeos antimicrobianos D-fenilseptina (D-Phes) e L-fenilseptina (L-Phes), além do peptídeo Schistocina-2, um novo peptídeo, desenhado com base na sequência primária da proteína SmKI-1 (*Kunitz Inhibitor Schistosoma mansoni*). Assim, os resultados deste estudo serão divididos em dois capítulos: (a) capítulo 1, sobre as fenilseptinas, e (b) capítulo 2, sobre a Schistocina-2

No primeiro capítulo, será abordado a síntese e o estudo de interação dos peptídeos epímeros da fenilseptina, (D-Phes) e L-Phes, isolados do anuro *Hypsiboas punctatus*, uma espécie encontrada na América do Sul, descrito por de Magalhães e colaboradores (de MAGALHÃES *et al.*, 2013). Estes peptídeos possuem 18 resíduos de aminoácidos, diferenciando-se apenas no segundo resíduo de fenilalanina da porção *N*-terminal da cadeia peptídica, onde um é a D-fenilalanina e o outro L-fenilalanina. Estudos anteriores demonstraram que a epimerização induz uma alteração na conformação da estrutura de D-Phes em relação a L-Phes, sendo esta característica atribuída a maior atividade antimicrobiana de D-Phes em relação ao seu epímero (de MAGALHÃES *et al.*, 2013). Nesse contexto, estudos termodinâmicos da interação (ITC, DLS e potencial Zeta) foram realizados para investigar aspectos adicionais da relação estrutura-atividade biológica desses epímeros. Além disso, foram realizados ensaios biológicos com linhagens de células tumorais (MDA-MB-231) e a avaliação do potencial antifúngico.

No segundo capítulo, será abordado o estudo do peptídeo Schistocina-2, desenhado a partir do domínio *C*-terminal da proteína SmKI-1, funcionalmente caracterizada como inibidor de protease do tipo *Kunitz* (RANASINGHE, 2015; MORAIS *et al.*, 2018; de MAGALHÃES *et al.*, 2018). Este peptídeo foi sintetizado e análises estruturais em meios miméticos de membrana também foram realizados.

Análises prévias de bioinformática da estrutura primária do Schistocina-2 mostraram uma alta similaridade desta com outros peptídeos bioativos já depositados nos bancos de dados. Isso despertou a atenção e o interesse em sintetizar e estudar este

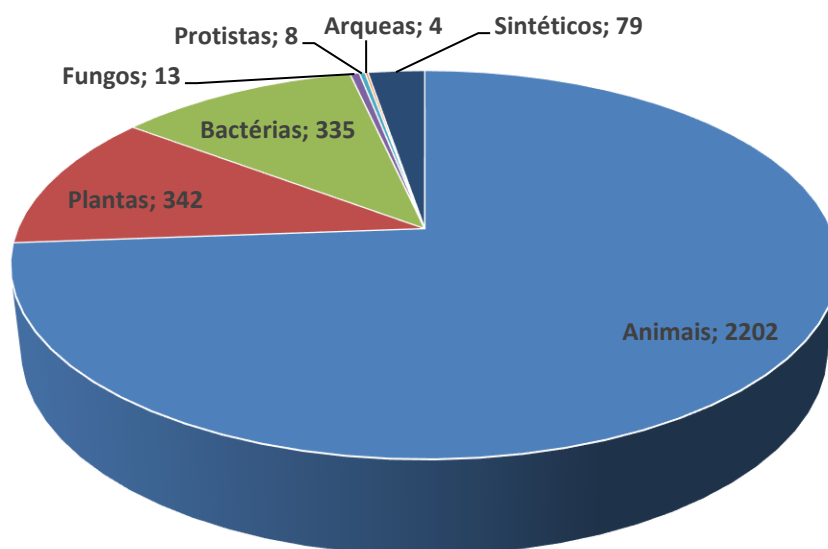
novo peptídeo com potencial atividade antimicrobiana. Os estudos do modo de interação peptídeo-membrana foram desenvolvidos por meio de técnicas de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), de dicroísmo circular (CD), de espalhamento de luz dinâmico (DLS), de potencial Zeta (ζ) e de ressonância magnética nuclear (RMN).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos são caracterizados por serem cadeias poliméricas curtas contendo de 2 a 50 resíduos de aminoácidos conectados por uma ligação peptídica (POWERS & HANCOCK, 2003). Até junho de 2018, o Banco de Dados de peptídeos antimicrobianos registrou 2983 peptídeos de seis fontes naturais distintas, além dos sintéticos (APD – *Antimicrobial Peptide Database*, disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> acesso em junho, 2018). A Figura 1 mostra a divisão dos peptídeos antimicrobianos isolados de fontes naturais já registrados. Os dados revelam que a maioria deles, até o momento, são de origem eucariótica (animais, fungos e plantas), sendo que cerca de 74% (2202) do total são de animais e, mais especificamente, 988 são de anuros.

Figura 1: Gráfico de discos da distribuição de peptídeos isolados de fontes naturais (total 2983) registrados no banco de dados APD.



Números obtidos em <http://aps.unmc.edu/AP/>, acessados em 19 de junho de 2018.

Estes peptídeos são produzidos por diferentes tipos celulares, atuando no controle de diversas bactérias, fungos e vírus patogênicos, fazendo parte do sistema imune inato de diversas espécies (SATO & FEIX, 2006). Embora o modo de ação dos peptídeos antimicrobianos (PAM) contra patógenos ainda não seja completamente estabelecido, sabe-se que a interação na superfície de células bacterianas causa

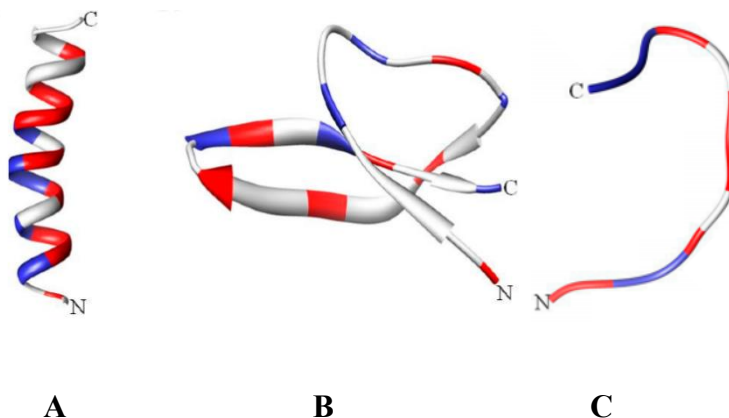
perturbações na estrutura da bicamada lipídica do microrganismo e a morte celular (ZASLOFF, 2002; LEE *et al.*, 2016).

Os peptídeos podem ser distribuídos em diferentes classes de estruturas secundárias, porém são agrupados majoritariamente em dois conjuntos característicos, a saber, aqueles que se estruturam segundo uma α -hélice e aqueles em β -folha (FIG. 2, p. 21).

A estrutura secundária mais comum adquirida por peptídeos antimicrobianos ao interagir com a membrana é a α -hélice. Essa mudança estrutural na interação é devido a cadeia lateral dos resíduos que ajuda no enovelamento da estrutura. A estrutura enovela-se formando uma conformação helicoidal, que se estabiliza por ligações de hidrogênio intramoleculares entre o hidrogênio do grupo amino (-NH) e o oxigênio da carbonila (C=O), distantes na cadeia peptídica por aproximadamente três a quatro resíduos de aminoácidos (NABUURS *et al.*, 2004). Uma característica dos peptídeos antimicrobianos α -helicoidais é que a maioria apresenta uma amidação na região C-terminal, uma modificação pós-traducional, que pode proporcionar uma maior atividade antimicrobiana, aumentando a interação eletrostática entre o peptídeo carregado positivamente e a membrana bacteriana, carregada negativamente (KUMAR *et al.*, 2018). A α -amidação de peptídeos ativos é proveniente de uma N-clivagem oxidativa de substratos estendidos com glicina, gerados a partir de proteínas precursoras, catalisada por uma enzima *peptidilglicina α -amidating monooxygenase* (PAM) (CHUFÁN *et al.*, 2009).

A estrutura β -folha, muitas vezes estabilizada por ligações dissulfeto, também é estabilizada por ligações de hidrogênio. Contudo, diferentemente da conformação α -hélice, a β -folha as ligações de hidrogênio ocorrem entre aminoácidos de segmentos de cadeia peptídicas distintas, conhecidas como fitas β (BERG *et al.*, 2006). Embora menos comuns, alguns peptídeos podem apresentar conformação desenovelada, como no caso da indolicidina.

Figura 2: Estruturas secundárias mais comuns dos peptídeos. (A) a magainina em α -hélice, (B) a defensina humana com presença de β -folha na estrutura terciária e (C) indolicidina desenovelada. Os resíduos carregados positivamente estão em azul e os resíduos hidrofóbicos estão em vermelho. As porções *N*-terminal e *C*-terminal estão representadas como N e C, respectivamente.



Extraída de: KUMAR *et al.*, 2018.

Acredita-se que os PAM tenham um mecanismo de ação muito diferente daqueles dos atuais antibióticos clinicamente utilizados, que normalmente se baseiam em inibições enzimáticas (LOHNER & PRENNER, 1999; LI *et al.*, 2017). A interação dos peptídeos com a membrana é de natureza eletrostática e também hidrofóbica e, atuam mediante mecanismos de perturbação da organização da bicamada fosfolipídica da membrana. Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos apresentam elevada toxicidade às células dos patógenos, quando comparados a antibióticos convencionais, podendo ou não atuar em alvos específicos na célula microbiana. Como consequência, observa-se maior dificuldade dos microrganismos patogênicos em desenvolver resistência a essas substâncias (HANCOCK & SAHL, 2006).

Em seu mais recente relatório anual sobre riscos globais, o Fórum Econômico Mundial (FEM) concluiu que possivelmente o maior risco à saúde humana refere-se às bactérias resistentes aos antibióticos (WORLD ECONOMIC FORUM, 2017). Além disso, de acordo com a *Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS)*, há uma ocorrência generalizada de resistência aos antibióticos entre 500 mil pessoas com suspeita de infecção bacteriana, em 22 países. As bactérias resistentes mais comumente relatadas foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Saumonella spp* (CAESAR, 2017).

Diante de todos esses fatores, os estudos relacionados a antibióticos alternativos,

como os peptídeos antimicrobianos, despertaram ainda mais o interesse da sociedade científica no isolamento e estudos biológicos dessas moléculas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos alternativos no combate aos patógenos resistentes a drogas convencionais (ZASLOFF, 2002; FOX, 2013). Contudo, devido à limitação da abundância natural, o isolamento em quantidade suficiente para os estudos biológicos e biofísicos do modo de ação dessas moléculas torna-se extremamente difícil. Um exemplo é que para obter 37,0 e 580,0 nmol dos peptídeos antimicrobianos brevinina-2Oa e brevinina-2Ob, respectivamente, são necessários 3,4 g de pele seca do sapo marrom da montanha (*Rana ornativentris*). Outro exemplo é que para a obtenção de 5,0 mg de somatostatina, hormônio envolvido no controle do metabolismo animal, são necessários 500.000 cérebros de carneiro (MACHADO, 2004). Uma das formas de obtenção dessas biomoléculas em maior quantidade é através da síntese química, contornando assim o problema da baixa abundância natural. Além disso, há a vantagem de propiciar a incorporação de aminoácidos não naturais, D-aminoácidos ou realizar modificações estruturais, que podem potencializar a atividade antimicrobiana de um peptídeo (AMBLARD *et al.*, 2006, YIN *et al.*, 2012).

2.2 Relação estrutura e atividade antimicrobiana e mecanismos de ação

Algumas características estruturais e físico-químicas dos peptídeos são importantes para a atividade antimicrobiana dos mesmos (POWERS & HANCOCK, 2003). A carga líquida, por exemplo, que para a maioria dos PAM é positiva, facilita a interação eletrostática com membranas celulares aniônicas de bactérias. A natureza catiônica pode ser atribuída à presença de resíduos de lisina e arginina e, às vezes histidina (em condições em que o pH do meio seja inferior a 7) (EPAND & VOGUEL, 1999; BECHINGER, 2006).

A hidrofobicidade também é uma característica específica dos peptídeos antimicrobianos e é definida como a porcentagem de resíduos hidrofóbicos presentes na estrutura primária (valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano). A hidrofobicidade pode definir a capacidade de penetração celular e as propriedades membranolíticas de um PAM (WANG *et al.*, 2012), contudo, uma elevada porcentagem de resíduos hidrofóbicos (muito acima de 50%) pode resultar em toxicidade frente a células de mamíferos e perda de seletividade a células microbianas, isso porque o excesso de hidrofobicidade impede o trânsito ordenado dos fosfolipídeos

(YEAMAN & YOUNT, 2003; YIN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2007, CHOU *et al.*, 2008 *apud* LEE *et al.*, 2016).

Antes da interação com a membrana, sabe-se que a maioria dos PAM não apresenta uma conformação definida em solução aquosa. Entretanto, ao entrarem em contato com o ambiente da membrana, esses peptídeos adquirem uma conformação estável (em geral, α -hélice ou β -folha), que permite melhor interação com a bicamada fosfolipídica (YEAMAN & YOUNT, 2003). Grande parte dessas conformações apresenta outra característica comum em PAM, que consiste na anfipaticidade. Tal característica torna-se importante, pois as regiões hidrofóbicas podem se ligar à região apolar da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas interagem com a superfície carregada das membranas dos microrganismos. Estas regiões geralmente são bem definidas na conformação adotada durante a interação e se localizam em faces opostas na estrutura tridimensional do peptídeo. A anfipaticidade permite ainda a formação de agregados de peptídeo na superfície da membrana, que podem evoluir para a formação de poros de tamanhos variáveis, permitindo assim o extravazamento do conteúdo intracelular (íons e outros solutos citoplasmáticos) e a consequente morte celular. (BECHINGER, 2006; KOSIKOWSKA & LESNER, 2016).

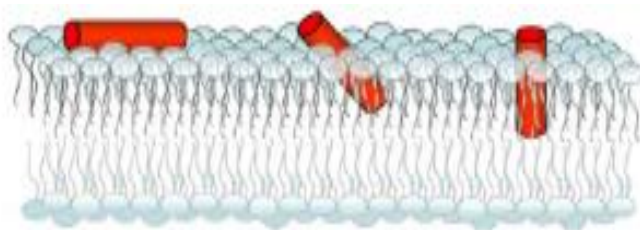
A estabilidade estrutural do peptídeo também é um fator importante e que influencia diretamente na sua atividade antimicrobiana. Esta estabilidade depende de diversos fatores, como a disposição de resíduos de aminoácidos na sequência peptídica (estrutura primária). A separação espacial de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos torna os peptídeos moléculas anfipáticas. Além disso, a presença de resíduos com cadeia lateral carregadas positivamente aumentam o caráter catiônico dos peptídeos (PAPO & SHAI, 2003). A tendência a anfipaticidade e o caráter catiônico facilitam a interação do peptídeo com a superfície da membrana e sua inserção na mesma (ZASLOFF, 2002).

De forma ampla, o processo de interação ocorre em duas etapas. Primeiramente, uma atração eletrostática entre o peptídeo e a superfície externa da membrana, seguida da inserção da região hidrofóbica do peptídeo na interface da bicamada fosfolipídica causando sua desorganização (SATO & FEIX, 2006; KUMAR *et al.*, 2018). Ao se ligarem a bicamada lipídica, os PAM se acumulam na superfície da membrana e, após atingir uma certa concentração, perturbam a mesma, causando sua desorganização e a morte celular. Diante disso, vários modelos foram propostos para descrever a ação dos

PAM (SATO & FEIX, 2006).

Devido à presença e distribuição dos resíduos hidrofóbicos na sequência primária, a interação inicial do peptídeo na bicamada pode ser estabelecida em três orientações principais, paralela, diagonal ou perpendicular à superfície da bicamada fosfolipídica, como representado na Figura 3.

Figura 3: Possibilidades de orientações da interação inicial do peptídeo com a bicamada fosfolipídica: paralela, em diagonal ou perpendicular à superfície.



Extraída de SATO & FEIX, 2006.

Muitos modelos são propostos na literatura e enunciam que o modo de interação de peptídeos antimicrobianos depende de uma combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos (NGUYEN, 2011; SANDERSON, 2005; POWERS & HANCOCK, 2003). Alguns desses modelos já propostos são o modelo barril, poro-toroidal, tapete, detergente, segregação lipídica em domínios, atividade interfacial e formação de fases não lamelares e o modelo jangada não permeabilizantes, são utilizados para descrever a ação dos peptídeos na membrana. Com a variedade ampla de modelos de ação de peptídeo-membrana, é possível que vários mecanismos ocorram simultaneamente ou que possa acontecer uma troca sequencial (LEE *et al.*, 2016).

Dentre os vários modelos, o de barril, o poro-toroidal e o de tapete têm sido amplamente utilizados para descrever os mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos na membrana celular. A Figura 4 (p. 25) representa esquematicamente os três dos modelos mais comumente propostos na literatura e esses são discutidos a seguir.

No modelo barril, os peptídeos, após a agregação na superfície, se inserem perpendicularmente na bicamada formando um poro. Esse poro atua como um canal de condutância, que permite um vazamento de componentes intracelulares e, conseqüentemente, a lise celular. Nesse modelo, a face hidrofóbica das cadeias helicoidais de moléculas de peptídeo interage com as cadeias carbônicas dos

fosfolipídios, deixando exposta a face hidrofílica (CARVALHO *et al.*, 2013; SATO & FEIX, 2006; SHAI, 2002; LI *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2018).

Embora muito parecido, no modelo poro-toroidal não ocorrem interações peptídeo-peptídeo. Ocorre inicialmente uma interação eletrostática forte da face hidrofílica do peptídeo com as cabeças também hidrofílicas da superfície externa da membrana. Em seguida, o aumento de moléculas de peptídeo e a forte interação eletrostática peptídeo-membrana causam uma curvatura da bicamada lipídica, na qual há uma orientação perpendicular do peptídeo em relação à interface da mesma. Por fim, no modelo carpete, os peptídeos se acumulam na superfície da bicamada em uma orientação paralela devido à interação eletrostática inicial (CARVALHO *et al.*, 2013, KUMAR *et al.*, 2018), de forma similar a um “carpete”. Após alcançar uma concentração crítica, ocorre uma redistribuição dos lipídios, resultando em uma tensão na curvatura da membrana que pode levar ao seu rompimento e à formação de estruturas micelares compostas por fosfolipídios envolvidos por moléculas de peptídeo (SATO & FEIX, 2006; SANDERSON, 2005).

Figura 4: Esquema de três modelos de interação peptídeo-membrana propostos na literatura. Modelo Barril, poro-toroidal e carpete.

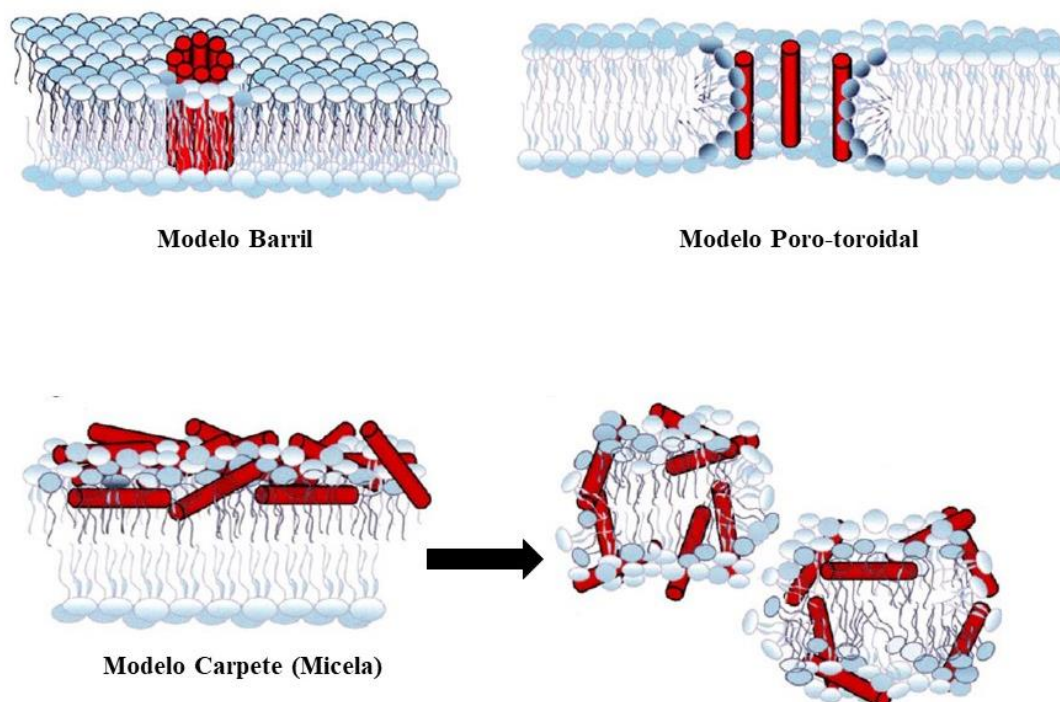


Figura extraída e adaptada de SATO & FEIX, 2006.

Estes mecanismos de ação têm sido amplamente descritos na literatura, porém, o modo de ação pode ser específico para diferentes moléculas de peptídeos (SHAI, 2002; BECHINGER & LOHNER, 2006). Portanto, para o desenvolvimento de fármacos com segurança biotecnológica, é extremamente relevante a ampliação dos conhecimentos sobre o modo de interação peptídeo-membrana. Assim sendo, para estudos biofísicos da interação de peptídeo-membrana que permitam a compreensão do modo de ação de PAM, é comum o emprego de meios biomiméticos de composições químicas variáveis e compatíveis com os da célula alvo. Dentre as diferentes técnicas utilizadas para este tipo de estudo, pode-se ressaltar aquelas empregadas neste trabalho, como o Dicroísmo Circular (CD) (BÜRCK *et al.*, 2016), a Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) (ARIAS, *et al.*, 2017), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ) (BESCHIASCHVILI & SEELIG, 1990), além da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (OPELLA & MARASSI, 2004) que serão brevemente descritas a seguir. Todas essas técnicas serão utilizadas para o estudo de interação dos peptídeos D-Phe e L-Phe e o peptídeo Schistocina-2.

2.3 Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma poderosa técnica para caracterizar interações em solução, visto que é possível obter o perfil termodinâmico completo destas interações, mesmo que o calor liberado durante a interação seja relativamente baixo ($< 5 \mu\text{cal}$) (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008; SEELIG, 2004). Diante do princípio de que os processos químicos, físicos e bioquímicos ocorrem por absorção ou liberação de calor, essa técnica vem sendo muito utilizada para analisar, dentre outras coisas, a afinidade entre peptídeo e lipídio de forma a auxiliar na compreensão da atividade biológica e no modo de interação com membranas. Essa técnica permite, em um único experimento, a descrição termodinâmica completa da interação peptídeo-membrana (ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0 , constante de interação K e coeficiente estequiométrico n). Este estudo termodinâmico é de extrema importância para a avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos, visto que a afinidade com a membrana está diretamente ligada à interação do peptídeo com a membrana bacteriana (WIEPRECHT & SEELIG, 2002; SEELIG, 2004).

Vários trabalhos publicados utilizaram da técnica de ITC para a caracterização da interação de peptídeos com meios miméticos de membrana (ANDRUSHCHENKO *et*

al., 2008; WIEPRECHT *et al.*, 2000; MARQUETTE & BECHINGER, 2018). Um estudo efetuado em 2000 por Wieprecht e colaboradores utilizou diastereoisômeros da magainina 2 com o objetivo de obter informações sobre a termodinâmica da transição helicoidal em um ambiente de membrana (POPC:POPG 3:1 v/v) além de elucidar a contribuição da formação da α -hélice para o equilíbrio de ligação. Descobriu-se que a presença de dois D-aminoácidos dentro da sequência era capaz de perturbar a conformação helicoidal, resultando em uma flexibilidade melhorada em torno da região da D- substituição, porém não afetando a capacidade da parte hidrofóbica do peptídeo de se inserir na superfície da membrana (WIEPRECHT *et al.*, 2000; WIEPRECHT *et al.*, 1996). Os resultados revelaram ainda que a formação de α -hélice constitui uma contribuição importante de 70% para a entalpia de ligação total de -17 kcal/mol.

Também é possível detectar pelo ITC a ausência de interação do peptídeo com a membrana, como no caso do estudo realizado em 2010 por Al-Kaddah Saad e colaboradores. Foram analisadas a interação de 1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC) puro com os peptídeos e observou-se que as alterações entálpicas (exotérmicas) muito mais elevadas da galidermina referem-se a interações mais fortes, enquanto a vancomicina, por sua vez, não apresentou interação considerável com a membrana. As diferenças das alterações de entalpia da vancomicina foram cerca de dez vezes menores comparadas à galidermina. Diante disso, conclui-se que a galidermina interfere na integridade da membrana de uma maneira mais eficaz e, portanto, possui uma atividade antimicrobiana mais potente.

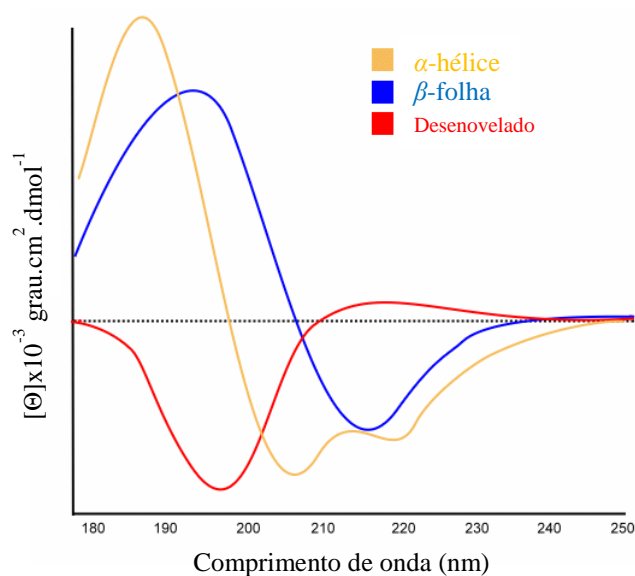
2.4 Dicroísmo Circular (CD)

O mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos é desencadeado por mudanças conformacionais que promovem uma melhor interação com a membrana bacteriana (VOIEVODA *et al.*, 2015; KOSIKOWSKA & LESNER, 2016). Neste sentido, a espectroscopia do dicroísmo circular tem sido amplamente utilizada para o estudo do modo de ação de PAM, pois possibilita a análise da estrutura secundária de peptídeos na presença de diferentes ambientes biomiméticos.

O Dicroísmo Circular leva em consideração a absorção da luz circularmente polarizada para a direita ou para a esquerda. Uma assimetria estrutural em uma molécula leva à diferença de absorção de luz polarizada. Essa diferença permite ter uma idéia da estrutura obtida pelo peptídeo (FASMAN, 1996).

Um espectro de CD pode identificar três diferentes conformações dos peptídeos. Na conformação em α -hélice, o espectro de CD apresenta um máximo em aproximadamente 192 nm e dois mínimos característicos, em regiões de comprimento de onda (λ) próximos de 209 e 222 nm. Já a conformação em β -folha, o espectro apresenta um máximo em regiões próximas de 196 nm e mínimo com comprimento de onda próximo a 218 nm, aproximadamente. Quando o peptídeo não apresenta nenhuma das conformações anteriores, é observado um mínimo com λ próximo de 195 nm e uma relativa constância em 0 grau.cm².dmol⁻¹ a partir de 210 nm. A Figura 5 representa de forma clara esses padrões das curvas que podem ser obtidas em um espectro de CD.

Figura 5: Espectro modelo para a análise de diferentes estruturas dos peptídeos em meios biomiméticos de membrana. Em amarelo, está a curva para α -hélice; em azul, para β -folha; em vermelho, a curva característica para o peptídeo desenovelado.



Extraído e adaptado de: <http://www.proteinchemist.com/cd/cd7.gif>. Acesso em: julho de 2018.

De acordo com o banco de dados APD3, em uma estatística estrutural de 2981 peptídeos registrados, 432 (14,5 %) possuem estrutura secundária em α -hélice, 81 (2,7 %) em β -folha, 19 (0,6 %) não se estruturam em nenhuma das duas e 1791 (58,8 %) possuem estrutura desconhecida. O restante (23,3 %) são variações de combinações de estrutura (APD – *Antimicrobial Peptide Database*).

Embora seja muito comum o emprego de meios biomiméticos em CD, em 2014, Concetta Avitabile, Luca Domenico D'Andrea e Alessandra Romanelli realizaram um

estudo de CD nas interações dos peptídeos magainina 2 e a cecropina A na presença de células bacterianas de *E. coli*. Os resultados sugeriram que ambos os peptídeos adotam uma estrutura secundária definida após a interação com as células bacterianas. A posição das bandas de CD indica claramente que os peptídeos se dobram em hélices após interação com as células, e que a capacidade dos peptídeos em assumir a estrutura secundária está relacionada com a concentração de células.

No estudo publicado por Pablo Aran Terol e colaboradores (2015), foi utilizado o dicroísmo circular para examinar as diferenças estruturais, particularmente relacionadas ao microambiente ao redor da região *N*-terminal, de oligômeros globulares solúveis de $A\beta_{1-42}$ para tentar explicar as diferenças nas atividades biológicas anteriormente relatadas para estes peptídeos. Os resultados indicaram que $A\beta_{1-42}$ apresentam um grau de estrutura da folha β -folha, porém são claramente menos ordenadas do que as estrutura da β -folha de fibrilas. Em conjunto, esses resultados destacam diferenças significativas na arquitetura molecular das formas oligomérica versus fibrilar dos peptídeos $A\beta$, que podem oferecer novas percepções sobre as atividades biológicas diferenciadas. Esses resultados são condizentes com os estudos biológicos já realizados que mostram uma menor atividade de $A\beta$ quando comparado ao $fA\beta$, provavelmente pela menor estruturação observada por estudos de Dicroísmo Circular que interferem na interação com a membrana.

Com isso, podemos observar a importância dos estudos de CD para análises estruturais e interpretações de interação com membrana de potenciais peptídeos bioativos.

2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

A interação de ambos os peptídeos com membranas pode resultar na perturbação da bicamada fosfolipídica e, conseqüentemente, alterar toda a estrutura da membrana (NGUYEN, *et al.*, 2011). Alguns estudos com peptídeos antimicrobianos revelam a formação de agregados supramoleculares durante o processo de interação com vesículas fosfolipídicas, podendo resultar na variação do volume e da carga superficial das vesículas (ABRUNHOSA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008). Dessa forma, a técnica de DLS também tem sido muito utilizada para a análise de processos de interação peptídeo-membrana, via análise da variação das dimensões e cargas de suspensões de vesículas fosfolipídicas com adição de PAM (SILVA *et al.*, 2008).

Nesta técnica, quando a luz do laser atravessa uma suspensão, as partículas presentes no meio podem espalhar a luz em todas as direções. A avaliação das flutuações de intensidade de luz espalhada em um determinado ângulo fornece informações sobre o movimento da partícula (DOMINGUES *et al.*, 2008). O movimento das partículas provoca flutuações da intensidade da luz espalhada que ocorre devido à variação na densidade de partículas na solução em análise. A medida de DLS é baseada na dispersão dessa luz que, devido ao movimento Browniano (aleatório) nas partículas, há variação de intensidade de luz espalhada. As partículas pequenas apresentam um movimento Browniano mais rápido, resultando em um grande espalhamento da luz. Por outro lado, um movimento mais lento ocorre com partículas maiores e, conseqüentemente, um menor espalhamento de luz é detectado. O movimento das partículas provoca flutuações da intensidade da luz espalhada que ocorre devido à variação na densidade de partículas na solução em análise (FREIRE *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2013).

Uma titulação de peptídeos carregados positivamente em meios miméticos de membrana, carregadas negativamente, faz com que a carga na superfície da membrana mude. Com o aumento da concentração de peptídeos, valores cada vez mais positivos de potencial são detectados, até que seja observada uma aproximação de neutralização de carga. Esse aumento no valor do potencial é reflexo da interação do peptídeo com as bicamadas lipídicas mostrando que a interação é impulsionada por fatores eletrostáticos (FREIRE *et al.*, 2011).

De acordo com um estudo realizado por Halder e colaboradores, em 2015, foi avaliado a alteração na permeabilidade da membrana de bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e subsequente viabilidade bacteriana com a utilização de agentes catiônicos para induzir a alteração do potencial Zeta. Sugere-se que a alteração do potencial Zeta pode estar correlacionada com o aumento da permeabilidade da membrana e do índice de polidispersividade (PDI) e, foi observado que leva à morte celular (HALDER *et al.*, 2015).

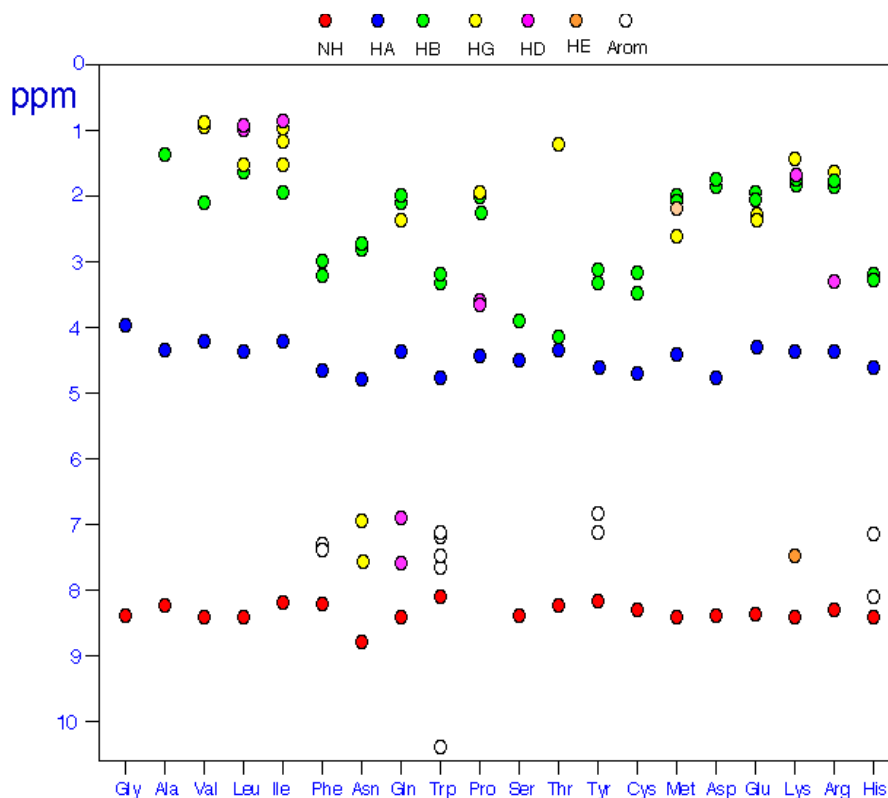
2.6 Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permite a determinação da estrutura tridimensional (3D), possibilitando a identificação da posição espacial de cada resíduo, destacando os que são mais importantes para a sua ação, e que poderiam ser

modificados para aumentar a atividade antimicrobiana, por exemplo (CAVANAGH, 2006). Wüthrich, em 1986, propôs um método de atribuição sequencial que possibilitou elucidar estruturas tridimensionais dos peptídeos e a partir de então, o RMN tem sido vastamente empregada para determinação estrutural de peptídeos, que auxiliam na interpretação do modo de interação com a membrana e mecanismo de ação dessas moléculas (WÜTHRICH, 1986; CAVANAGH, 2006). Atualmente, são registrados 403 peptídeos com estruturas 3D já determinadas. Desse total, 351 foram determinadas pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear e somente 52 por Difração de Raio-X (APD – *Antimicrobial Peptide Database*). A técnica de assinalamento sequencial combina as correlações intraresiduais obtidas por acoplamento escalar (J), observados nos mapas de contorno TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*) com acoplamentos espaciais dipolares observados no NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*).

As correlações intraresiduais observadas nos experimentos bidimensionais de ^1H -TOCSY, também chamadas de sistema de spin, são identificadas pois cada tipo de resíduo possui um padrão de deslocamento químico para os átomos de acordo com a estrutura do aminoácido. A Figura 6 (pág. 32) é um esquema representativo do padrão dos sistemas de spin, com os deslocamentos químicos médios de cada hidrogênio dos resíduos de aminoácidos.

Figura 6: Esquema representativo dos sistemas de spin com os respectivos deslocamentos químicos para os resíduos de aminoácidos.



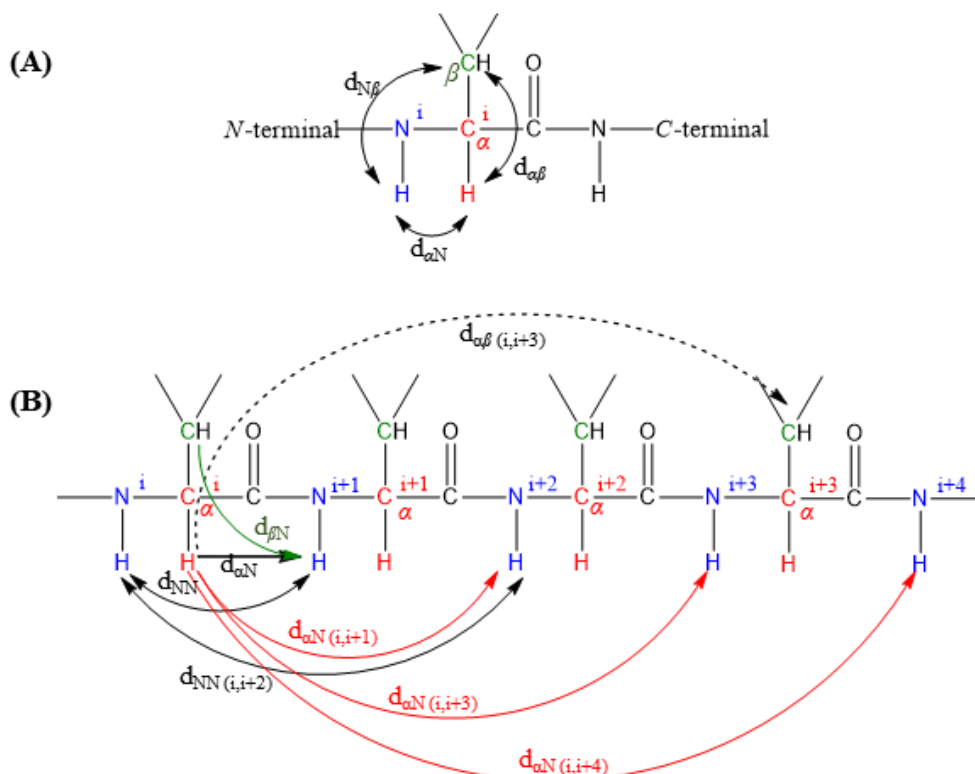
Fonte: <http://tritton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/proteins/chempro5.html>

Os exemplos mais simples de sistema de spin são obtidos pelo padrão de deslocamento químico dos resíduos de alanina (Ala) e glicina (Gly) que, devido às cadeias laterais menores, apresentam sistemas de *spin* com poucas correlações. Dessa forma, uma única correlação é possível para o resíduo de glicina, devido ao acoplamento escalar ($^3J_{\text{HH}}$) entre o hidrogênio amídico (H_N) e o hidrogênio alfa (H_α). Por sua vez, correlações $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha$ e $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\beta$ são possíveis para o resíduo de alanina como resultado dos acoplamentos escalares $^nJ_{\text{HH}}$ entre os resíduos de H_N , H_α , e hidrogênio beta (H_β). Além disso, o deslocamento químico de H_β da alanina destaca-se pelo baixo valor ($\delta_{\text{méd.}} \approx 1,35$) quando comparado com os demais resíduos de aminoácidos, por possuir apenas o grupo CH_3 na cadeia lateral, que facilita assim a sua distinção. Por outro lado, resíduos de lisina possuem sistemas de spin mais complexos (correlações do tipo $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha$, $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\beta$, $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\gamma$, $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\delta$ e $\text{H}_\text{N}-\text{H}_\epsilon$), já que suas cadeias laterais são maiores e, conseqüentemente, apresentam maior possibilidade de acoplamentos escalares entre núcleos de hidrogênio.

Por outro lado, a espectroscopia de efeito *Overhauser* nuclear (NOESY) está relacionado com o efeito da interação dipolar nas populações dos estados de *spin* e fornece informações a respeito da vizinhança espacial do aminoácido a partir das correlações intra- e interresiduais, denominados de NOE (efeito *Overhauser* nuclear). Esse tipo de correlação surge devido à interação dipolar que ocorre através do espaço dos núcleos em análise, desde que estejam a uma distância máxima de 5 Å (WÜTHRICH, 1986).

As correlações mais comuns de NOE são denominadas de correlações sequenciais ($d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+1)$, $d_{\beta N}(i,i+1)$), e determinam quais resíduos de aminoácidos são vizinhos entre si na sequência peptídica. Correlações de média distância também são comumente observadas, porém são correlações específicas para cada tipo de estrutura secundária (WILLIAMSON, 1993). A Figura 7 representa as principais correlações intraresiduais e espaciais interresiduais observados para uma estrutura secundária em α -hélice.

Figura 7: Representação dos NOE de estrutura secundária em α -hélice. Possíveis correlações intraresiduais (A) e interresiduais (B) de núcleos de hidrogênio.

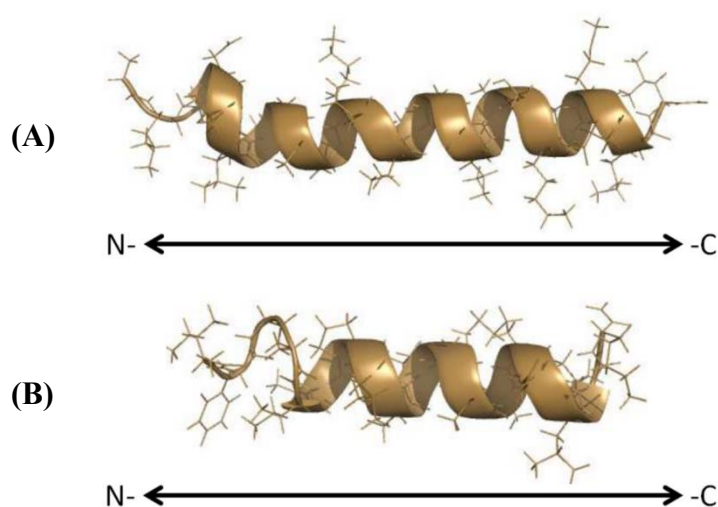


Fonte: WÜTHRICH, 1986 - adaptado.

Os experimentos bidimensionais heteronucleares são ainda utilizados para auxiliar na atribuição completa da ressonância, devido a possíveis problemas de sobreposição de sinais de diferentes resíduos de aminoácidos na atribuição de peptídeos. Nos mapas de contorno $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC, por exemplo, é possível identificar correlações apenas via ligação (1J) de carbono com hidrogênio (GRZESIEK & BAX, 1993). Dessa forma, podem ser correlacionados os hidrogênios com seus respectivos carbonos nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

Na literatura, diversos trabalhos utilizam a técnica de RMN para obtenção da estrutura tridimensional do peptídeo e, deste modo, identificar a posição de cada resíduo e entender a contribuição de cada um para a ação do peptídeo. A partir desses resultados é possível propor, caso necessário, modificações nas estruturas primárias para aumento da atividade antimicrobiana. Isso foi realizado, por exemplo, em 2011, por Alves e colaboradores, que apresentaram um estudo da determinação da estrutura tridimensional dos peptídeos Ocellatina-PIG16 e Hylina por compreender melhor a interação de cada um com meios miméticos de membrana. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de RMN ^1H , em micelas de SDS, e foi possível observar a anfipaticidade dos dois peptídeos, com faces hidrofóbicas e hidrofílicas bem definidas (FIG. 8). Estas características na estrutura secundária dos peptídeos juntamente com a presença de resíduos positivamente carregados parecem ser os fatores que contribuem para a interação com a membrana biológica e, conseqüentemente, os efeitos biológicos observados.

Figura 8: Representação em fita das estruturas de menor energia em presença de micelas de SDS-d₂₅ dos peptídeos: (A) Ocellatina-PIG16 e (B) Hylina.



Fonte: ALVES, 2011.

2.7 Estudos da estrutura e modo de interação do peptídeo com meios miméticos de membrana

O uso concomitante de ferramentas biofísicas e estruturais como uma forma de auxiliar e facilitar o entendimento dos mecanismos de ação de PAM, já são comumente relatados na literatura (SEELIG, 1997; SCHOTE & SEELIG, 1998; SHANG & BI, 2016). Dentre as diferentes técnicas, podem ser destacadas a Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC), o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ), Dicroísmo Circular (CD) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução, que foram utilizadas neste trabalho.

No trabalho de Dejing Shang e Xiaonan Bi de 2016, foram coletadas medidas de CD, ITC, DLS, potencial Zeta, além dos testes biológicos em bactérias para avaliar a interação de 5 peptídeos com lipopolisacarídeo LPS (uma barreira de permeabilidade na membrana externa), peptídeos esses que possuem composições de aminoácidos semelhantes e mesmo comprimento de cadeia, composta por 13 resíduos de aminoácidos (I1W, I4W, L5W, L11W, L12W). Pelos testes biológicos anteriormente realizados, pode-se observar que peptídeos I1W e I4W são ativos contra bactérias Gram-negativas e os L5W, L11W e L12W são inativos. Diante disso, foram realizados estudos para investigar o efeito das localizações de resíduos de Trp na propriedade antibacteriana de PAM.

Os resultados de Potencial Zeta mostraram que, após a adição dos peptídeos às diferentes células bacterianas Gram-negativas (de cargas líquidas negativas), o potencial Zeta aumentou dramaticamente para valores positivos devido a compensação de cargas positivas dos peptídeos que se ligam inicialmente por interação eletrostática na membrana. Os peptídeos contendo triptofano (Trp) apresentaram uma sobrecompensação de cargas (valores acima da neutralização), sugerindo que eles não só se ligam na membrana externa às células bacterianas e neutralizam todas as cargas, mas também se inserem ligeiramente a membrana externa.

Os ensaios por ITC de I1W e I4W indicaram um processo de interação em duas etapas: um processo exotérmico nos primeiros 25 minutos, seguido por uma reação endotérmica. Pelos estudos de CD, foi possível constatar que os cinco peptídeos, assumem conformações helicoidais, embora os conteúdos de α -hélice sejam diferentes. Além disso, a dispersão de luz dinâmica mostrou que I1W e I4W levam à dissociação de agregados maiores de LPS em agregados menores. Os agregados

limitam a capacidade dos peptídeos de se inserirem na membrana citoplasmática. Este mecanismo pode ser importante para a atividade bactericida dos peptídeos.

Esses dados obtidos em conjunto são importantes para um estudo mais detalhado da interação peptídeo-membrana. Cada técnica fornece uma informação diferente, que são complementares entre si e que juntas auxiliam a compreensão do modo de ação destas moléculas. O entendimento amplo do modo de interação e de ação de PAM possibilita assim o desenvolvimento biofármacos mais potentes e menos propensos a resistência bacteriana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos peptídeos D-Phes, L-Phes e Schistocina-2

Os peptídeos foram obtidos de acordo com a metodologia em fase sólida via estratégia Fmoc, proposta por Chan e White, 2000, no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB), UFVJM. O suporte sólido utilizado foi a resina Rink-Amide (*Sigma-Aldrich*[®]) (FIG. 9A, pág. 37), com grau de substituição 0,79 mmol.g⁻¹ e que fornece um produto final amidado na porção C-terminal.

Todos os derivados de aminoácidos foram obtidos da *Sigma-Aldrich*[®] e as medidas das massas foram feitas em balança analítica (*Shimadzu*[®] modelo ATX 224) com precisão de 0,0010 g.

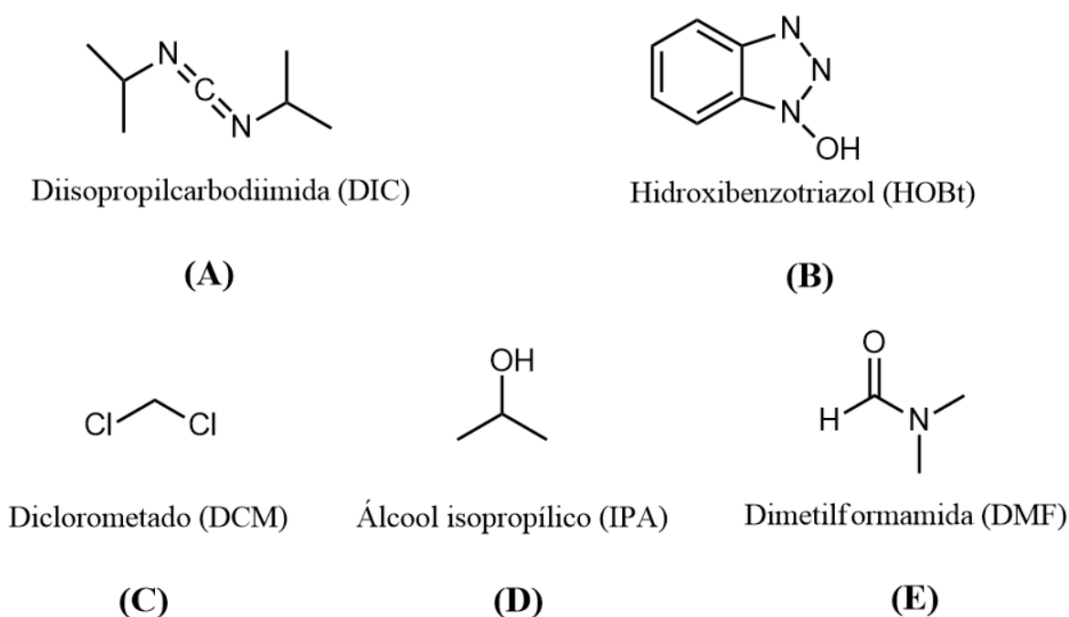
Os resíduos utilizados para as sínteses foram: Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Val-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-Asn(trt)-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-(L)Phe-OH; Fmoc-(D)Phe-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH.

Todos os derivados de aminoácidos continham o grupo protetor Fmoc para o grupo amino e, para as cadeias laterais reativas, grupo protetor com *t*-butoxicarbonila (Boc), trifenilmetila (trt) ou *t*-butila (t-Bu). A síntese foi planejada para um rendimento aproximado de 200 mg para cada peptídeo fenilseptina e de 250 mg para o Schistocina-2.

Antes da reação, os derivados de aminoácidos foram convertidos a ésteres ativos, usando o diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidróxibenziltriazol (HOBt) (*Sigma-Aldrich*[®]) como ativadores. Após cada etapa de acoplamento e de desproteção, as

lavagens foram realizadas sequencialmente com dimetilformamida (DMF), álcool isopropílico (IPA) e diclorometano (DCM) (*Sigma-Aldrich*[®]) (FIG. 9).

Figura 9: Estrutura química dos ativadores do grupo carboxila. DIC (A) e HOBt (B), DCM (C), IPA (D) e DMF (E).



3.2 Teste de *Kaiser*

Para a verificação do sucesso das etapas de acoplamento e desproteção foi realizado o teste de *Kaiser*, também conhecido como teste de ninhidrina. O resultado positivo da reação, caracterizado pela coloração violeta dos grãos da resina, indica a presença de grupo amino livre. (TROLL *et al.*, 1953).

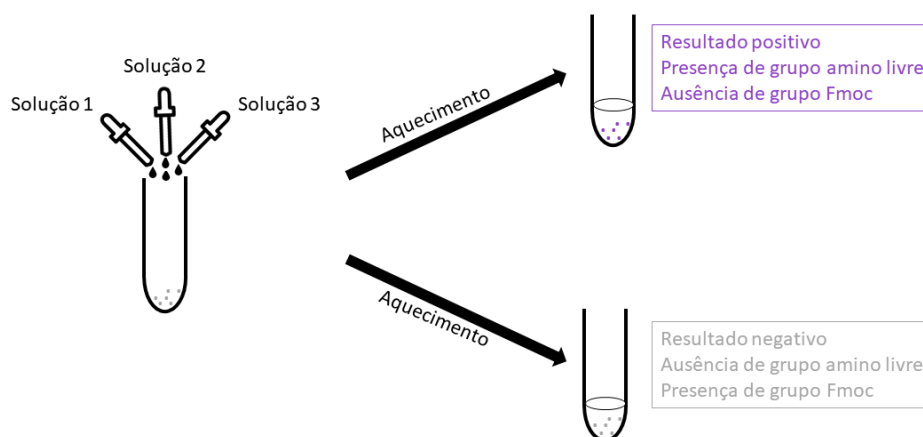
O teste foi feito com a adição de gotas de três soluções (soluções 1, 2 e 3), listadas a seguir, na proporção de 1:2:1, respectivamente, em uma pequena amostra da resina minuciosamente separada em um tubo de ensaio com o auxílio de uma espátula (KAISER *et al.*, 1970) (FIG. 10, p. 38).

Solução 1 - Piridina a 2 % (v/v) em solução aquosa de cianeto de potássio (KCN) 1 mM;

Solução 2 - Solução de fenol a 80 % (m/v) em etanol;

Solução 3 – Solução de ninidrina a 5 % (m/v) em piridina.

Figura 10: Esquema representativo do Teste de Kaiser. A coloração violeta da resina indica positivo para a desproteção (ausência de grupo Fmoc) e a não coloração indica negativo para a desproteção (presença de grupo Fmoc).



Fonte: Arquivo pessoal.

3.3 Preparação da resina para SPFS

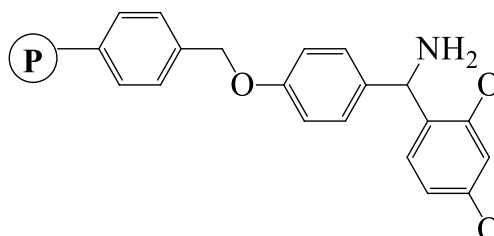
Antes de iniciar o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido ao suporte polimérico, foi feita a preparação da resina. Primeiramente, a resina foi pesada e transferida para uma seringa de polipropileno, utilizada para a síntese, contendo um filtro na ponta para reter a resina. Depois a resina é mantida sob agitação com DCM por 10 min, repetindo-se este processo por três vezes. A quantidade de resina pesada foi o suficiente para um rendimento de 200,0 mg de peptídeo da fenilseptina e de 250,0 mg para Schistocina-2 (CHAN & WHITE, 2000).

Em seguida, para promover a desproteção da resina foi utilizado PIPE em DMF 25% (v/v), deixando-se sob agitação por 15 minutos, para que o primeiro resíduo de aminoácido fosse ligado ao suporte. A solução foi descartada e o processo repetido. Ao final da desproteção, a resina foi lavada com soluções de DMF, IPA e DCM e o teste de Kaiser é feito para verificar grupo amino livre.

A lavagem foi realizada pela agitação da seringa por um minuto, alternadamente com as soluções de DMF e IPA, por três vezes, finalizando com uma lavagem com DCM, para a remoção completa da piperidina da seringa (CHAN & WHITE, 2000).

A resina utilizada neste trabalho para a síntese dos três peptídeos foi a Resina Rink Amide, cuja estrutura está representada na Figura 11 (p. 39).

Figura 11: Estrutura química da resina polimérica utilizada na SPFS, via estratégia Fmoc. Resina Rink Amide.



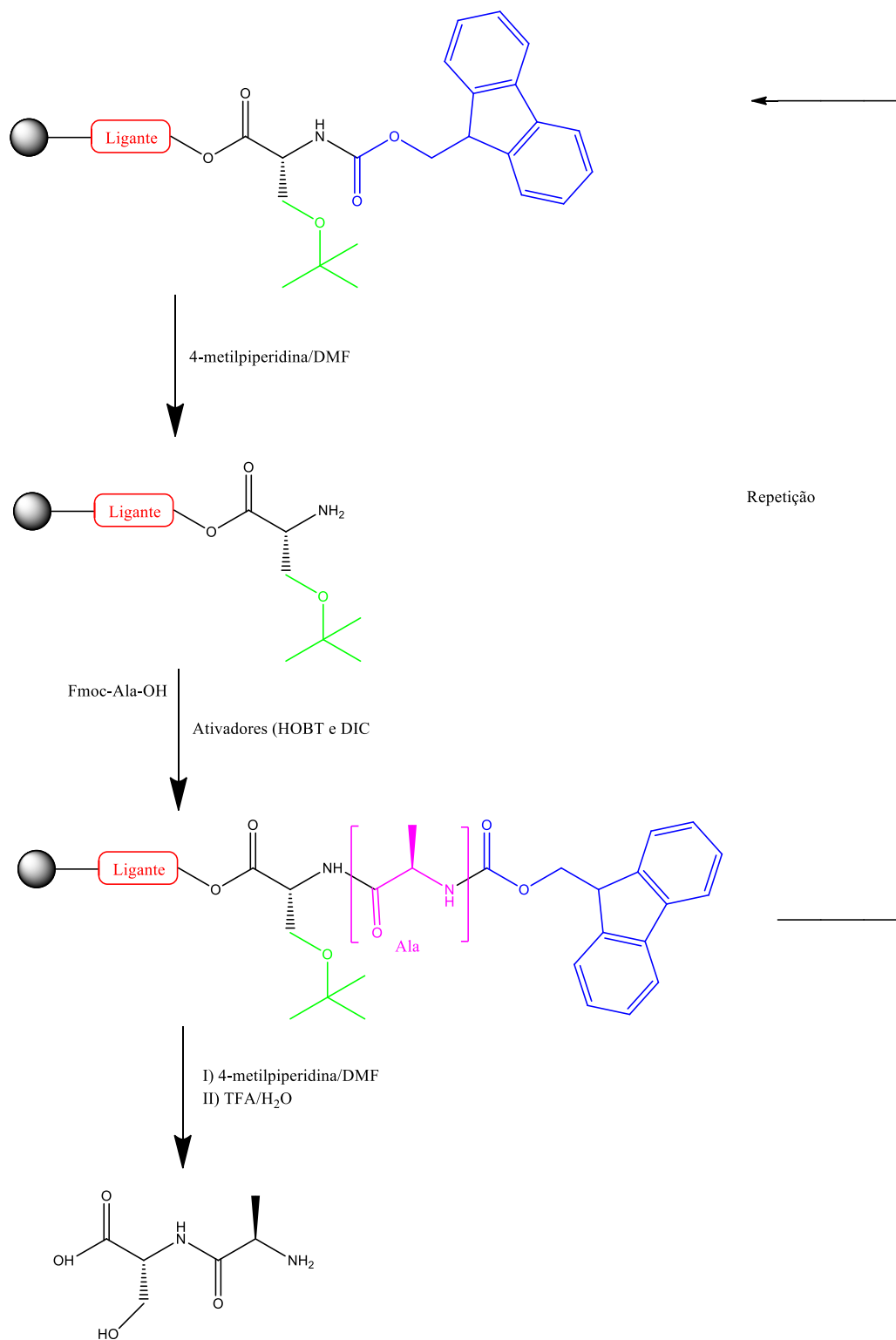
Resina Rink Amide

3.4 Etapa de acoplamento

A etapa de acoplamento compreende a introdução de um resíduo de aminoácido, via ligação amídica, à cadeia polipeptídica ligada à resina. Ésteres ativos são empregados a partir de derivados de aminoácidos em conjunto com ativadores DIC e HOBt. Na Figura 12 (p. 40) está representado o mecanismo da reação de acoplamento da síntese em fase sólida via estratégia Fmoc de peptídeos. A solução de acoplamento foi preparada em um tubo de polipropileno, com resíduo de aminoácido e o HOBt previamente pesados, o DIC, 1,5 mL de DCM e 1,5 mL de DMF. A solução preparada com a seringa foi succionada e colocada sob agitação com tempo médio de reação de 3 h para o primeiro acoplamento e de 2 h para os próximos acoplamentos. Após esse tempo, a solução foi descartada e em seguida foi realizada a lavagem seguida do teste de Kaiser (CHAN & WHITE, 2000).

Caso o resultado do teste de Kaiser seja negativo para o acoplamento (grupo amino não livre), é realizada novamente a etapa de acoplamento. Se necessário, a quantidade de reagentes e/ou o tempo de reação devem ser aumentados.

Figura 12: Esquema do princípio da SPFS via estratégia Fmoc. Em azul, está representado o grupo Fmoc, protetor do grupamento amino; em verde, o grupo protetor da cadeia lateral; em roxo, um resíduo de aminoácido (Alanina).

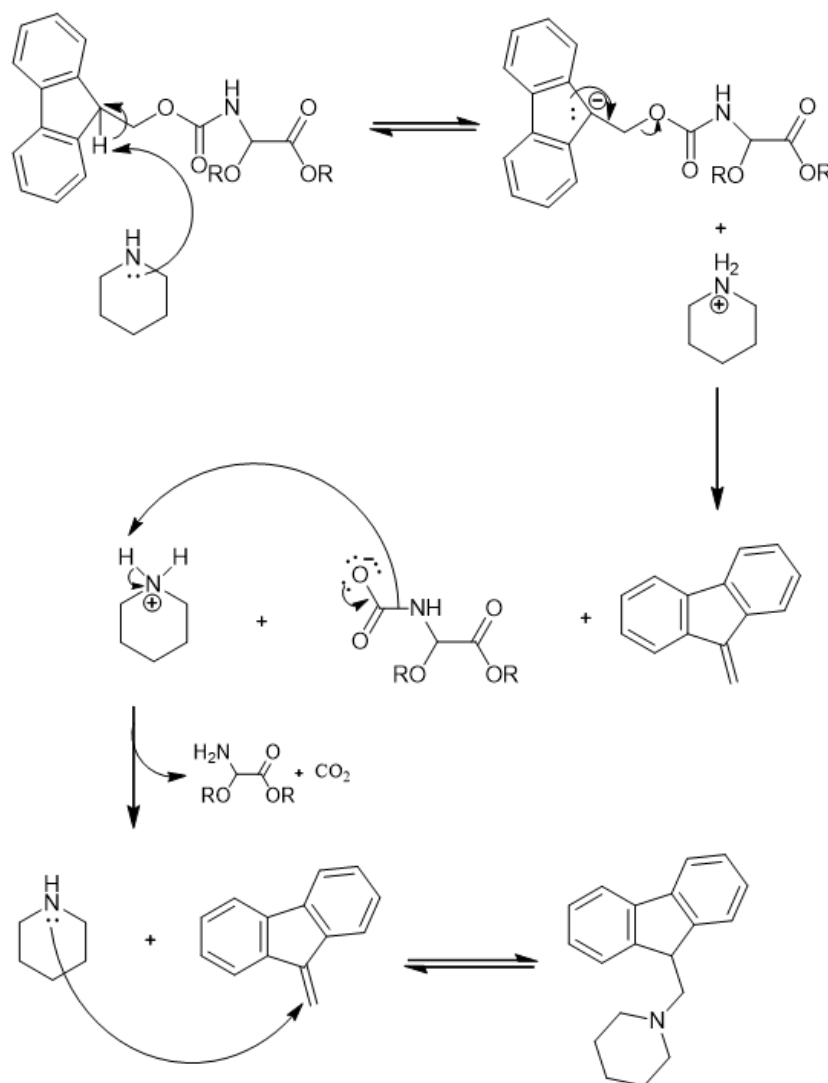


Extraído e adaptado de Chan & White, 2000.

3.5 Etapa de Desproteção

Após cada etapa de acoplamento, o último resíduo de aminoácido está com o grupo amino protegido com Fmoc e, para que seja possível a ligação com o próximo resíduo, é necessária a remoção deste grupo Fmoc para a liberação do grupo amino para que o próximo resíduo possa ser acoplado. A reação de desproteção está representada na Figura 13, e a metodologia já foi descrita na preparação da resina.

Figura 13: Mecanismo de remoção do grupo amino protetor Fmoc.



Extraído e adaptado de Chan & White, 2000.

3.6 Reação de Clivagem do Peptídeo

A solução de clivagem para os peptídeos D-Phes, L-Phes e Schistocina-2 foram estabelecidas previamente em 95% de TFA, 2,5 % de água e 2,5% de TIS, com um tempo de reação de 1 hora e 30 minutos.

Após a clivagem, o peptídeo sólido obtido foi solubilizado em água deionizada Mili-Q® tipo 1. Essa etapa foi realizada para subsequente liofilização no equipamento do departamento de Farmácia da UFVJM (Terroni LS3000®, São Paulo, Brasil). Após a liofilização, o peptídeo foi estocado em forma de pó, em baixas temperaturas.

3.7 Purificação dos Peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os peptídeos foram purificados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Varian® (Varian, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA), modelo Pro Star 315 com detector na região do ultravioleta modelo Pro Star 335 e válvula de injeção marca Rheodyne®, no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB), UFVJM. Foi utilizado gradientes de dois eluentes: um de água deionizada Mili-Q® tipo 1 acidulada com 0,10% (v/v) de TFA (Fase A) e o outro de acetonitrila grau UV/HPLC de TFA 0,08% (v/v) (Fase B). A detecção foi realizada em comprimento de onda de 215 nm, visto que o grupamento amino absorve entre 210 e 215 nm. A coluna analítica em fase reversa utilizada foi Waters® C18 (7,8 x 300 mm) e um loop de 100 µL.

3.8 Caracterização por Espectrometria de Massa

A pureza do peptídeo e a sequência primária foram confirmadas em um espectrômetro do tipo MALDI-ToF/ToF no modo MS em instrumentos *Autoflex III* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG, equipado com *Laser Smart beam™*, operando em modo positivo e controlados pelo *software FlexControl 3.2* (Bruker Daltonics).

A solução matriz foi preparada a partir de 5,0 mg de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e transferida para um tubo de propileno de 1,5 mL. O sólido foi dissolvido em 250 µL de ACN, 200 µL de água ultrapura e 50 µL de solução aquosa de TFA a 3% (v/v) para a obtenção de uma solução de CHCA a 10 mg.mL⁻¹ (50 mM). Na

placa de análise foi adicionado 1 μL da solução de peptídeo misturada a 3 μL da solução de matriz, onde as medidas foram obtidas após a solidificação da mistura.

3.9 Preparação de LUV

Para a preparação das vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*) foi utilizado 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocoina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicero)] (POPG) (FIG. 14) em solução tampão de Tris-HCl a 10 mM (NaCl a 20 mM) em pH 8,5. O preparo foi realizado segundo a metodologia de desidratação/reidratação de vesículas (DRV) proposta por Kirby (KIRBY & GREGORIADIS, 1984), no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB), UFVJM. A Figura 15 (p. 44) apresenta um esquema com todas as etapas do preparo das vesículas. A etapa de extrusão foi realizada apenas para experimentos de DLS/ZETA. Foi utilizado um filtro de 100 nm onde a solução de vesícula é passada por 8 vezes para uma padronização do tamanho.

Figura 14: Estrutura química dos fosfolípidios utilizados para o preparo de vesículas unilamelares e suas respectivas massas molares. (A) POPC e (B) POPG.

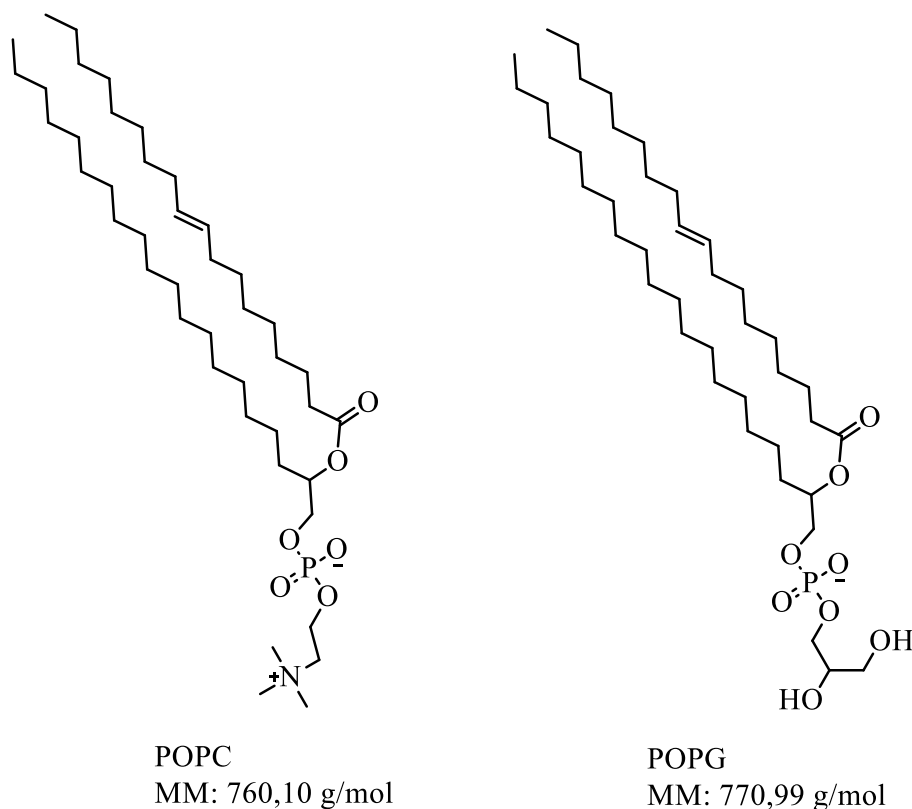
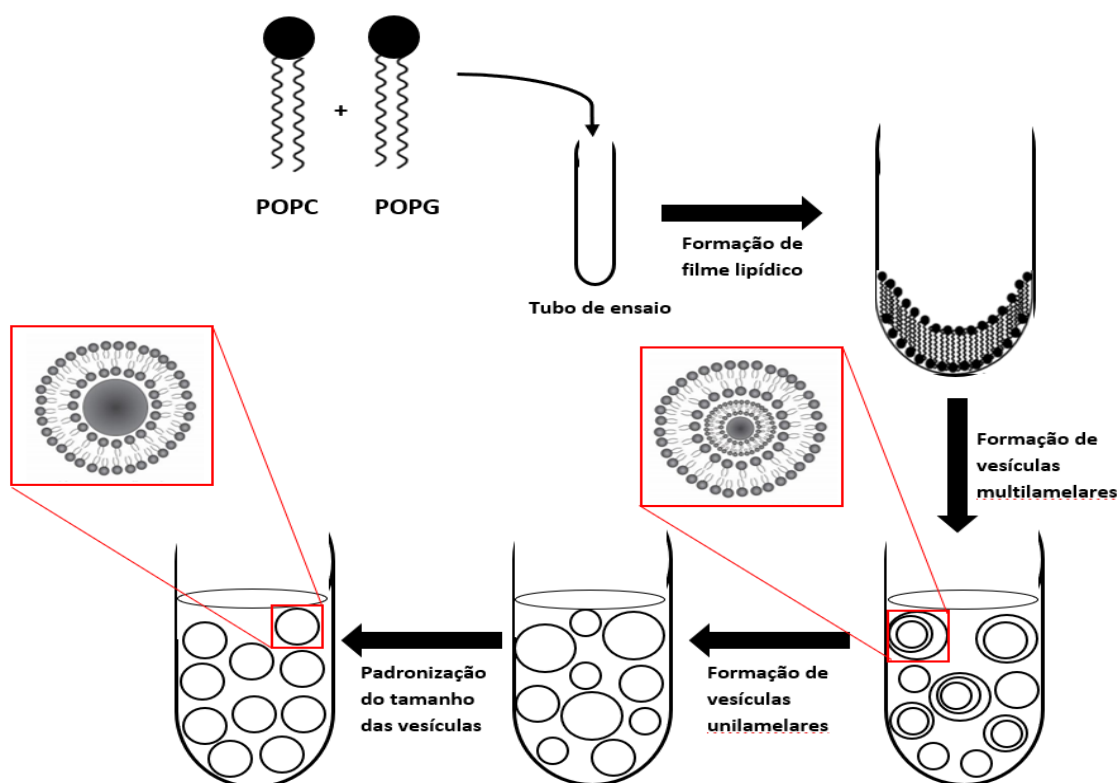


Figura 15: Esquema da preparação de vesículas unilamelares (LUV).



Fonte: Arquivo pessoal.

3.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

As análises de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizadas em um microcalorímetro VP-ITC da *Malvern*[®] (Malvern, Reino Unido), a 25 °C, pela titulação de solução de vesículas de POPC e POPC:POPG em peptídeo, no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB), UFVJM. A calibração do equipamento foi realizada com água deionizada Mili-Q[®] tipo 1, os dados foram tratados em *software Microcal Origin*[®] 7.0 para ITC. As soluções utilizadas foram previamente degaseificadas em um *Microcal Thermovac*[®] da marca *Malvern*[®].

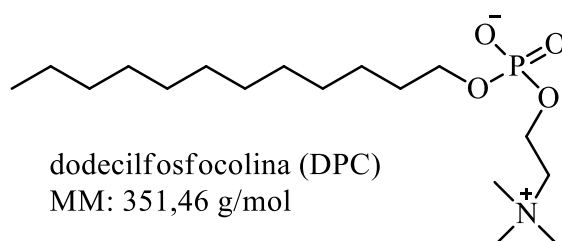
Os experimentos foram realizados com 50 injeções sucessivas de 1 μ L de titulante (LUV) a 20mM na célula de reação preenchida com 1,4 mL de solução de peptídeo, com intervalos de 300 s. Para os experimentos com D- e L- fenilseptina, foram utilizados 24 μ M de cada peptídeo em solução de 20 mM de vesículas de POPC e de POPC:POPG (3:1), preparados em solução tampão Tris-HCl pH 8,5. Já nos experimentos com Schistocina-2, as vesículas foram utilizadas na mesma concentração e pH, porém a concentração de peptídeo utilizada foi de 150 μ M.

3.11 Dicroísmo Circular (CD)

Os estudos conformacionais por CD foram realizados em um espectropolarímetro da JASCO® J-810 (Tóquio, Japão), equipado com sistema de controle de temperatura Peltier Jasco - PFD425S. O equipamento está situado no LIPq- Laboratório Multiusuário de Proteômica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. As análises foram realizadas em uma cubeta de quartzo com 0,5 mm de caminho óptico, a 25 °C, com janela espectral de 190 a 260 nm. Foram acumuladas cinco varreduras para cada medida. Estudos de Dicroísmo Circular foram realizados com os peptídeos a 100 µM em diferentes meios biomiméticos de membrana. As análises foram feitas em POPC (0,10, 0,25 e 0,50 mM), POPC:POPG 3:1 (0,25, 0,5 e 1 mM) ambas em solução tampão de Tris-HCl (10 mM) pH 8,5. Também foram preparadas soluções micelas de DPC (FIG. 16) (1, 10 e 100 mM) e SDS (FIG. 17, p. 46) (100, 200 e 400 mM) em água ultrapura. O tratamento de dados e os cálculos de deconvolução para obtenção dos teores de estruturas secundárias foram realizados a partir do programa CDpro® (SREERAMA & WOODY, 2000).

Para o Schistocina-2, as vesículas de POPC:POPG (3:1) (250, 500, 1 mM) e micelas de SDS (100, 200 e 400 mM) foram preparadas em solução tampão Tris-HCl pH 7,5.

Figura 16: Estrutura química do DPC e a massa molar correspondente.



3.12 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

Para a determinação do potencial Zeta e do diâmetro hidrodinâmico foram utilizadas vesículas de POPC e POPC:POPG (3:1) em um equipamento *Zetasizer nano* ZS da Malvern® modelo BI-900 (Worcestershire, Reino Unido) do Departamento de Farmácia da UFVJM. Foi utilizada uma cubeta de 1000 µL da Malvern® - modelo DTS1060. Foi realizado o espalhamento de luz monocromática (4 mW *Ne laser*, λ de

633 nm) e a intensidade de luz que foi espalhada pelas amostras foi determinada em um ângulo de 90°.

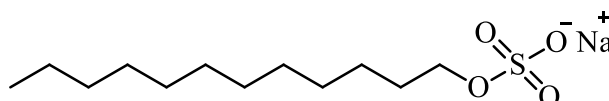
Os experimentos foram realizados pela titulação de solução de peptídeo a 0,00812 M de D-Phes e L-Phes em solução de vesículas de POPC e POPC:POPG (3:1) a 500 µM. As concentrações de peptídeos foram calculadas de modo que a concentração inicial dos peptídeos da fenilseptina na primeira titulação fosse igual a 56 µM, valor próximo ao MIC. Os experimentos consistiram em cinco injeções consecutivas de 5 µL de solução de peptídeo diretamente na cubeta contendo 700 µL da solução de LUV. Após cada injeção, aguardou-se 60 min para realizar as leituras do potencial Zeta e diâmetro hidrodinâmico para a estabilização do sistema.

Para o Schistocina-2, foram utilizadas vesículas de POPC e POPC:POPG (3:1) a 500 µM com solução de concentração inicial de 0,02175 M de peptídeo. Essa concentração foi calculada de modo a obter na solução inicial da primeira titulação, 150 µM de peptídeo, a mesma concentração utilizada para o experimento de ITC. Também foram realizadas titulações de 5 em 5 µL de solução de peptídeo na cubeta, contendo 700 µL de solução de LUV.

3.13 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os estudos estruturais dos peptídeos Pep 1 e Schistocina-2 foram realizados em ambientes micelares de SDS-d₂₅ (FIG. 17) (200 mM), os quais mimetizam a condição de membrana celular de bactérias (SCHNEIDER, 2015). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos em um espectrômetro *Bruker*[®] *AVANCE III 500* (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Figura 17: Estrutura química do SDS e a massa molar correspondente.



dodecilsulfato de sódio (SDS)

MM: 288,38 g/mol

Os experimentos unidimensionais de ¹H foram realizados empregando-se o programa de pulsos zg30, calibração de pulso e determinação do valor de frequência de

irradiação do sinal da água (o1). Foram realizados experimentos bidimensionais homonucleares de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY (BAX & DAVIS, 1985) e $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (WÜTHRICH, 1986) usando uma sonda de tripla ressonância (TBI - *Triple Resonance Broadband Inverse*).

Os parâmetros utilizados para o experimento de TOCSY foram janela espectral de 6009,6 Hz (12 ppm) e F1 e F2, número de pontos no domínio do tempo (TD) de 4096 em F2 e 512 em F1. Foi aplicado o programa de pulsos dipsi2esgpph com 60 varreduras (ns) e 16 varreduras de espera (ds). O pulso de radiofrequência utilizado para 90° (p1) foi de 10,88 μs e com tempo de mistura (d9) de 80 ms e modo de aquisição STATES-TPPI.

Já para os experimentos NOESY, foram utilizadas janela espectral de 6009,15 Hz (12 ppm) em F1 e F2, número de pontos no domínio do tempo (TD) de 4096 em F2 e 512 em F1. Foi aplicada a sequência de pulso noesygpwh5 com 60 varreduras (ns) e 32 varreduras de espera (ds). O pulso de radiofrequência empregado 90° (p1) foi de 11,13 μs . Os experimentos de TOCSY e NOESY foram atribuídos com tempo de mistura (d8) 250 ms em modo de aquisição TPPI.

Para os processamentos dos dados, foi utilizada a plataforma Linux na distribuição Fedora, versão 14, empregando-se o pacote computacional NMRPIPE[®] (DELAGLIO *et al.*, 1995). Os assinalamentos dos mapas de contornos de RMN foram realizados com o auxílio do programa NMRVIEW[®] versão 5.0.4 (JOHNSON & BLEVINS, 1994).

As estruturas tridimensionais foram determinadas por meio de experimentos de RMN bidimensionais (2D) homonucleares ($^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY e $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY). Como referência para identificação dos sistemas de spin dos resíduos de aminoácidos, foi utilizada a tabela de deslocamentos químicos do *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (disponível em: http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm. Acesso em fevereiro de 2018). O programa XPLOR-NIH (RICE & BRÜNGER, 1994; SCHWIETERS *et al.*, 2006) foi utilizado para os cálculos das estruturas tridimensionais, segundo o protocolo de arrefecimento simulado por dinâmica de ângulos de torção (*simulated annealing*) nmr_torsion. O limite máximo permitido para violações de restrições de distância aplicadas ao cálculo foi de 0,5 Å. As 10 estruturas de menor energia foram analisadas no programa molmol (KORADI & BILLETER, 1996).

As atribuições completas dos espectros bidimensionais foram realizadas seguindo a metodologia proposta por Wuthrich (WÜTHRICH, 1986). As correlações intra-residuais foram assinaladas primeiramente no mapa de contorno ^1H - ^1H -TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*).

3.14 Ensaios biológicos

3.14.1 Ensaios de citotoxicidade em células tumorais

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG, no Laboratório de Membrana Excitáveis (LAMEX). A linhagem celular MDA-MB-231 foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO), suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina e 5% de glutamina, a 37 °C e 5% de ambiente de CO₂. As células foram incubadas em placas de 96 poços (1 × 10⁴ células/poço) e mantidas durante 24 horas a 37 °C em 5% de CO₂ para adesão. Após esse tempo, foi feito um teste variando a concentração de L-Phes e D-Phes para verificar a viabilidade das células. O tempo de exposição ao fármaco foi de 60 minutos.

Depois, o meio de cultura celular com peptídeos foi modificado para um novo meio. Após 1 h de exposição aos peptídeos, 20 µL de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) foram adicionados a cada poço e incubados por 3 horas a 37 °C (MOSMANN, 1983). Após a eliminação do sobrenadante, foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver o formazan azul, à temperatura ambiente durante 15 min. Após o tempo de exposição aos peptídeos, a viabilidade celular (%) foi calculada segundo a equação 1:

$$\mathbf{viabilidade\ celular\ (\%)} = \frac{A_{540nm}^a}{A_{540nm}^c} \times \mathbf{100} \quad \mathbf{(Eq.1)}$$

Onde, A^a é a absorvância da amostra e A^c é a absorvância do controle, ambos medidos a 540 nm de densidade óptica.

Não há controle de solventes. O peptídeo é dissolvido em água Mili-Q estéril, e está extremamente concentrado.

3.14.2 Atividade antifúngica

Os testes de avaliação da atividade antifúngica dos peptídeos foram realizados na Universidade Federal de Vitória da Conquista. As leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 22019, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 e *Candida glabrata* ATCC 2001 foram utilizadas para atividade antifúngica. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o teste de suscetibilidade de microdiluição em cultura de leveduras (CSLI, 2002), com modificações.

Os testes foram realizados no meio de cultura Sabouraud dextrose (Kasvi, Itália). Diluições seriadas de 0,5 a 0,9765 mg.mL⁻¹ de L-Phes e D-Phes foram inoculadas nas placas de microtitulação de 96 poços estéreis. A densidade de leveduras por poço correspondeu a $1-5 \times 10^3$ CFU.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 44 h e processadas por leitura visual por turbidez. O controle positivo utilizado foi a nistatina nas mesmas concentrações de peptídeos (0,5 a 0,9765 mg.mL⁻¹). O uso do controle foi para avaliação da viabilidade dos microrganismos e da esterilidade do meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

CAPÍTULO 1

ESTUDO ESTRUTURAL, TERMODINÂMICO E BIOLÓGICO DOS PEPTÍDEOS EPÍMEROS DA FENILSEPTINA

4.1 INTRODUÇÃO

As moléculas de proteínas e peptídeos são majoritariamente constituídas por aminoácidos na configuração L. Contudo, tem sido registrada a ocorrência de vários resíduos de D-aminoácido na composição dessas moléculas. Inicialmente, foram registrados apenas em bactérias, mas, crescentemente tem sido reportada a ocorrência também em outros organismos vivos, incluindo seres humanos (da SILVA, 2009).


Alguns desses isômeros D- podem ser tóxicos ao organismo ou são usados com esse objetivo, para a potencialização da ação dos antibióticos, por exemplo (da SILVA, 2009). Curiosamente, muitos peptídeos, já relatados contendo isômeros D- e L- em vertebrados, possuem a isomerização no segundo resíduo de aminoácido da região N-terminal (JILEK *et al.*, 2005; BANSAL *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2007; JILEK *et al.*, 2012).

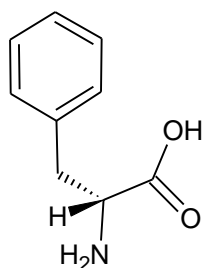
A substituição de um L-aminoácido por seu enantiômero D- pode determinar mudanças significativas na atividade biológica de um determinado peptídeo (LEE *et al.*, 2016). Um exemplo já publicado na literatura é da NdWFamida, que é a forma sintética contendo L-triptofano em substituição ao D-triptofano presente na forma natural e que diminui cerca de 1000 vezes o efeito de contração da aorta (MORISHITA *et al.*, 1997). No caso da dermorfina, foi o primeiro peptídeo de fonte animal que foi encontrado contendo D-aminoácido. Este resíduo foi descoberto apenas porque o isômero L- sintético era biologicamente inativo (MONTECUCCHI, 1981). Porém, a potencialização da atividade com a substituição de um D-aminoácido por um L- também já foi verificada, como no caso da ω -agatoxina IV, que possuem capacidades diferentes para o bloqueio de canais de cálcio sensíveis à voltagem em células de Purkinje cerebelares de ratos devido à enantiomerização no resíduo de serina 46 (HECK, *et al.*, 1994). No caso das bombininas H, o epímero L causa 60% de hemólise a uma concentração muito baixa e o epímero D causa menos que 35% (MANGONI, *et al.*, 2000).

As fenilseptinas são peptídeos antimicrobianos isolados do anuro *Hypsiboas*

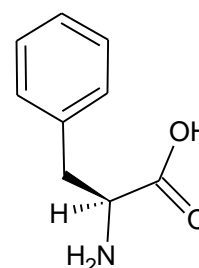
punctatus (FIG. 18), por de Magalhães e colaboradores (2013). Este peptídeo é constituído por 18 resíduos de aminoácidos (FFFDTLKKNLAGKVVIGALT-NH₂), que ocorrem naturalmente como dois epímeros (D e L) diferenciando-se apenas na estereoquímica do segundo resíduo de fenilalanina (F-2) da região *N*-terminal (FIG. 18).

Figura 18: Imagem do anuro da espécie *Hypsiboas punctatus* (à esquerda), seqüências primárias dos epímeros da fenilseptina (à direita) e representação estrutural dos enantiômeros da fenilalanina.

	Peptídeo	Seqüência primária
	D-Phes	F(D-F)FDTLKKNLAGKVVIGALT - NH ₂
	L-Phes	F(L-F)FDTLKKNLAGKVVIGALT - NH ₂



D-Fenilalanina



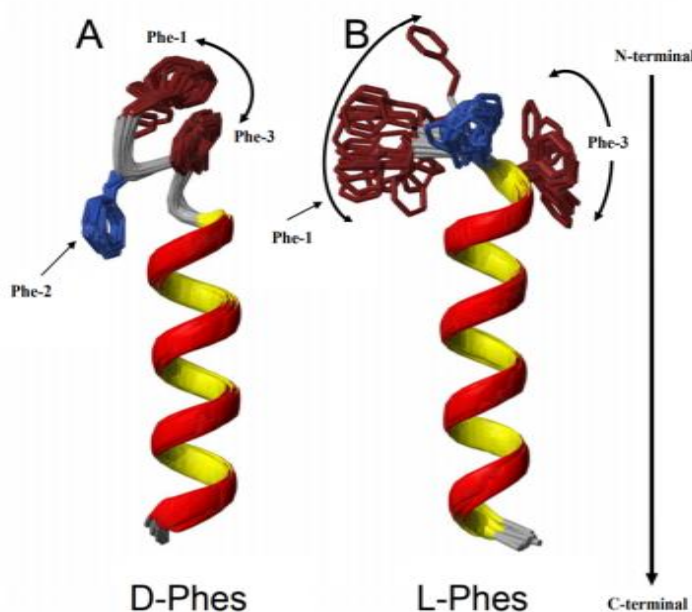
L-Fenilalanina

Fonte: A figura da espécie de anuro foi extraída de <https://www.shutterstock.com/video/clip-128008-stock-footage-spotted-treefrog-hypsiboas-punctatus.html>. Acesso em março 2018.

Até o momento, alguns estudos já foram realizados com esses peptídeos para observar se a epimerização é um fator que influencia na atividade antimicrobiana. Foram realizados ensaios *in vitro*, que comprovaram que o [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes) foi mais efetivo do que L-Phes contra as bactérias patogênicas *S. aureus* (ATCC 29313) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (de MAGALHÃES *et al.*, 2013). Estudos de RMN em solução de 60% de TFE/H₂O (v/v), demonstraram que a epimerização induz uma alteração na conformação nos primeiros quatro resíduos *N*-terminais e mudanças de orientação em suas respectivas cadeias laterais na estrutura de D-Phes em relação a L-Phes (FIG. 19, p. 52) (de MAGALHÃES, *et al.*, 2013). Além disso, observou-se também que a região *N*-terminal de D-Phes possui uma maior convergência das

estruturas calculadas sendo, portanto, uma região melhor estruturada. Essa alteração na conformação foi atribuída a diferença na atividade antimicrobiana desses dois peptídeos.

Figura 19: Sobreposição das estruturas de menor energia das fenilseptinas em 60% TFE. Em azul, o segundo resíduo de fenilalanina da região *N*-terminal, onde é mostrado o efeito da enantiomerização na conformação do peptídeo. Os demais resíduos de fenilalanina, F1 e F3, estão em vermelho escuro.



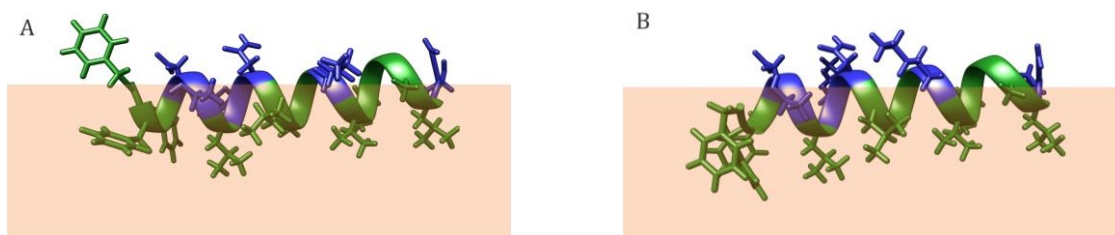
Fonte: de MAGALHÃES *et al.*, 2013.

Os estudos estruturais de RMN realizados por de Magalhães, (2013) e Munhoz, (2012), mostraram que os anéis aromáticos de F1, F2 e F3 assumem uma organização conformacional devido à interações de empilhamento π - π que aumenta a interação do resíduo F1 com o F3. Esse arranjo estrutural permite que o resíduo D-Phe-2 interaja com a Leu-6. Em conjunto, estes elementos proporcionam um maior momento hidrofóbico na região *N*-terminal de D-Phes em comparação com a L-Phes. A Figura 20 (pág. 53) mostra essa interação dos anéis aromáticos e a influência disso no ancoramento do peptídeo com a membrana.

Estudos de RMN em fase sólida foram realizados por Munhoz para determinar a topologia dos peptídeos (orientação na bicamada). Foi verificado que, apesar de D-Phes possuir um alinhamento muito mais definido na região *N*-terminal, os dois peptídeos possuem os mesmos parâmetros angulares, de 93° para ângulos de inclinação do peptídeo com relação a superfície da membrana e ângulo rotacional de 70° . Essas orientações foram as mais plausíveis das sete determinadas para ambas as estruturas por

indicarem uma maior inserção dos resíduos hidrofóbicos na superfície da bicamada (FIG.20). Porém, a cadeia lateral do resíduo F1 de L-Phes é exposta à região da interface, não estando na mesma face que os outros resíduos, proporcionando uma menor ancoragem da região *N*-terminal com relação a D-Phes (MUNHOZ, 2012).

Figura 20: Alinhamentos possíveis para L-Phes (A) e D-Phes (B). Os resíduos com cadeias laterais hidrofílicas são representados em azul e, com cadeias laterais hidrofóbicas, em verde. O núcleo hidrofóbico da bicamada fosfolipídica é representado pela caixa em rosa claro.



Fonte: MUNHOZ, 2012.

Na Figura 20, podemos observar que o anel aromático do resíduo D-Phe-1 do peptídeo D-Phes apresenta-se inserido na membrana, enquanto que o resíduo L-Phe-1 do peptídeo L-Phes fica exposto ao ambiente hidrofílico. Este efeito observado é devido à enantiomerização do segundo resíduo da fenilalanina, que permite um maior momento hidrofóbico de D-phes, o que justifica uma maior interação e atividade deste peptídeo, quando comparado ao seu epímero.

Embora os dados estruturais de RMN apontem para uma relação entre a atividade biológica e as características conformacionais de cada peptídeo, muitos estudos da interação peptídeo-membrana ainda são necessários para investigar se as afinidades e efeitos da epimerização na bicamada fosfolipídica e a maior atividade bactericida por parte de D-Phes em relação a L-Phes estejam de fato associadas a alterações estruturais que permitam uma interação mais efetiva do peptídeo com a membrana bacteriana fosfolipídica (de MAGALHÃES *et al.*, 2013). Para isto, neste trabalho, foram realizados os estudos conformacionais por CD e termodinâmicos da interação desses peptídeos com meios biomiméticos de membrana através da Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e Espalhamento de Luz dinâmico (DLS), Potencial Zeta, além de ensaios biológicos em células tumorais e avaliação da atividade antifúngica, para a avaliação de aspectos adicionais da relação estrutura-atividade biológica desses epímeros.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Síntese e caracterização dos peptídeos D-Phes e L-Phes

As Tabelas 1 e 2 (p. 55) mostram os dados e resultados obtidos para todas as etapas de acoplamento e desproteção da síntese. A síntese apresentou somente um problema de acoplamento para cada peptídeo, sendo no 17º resíduo para a D-fenilseptina e, no 18º resíduo para a L-fenilseptina. Neste sentido, foi necessário o reacoplamento desses resíduos para a efetivação da etapa de acoplamento, com o tempo de reação de 3 h, sem ter sido necessário o aumento da quantidade de reagentes.

Tabela 1: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo D-fenilseptina. # Etapa de reacoplamento; + Resultado positivo para o teste de Kaiser (presença de grupo amino livre); - Resultado negativo (ausência de grupo amino livre); ~ Teste não realizado

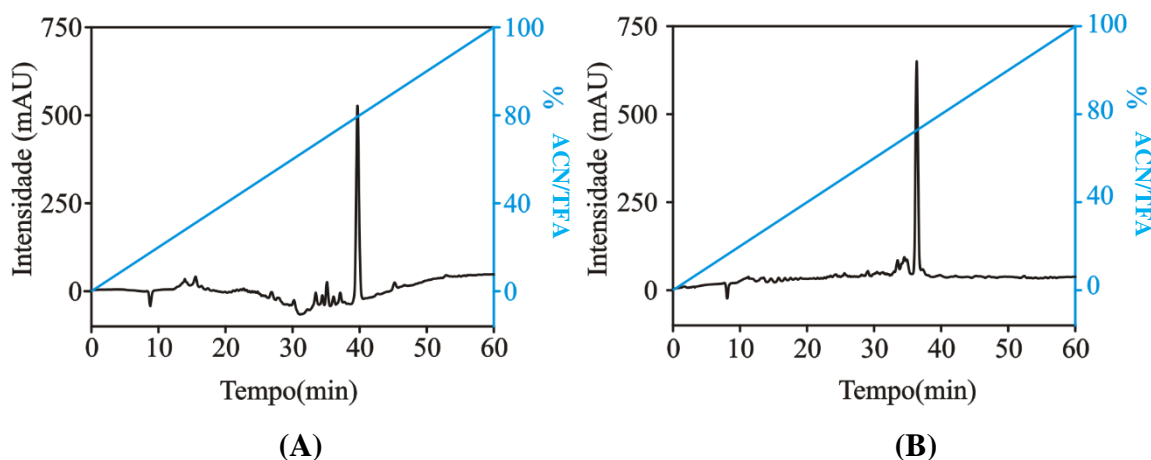
Ordem de acoplamento	Derivado de aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Acoplamento	Desproteção
1º	Fmoc-Thr(tBu)-OH	4	3	+	+
2º	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
3º	Fmoc-Ala-OH	3	2	+	+
4º	Fmoc-Gly-OH	3	2	+	+
5º	Fmoc-Ile-OH	3	2	+	+
6º	Fmoc-Val-OH	3	2	+	+
7º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
8º	Fmoc-Gly-OH	3	2	+	+
9º	Fmoc-Ala-OH	3	2	+	+
10º	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
11º	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	+	+
12º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
13º	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
14º	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3	2	+	+
15º	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	2	+	+
16º	Fmoc-Phe-OH	3	2	+	+
17º	Fmoc-(D)Phe-OH	3	2	-	~
#	Fmoc-(D)Phe-OH	3	3	+	+
18º	Fmoc-Phe-OH	3	2	+	+

Tabela 2: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo L-fenilseptina. # Etapa de reacoplamento; + Resultado positivo para o teste de Kaiser (presença de grupo amino livre); - Resultado negativo (ausência de grupo amino livre); ~ Teste não realizado

Ordem de acoplamento	Derivado de aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Thr(tBu)-OH	4	3	+	+
2°	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
3°	Fmoc-Ala-OH	3	2	+	+
4°	Fmoc-Gly-OH	3	2	+	+
5°	Fmoc-Ile-OH	3	2	+	+
6°	Fmoc-Val-OH	3	2	+	+
7°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
8°	Fmoc-Gly-OH	3	2	+	+
9°	Fmoc-Ala-OH	3	2	+	+
10°	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
11°	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	+	+
12°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
13°	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
14°	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3	2	+	+
15°	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	2	+	+
16°	Fmoc-Phe-OH	3	2	+	+
17°	Fmoc-(L)Phe-OH	3	2	+	+
18°	Fmoc-Phe-OH	3	2	-	~
#	Fmoc-Phe-OH	3	3	+	+

Ao final das sínteses, foi realizada a etapa de clivagem das peptidil-resinas e a liofilização para obtenção do peptídeo livre e seco. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por CLAE-FR para a verificação da qualidade da síntese pelo perfil cromatográfico. A Figura 21 (p. 56) apresenta o perfil cromatográfico analítico de fase reversa obtido para as fenilseptinas.

Figura 21: Perfil cromatográfico das amostras brutas do peptídeo fenilseptina. (A) D-Phes e (B) L-Phes. A linha azul retrata a variação da concentração de acetonitrila.

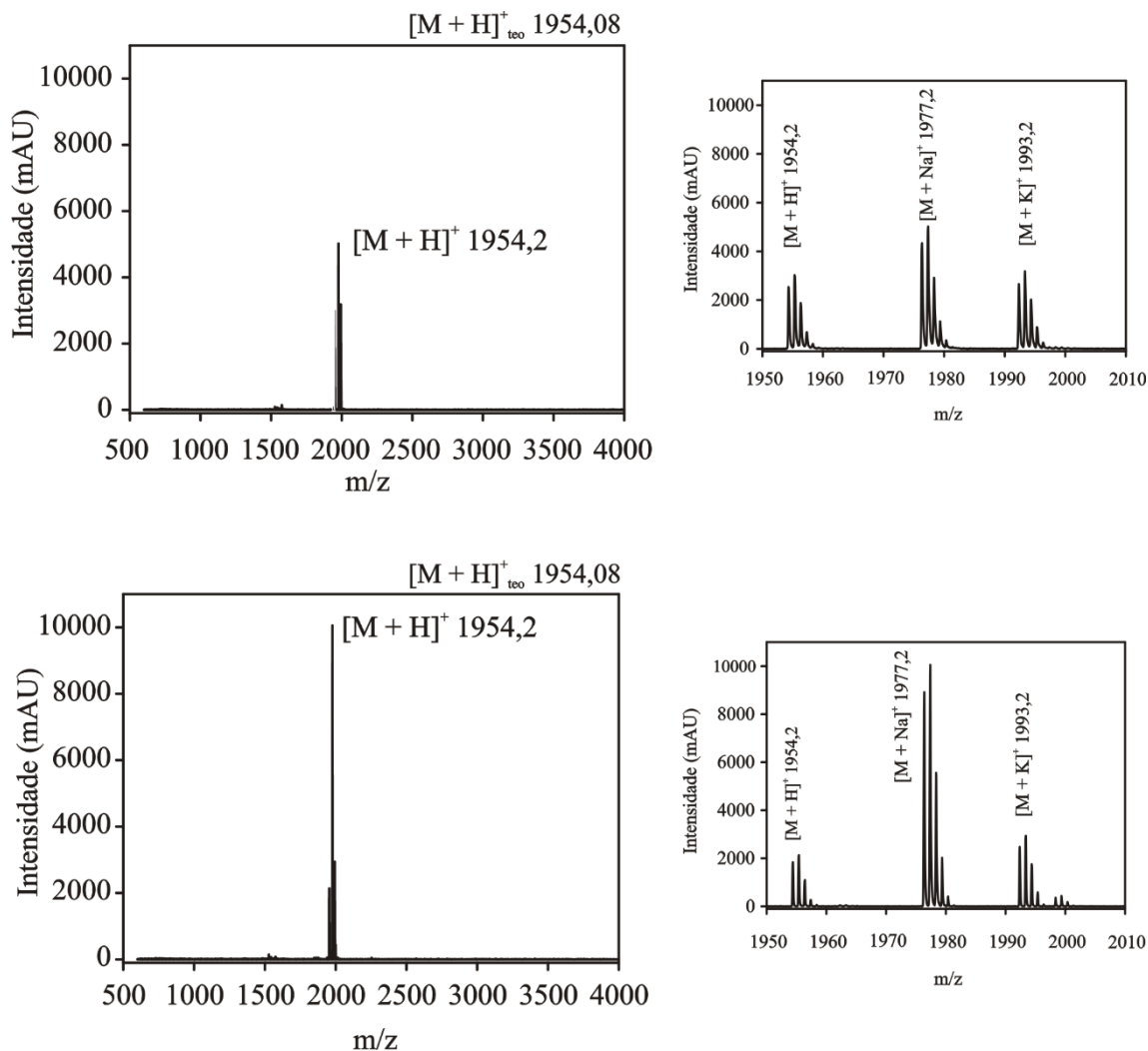


Pelos perfis cromatográficos, foi observada a presença de um pico principal em cada cromatograma, com diferentes tempos de retenção para cada epímero. Para o isômero D- foi observado um tempo de retenção (t_r) de 39,64 min, enquanto que para o L-Phes um t_r de 36,31 min. Esses resultados mostraram que a síntese foi eficiente pela presença de poucos picos indicativos de impurezas.

As sequências primárias de D-Phes e L-Phes distinguem-se, como dito anteriormente, apenas pela enantiomerização do resíduo-2. Esta única modificação pós-traducional contribui para diferenças na polaridade dos peptídeos, modificando a ligação com a coluna cromatográfica, resultando em tempos de retenção distintos para as duas moléculas. Este resultado é condizente com estudos que utilizam a diferença no tempo de retenção para detecção de epímeros (BUCZEK, *et al.*, 2005; de MAGALHÃES, *et al.*, 2013). A diferença pode ser justificada pelo maior momento hidrofóbico de D- com relação a L-Phes, diminuindo minimamente a polaridade do mesmo e fazendo com que interaja mais com a fase estacionária, resultando no aumento no tempo de retenção.

As alíquotas coletadas nos respectivos tempos de retenção $t_r = 36,31$ para L-Phe e $t_r = 39,64$ para o D-Phe foram caracterizadas por espectrometria de massa em equipamento do tipo MALDI-ToF/ToF e os espectros estão representados na Figura 22 (p. 57).

Figura 22: Ionograma da amostra bruta dos peptídeos fenilseptina. O primeiro é o ionograma de D-Phes e, abaixo, o de L-Phes.



A massa teórica monoisotópica dos peptídeos epímeros protonados é de 1954,08 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Nos espectros, é possível verificar a presença do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 1954,2 para ambos os peptídeos da fenilseptina. Como a massa do resíduo de aminoácido D-fenilalanina é a mesma do L-fenilalanina, o resultado semelhante para ambos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ era esperado. Também é possível identificar a presença dos adutos formados por íons de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 1977,2 e de potássio $[\text{M}+\text{K}]^+$ em m/z 1993,2.

Após verificar que os peptídeos foram corretamente sintetizados, e encontravam-se puros, os mesmos foram utilizados para estudos conformacionais, termodinâmicos e biológicos, com o intuito de compreender com mais afinco a interação peptídeo-membrana do D-Phes e L-Phes e verificar sua ação citotóxica em modelos de células tumorais.

4.2.2 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular

Foram obtidos espectros de Dicroísmo Circular (CD) em diferentes meios biomiméticos de membrana (DPC, POPC, POPC:POPG) e em solução tampão tris HCl pH 8,5 para ambos os epímeros da fenilseptina para avaliar o comportamento conformacional dos mesmos. As Figuras 23, 24 e 25 (p. 59) apresentam os espectros de CD obtidos para o peptídeo D-Phes e L-Phes nos diferentes meios já citados.

Figura 23: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de DPC. (A) D-Phes e (B) L-Phes.

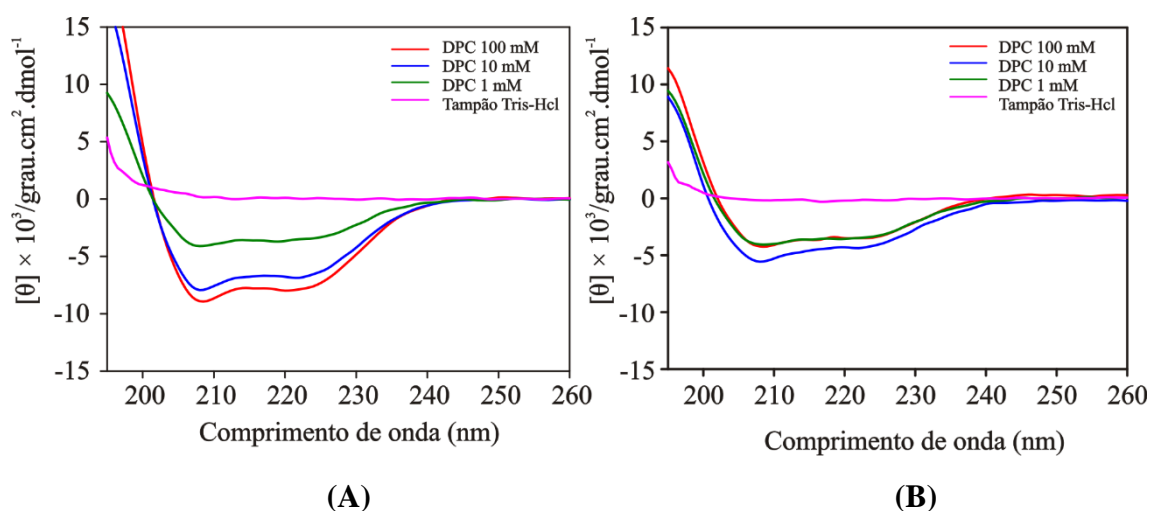


Figura 24: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de POPC:POPG. (A) D-Phes e (B) L-Phes.

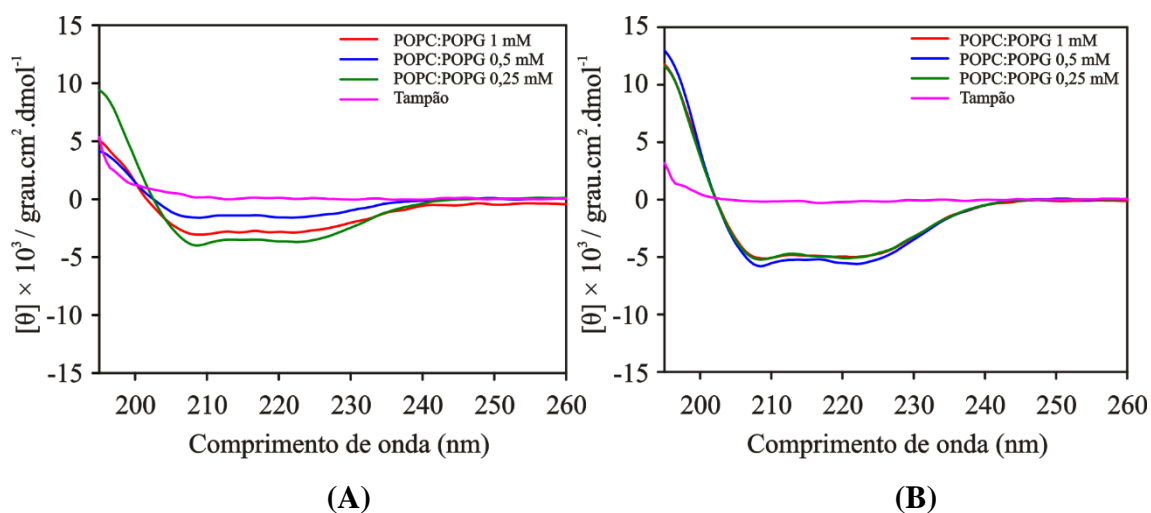
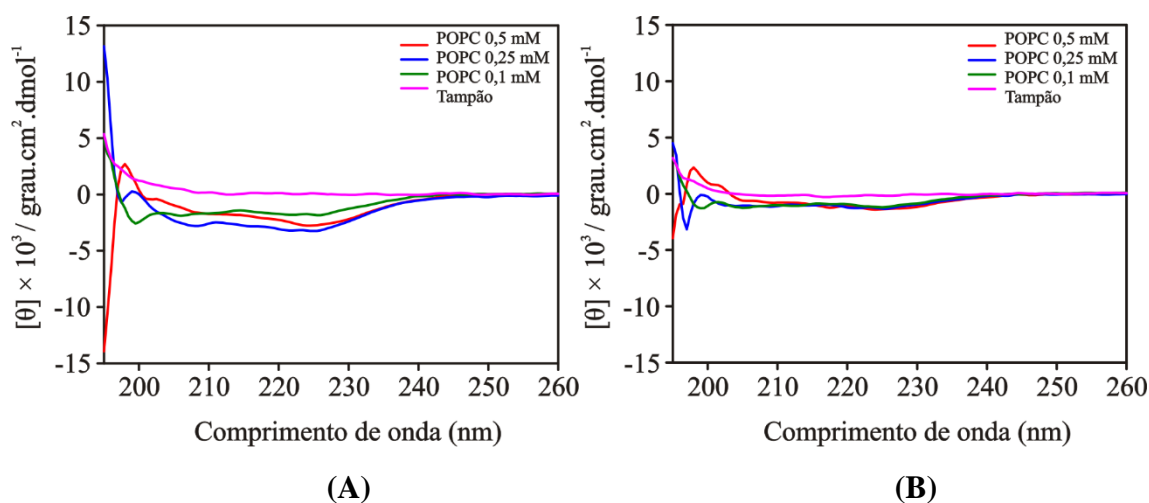


Figura 25: Espectros de CD de 100 μ M de peptídeos fenilseptina em diferentes concentrações de POPC. (A) D-Phes e (B) L-Phes.



Os resultados mostram que os peptídeos não possuem uma conformação preferencial em solução tampão. A tendência de estruturação é baixa em meio aquoso, pois as ligações de hidrogênio intramoleculares do peptídeo estão em competição com as ligações de hidrogênio do solvente (SUEKI *et al.*, 1984; WOJCIK *et al.*, 1990), não possibilitando que a conformação helicoidal seja definida. No entanto, na presença de micelas de DPC e vesículas de POPC:POPG, foram observadas mudanças significativas nos perfis dos espectros de CD. O aumento da amplitude dos sinais observados nos espectros, com mínimos próximos a 208 e 222 nm e máximos em aproximadamente 196 nm é um indício de que ambos os peptídeos adquirem a conformação predominantemente helicoidal (GREENFIELD, 2006).

Em 10 mM de DPC, por exemplo, foi observado um conteúdo de hélice de 29 % para D-Phes e de 12 % para L-Phes. O maior conteúdo de hélice de D-Phes pode estar relacionado com a estruturação em hélice mais homogênea na porção *N*-terminal, proposta por RMN. Em contraste, L-Phes possui a região *N*-terminal menos homogênea devido ao não empilhamento dos anéis aromáticos das cadeias laterais de F1, F2 e F3, provocando um menor momento hidrofóbico e, conseqüentemente, uma interação menos efetiva com a superfície da membrana.

Em POPC, pode-se observar que a estruturação em hélice para ambos os peptídeos não foi muito bem definida pelos espectros, comparados com POPC:POPG. Na concentração de 0,5 mM em POPC:POPG, os mínimos característicos de formação de hélice estão mais visíveis do que na mesma concentração de POPC. Isso pode ser confirmado pelos cálculos de porcentagem de hélice para um mesmo peptídeo (L-Phes),

na mesma concentração (0,5 mM), em vesículas aniônicas e zwitteriônicas. Foi obtido 18 % de hélice em POPC:POPG e 6,26% em POPC. O conteúdo de hélice foi cerca de três vezes maior. Este resultado pode estar associado a seletividade dos peptídeos a membranas de bactérias que são predominantemente aniônicas, e pouco ativos a células eucarióticas que são zwitteriônica.

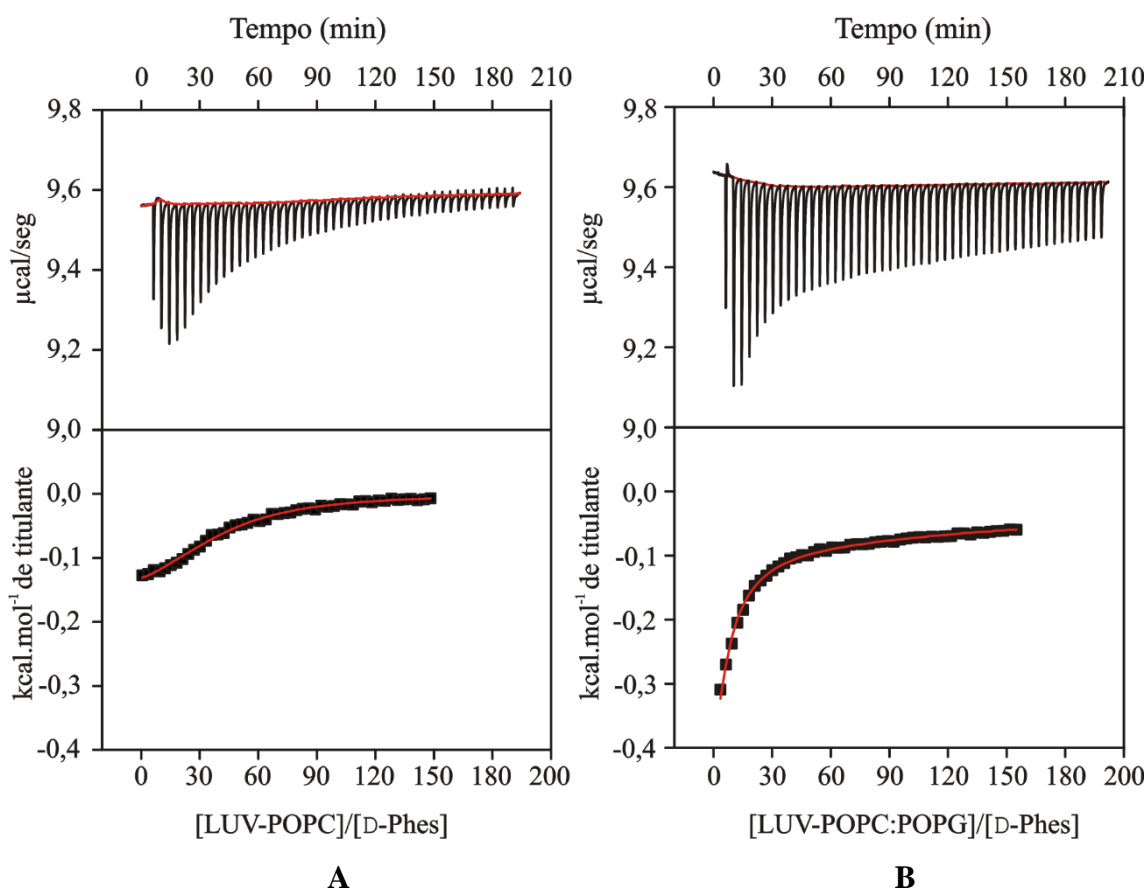
Em 0,25 mM de POPC:POPG, é possível observar uma menor estruturação em hélice de D-Phes ($H = 12\%$) com relação a L-Phes ($H = 18\%$). Isso pode ter ocorrido devido à uma distorção da hélice de D-Phes na região próxima à extremidade C-terminal observada nos estudos de RMN realizados por Munhoz (MUNHOZ, p. 122-123, 2012).

4.2.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Os experimentos de ITC foram realizados titulando-se suspensão de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG 3:1 (20 mM) em soluções de 24 μM de peptídeos (D-Phes e L-Phes) para obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação. As integrais da variação de calor envolvido em cada injeção resultam nas isotermas de calor. A injeção de 5 μL de vesícula à célula de reação que contém peptídeo provoca uma alteração do fluxo de calor que é representado por cada sinal da curva calorimétrica.

Os resultados do fluxo de calor obtidos para a interação de D-Phes e L-Phes com meios biomiméticos de membrana apresentaram variação de energia negativa, indicando a predominância de interação exotérmica, que pode ser consequência de interações eletrostáticas entre o peptídeo e as vesículas (SEELIG, 2004; ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008) (FIG. 26, p. 61 e 27, p. 63). Com o aumento da razão molar LUV/peptídeo ocorre também a diminuição do fluxo de calor. Este comportamento ocorre, pois à medida que aumenta a razão molar diminui a quantidade de peptídeos disponíveis para a interação. É descrito que quando há saturação do sistema, esse valor tende a diminuir até que se tornem próximos ao calor de diluição das vesículas (ARIAS *et al.*, 2017).

Figura 26: Isotermas de fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica para D-Phes. Titulação de LUV de (A) POPC (20 mM) em D-Phes e (B) LUV-POPC:POPG em D-Phes.



Os parâmetros termodinâmicos calculados para cada curva calorimétrica obtidas para D-Phes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em D-Phes (24 μM) a 25 °C

Parâmetros Termodinâmicos	LUV POPC (20 mM)	LUV POPC:POPG (20 mM)
n	$11,90 \pm 1,04$	$1,84 \pm 7,31 \times 10^{-5}$
K (L.mol ⁻¹)	$2,34 \times 10^3 \pm 160$	$7,48 \times 10^3 \pm 2,40 \times 10^2$
ΔG^0 (cal.mol ⁻¹)	-4602,02	-5289,00
ΔH^0 (cal.mol ⁻¹)	$-189,40 \pm 6,53$	$-4481,00 \pm 65$
ΔS^0 (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	14,80	2,70

Os três parâmetros termodinâmicos de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs

obtidos por ITC variam linearmente com a helicidade dos peptídeos ligados à membrana (WIEPRECHT *et al.*, 2000). Como observado nos resultados de CD, a helicidade para os peptídeos em POPC foi significativamente menor do que observado na presença de POPC:POPG. Esses dados concordam com a constante de interação que foi menor em POPC ($2,34 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$) do que em POPC:POPG ($7,48 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$), indicando uma maior interação do peptídeo D- em meios aniônicos.

Para as interações de D-Phes com os dois sistemas de vesículas, ocorreu uma variação negativa da energia livre de Gibbs. Isso sugere que a interação peptídeo-membrana é um processo espontâneo (forte ligação e alta afinidade) e que resulta em uma afinidade de interação que pode causar uma perturbação do sistema, como observado para o peptídeo Tritrp3 (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008). Estes resultados mostram que existe uma constante de partição alta para o sistema

A entropia do sistema está associada à rotação e translação global das moléculas presente no sistema. Contudo, em todos os sistemas aqui avaliados o aumento da entropia pode ser explicado pela dessolvatação resultante da interação peptídeo-membrana, que aumenta também o número de moléculas livres (WIEPRECHT, *et al.*, 2000). Assim, o maior valor encontrado para a componente entrópica (ΔS^0) da interação de D-Phes/POPC, comparado ao de D-Phes/POPC:POPG, é resultado também de um maior número de peptídeos livre em solução. Este resultado sugere que há menor inserção do D-Phes na interface hidrofóbica da bicamada de vesícula zwitteriônica (POPC) que na vesícula aniônica (POPC:POPG). Adicionalmente a isto, a maior contribuição entálpica em vesículas de POPC:POPG ($-4481 \text{ cal. mol}^{-1}$) revelam que a interação eletrostática com a D-Phes é significativamente maior do que em vesículas zwitteriônicas de POPC ($-189,4 \text{ cal.mol}^{-1}$) (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008). Essa variação da entalpia também pode estar relacionada a enovelamento do peptídeo, que é um processo que gera muito calor. Com isso, quanto maior a variação da entalpia, maior o calor liberado para a estruturação em α -hélice da estrutura secundária do peptídeo.

O mesmo experimento foi realizado para o peptídeo L-Phes. As isotermas obtidas podem ser observadas na Figura 27 (p. 63) e, na Tabela 4 (p. 63), estão os parâmetros termodinâmicos calculados para a interação desse peptídeo com as mesmas vesículas de POPC e POPG:POPG.

Figura 27: Gráfico de fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica para L-Phes. Titulação de LUV de (A) POPC (20 mM) em L-Phes e (B) POPC:POPG em L-Phes.

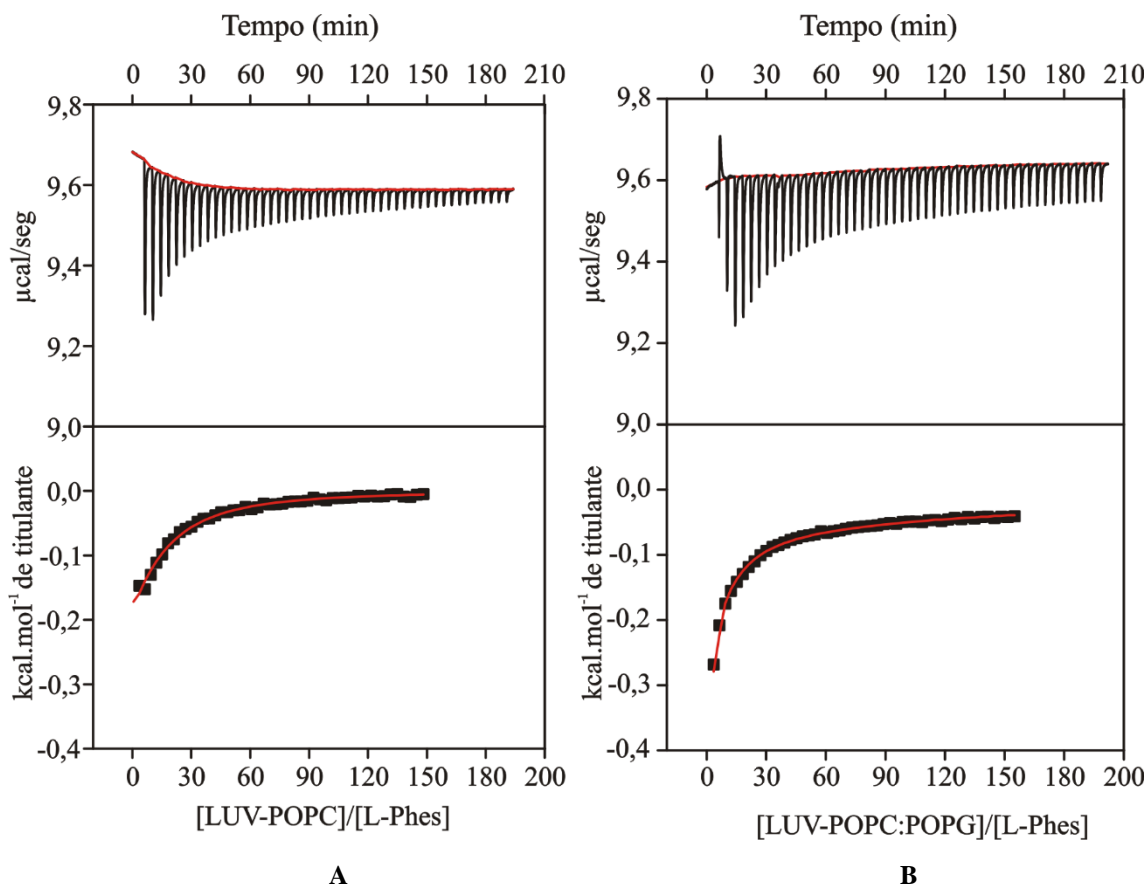


Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em L-Phes (24 μM) a 25 °C

Parâmetros Termodinâmicos	LUV POPC (20 mM)	LUV POPC:POPG (20 mM)
n	$8,39 \pm 2,56$	$0,99 \pm 3,98 \times 10^{-5}$
K (L.mol ⁻¹)	$1,52 \times 10^3 \pm 164,00$	$2,32 \times 10^3 \pm 1,30 \times 10^2$
ΔG^0 (cal.mol ⁻¹)	-4349,01	-4592,42
ΔH^0 (cal.mol ⁻¹)	$-741,40 \pm 242,10$	$-5305,00 \pm 122,00$
ΔS^0 (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	12,10	-2,39

Da mesma forma e utilizando as mesmas considerações feitas sobre os efeitos termodinâmicos da interação do D-Phes com as vesículas, foi observado que L-Phes

possui maior afinidade com LUVs aniônicas de POPC:POPG quando comparado com LUV zwitteriônicas de POPC.

O processo de interação do L-Phes com LUV também ocorre via um processo espontâneo sugerido pelo valor negativo da energia livre de Gibbs. Semelhantemente, o menor valor da entalpia para POPC ($-741,4 \text{ cal.mol}^{-1}$), cerca de sete vezes menor com relação a POPC:POPG, sugere uma maior interação eletrostática de L-Phes com vesículas aniônicas em comparação a vesículas zwitteriônicas.

A contribuição entrópica foi maior na presença de vesículas zwitteriônicas ($12,1 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) quando comparado com as vesículas aniônicas de POPC:POPG ($-2,39 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$). Como já foi relatado, como o peptídeo se insere menos em vesículas de POPC, há um maior número de moléculas de peptídeos livres e, conseqüentemente, uma maior desorganização do sistema. Novamente, a interação ocorre de forma mais efetiva com vesículas de POPC:POPG em comparação a vesículas zwitteriônicas, como observado para o D-Phes. Importante destacar que o valor negativo para a variação da entropia em POPC:POPG pode salientar uma alteração conformacional do peptídeo L-Phes, de uma menos ordenada em solução aquosa para uma muito ordenada na interação com a membrana. Essa mudança faz com que o peptídeo permaneça mais na superfície e menos na interface, ou seja, interagindo mais eletrostaticamente e, assim, prevalecendo a componente entálpica. (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008). A variação da entropia também pode informar sobre a contribuição da interação hidrofóbica do sistema (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008). Como os valores da variação de entropia são maiores para D-Phes tanto em vesículas aniônicas quanto em zwitteriônicas, é possível sugerir que a interação hidrofóbica é mais representativa em D-Phes do que em L-Phes, concordando com os estudos de RMN que propuseram um maior momento hidrofóbico para D-Phes oriundo da maior convergência dos anéis aromáticos da cadeia lateral das fenilalaninas da porção *N*-terminal.

Pode-se observar que pelos valores da constante de interação terem sido maiores para D-Phes em ambos os meios, esse peptídeo possui uma maior interação com a membrana comparado ao seu epímero. Nota-se que o valor de *K* na presença de LUVs de POPC:POPG foi aproximadamente o dobro para D-Phes ($7,48 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$) em comparação ao L-Phes ($2,32 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$). Contudo, a componente entálpica para D-Phes ($-4481,00 \text{ cal.mol}^{-1}$) foi apenas 15% maior daquela observada para L-Phes ($-5305,00 \text{ cal.mol}^{-1}$). Dessa forma, não se trata de um aumento na interação eletrostática e

sim, de uma maior capacidade de inserção, que está de acordo com o maior momento hidrofóbico proposto pelos estudos de RMN (MUNHOZ, 2012; de MAGALHÃES *et al.*, 2013).

Esta maior interação pode estar relacionada à orientação das cadeias laterais das fenilalaninas (F1, F2 e F3) na D-Phes, estabilizada por interações π dos anéis fenílicos proposto por Munhoz (2012), permitindo maior inserção da região *N*-terminal da cadeia peptídica da D-Phes na interface das membranas (FIG. 20).

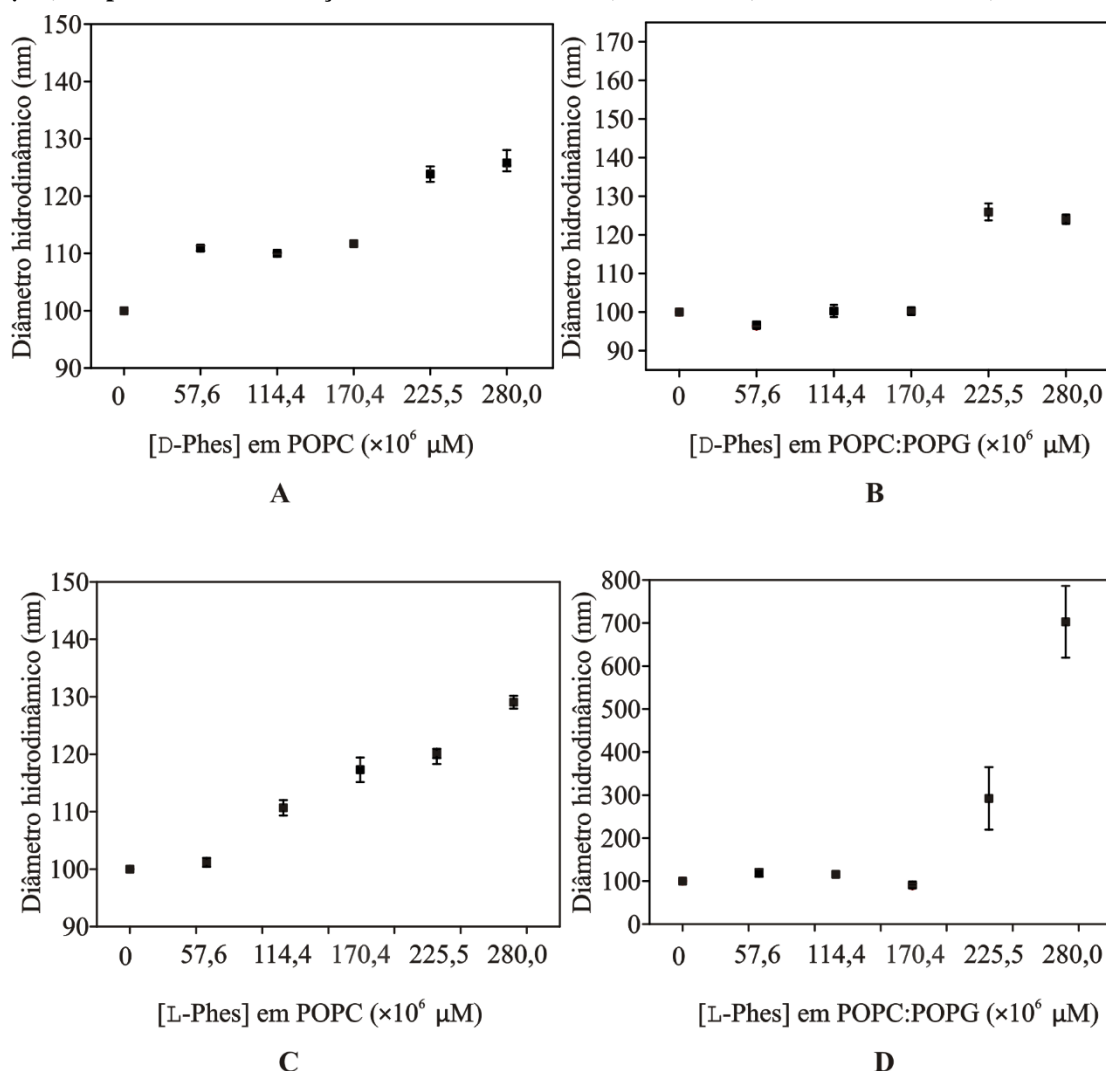
4.2.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

Foram ainda realizados estudos do potencial Zeta (ζ) e do diâmetro hidrodinâmico (D_h) das LUV de tamanho definido (100 nm) através da titulação de peptídeos em soluções de LUV de POPC e POPC:POPG.

Inicialmente, foi realizado um experimento com o intuito de determinar o tempo ideal de leitura, após o qual o sistema esteja em total equilíbrio. Para isso, após a adição de peptídeo na cubeta contendo vesículas, foram realizadas leituras em intervalos de 10 minutos até um tempo final de 60 minutos, determinando-se 60 minutos como o tempo necessário para estabilização do sistema após o qual não ocorreu grandes variações nas medidas de D_h e de ζ das LUV.

A Figura 28 (p. 66) mostra as variações do diâmetro hidrodinâmico obtidos para as vesículas em função da concentração dos peptídeos.

Figura 28: Gráfico da variação do diâmetro hidrodinâmico de LUV de POPC e POPC:POPG (500 μM) para a titulação de D-Phes. (A e B) e L-Phes (C e D).



Para os dois peptídeos, foi verificado que a interação com vesículas promove o aumento no tamanho do diâmetro hidrodinâmico. Os valores iniciais para LUV, na ausência de peptídeo, foram próximos (100 nm) para ambos os epímeros devido ao processo de extrusão para uma padronização do tamanho das vesículas.

Em vesículas zwitteriônicas, o comportamento de D-Phes e L-Phes foi bem aproximado, aumentando o D_h de 100 nm para aproximadamente 130 nm. O aumento do diâmetro é resultado da interação dos peptídeos com superfícies das membranas das vesículas (ALVES *et al.*, 2011), conforme comprovado pelos dados termodinâmicos obtidos por ITC.

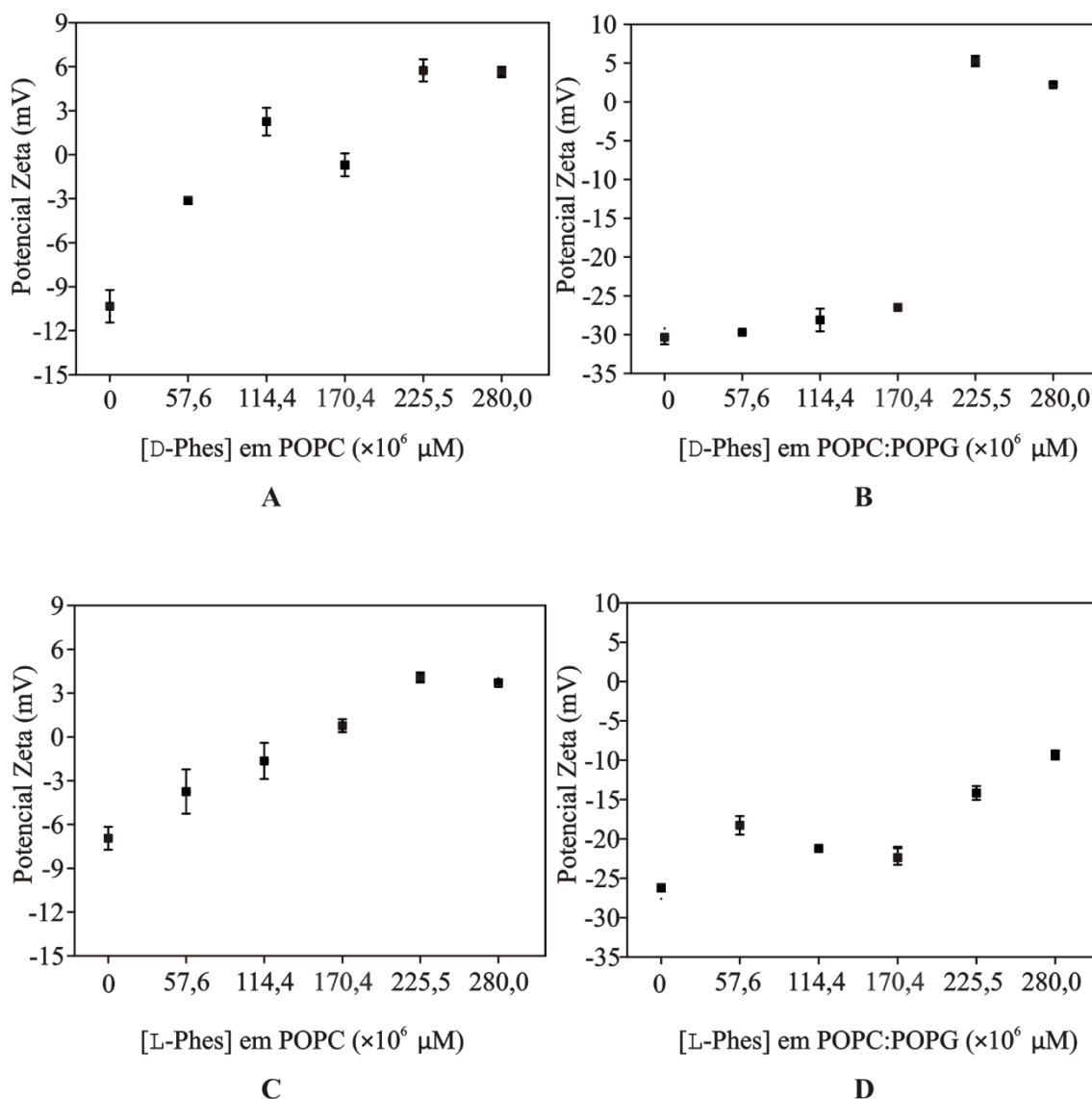
A principal diferença está no comportamento das vesículas durante a titulação. Nota-se que na presença de D-Phes o aumento do D_h é progressivo enquanto para L-Phes o aumento ocorre apenas de forma abrupta após concentrações superiores a

170 μM . Neste caso, o maior momento hidrofóbico de D-Phes permite que o peptídeo consiga inserir-se na interface da bicamada mesmo em baixas concentrações. Contudo, a perturbação na bicamada por parte da L-Phes somente ocorre com o acúmulo e associação de moléculas de peptídeo na bicamada. Estes dados estão de acordo com o observado por ITC que mostram que o isômero D-Phes se liga mais facilmente a membranas, ($K = 7,48 \text{ L.mol}^{-1}$) quando compara ao isômero L-Phes ($K = 2,32 \text{ L.mol}^{-1}$).

Segundo análises de RMN realizadas previamente por Munhoz e de Magalhães (MUNHOZ, 2012; de MAGALHÃES *et al.*, 2013) o peptídeo L-Phes possui uma maior mobilidade provocada por uma maior possibilidade de orientações moleculares. Como consequência, ocorrem interações peptídeo-membrana distintas, e por isso, uma maior variação de Diâmetro Hidrodinâmico que é observada para L-Phes com relação ao seu epímero. Por outro lado, as moléculas de D-Phes adotam uma orientação preferencial com relação à bicamada lipídica e, por isso, as interações são mais fortes e resultam em uma menor variação do Diâmetro Hidrodinâmico.

Também foram feitas medidas dos valores do potencial zeta para as vesículas de POPC e POPC:POPG com adição dos peptídeos e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29 (p. 68).

Figura 29: Gráficos da variação do potencial Zeta de LUV de POPC e POPC:POPG (500 μM) para a titulação de D-Phes (A e B) e L-Phes (C e D).



O potencial das vesículas de POPC na ausência de peptídeo foi de aproximadamente -9 mV. O comportamento das LUV de POPC frente a adição dos peptídeos epímeros foi aproximadamente o mesmo, com uma variação de cargas por volta de 15 mV. Apenas com a adição de 5 μL de peptídeo esse valor aumentou para -3 mV (FIG.29 A). Isso ocorre devido à carga positiva dos peptídeos D- e L- fenilseptinas (+2) que deixa a carga superficial da vesícula menos negativa. A neutralização da carga ocorreu em concentrações superiores a 57,6- μM de D-Phes e em aproximadamente 170,4 μM para a L-Phes. Ambos interagem com vesículas zwitteriônicas porém, observa-se novamente evidências da menor afinidade do epímero L em comparação com o D. Para valores acima da neutralização de cargas, é indício de que apenas interações hidrofóbicas são necessárias para ligar o peptídeo à membrana

(ALVES *et al.*, 2011). Em D-Phes a carga final foi de 6 mV enquanto que para L-Phes este valor foi de 3 mV.

Em vesículas aniônicas observou-se o mesmo comportamento das LUV com adição de peptídeo. Neste caso, a carga líquida de POPC:POPG na ausência de peptídeos ficou entre -25 e -30 mV. O aumento da carga das LUV na presença de L-Phes foi menor, atingindo um máximo de -10 mV. Já para o seu epímero foi observado um valor de potencial zeta de 5 mV. Embora a contribuição entálpica observada tenha sido maior para L-Phes, também foi observado maior estequiometria para o sistema D-Phes-POPC:POPG ($n \approx 1,84$) em relação ao seu epímero ($n \approx 0,99$). Assim, nas mesmas concentrações há um maior número de moléculas de D-Phes interagindo com as LUV aniônicas do que L-Phes e, conseqüentemente, é esperado a maior alteração no potencial zeta das LUV de POPC:POPG por parte do D-Phes, como observado no presente estudo.

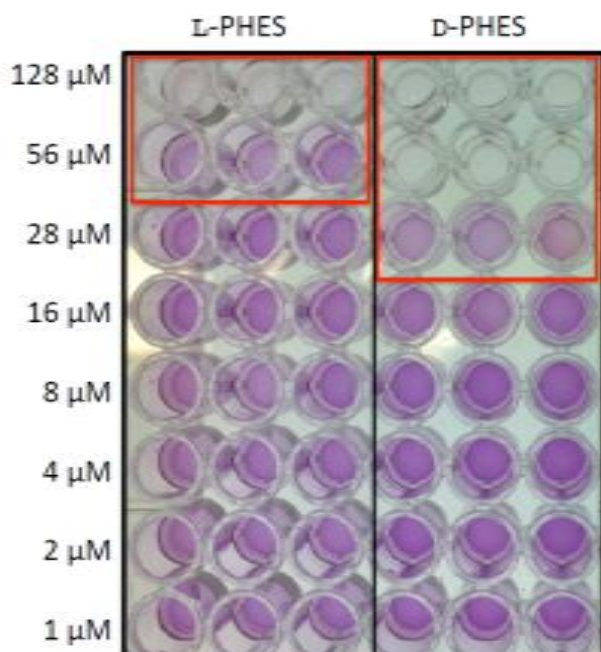
4.2.5 Ensaios biológicos

Além da importância do estudo do modo de ação e da estruturação do peptídeo, quando em contato com a membrana celular, também é relevante o conhecimento da LC_{50} (concentração letal média). Para a determinação da sensibilidade aos agentes antimicrobianos, algumas metodologias fornecem resultados quantitativos da concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração mínima necessária para inibir em 100% a viabilidade celular.

Um método para a avaliação da viabilidade das células, que foi utilizado neste trabalho, é a medida da atividade mitocondrial, através de corante MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio]). Esse corante forma um precipitado azul (formazan) sobre as células viáveis, o qual é quantificado por espectrofotometria. A viabilidade celular em 100% é representada pelo controle negativo do valor de densidade óptica (LIEBSCH & SPIELMANN, 2002).

A Figura 30 (p. 70) é uma foto retirada do teste de MTT realizado para os peptídeos D-Phes e L-Phes.

Figura 30: Foto retirada do ensaio de MTT realizado Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX) no ICB da UFMG para os peptídeos D-Phes e L-Phes.

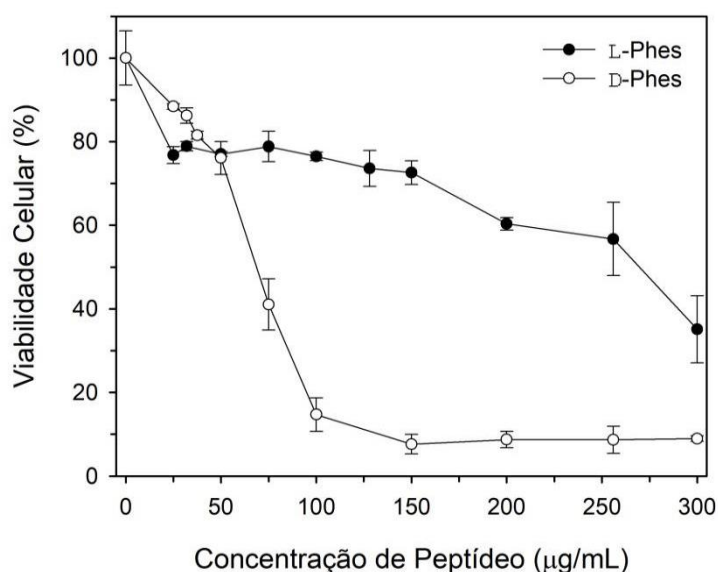


4.2.5.1 Ensaio de viabilidade celular

As células tumorais possuem membranas celulares alteradas com relação às células normais, e se tornam mais negativa (OELKRUG *et al.*, 2015). Isso porque a assimetria entre a membrana interna e externa em termos dos fosfolípidos é perdida, resultando no aumento de fosfatidilserina (PS), carregada negativamente, no folheto externo. Conseqüentemente, essas células ficam mais predispostas a serem alvos de peptídeos antimicrobianos (KUMAR *et al.*, 2018). Por isso, os peptídeos são moléculas que possuem propriedades interessantes com potencial aplicação para em células tumorais.

Neste ensaio, foram utilizadas as linhagens celulares MDA-MB-231, célula de câncer de mama humano. Para avaliar o efeito citotóxico dos peptídeos L-Phes e D-Phes, primeiro foi realizado o ensaio MTT com a célula MDA-MB-231 com diferentes concentrações de incubação. A viabilidade celular apresentou um efeito dose-dependente (FIG. 31, p. 71).

Figura 31: Avaliação do efeito citotóxico nas células MDA-MB-231 dos peptídeos D-Phes e L-Phes em diferentes concentrações, em 60 minutos.



Para L-Phes, em todas as linhagens celulares, a viabilidade reduziu significativamente na concentração entre valores aproximados de 150-300 µg/mL; e para D-Phes entre, aproximadamente, 50-130 µg/mL para MDA-MB-231.

Os dados mostraram que L-Phes teve um menor efeito na viabilidade celular que seu epímero. Isso pode ser sugerido, pois em baixas concentrações (150 µg/mL), a célula foi inviabilizada em aproximadamente 90% por D-Phes, enquanto L-Phes inviabilizou no máximo 60% da célula com o dobro de concentração que seu epímero (300 µg/mL).

Os estudos foram realizados em 60 minutos devido a uma prévia investigação da cinética de ação dos peptídeos (*time-kill*) frente as células, onde observou-se que 1 hora era suficiente para ocorrer a perda da viabilidade celular. Muitos trabalhos já descritos na literatura mostram que 1 h é um tempo suficiente para a atividade do peptídeo na célula. Um deles é o trabalho de Picoli e colaboradores, de 2016, que estudou a sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha. Diferentes tipos celulares foram submetidos à exposição com melitina e foi notada uma rápida ação citotóxica, que também já foi relatada em outros trabalhos (CERNE *et al.*, 2013; LO *et al.*, 1997; PRATT *et al.*, 2005). Neste trabalho, com 5 minutos de exposição das células frente à melitina, já foram observadas reduções consideráveis na viabilidade celular e, com 60 minutos, foi observada uma redução de cerca de 50% na viabilidade. Cerne e colaboradores, em 2013, ao tratarem células endoteliais humanas

com 10 µg/mL de melitina, observaram que a viabilidade celular foi reduzida a 40,3% com apenas 5 minutos de exposição, 20% com 15 minutos de exposição e em 60 minutos não foram observadas células viáveis.

Em um outro estudo realizado por Irazazabal, em 2017, foi verificada a velocidade de ação de EcDBS1R6 (6,25 µM) para *E. coli* e *S. aureus*, e observou-se que em apenas 15 minutos o peptídeo produziu a morte de ambas as cepas bacterianas.

Como observado, ambos os peptídeos apresentam efeito na viabilidade celular de células tumorais e são dose-dependente, efeito este observado nas primeiras horas de incubação com a droga. Contudo, D-Phes apresenta maior atividade antitumoral que seu epímero já que em metade da concentração inviabiliza a célula em quase 100 %. Isso pode ocorrer devido a epimerização do segundo resíduo de aminoácido do peptídeo D-Phes que proporciona uma conformação mais convergente e, conseqüentemente, favorece uma interação mais efetiva com a membrana da célula de câncer de mama em estudo.

4.2.5.2 Atividade antifúngica

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos de CIM (em µg/mL) para os peptídeos D-Phes e L-Phes sobre diferentes espécies de *Candida*.

Tabela 5: Valores da concentração inibitória mínima de D-Phes e L-Phes sobre diferentes espécies de *Candida* spp.

Peptídeo	CIM (µg/mL)				
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
L-Phes	250	>500	250	250	>500
D-Phes	62,5	500	125	62,5	125
Nistatina	125	62,5	125	125	7,8

A nistatina é um antifúngico muito efetivo contra a maioria das infecções causadas pelas espécies de *Candida* (TAVARES, 2001). Foi utilizado para critério de comparação com os peptídeos epímeros da fenilseptina. A concentração inibitória mínima da nistatina para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* foi de 125 µg/mL. Além disso apresentou uma alta atividade contra *C. glabrata* (CIM = 7,8 µg/mL) e contra *C. parapsilosis* (CIM = 62,5 µg/mL).

Pelos valores de CIM obtidos, foi observado que a atividade antifúngica de D-Phes é maior quando comparada ao antifúngico de controle. Para *C. albicans* e *C. tropicalis*, o valor de CIM é duas vezes menor para D-Phes, indicando que D-Phes possui uma boa atividade antifúngica quando comparado a um fármaco de controle potente. Quando comparado a L-Phes, novamente foi observado o maior efeito do peptídeo D-Phes. Também para *C. albicans* e *C. tropicalis*, os valores de CIM obtidos para D-Phes foi cerca de quatro vezes menor (62,5 µg/mL) que L-Phes (250 µg/mL), indicando que em quatro vezes menos concentração o peptídeo já inibe a célula fúngica. A maior atividade também pode ser observada para *C. krusei* e *C. glabrata* com valores de CIM de 125 µg/mL para D-Phes enquanto que para L-Phes os valores de CIM foram 250 e 500 µg/mL, respectivamente. Nem D-Phes nem L-Phes apresentaram atividade contra *C. parapsilosis*.

A partir desses resultados, sugere-se que a atividade antifúngica é maior para D-Phes do que para L-Phes. Para as células tumorais, D-Phes também reduziu mais (90%) a viabilidade celular do que L-Phes (60%). Nas atividades antimicrobianas realizadas em outros estudos (de MAGALHÃES, *et al.*, 2013), a atividade de D-Phes também é maior quando comparada a seu epímero para *S. aureus* (ATCC 29313), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Quando analisados todos os dados, é observado que as estruturas calculadas a partir dos dados de RMN sugerem interação mais efetiva de D-Phes com relação ao seu epímero. Esses resultados concordam com os estudos de ITC, que apontaram uma constante de interação cerca de três vezes maior em vesículas de POPC:POPG para D-Phes em relação a L-Phes. Isso indica uma interação mais eficiente em vesículas aniônicas, o que concorda com os resultados obtidos nos ensaios antifúngicos, uma vez que a membrana de fungos é composta por fosfolipídeos aniônicos (THEIS & STAHL, 2004). Os resultados concordam também com os estudos de DLS e Potencial Zeta, que comprovam a maior agregação de L-Phes na superfície da membrana com relação ao seu epímero, indicando uma interação menos efetiva do mesmo, e uma variação de carga superficial que sugere uma interação mais efetiva de D-Phes.

CAPÍTULO 2

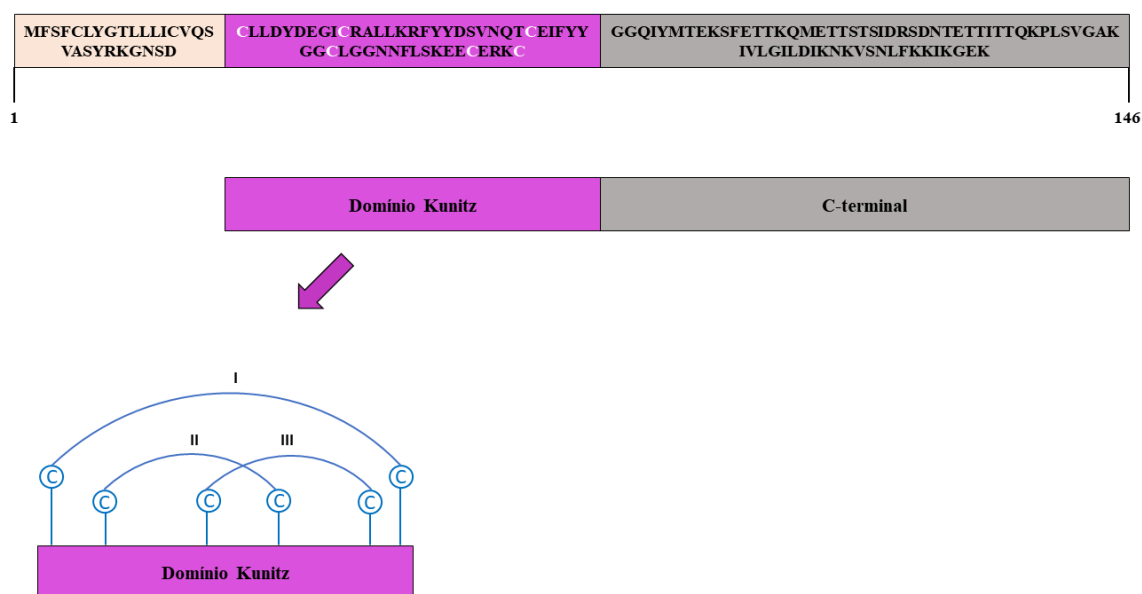
ESTUDOS DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DESENHADO DA PORÇÃO C-terminal DA PROTEÍNA SmKI-1

5.1 INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que desempenham papéis importantes em uma variedade de processos em animais superiores, incluindo defesa imunológica, inflamação, coagulação sanguínea e a remodelação de tecido (NEURATH, 1986) e podem também ser empregadas no combate diferentes parasitas. A proteína SmKI-1 foi caracterizada funcionalmente como o primeiro inibidor do tipo Kunitz de *Schistosoma mansoni*, com propriedades anti-inflamatórias e anticoagulantes (MORAIS *et al.*, 2018; RANASINGHE *et al.*, 2015). Um inibidor do tipo Kunitz é um inibidor de serino-protease (enzimas do trato digestivo, responsáveis por degradar proteínas) que também tem função anticoagulante e anti-inflamatória. Em uma proteína, o domínio Kunitz é a região em que estão presentes seis resíduos de cisteínas (MORAIS *et al.*, 2018).

A proteína SmKI-1 é constituída por 146 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 15.108 Da e possui domínios: *Kunitz* e C-terminal (FIG. 32).

Figura 32: Sequência primária da proteína SmKI-1 e representação esquemática dos domínios da proteína SmKI-1, mostrando o domínio *Kunitz* com as três ligações dissulfeto.



Fonte: Adaptado de de MAGALHÃES *et al.*, 2013.

Devido ao fato do domínio C-terminal ser uma proteína órfã e não possuir estrutura secundária definida (MORAIS *et al.*, 2018), surgiu a necessidade para um melhor entendimento das propriedades físico-químicas deste domínio. Neste sentido, foi hipotetizado que esta região seja capaz de se ligar a membrana celular, e que assim como um PAM, estaria desenovelado em solução aquosa adquirindo uma conformação ativa apenas ao interagir com a bicamada fosfolipídica.

Análises de bioinformática do domínio C-terminal mostraram a presença de uma sequência de resíduos de aminoácidos (**GILDI**) comum entre peptídeos antimicrobianos já registrados, de elevado potencial (ALI *et al.*, 2002; TREVIÑO *et al.*, 2014). Assim, uma segunda hipótese para este capítulo trabalhou a possibilidade do potencial biotecnológico do peptídeo desenhado a partir do domínio C-terminal da SmKI-1 como um peptídeo antimicrobiano. Por esses motivos, neste trabalho, foi sintetizado um peptídeo da região C-terminal o qual possui características membranolíticas semelhantes às aquelas conhecidas de antimicrobianos (carga, hidrofobicidade e massa molecular).

Na Figura 33 está destacado, dentro da sequência proteica dos 146 resíduos de aminoácidos da SmKI-1, na região C-terminal da proteína, a estrutura primária do peptídeo que foi sintetizado. O peptídeo foi nomeado como Schistocina-2, contendo 17 resíduos na sua estrutura. Neste trabalho foram realizados estudos estruturais por CD e RMN em solução, além de estudos de interação peptídeo-membrana em meios biomiméticos de membrana.

Figura 33: Sequência primária da proteína SmKI-1 e em azul a sequência primária do peptídeo Schistocina-2 destacado na proteína.

Schistocina-2

```
MFSFCLYGTLLLICVQSVASYRKGNSDCLLDYDEGICRALLKRFYYDSVNQTCE
IFYYGGCLGGNNFLSKEECERKCGGQIYMTEKSFETTKQMETTSTSIDRSNTET
TITTQKPLSVGAKIVLGILDIKNKVSNFLFKKIKGEK
```

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Schistocina-2

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa colaborador LVTA (UFMG-ICB, trabalho em andamento de Bruno de Paula Santos), mostraram uma elevada

similaridade de Schistocina-2 com outros peptídeos presentes no banco de dados APD3 (APD – *Antimicrobial Peptide Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Uma representação dos resultados pode ser observada na Figura 34, que mostra o alinhamento entre os peptídeos.

Figura 34: Similaridade da sequência de Schistocina-2 com o banco de dados de peptídeos e aminoácidos. Em azul, estão os resíduos comuns entre o peptídeo com o Schistocina-2.

Schistocina-2	GILDIKNKVSNFLFKKIK
Dahleina 1.1 (47,4 %)	G+LFDI IKNIVSTL+++
Temporina-HN2 (47,1 %)	NIL+++NTIINLAKKIL
Ranatuerina 2ARb (46,4 %)	GILDTIKNAAKTVAVGLLEKIKCKMTGC
Uperina 3.6 (45 %)	GVI+DAAK+KVVNVL+KNLF
Palustrina 2DY1 (44,8 %)	GIMDTIKNAAKDVVQSLLNKASCCLAKTC
HSP1	GILDAIKAIKAAG

O peptídeo que possui maior similaridade com o Schistocina-2 é o Dahleina 1.1 (47,4 %), contendo 13 resíduos de aminoácidos, isolado da rã aquática australiana *Litoria dahlii*. Este peptídeo possui amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (WEGENER et al., 2001), despertando ainda mais o interesse biotecnológico no Schistocina-2.

Na sequência, o peptídeo Temporina-HN2, com 14 resíduos de aminoácidos, possui 47,1 % de similaridade com Schistocina-2. É um peptídeo isolado da secreção da pele anuro, porém do sapo odorífero de Hainan, *Odorrana hainanensis*, encontrado na China. Trata-se de um peptídeo com atividade frente a *S. aureus* ATCC2592 (MIC 4,8 µM), *S. carnosus* KHS (MIC 19 µM), *B. licheniformis* X39 (MIC 19 µM), *R. rodocrico* X15 (MIC 2,4 µM); *P. faecalis* X29 Gram-negativo (MIC 37,5 µM) e fungos *S. mofo* 090223 e *C. albicans* ATCC2002 (MIC 9,5 µM) (WANG et al., 2012).

O peptídeo Ranatuerina 2ARb é isolado da pele de rã *Rana areolata*. Esse peptídeo inibiu o crescimento de *E. coli* (CIM 17µM), *S. aureus* (CIM 70 µM) e *C. albicans* (CIM 150 µM) (ALI et al., 2002). Por sua vez, este peptídeo apresentou 46,42% de similaridade com o Schistocina-2.

Um outro peptídeo com 45% de similaridade é Uperina 3.6, que possui 17 resíduos de aminoácidos. Este peptídeo foi isolado das glândulas dorsais do cogumelo australiano *Uperoleia mjobergii*, possui atividade contra bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas, antivirais e pode até inibir a infecção por HIV. A Uperina 3.6 possui estrutura helicoidal em solução de 50% (v:v) TFE:água (BRADFORD *et al.*, 1996).

Já o Palustrina 2DY1 possui 44,8% de similaridade com o Schistocina-2, é isolado do sapo *Amolops daiyunensis* e possui atividade contra *E. coli* (CIM 150 μ M) e *N. asteroides* (CIM 2,3 μ M) (WANG *et al.*, 2017).

O último peptídeo que possui similaridade com o Schistocina-2 é o HSP1, isolado do anuro da espécie *Hyla punctata*. Este peptídeo possui uma baixa atividade antimicrobiana (PRATES *et al.*, 2004), porém elevado teor de helicidade, comprovados por CD e RMN em solução e, além disso, a inserção de cadeias sacarídicas apontaram um aumento considerável no potencial antifúngico dessas moléculas (JUNIOR *et al.*, 2017).

A Tabela 6 resume as informações obtidas na análise de similaridade, relacionando o peptídeo com a porcentagem de similaridade ao Schistocina-2.

Tabela 6: Estudo de similaridade de peptídeos bioativos, já publicados no banco de dados, com o peptídeo em estudo Schistocina-2

Peptídeo	Similaridade ao Schistocina-2 (%)
Dahleina 1.1	47,4 %
Temporina-HN2	47,1 %
Ranatuerina 2ARb	46,4 %
Uperina 3.6	45 %
Palustrina 2DY1	44,8 %
HSP1	não calculado

5.2.2 Síntese e caracterização do peptídeo Schistocina-2

A síntese do peptídeo Schistocina-2 também foi realizada manualmente em fase sólida via estratégia Fmoc (CHAN & WHITE, 2000). Para a síntese do Schistocina-2, foi utilizada a resina Rink amida e a síntese apresentou problemas de acoplamento

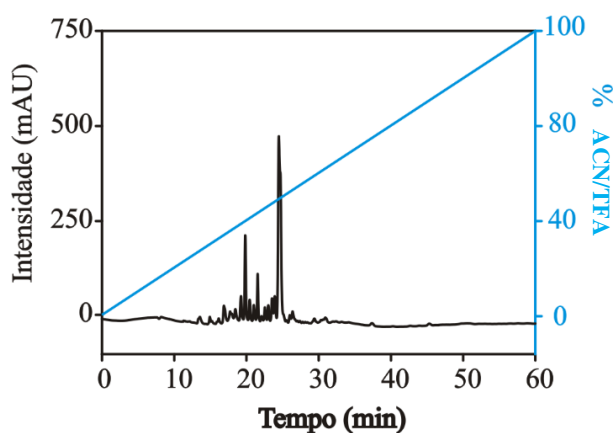
apenas no 9º resíduo (Fmoc-Val-OH), sendo necessário realizar uma etapa de reacoplamento (TABELA 7).

Tabela 7: Dados do acoplamento e desproteção da síntese do peptídeo Schistocina-2. # Etapa de reacoplamento; + Resultado positivo para o teste de Kaiser (presença de grupo amino livre); - Resultado negativo (ausência de grupo amino livre); ~ Teste não realizado

Ordem de acoplamento	Derivado de aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Acoplamento	Desproteção
1º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	3	+	+
2º	Fmoc-Ile-OH	3	2	+	+
3º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
4º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
5º	Fmoc-Phe-OH	3	2	+	+
6º	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
7º	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	+	+
8º	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2	+	+
9º	Fmoc-Val-OH	3	2	-	~
#	Fmoc-Val-OH	3	2	+	+
10º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
11º	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	+	+
12º	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	+	+
13º	Fmoc-Ile-OH	3	2	+	+
14º	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	3	+	+
15º	Fmoc-Leu-OH	3	2	+	+
16º	Fmoc-Ile-OH	3	2	+	+
17º	Fmoc-Gly-OH	3	2	+	+

Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido para a síntese, o peptídeo foi clivado, liofilizado para obtenção do peptídeo sólido e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrometria de massa (EM). A Figura 35 (p. 79) apresenta o cromatograma do peptídeo bruto obtido.

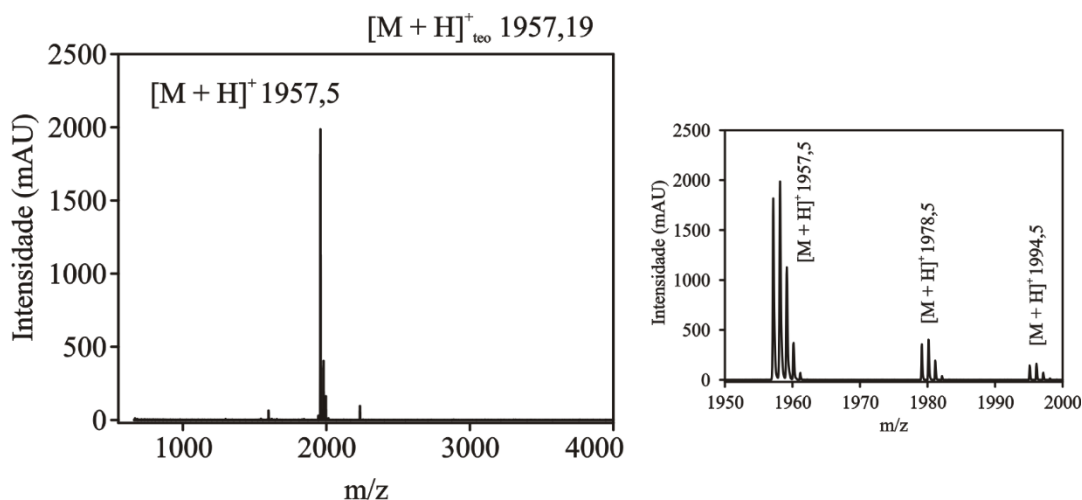
Figura 35: Perfil cromatográfico da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2. A linha azul retrata a variação da concentração de acetonitrila.



Foi observado um pico proeminente com um tempo de retenção (t_r) 26,40 minutos além de impurezas na faixa de t_r 15 a 25 minutos, aproximadamente, sendo necessária uma cuidadosa purificação do peptídeo.

A amostra coletada em t_r de 26,40 minutos foi então submetida a análise em EM-MALDI-ToF/ToF, cujo o espectro está apresentado na Figura 36.

Figura 36: Espectro de massa da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2.



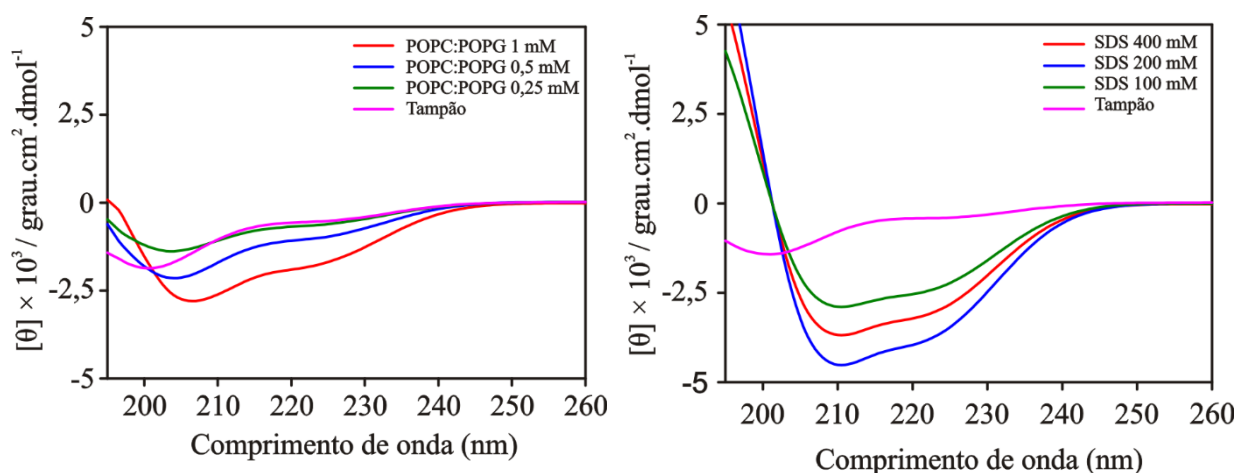
Foi possível identificar a presença de íons $[M+H]^+$ de m/z 1957,5 para o Schistocina-2, além dos íons dos adutos de sódio e potássio. Esse resultado foi condizente com a massa teórica monoisotópica protonada do peptídeo em estudo ($[M+H]^+_{teo} = 1957,19$). O peptídeo foi fragmentado em uma célula LIFT, e o sequenciamento confirmou o sucesso da síntese química.

A amostra sintetizada e caracterizada do peptídeo foi utilizada para as análises de Dicroísmo Circular, Titulação Calorimétrica Isotérmica, Ressonância Magnética Nuclear e testes de atividade biológica.

5.2.3 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular do peptídeo Schistocina-2.

A Figura 37 apresenta os espectros de CD obtidos para o Schistocina-2 nos meios de POPC:POPG e SDS.

Figura 37: Espectro de CD da amostra bruta do peptídeo Schistocina-2 em POPC:POPG e micelas de SDS.



Em solução tampão, o peptídeo não possui uma conformação preferencial. Já em meio aniônico de POPC:POPG, o Schistocina-2 se estrutura em α -hélice. Isso pode ser observado pela presença de dois mínimos em aproximadamente 208 e 222 nm. O índice de helicidade molar (H) em POPC:POPG 1 mM para o Schistocina-2 foi cerca de 56 %.

As mudanças mais significativas nos perfis dos espectros podem ser observadas em micelas de SDS, com a presença de mínimos ainda mais acentuados nos comprimentos de onda característicos de hélice. O Schistocina-2 apresentou um conteúdo de hélice de 88 % em 400 mM de SDS. Contudo, o maior conteúdo helicoidal foi observado em 200 mM de SDS ($H = 89$ %). Isso permitiu inferir que o aumento do conteúdo de hélice do peptídeo não é necessariamente dependente do aumento da concentração de vesículas, já que o peptídeo apresentou menor helicidade molar em 400 mM de SDS, quando comparado a 200 mM. Uma explicação mais utilizada para a dependência de concentração é que existe agregação molecular (CHEN *et al.*, 2002). A

diminuição do conteúdo de hélice com o aumento da concentração de vesículas pode estar relacionada com a diminuição de peptídeos livres para interagir e adquirir a estrutura secundária (CUNHA, 2013). Neste caso, quanto maior a concentração de vesículas, menor a quantidade de peptídeos livres para mais ligações e, conseqüentemente, gera a agregação. Por isso foi observada essa diferença de helicidade em 200 e 400 μM de SDS.

Estes resultados mostram a capacidade de ligação do peptídeo a membranas, como proposto desde o início e, para verificar a constante de ligação do peptídeo Schistocina-2, foi realizado o estudo de ITC.

5.2.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Análises de ITC foram realizadas para avaliar o quanto o peptídeo Schistocina-2 interage com meios miméticos de membrana, através da obtenção da constante de interação e outros parâmetros termodinâmicos. Além disso, também foi realizado para comparar o efeito da carga da vesícula sobre a capacidade de ligação do peptídeo.

O fluxo de calor obtido da interação de Schistocina-2 com vesículas de POPC e POPC:POPG estão representados na Figura 38 (p. 82). O fluxo negativo de calor obtido representa a predominância de interação exotérmica, que pode indicar um favorecimento da interação eletrostática entre o peptídeo e os meios miméticos de membrana. Com o aumento da razão molar LUV/peptídeo, o fluxo de calor diminui, indicando a saturação do sistema pela diminuição da quantidade de peptídeos disponíveis para interação.

A integral de cada curva de fluxo de calor fornece a isoterma de titulação calorimétrica, representada pela linha sólida em vermelho. e os parâmetros termodinâmicos da interação, listados na Tabela 8 (p. 82).

Figura 38: Fluxo de calor para cada injeção em função do tempo e isotermas de titulação calorimétrica. Titulação de LUV de POPC (20 mM) em Schistocina-2 e LUV-POPC:POPG em Schistocina-2.

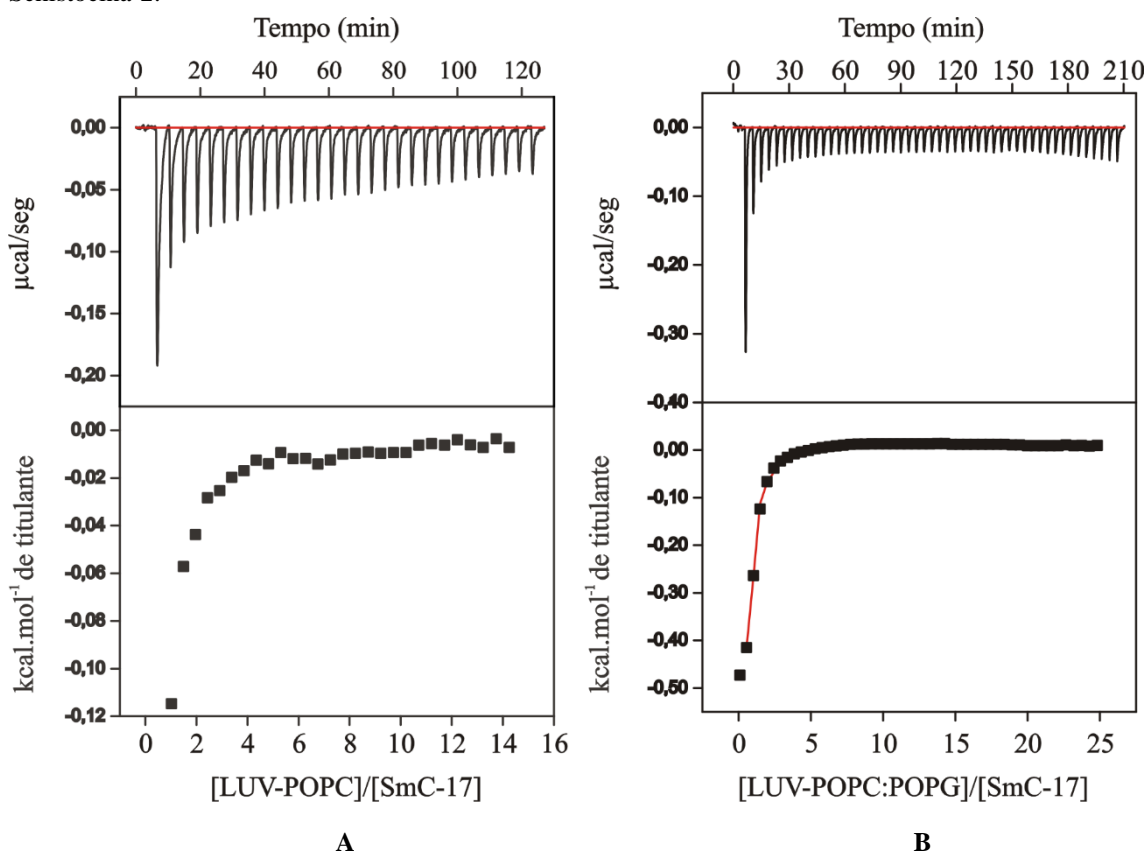


Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUV de POPC (20 mM) e POPC:POPG (20 mM) em Schistocina-2 (150 μM) a 25 °C

Parâmetros Termodinâmicos	LUV POPC (20 mM)	LUV POPC:POPG (20 mM)
n	$1,37 \pm 0,383$	$1,8 \pm 0,06$
K (L.mol ⁻¹)	$7,90 \times 10^4 \pm 2,70 \times 10^3$	$4,41 \times 10^4 \pm 1,06 \times 10^3$
ΔG^0 (cal.mol ⁻¹)	-6666,94	-6343,91
ΔH^0 (cal.mol ⁻¹)	$-226,9 \pm 11,3$	$-559,80 \pm 52,90$
ΔS^0 (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	21,6	19,4

A energia livre de Gibbs altamente negativa tanto em POPC quanto em POPC:POPG ($\Delta G^0 = -6343,91$ cal.mol⁻¹ e, $-6666,94$ cal.mol⁻¹ respectivamente) sugere que a interação é um processo altamente espontâneo. As constantes de interação obtidas ($K = 4,41 \times 10^4$ L.mol⁻¹ e $7,90 \times 10^4$ L.mol⁻¹) indicam uma interação significativa do peptídeo tanto com vesículas de POPC quanto com vesículas de POPC:POPG. Estudos

com outros peptídeos mostraram que a constante de interação na ordem de $10^3 - 10^4$ são características de peptídeos que possuem elevada afinidade com meios miméticos de membrana e citotoxicidade frente a células microbianas (VERLY *et al.* 2017; VOIEVODA *et al.*, 2015). Portanto, de acordo com a faixa de grandeza molar observada, este resultado mostra que o peptídeo Schistocina-2 apresenta significativa afinidade com membranas fosfolipídicas.

Os valores negativos de entalpia tanto em LUV de POPC ($\Delta H^0 = -226,9 \text{ cal.mol}^{-1}$) quanto em LUV de POPC:POPOG ($\Delta H^0 = -559,80 \text{ cal.mol}^{-1}$) indicam que o processo global de interação peptídeo-LUV é guiado por atrações eletrostáticas (ANDRUSHCHENKO *et al.*, 2008). Isso porque a superfície hidrofílica do peptídeo expõe uma alta densidade de cargas catiônicas (+5), que favorecem esse processo de interação, principalmente, com vesículas aniônicas como o POPC:POPG.

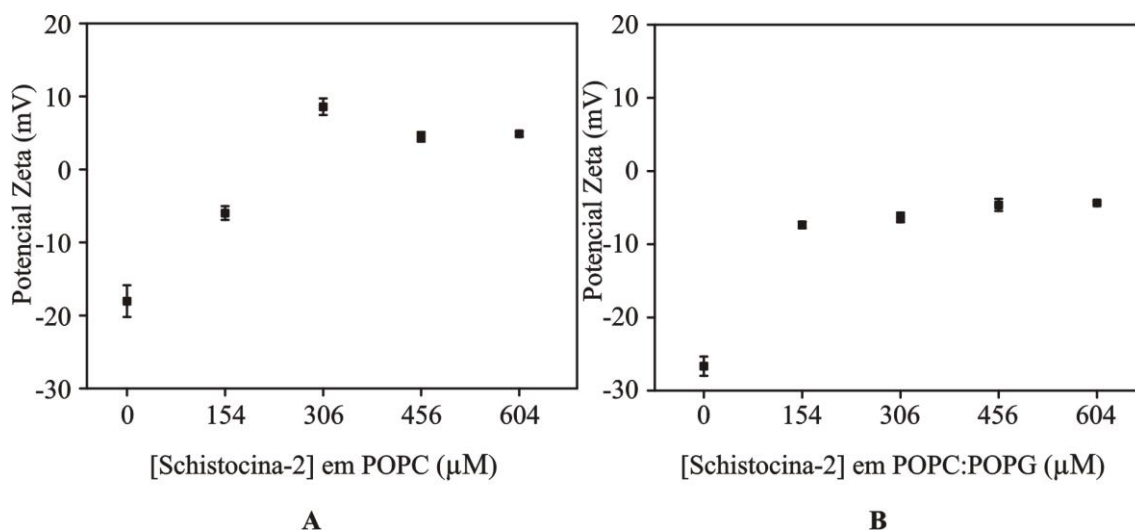
Além disso, a componente entrópica da interação com vesículas de POPC com Schistocina-2 ($21,6 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) apresenta um maior valor quando comparado à interação do peptídeo com vesículas de POPC:POPG ($19,4 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$). Isso implica que possui um maior número de peptídeos livre em solução, deixando o sistema mais desorganizado.

Diante destes resultados, é possível propor que o peptídeo Schistocina-2 interage de forma eficiente e espontânea com a superfície da membrana.

5.2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

A variação da carga superficial de meios miméticos de membrana com a adição de Schistocina-2 foi medida por potencial Zeta. A Figura 39 (p. 84) mostra os resultados obtidos para o experimento de potencial Zeta da titulação de Schistocina-2 em vesículas de POPC e POPC:POPG. Foram realizadas leituras no instante zero da interação e após 60 minutos (preto). Isso foi feito para observar se o sistema necessita de um tempo para estabilizar e apresentar resultados mais confiáveis.

Figura 39: Resultados obtidos do estudo de Potencial Zeta da titulação do peptídeo Schistocina-2 em vesículas de (A)POPC e (B) POPC:POPG.



Assim como para os peptídeos D-Phes e L-Phes, inicialmente determinou-se um tempo ideal de medida para estabilização do sistema de 60 minutos.

Na ausência de peptídeo, a vesícula de POPC apresentou um potencial de aproximadamente $-18,03 \pm 2,17$ mV. Logo com a adição de 5 µL de peptídeo esse valor aumentou para $-5,97 \pm 0,93$ mV. Isso ocorre devido à carga positiva do peptídeo Schistocina-2 (+5) que deixa a carga superficial da vesícula menos negativa. A neutralização da carga ocorreu entre a faixa de concentração 154-306 µM de peptídeo na solução de POPC. Para valores acima da neutralização de cargas, é indício de que apenas interações hidrofóbicas são necessárias para ligar o peptídeo à membrana (ALVES *et al.*, 2011). Em 604 µM de peptídeo na solução de vesículas de POPC, a carga superficial aumentou para $4,86 \pm 0,38$ mV. Isso pode ocorrer devido à alta carga do peptídeo (+5), que pode estar prejudicando um pouco a interação. Portanto, uma proposta para modificações na sequência primária do peptídeo seria interessante, de modo a reduzir a carga líquida positiva (substituindo lisina por algum resíduo apolar) de Schistocina-2 para que não ocorra aumento de carga acima da neutralização.

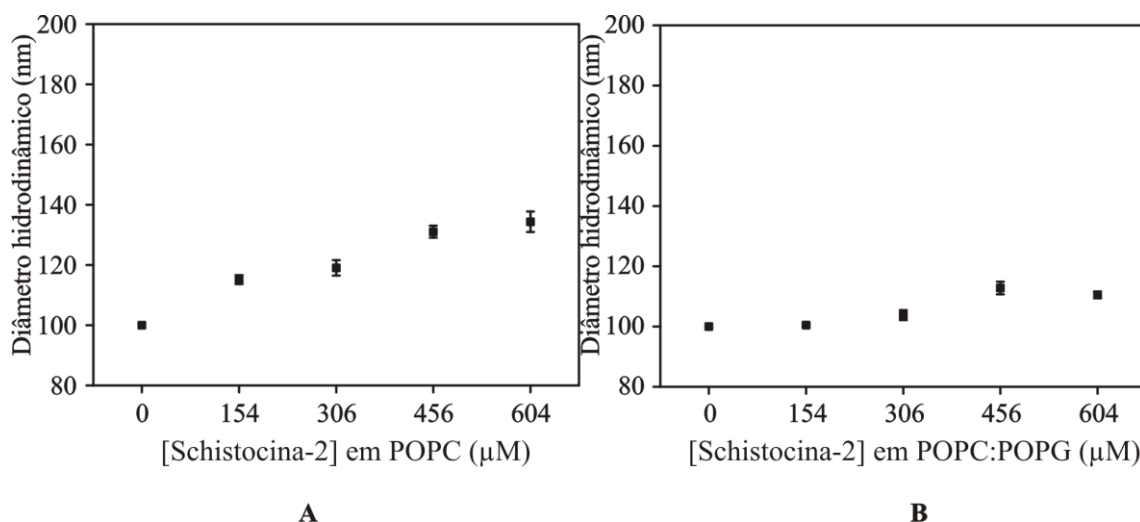
Da mesma forma, em POPC:POPG houve um aumento da carga superficial, consequência provável da alta cationicidade do peptídeo. A carga da superfície das vesículas aniônicas foram de $-26,67 \pm 1,31$ mV. Com o aumento da concentração de peptídeo na solução, essa carga ficou menos negativa e praticamente estável em valores de concentração entre 154-604 µM, chegando a um máximo de $-4,34 \pm 0,21$ mV.

A variação do potencial Zeta em ambos os meios pode estar relacionada com o aumento da permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, a morte celular. A

análise dos resultados permite propor que o peptídeo Schistocina-2 interage bem com ambos os meios miméticos de membrana.

Também foram realizados estudos de espalhamento de luz dinâmico, que mostraram a variação diâmetro hidrodinâmico das vesículas após a interação do peptídeo (FIG. 40).

Figura 40: Resultados obtidos do estudo de Espalhamento de Luz Dinâmico da titulação do peptídeo Schistocina-2 em vesículas de (A)POPC e (B)POPC:POPG.



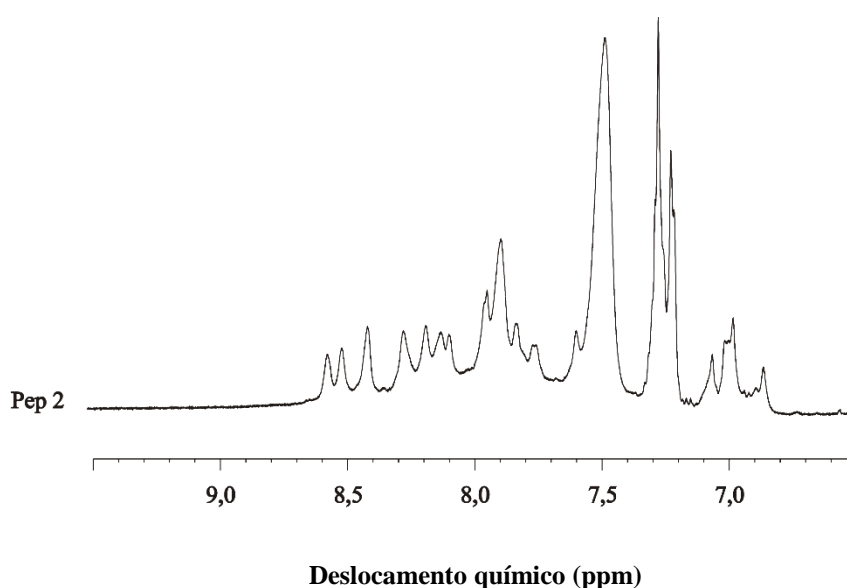
Inicialmente, na ausência de Schistocina-2, as vesículas de POPC e POPC:POPG apresentaram valores aproximados de 100 nm, devido à extrusão das vesículas para padronização do tamanho. Com a adição de peptídeo, pode-se observar um aumento no diâmetro hidrodinâmico em ambos os meios, indicando a agregação de peptídeos na superfície da membrana (ALVES *et al.*, 2011). Porém, esse aumento foi maior em vesículas de POPC. Isso sugere que o peptídeo Schistocina-2 interage de forma efetiva em ambos os meios, porém em vesículas aniônicas (POPC:POPG) a interação é mais efetiva. A menor variação do diâmetro hidrodinâmico indica uma menor agregação de peptídeos na superfície da membrana. A carga +5 muito negativa do peptídeo pode ser a justificativa para a interação mais efetiva com vesículas aniônicas pelo favorecimento da interação eletrostática entre a carga positiva do peptídeo e a carga negativa das cabeças fosfolipídicas da superfície da membrana.

5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)

O estudo da estrutura tridimensional do peptídeo SmKI-1 foi proposto em micelas de SDS- d_{25} (200 mM), uma vez que o peptídeo apresentou elevado teor helicoidal neste meio, como visto nos estudos de CD (FIG. 37, p. 80).

A Figura 41 apresenta a região amídica do espectro unidimensional (1D) obtido para o peptídeo.

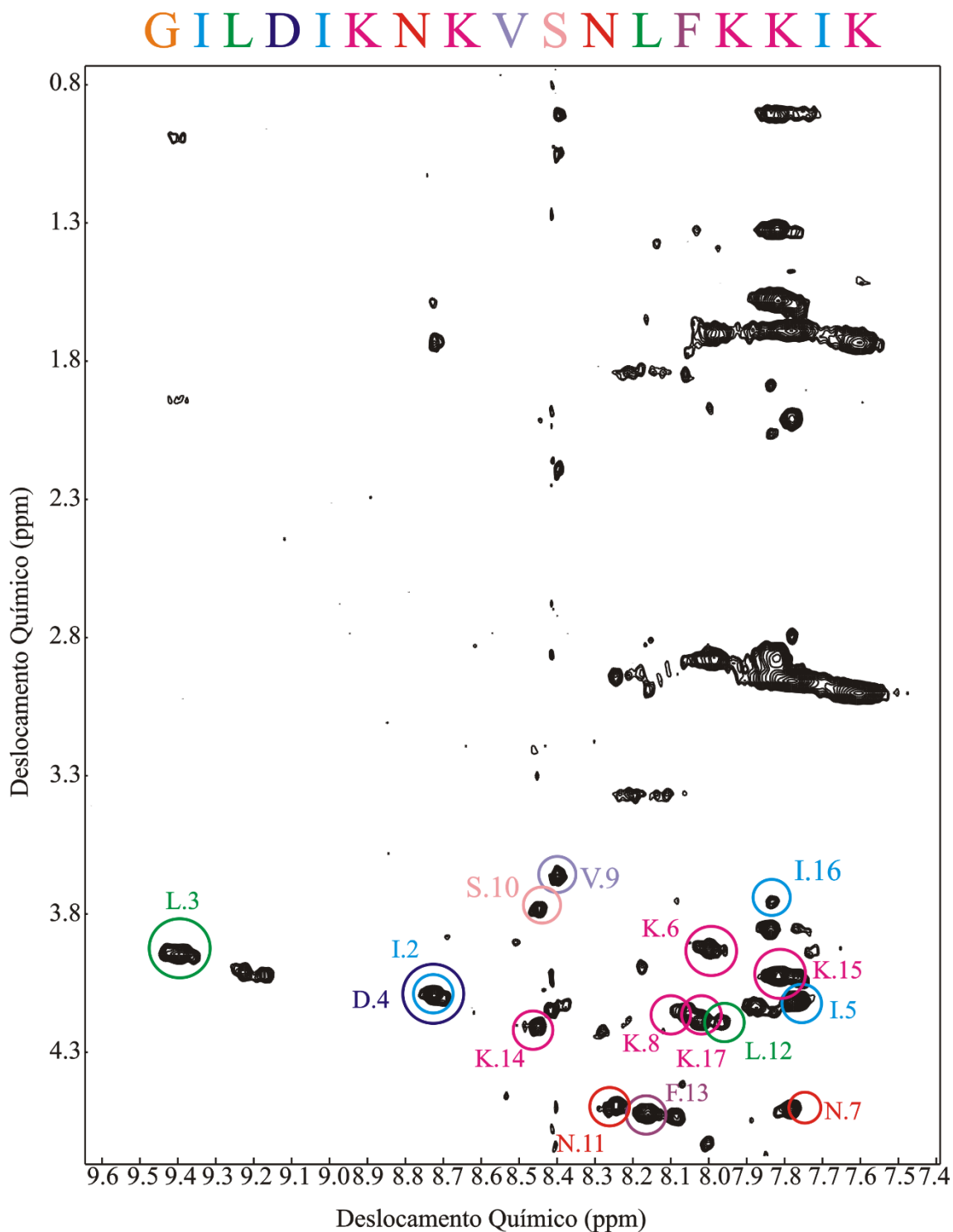
Figura 41: Ampliação da região amídica dos espectros unidimensionais ^1H em SDS- d_{25} (200 mM) do peptídeo Schistocina-2.



A ampliação da região amídica mostra uma boa dispersão de sinais, o que indica uma conformação relativamente definida. Essa região contém informação sobre o ambiente químico dos hidrogênios amídicos do peptídeo, e sinais dispersos e resolvidos refletem ambientes químicos distintos para estes núcleos (TINOCO *et al.*, 2002), sugerindo uma conformação definida para a cadeia peptídica de Schistocina-2.

A Figura 42 (p. 87) apresenta também uma ampliação da região amídica (eixo horizontal) do mapa de contorno $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY, porém correlacionada com a região característica de H_α e hidrogênios de cadeia lateral.

Figura 42: Ampliação da região amídica do mapa de contorno ^1H - ^1H -TOCSY (500 MHz) de Schistocina-2.

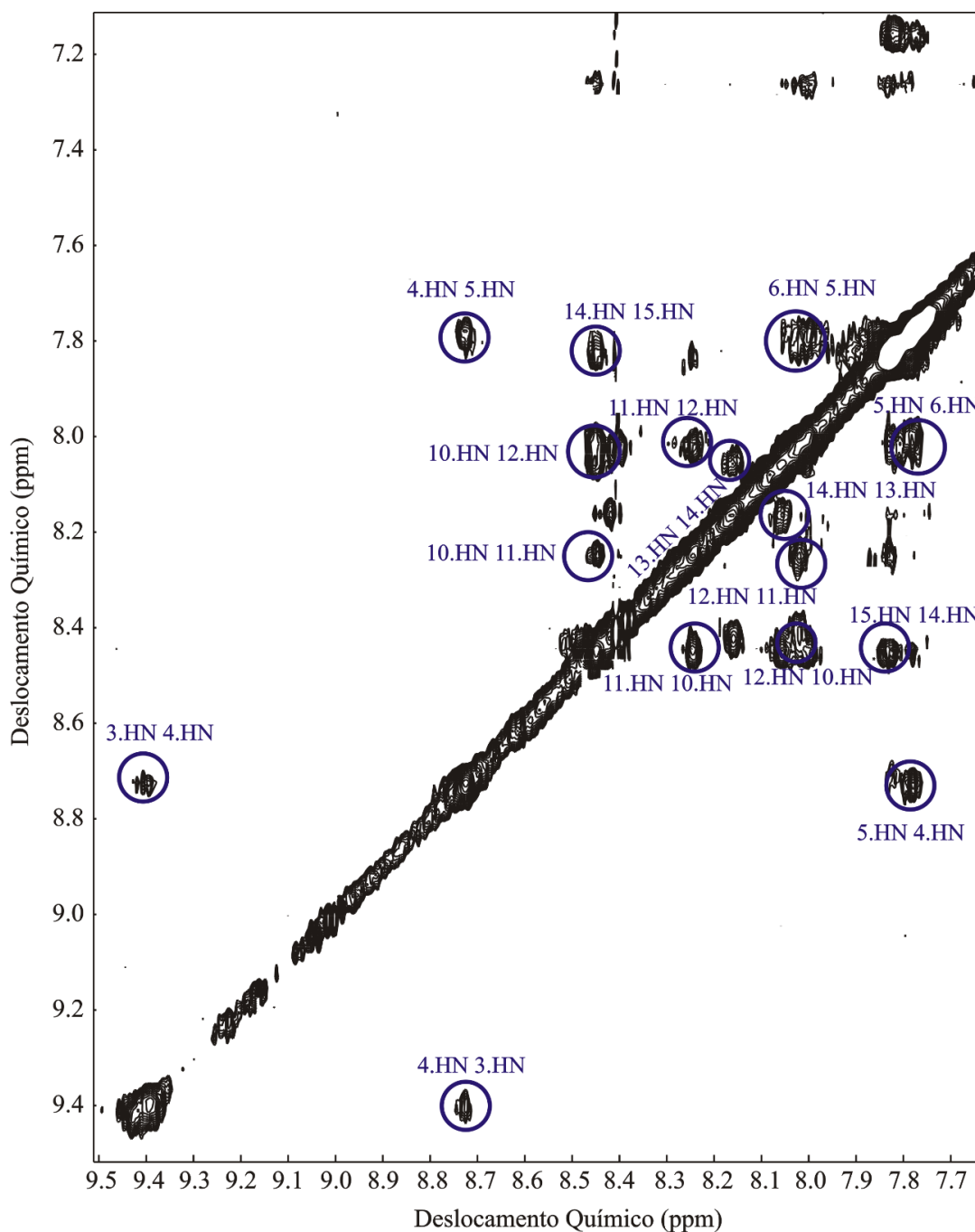


Neste mapa de contorno foram identificados os sistemas de spin de cada resíduo da sequência primária do peptídeo, incluindo sinais devidos a correlações entre H_N com H_α e com os demais hidrogênios de cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos, exceto a glicina 1 da região *N*-terminal da cadeia peptídica.

Já para valores abaixo de 3,5 ppm podem ser observados deslocamentos típicos de H_N - $H_{\beta 2}$ dos resíduos presentes na cadeia peptídica de Schistocina-2. Os deslocamentos químicos nas regiões próximas a 1 ppm são característicos de $H_{\delta 1}$ e $H_{\delta 2}$ de leucinas e valinas, além de $H_{\gamma 2}$ e $H_{\delta 1}$ de isoleucinas.

No entanto, o mapa de contorno TOCSY não fornece informações a respeito da posição de cada resíduo na estrutura primária do peptídeo. Para isso, foi empregado também o mapa de contornos NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) cuja região de correlações intraresiduais do tipo $d_{NN}(i, i+1)$ e $d_{NN}(i, i+2)$ contribuiu muito para a determinação de NOE sequenciais, e está apresentada na Figura 43 (p. 89).

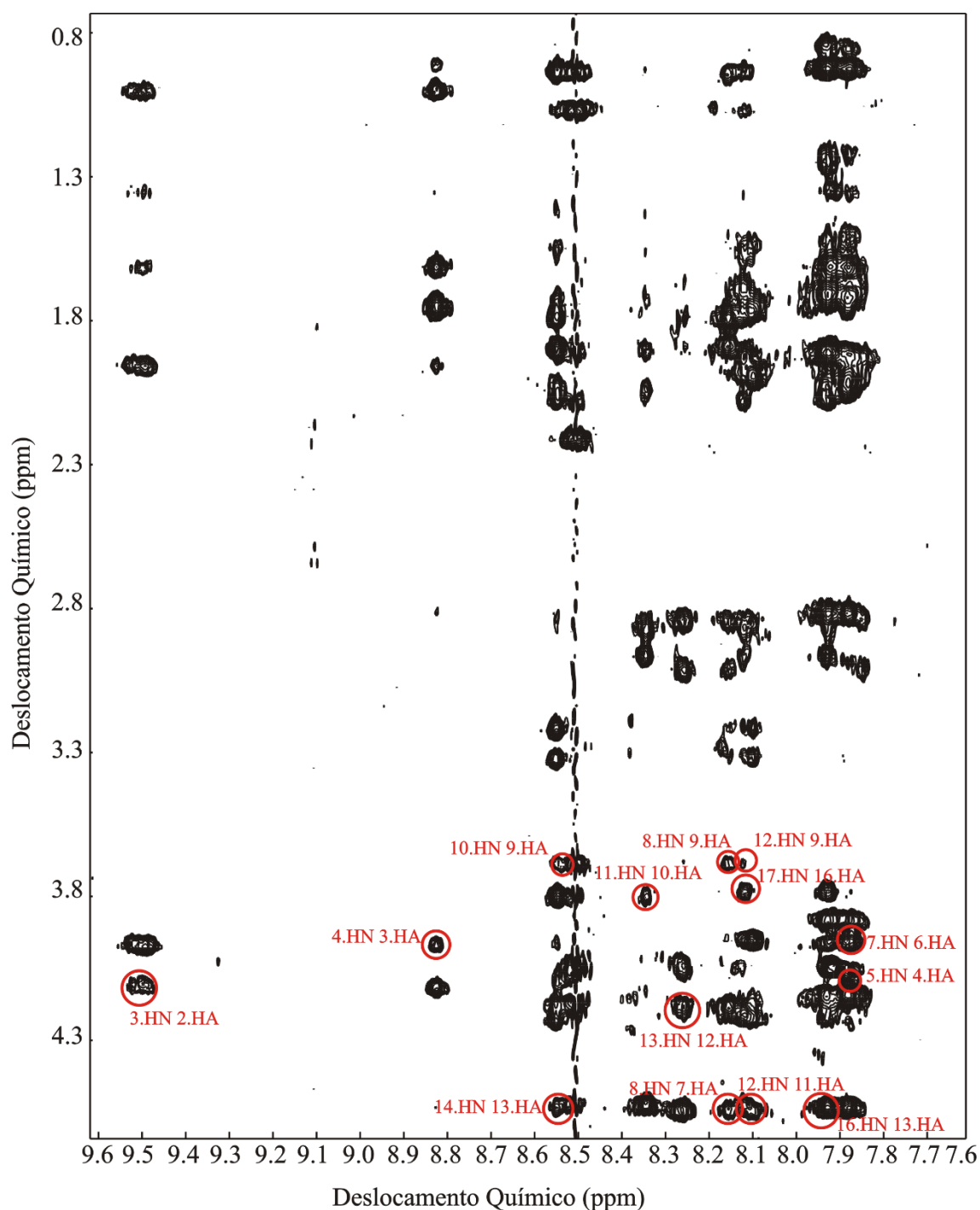
Figura 43: Ampliação do mapa de contorno NOESY da região de interações interresiduais do tipo $d_{NN}(i,i+1)$ e $d_{NN}(i,i+2)$.



A Figura 43 mostra as regiões características do tipo d_{NN} , sendo possível observar as interações do tipo $d_{NN}(i, i+1)$ entre praticamente todos os resíduos da cadeia peptídica de Schistocina-2. Além disso, ainda foram observadas as correlações $d_{NN}(i,i+2)$ entre 12.HN 10.HN; 10.HN 12.HN. As correlações entre alguns resíduos como, por exemplo, 2.HN 4.HN e 9.HN 10.HN, não foram identificadas, pois estes resíduos apresentaram deslocamentos químicos muito próximos.

Pela análise conjunta dos mapas de contorno TOCSY e NOESY foi possível fazer a distinção entre resíduos recorrentes da sequência de aminoácidos da estrutura primária a partir da identificação de correlações intraresiduais observadas no NOESY. Com isso, foi possível identificar a vizinhança de cada resíduo e sua posição na estrutura primária do peptídeo Schistocina-2. A Figura 44 mostra os NOE $d_{\alpha N}(i, i+n, n=2,3,4)$, característicos de hélice.

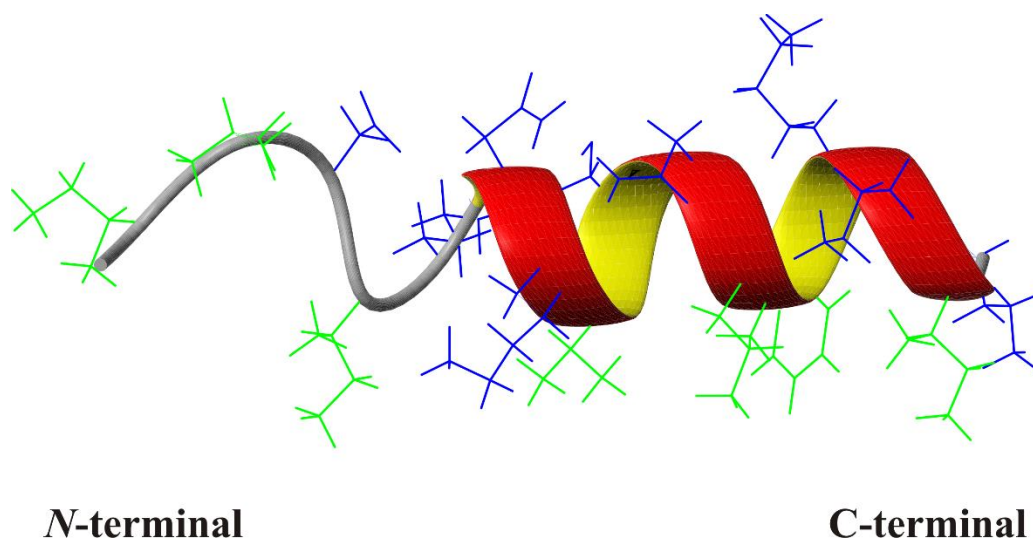
Figura 44: Ampliação da região amídica do mapa de contorno NOESY (500 MHz) de Schistocina-2.



Nesse mapa de contorno, é possível verificar um maior número de sinais do que os obtidos para TOCSY. Isso porque, como já foi dito, há também correlações interresiduais típicas de α -hélice que só podem ser observadas nesse mapa de contorno (WÜTHRICH, 1986). Na Figura 44 (p. 90) é possível observar correlações de média distância $d_{\alpha N}(i, i+n, n=2,3,4)$, características de conformação α -hélice. Diversas correlações interresiduais foram identificadas devido a NOE característicos de hélice, $d_{\alpha N}(i, i+k; 1 \leq k \leq 4)$, $d_{NN}(i, i+k; 1 \leq k \leq 2)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$. Esses NOE foram observados em maior quantidade próximos a região *N*-terminal, se estendendo para o meio da cadeia. Um número menor de correlações interresiduais foram determinados para a porção *N*-terminal da cadeia peptídica, podendo indicar uma menor estruturação em hélice nessa região. Porém, a sobreposição de sistemas de spin para alguns resíduos também pode ter contribuído para o menor número de correlações interresiduais encontrados na porção *N*-terminal. O pouco número de NOE encontrado também pode ocorrer devido a uma dinâmica interna do peptídeo.

Após a atribuição completa dos sistemas de spin e NOE nos mapas de contorno obtidos para o peptídeo Schistocina-2, a integral do volume dos sinais dos NOE foram convertidos em restrições de distância de acordo com a intensidade dos sinais observados e foi realizado cálculos de dinâmica molecular e obtenção da estrutura tridimensional de Schistocina-2 obtidas em SDS-d₂₅. A estrutura de menor energia calculada para o peptídeo está representada na Figura 45.

Figura 45: Estrutura de menor energia obtida por RMN na presença de micelas de SDS-d₂₅ para o peptídeo Schistocina-2. Em azul os resíduos hidrofílicos e em verde os hidrofóbicos.

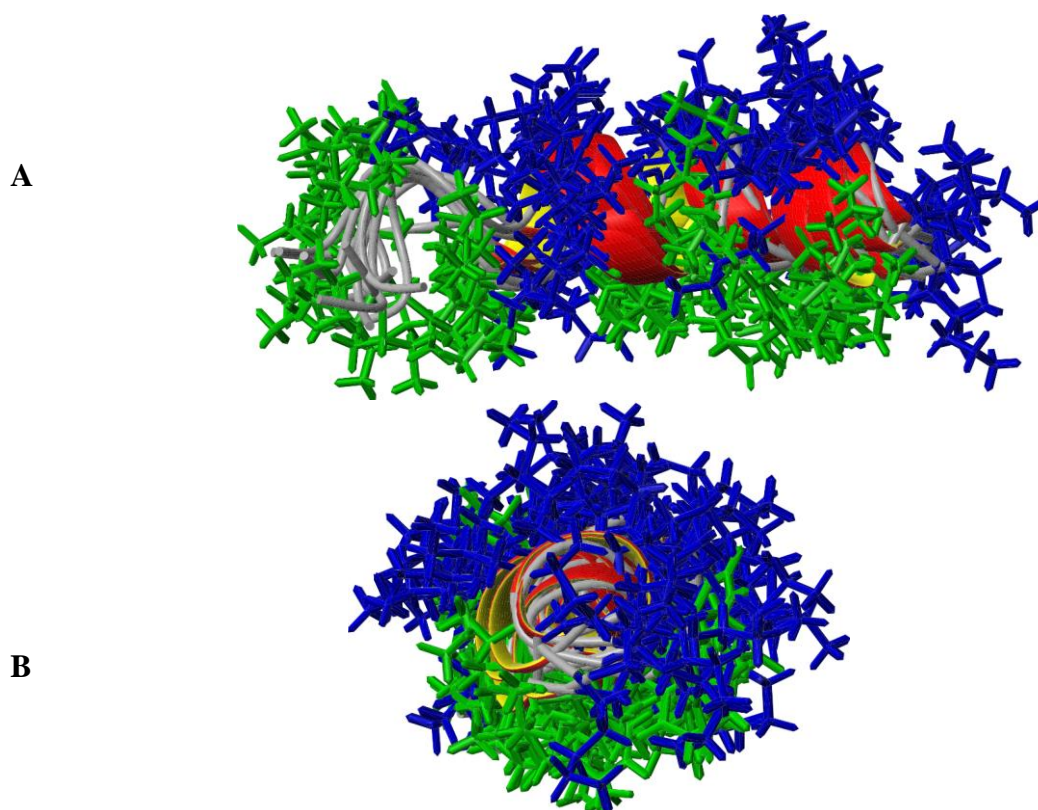


É possível observar uma conformação helicoidal do resíduo 6 ao 17, porém, como foi observado no assinalamento de NOE (FIG.45. p. 91), um menor número de correlações interresiduais foram encontradas para a porção N-terminal da cadeia peptídica.

Porém, através desta estrutura já é possível observar a boa distribuição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos hidrofílicos (azul) e hidrofóbicos (verde), localizados em faces opostas, indicam o caráter anfipático do peptídeo. Como já foi dito, a anfipaticidade é uma característica importante de um peptídeo para uma melhor interação com a membrana. Isso porque a face hidrofóbica interage com a região apolar da membrana e a face hidrofílica com a região carregada (KOSIKOWSKA & LESNER, 2016). Essa característica em conjunto com a alta carga do peptídeo Schistocina-2 (+5) pela presença de vários resíduos carregador positivamente contribuem para uma interação mais efetiva com a membrana e fazendo com que seja um potencial peptídeo com atividades biotecnológicas para a tentativa de reverter a situação da resistência microbiana dos antibióticos convencionais. Esses resultados estruturais concordam com os estudos de ITC que demonstraram uma boa interação do peptídeo com meios miméticos de membrana, com a obtenção de constantes de interação da ordem de 10^3 . Também está de acordo com os estudos de DLS e Potencial Zeta, que demonstram que a interação do peptídeo com meios que mimetizam a membrana celular provoca a perturbação da mesma e um aumento da carga inicial, devido aos resíduos carregados positivamente.

Uma sobreposição das 10 estruturas de menor energia foi realizada e está representada na Figura 46 (p. 93).

Figura 46: Sobreposição das 10 estruturas de menor energia calculadas para o peptídeo Schistocina-2 em micelas de SDS-d₂₅. Em A a vista lateral da sobreposição das estruturas, e em B a vista frontal.



A boa sobreposição das estruturas de menor energia indica uma conformação bastante estável para Schistocina-2. O que já foi previsto na análise da ampliação da região amídica dos espectros unidimensionais ^1H em SDS-d₂₅ (FIG.41). Tanto na vista frontal como na lateral da sobreposição das 10 estruturas de menor energia para Schistocina-2 é possível observar também a boa distribuição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos das cadeias laterais, indicando a boa anfipaticidade do peptídeo.

Essas estruturas calculadas são preliminares, e serão aperfeiçoadas para trabalhos futuros.

As estruturas calculadas a princípio, contribuem muito para a análise dos resultados obtidos neste trabalho. Porém, é interessante uma análise mais criteriosa para uma melhoria no cálculo e obtenção de uma estrutura melhor para Schistocina-2, onde a região *N*-terminal possa apresentar um maior caráter de hélice do que a presente estrutura.

8 CONCLUSÕES

Os estudos termodinâmicos para os peptídeos epiméricos da fenilseptina mostraram que D-Phes interage de forma mais efetiva com a membrana quando comparado a L-Phes. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os experimentos de RMN já publicados, que sugerem um momento hidrofóbico maior na parte *N*-terminal de D-Phes causado pela maior convergência da estrutura (de MAGALHÃES *et al.*, 2013). Neste caso, a interação mais efetiva com as membranas do microrganismo podem ser o fator principal para a maior atividade antimicrobiana, antifúngica e antitumoral apresentadas pelo peptídeo D-Phes do que para seu epímero.

Os ensaios biofísicos realizados para o peptídeo Schistocina-2 desenhado a partir da proteína SmKI-1, o Schistocina-2, mostraram que o peptídeo se estrutura em α -hélice quando entra em contato com LUV e interage com vesículas zwitteriônicas e aniônicas, perturbando as mesmas. Porém, a interação foi mais efetiva em vesículas aniônicas, possivelmente devido à alta carga líquida deste peptídeo (+5). Através da análise por RMN, foi possível obter a estrutura tridimensional e determinar a estruturação em α -hélice deste peptídeo, por correlações interesiduais características. Com isso, foi obtido um novo peptídeo, desenhado a partir de uma proteína, com potencial biotecnológico. Como perspectiva, será realizado um melhoramento da estrutura 3D de Schistocina-2, com a tentativa de encontrar mais NOE para que melhore a estruturação em hélice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, F.; FARIA, S.; GOMES, P.; TOMAZ, I.; PESSOA, J.C.; ANDREU, D.; BASTOS, M. **Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition.** Journal of Physical Chemistry B-Condensed Phase, v. 109, n. 36, p. 17311-17319, 2005.

AL-KADDAH, S.; REDER-CHRIST, K.; KLOCEK, G.; WIEDEMANN, I.; BRUNSCHWEIGER, M.; BENDAS, G. **Analysis of membrane interactions of antibiotic peptides using ITC and biosensor measurements.** Biophysical Chemistry, v. 152, Issues 1–3, p. 145-152, 2010.

ALI, M.F.; LIPS, K.R.; KNOOP, F.C.; FRITZSCH, B.; MILLER, C.; CONLON, J.M. **Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*.** Biochim Biophys Acta, 1601 (1), p. 55-63, 2002.

ALVES, FERNANDES, E.S. **Estudo estrutural por RMN de ¹H de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *Hypsiboas albopunctatus* e *Leptodactylus labyrinthicus*.** Revista de Biologia Neotropical, v.8, n.2, 2011.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J. E SUBRA, G. **Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis.** Molecular Biotechnology, v.33, n.3, p.239-254, 2006.

ANDRUSHCHENKO, V.V., H.AARABI, M.; NGUYEN, L.T.; PRENNER, E.J.; VOGEL, H.J. **Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes.** Biochimica et Biophysica Acta 1778, p. 1004–1014. 2008

APD – **Antimicrobial Peptide Database**, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.

ARIAS, M.; PRENNER, E.J.; VOGEL, H.J. **Calorimetry Methods to Study Membrane Interactions and Perturbations Induced by Antimicrobial Host Defense Peptides.** Methods in Molecular Biology, v. 1548. Humana Press, New York, NY, 2017.

AVITABILE, C.; D'ANDREA, L.D.; ROMANELLI, A. **Circular Dichroism studies on the interaction of antimicrobial peptides with bacterial cells.** Scientific Reports, 4293, 2014.

BANSAL P. S.; TORRES A. M.; CROSSETT B.; WONG K. K.; KOH J. M.; GERAGHTY D. P.; VANDENBERG J. I.; KUCHEL P. W. **Substrate specificity of platypus venom L-to-D-peptide isomerase.** J. Biol. Chem. 2008.

BAX, A. & DAVIS, D.G. **J. Magn. Reson.** 65, p. 355-360, 1985.

BECHINGER, B. & K. Lohner. **Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1758(9), p. 1529-1539, 2006.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry: international edition,** WH Freeman & Co. New York, 2006.

BESCHIASCHVILI, G.; & SEELIG, J. **Peptide Binding to Lipid Bilayers. Binding Isotherms and ψ -Potential of a Cyclic Somatostatin Analogue.** Biochemistry, 29, p. 10995-11000, 1990.

Biological Magnetic Resonance Data Bank (disponível em: http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm. Acesso em fevereiro de 2018).

BRADFORD, A.M.; RAFTERY, M.J.; BOWIE, J.H.; TYLER, M.J.; WALLACE, J.C.; ADAMS, G.W.; SEVERINI, C. **Novel Uperin peptides from the dorsal glands of the Australian Floodplain Toadlet *Uperoleia inundata*.** Australian Journal of Chemistry, 49(4), p. 475-484, 1996.

BUCZEK, O.; YOSHIKAMI, D.; BULAJ, G.; JIMENEZ, E.C., OLIVERA, B.M. **Post-translational amino acid isomerization: a functionally important D-amino acid in an excitatory peptide.** J. Biol. Chem. 280, p. 4247–4253, 2005.

BÜRCK, J.B.; WADHWANI, P.; FANGHANEL, S.; ULRICH, A.S. **Oriented Circular Dichroism: A Method to Characterize MembraneActive Peptides in Oriented Lipid Bilayers.** Accounts of chemical research. *Acc. Chem. Res.*, 49 (2), p. 184–192, 2016.

CAESAR. **Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2017.** World Health Organization. 2017

CARVALHO, L.A.C; MACHINI, M.T. **Hemodioxidinas derivadas da hemoglobina: estruturas, propriedades e perspectivas.** Química Nova, v. 36, no. 7, São Paulo, 2013.

CAVANAGH, J. **Protein NMR spectroscopy: principles and practice.** Oxford: Elsevier Academic Press, 2006.

CERNE, K.; ERMAN, A.; VERANIC, P. **Analysis of cytotoxicity of melittin on adherent culture of human endothelial cells reveals advantage of fluorescence microscopy over flow cytometry and haemocytometer assay.** Protoplasma, v. 250, n. 5, p. 1131-1137, 2013.

CHAN, W.C. & WHITE, P. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach,** Oxford University Press on Demand, 2000.

CHANG, T.W.; WEI, S.Y.; WANG, S.H.; WEI, H.M.; WANG, Y.J.; WANG, C.F.; CHEN, C.; LIAO, Y.D. **Hydrophobic residues are critical for the helix-forming, hemolytic and bactericidal activities of amphipathic antimicrobial peptide TP4.** PLoS ONE 12(10): e0186442, 2017.

CHEN, F.Y.; LEE, M.T.; HUANG, H.W. **Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin.** Biophysical Journal, v. 82, p. 908-914, 2002.

CHOU, H. T.; KUO, T. Y.; CHIANG, J. C.; PEI, M. J.; YANG, W. T.; YU, H. C.; LIN, S. B.; CHEN, W. J. **Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against Vibrio spp.** Int. J. Antimicrob. Agents, 32, 130-138, 2008.

CHUFÁN, E.E.; DE, M.; EIPPER, B.A.; MAINS, R.E.; AMZEL, L.M. **Amidation of bioactive peptides: The structure of the Lyase Domain of the Amidating Enzyme.** PMC Structure, 17 (7), p. 965-973, 2009.

CUNHA, R.A. **Caracterização molecular do mecanismo de interação de quitosanas com bicamadas lipídicas compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

DELAGLIO, F.; GRZESIEK, S.; VUISTER, G.W.; ZHU, L.; PFEIFER, J.; BAX, A. **NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.** J. Biomol NMR, 6(3), P. 277-293, 1995.

DOMINGUES, M.M.; SANTIAGO, P.S.; CASTANHO, M.A.R.B.; SANTOS, N.C. **What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies?** Journal of Peptide Science, 14: p. 394-400, 2008.

EPAND, R. M. & VOGEL, H. J. **Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1462, p. 11-28, 1999.

FASMAN, G. **Circular Dichroism and the Conformational Analyses of Biomolecules,** Plenum Press, 1996.

FJELL, C.D.; HISS, J.A.; HANCOCK, R.E.W.; SCHNEIDER, G. **Designing antimicrobial peptides: form follows function.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 11, p. 37-51, 2012.

FOX, J.L. **Antimicrobial peptides stage a comeback.** Nat Biotechnol, 31, p. 379 – 82, 2013.

FREIRE, J.M.; DOMINGUES, M.M.; MATOS, J.; MELO, M.N.; VEIGA, A.S.; SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. **Using Zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes.** European Biophysics Journal, v. 40, p. 481-487, 2011.

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

GRZESIEK, S. & BAX, A. **Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins.** Journal of biomolecular NMR, v. 3, n. 2, p. 185-204, 1993.

HANCOCK, R.E.W. & SAHL, H.G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies.** Nature Biotechnology, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.

HECK, S.D.; SIOK, C.J.; KRAPCHO, K.J.; KELBAUGH, P.R.; THADEIO, P.F.; WELCH, M.J.; WILLIAMS, R.D.; GANONG, A.H.; KELLY, M.E.; LANZETTI,

A.J. Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin. Science 266, p. 1065-1068, 1994.

HALDER, S.; YADAV, K.K.; SARKAR, R.; MUKHERJEE, S.; SAHA, P.; HALDAR, S.; KARMAKAR, S.; SEN, T. **Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents.** Springer Plus, 4: 672, 2015.

IRAZAZABAL, L.N. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional.** Infectious diseases. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 2016.

JILEK, A.; MOLLAY, C.; TIPPELT, C.; GRASSI, J.; MIGNOGNA, G.; MULLEGGER, J.; SANDER, V.; FEHRER, C.; BARRA, D.; KREIL, G.; **Biosynthesis of a D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, p. 4235, 2005.

JILEK A.; MOLLAY C.; LOHNER K.; KREIL G. **Sustrate specificity of the L/D-isomerase from frog skin.** Amino Acids, 4251757–176410.1007/s00726-011-0890-6, 2012.

JOHNSON, B.A.; BLEVINS, R.A. **NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data.** J. Biomol NMR, 4(5), P. 603-614, 1994.

JUNIOR, E.F.C.; GUIMARÃES, C.F.R.C.; FRANCO, L.L.; ALVES, R.J.; KATO, K.C.; MARTINS, H.R.; SOUZA FILHO, J.D.; BEMQUERER, M.P.; MUNHOZ, V.H.O.; RESENDE, J.M.; VELY, R.M. **Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity.** Amino acids, 49(8), p. 1389-1400, 2017.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. **Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides.** Analytical Biochemistry, v. 34, Issue 2, p. 595-598, 1970.

KIRBY, C. & GREGORIADIS, G. **Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes.** Nature Biotechnology, v. 2, n. 11, p. 979-984, 1984.

KORADI, R.K. & BILLETER, W.M. **MOLMOL: a program for display and analysis of**

macromolecular structures. Journal of Molecular Graphics 14(1): 51-55, 1996.

KOSIKOWSKA, P. & LESNER, A. **Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015).** Expert opinion on therapeutic patents, v. 26, n. 6, p. 689-702, 2016.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; STRAUS, S.K. **Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *in Vivo*.** Biomolecules, 8(1), 4, Canadá, 2018.

KUMAR, V. & SANIL, G. **A review of the mechanism of action of amphibian antimicrobial peptides focusing on peptide-membrane interaction and membrane curvature.** Curr Protein Pept Sci, 18(12), p. 1263-1272, 2017.

LEE, T.H.; HALL, K.N.; AGUILAR, M.I. **Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure.** Current Topics in Medicinal Chemistry, vol. 16, p. 25-39, 2016.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 2000.

LI, J.; KOH, J.J.; LIU, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; VERMA, C.S.; BEUERMAN, R.W. **Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design.** Font Neuroscience, vol.11, p.73, 2017.

LIEBSCH, M.& SPIELMANN, H. **Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology.** Toxicol Lett. 127(1-3), p. 127-134, 2002.

LO, W.C.; HENK, W.G.; ENRIGHT, F.M. **Light-microscopic studies of 3T3 cell plasma membrane alterations mediated by melittin.** Toxicon, v. 35, n. 1, p. 15-26, 1997.

LOHNER, K. & PRENNER, E. J. **Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1462, n.1-2, p.141-156, 1999.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. **Síntese Química e Enzimática de Peptídeos: princípios básicos e aplicações**, Química Nova, v. 27, n.5, São Paulo, set. 2004.

DE MAGALHÃES, M.T.Q.; BARBOSA, E.A.; PRATES, M.V.; VERLY, R.M.; MUNHOZ, V.H.O.; DE ARAÚJO, I.E. **Conformational and Functional Effects Induced by D- and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus***. PLoS ONE 8(4): e59255, 2013.

DE MAGALHÃES, M.T.Q.; MAMBELLI, F.S.; SANTOS, B.P.O.; MORAIS, S.B.; OLIVEIRA, S.C. **Serine protease inhibitors containing a Kunitz domains: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival**. Microbes and Infection, Elsevier, v. 20, 9-10, p. 606-609, 2018.

MANGONI, M.L.; GROVALE, N.; GIORGI, A.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; BARRA, D. **Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from *Bombina* skin secretions**. Péptidos 21 , p. 1673-1679, 2000.

MARQUETTE, A. & BECHINGER, B. **Biophysical Investigations Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and Their Synergism**. Biomolecules 8(2), 2018.

MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R.; PIANI, S.; GOZZINI, L.; ERSPAMER, V. **Int. J. Pept. Proteína Res.** 17, p. 275-283, 1981.

MORAIS, S.B.; FIGUEIREDO, B.C.; ASSIS, N.R.G.; ALVARENGA, D.M.; de MAGALHÃES, M.T.Q.; FERREIRA, R.S. ***Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation**. PLoS Pathog 14(2): e1006870, 2018.

MORISHITA, F.; NAKANISHI, Y.; KAKU, S.; FURUKAWA, Y.; OHTA, S.; HIRATA, T.; OHTANI, M.; FUJISAWA, Y.; MUNEOKA, Y.; MATSUSHIMA, O. **A novel D-amino-acid-containing peptide isolated from Aplysia heart.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 240, 354, 1997.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays,** J.Immunol.Methods 65, p. 55-63, 1983.

MUNHOZ, V. H.O. **Análise Estrutural e Topológica de Peptídeos Bioativos em Meios Biomiméticos de Membranas.** 183 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

NABUURS, S. B.; SPRONK, C.A.; VRIEND, G.; VUISTER, G.W. **Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation.** Concepts in Magnetic Resonance, v. 22, n. 2, p. 90-105, 2004.

NEURATH H. **The versatility of proteolytic enzymes.** J Cell Biochem. 32(1), p. 35–49, 1986.

NGUYEN, L.T.; HANEY, E.F.; VOGEL, H.J. **The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action.** Trends in Biotechnology, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.

NOMURA, D.A.; ENOKI, T.A.; SILVEIRA, N.P.; LAMY, M.T. **Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal system.** Trabalho apresentado na XLII Reunión annual de la Sociedad Argentina de Biofísica, Córdoba, Argentina, 2013.

OELKRUG, C.; HARTKE, M.; SCHUBERT, A. **Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin.** Anticancer Res. v. 35, n. 2, p. 635-643, 2015.

OPELLA, S.J. & MARASSI, F.M. **Structure Determination of Membrane Proteins by NMR Spectroscopy.** Chem. Rev. 104, p. 3587–3606, 2004.

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

POWERS, J.P.S. & HANCOCK, R.E.W. **The relationship between peptide structure and antibacterial activity.** Elsevier, Peptides, v. 24, p. 1681–1691, 2003.

PICOLI, T.; PICH, C.S.; LOPES, M.G.; TEIXEIRA, A.G.; FISCHER, G. **Sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha.** Science and animal health, v.4, n.2, p. 101-116, 2016.

PRATES, M. V.; SFORÇA, M.L.; REGIS, W.C.B.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; PERTINHEZ, T.A.; ARAÚJO, A.L.T.; AZEVEDO, R.B.; SPISNI, A.; BLOCH, C. **The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran Hyla punctata.** The Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 13018-13026, 2004.

PRATT, J.P.; RAVNIE, D.J.; JIANG, X.; OROZCO, B.S.; MENTZER, S.J. **Melittin-induced membrane permeability: a non osmotic mechanism of cell death.** In vitro cellular & development biology, v. 41, p. 349-355, 2005.

RANASINGHE, S.L.; FISCHER, K.; GOBERT, G.N.; MCMANUS, D.P., **Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke Schistosoma mansoni,** Parasites & Vectors 8:408, 2015.

RICE, L.M. & BRÜNGER, A.T. **Torsion angle dynamics: reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement.** Proteins, 19(4), p. 277-290, 1994,

SANDERSON, J.M. **Peptide–lipid interactions: insights and perspectives.** Organic & Biomolecular Chemistry, v.3, n.2, p.201-212, 2005.

SATO, H. & FEIX, J.B., **Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides.** Science direct, Biochimica et Biophysica Acta, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, USA, 2006.

SCHNEIDER, S.C.; BROWN, T.C.; GONZALEZ, J.D.; LEVONYAK, N.S.; RUSH, L.A.; CREMEENS, M.E. **CD and ³¹P NMR studies of tachykinin and MSH neuropeptides in SDS and DPC micelles.** *Journal of Molecular Structure*, 2015.

SCHOTE, U. & SEELIG, J. **Interaction of the neuronal marker dye FM1–43 with lipid membranes. Thermodynamics and lipid ordering.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1415, p. 135-146, 1998.

SCHWIETERS, C.D.; KUSZEWSKI, J.J.; CLORE, G.M. **Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination.** *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 48, p. 47–62, 2006.

SEELIG, J. **Titration calorimetry of lipid-peptide interactions.** *Biochim. Biophys. Acta*. 1331, p. 103–116, 1997.

SEELIG, J. **Thermodynamics of lipid–peptide interactions.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes*, v. 1666, n. 1, p. 40-50, 2004.

SHAI, Y. **Mode of action of membrane active antimicrobial peptides.** *Pub Med*, 66(4), p. 236-48, 2002.

SHANG, D.; ZHANG, Q.; DONG, W.; LIANG, H.; BI, X. **The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria and endotoxin neutralization.** *Acta Biomaterialia*, v. 33, p. 153-165, 2016.

SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; REGIS, W.B.; TEDESCO, A.C.; AZEVEDO, R.B.; FREITAS, S.M.; BLOCH, C. **Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 151, n. 3, p. 329-335, 2008.

DA SILVA, J.J.R.F.; DA SILVA, J.A.L. **D-aminoácidos em biologia – mais do que se julga.** *Química Nova*, Lisboa – Portugal, 2009.

SREERAMA, N. & WOOD, R.W. **Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set.** *Anal Biochem*, 287 (2), p. 252-260, 2000.

SUEKI, M.; LEE, S., POWERS, S.P.; DENTON, J.B.; KONISHI, Y.; Scheraga, H.A. **Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. 22. Histidine parameters from random poly (hydroxybutyl)-glutamine- ω -L-histidine** *Macromolecules*, 17, p. 148-155, 1984.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

TEROL, P.A.; KUMITA, J.R.; HOOK, S.C.; DOBSON, C.M.; ESBJORNER, E.K. **Solvent exposure of Tyr10 as a probe of structural differences between monomeric and aggregated forms of the amyloid- β peptide**. Elsevier, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 468, p. 696-701, 2015.

THEIS, T. & STAHL, U. **Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications**. *Cell Mol Life Sci* 61, 437-455, 2004.

TINOCO, L.W.; DA SILVA, A.; LEITE, A.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L. **NMR Structure of PW2 Bound to SDS Micelles A tryptophan-rich anticoccidial peptide selected from phage display libraries**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 39, p. 36351-36356, 2002.

TORRES, A.M.; TSAMPAZI, M.; KENNETT, E.C.; BELOV, K.; GERAGHTY, D.P.; BANSAL, P.S.; ALEWOOD, P.F.; KUCHEL, P.W. **Characterization and isolation of L-to-D-amino-acid-residue isomerase from platypus venom**. *Amino Acids*, 32163–810.1007, 2007.

TOSSI, A.; TARANTINO, C.; ROMEO, D. **Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity**. *Eur. J. Biochem.*, v. 250, p. 549-558, 1997.

TREVIÑO, J.; BAYÓN, C.; ARDÁ, A.; MARINELLI, F.; GANDOLFI, R.; MOLINARI, F.; JIMENEZ-BARBERO, J.; HERNÁIZ, M.J. **New Insights into Glycopeptide Antibiotic Binding to Cell Wall Precursors using SPR and NMR Spectroscopy**. *Chemistry European Journal*, v. 20, n. 24, p. 7363-7372, 2014.

TROLL, W. & CANNAN, R.K. **A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids.** Journal of Biological Chemistry, v. 200, p. 803-811, 1953.

VERLY, R.M.; RESENDE, J.M.; JUNIOR, E.F.C.; DE MAGALHÃES, M.T.Q.; GUIMARÃES, C.F.C.R.; MUNHOZ, V.H.O; BEMQUERER, M.P.; ALMEIDA, F.C.L.; SANTORO, M.M.; VELOSO, D.P.; BECHINGER, B. **Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin.** Scientific Reports 7, 40854, 2017.

VOIEVODA, N.; SCHULTHESS, T.; BURKHARD, B.; SEELIG, J. **Thermodynamic and Biophysical Analysis of the Membrane Association of a Histidine-Rich Peptide with Efficient Antimicrobial and Transfection Activities.** The Journal of Physical Chemistry B, v. 119, n. 30, p. 9678-9687, 2015.

WANG, H.; YU, Z.; HU, Y.; LI, F.; LIU, L.; ZHENG, H.; MENG, H.; YANG, S.; YANG, X.; LIU, J. **Novel antimicrobial peptides isolated from the skin secretions of Hainan odorous frog, *Odorrana hainensis*.** Peptides. v. 35, p. 285-290, 2012.

WANG, K.; YAN, J.; CHEN, R.; DANG, W.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; SONG, J.; WANG, R. **Membrane-Active Action Mode of Polybia-CP, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Venom of Polybia paulista.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 56, n. 6, p. 3318, 2012.

WANG, X.; REN, S.; GIO, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; LI, S.; REN, J.; HU, Y.; WANG, H. **Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species.** PubMed, Acta Biochim Biophys Sin, 49 (6), p.550-559, 2017.

WEGENER, K.L.; BRINKWORTH, C.S.; BOWIE, J.H.; WALLACE, J.C. TYLER, M.J. **Bioactive dahlein peptides from the skin secretions of the Australian aquatic frog *Litoria dahlia*: sequence determination by electrospray mass spectrometry.** Rapid Communications in mass spectrometry, v. 15, p. 1726-1734, 2001.

WIEPRECHT, T.; DATHE, M.; SCHUMANN, M.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. **Conformational and functional study of magainin 2 in model**

membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35, p.10844-10853, 1996.

WIEPRECHT, T. & SEELIG, J., **Isothermal Titration Calorimetry for Studying Interactions between Peptides and Lipid Membranes.** *Current Topics in Membranes*, Volume 52. Department of Biophysical Chemistry, Biocenter of the University of Basel, Switzerland, 2002.

WIEPRECHT, T.; APOSTOLOV, O.; SEELIG, J. **Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles.** *Biophysical chemistry*, v. 85, n. 2, 89, p. 187-198, 2000.

WILLIAMSON, M.P. **Peptide structure determination by NMR. Spectroscopic Methods and Analyses: NMR, Mass Spectrometry, and Metalloprotein Techniques**, p. 69-85, 1993.

WOJCIK, J.; ALTMANN, K.H.; SCHERAGA, H.A. **Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XXIV. Half-cystine parameters from random poly (hydrobutylglutamine- ω -S-Methylthio- α -cysteine).** *Biopolymers*, 30 (1990), p. 121-134, 1990.

WORLD ECONOMIC FORUM, **The Global Risks Report**, 13th Edition, 2018, Disponível em: http://www3.weforum.org/docs/WEF_GRR18_Report.pdf Acesso 3 nov. 2017.

WÜTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids.** New York: Wiley, 1986.

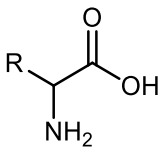
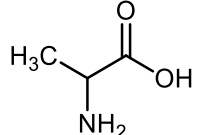
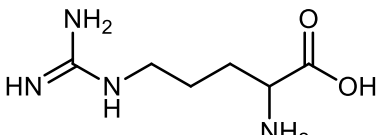
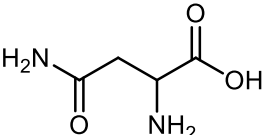
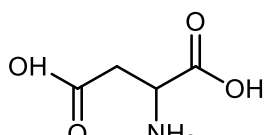
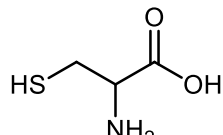
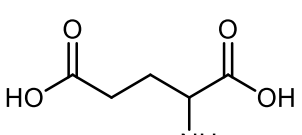
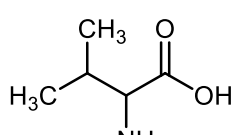
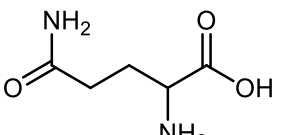
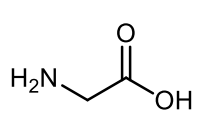
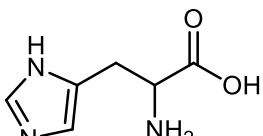
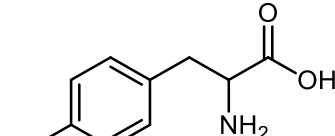
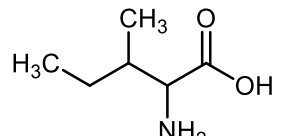
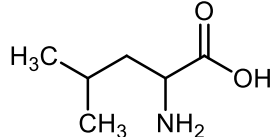
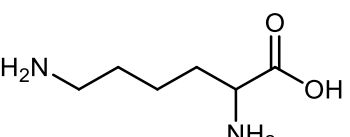
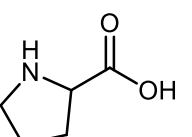
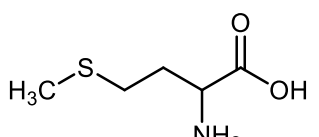
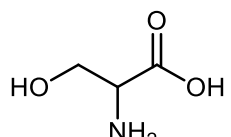
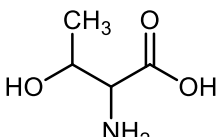
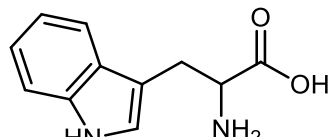
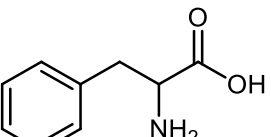
YEAMAN, M.R. & YOUNT, N.Y. **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.** *Pharmacological Reviews*, v.55, n.1, p.27-55, 2003.

YIN, L.M.; EDWARDS, M.A.; LI, J. YIP, C.M.; DEBER, C.M. **Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions.** *J. Biol. Chem.* v. 287, p. 7738-7745, 2012.

ZASLOFF, M. **Antimicrobial peptides in health and disease.** *The New England Journal of Medicine* 347(15), p. 1199-1210, 2002.

ANEXOS

Representação dos Vinte Aminoácidos Essenciais

 <p>Nome (Abreviação) Símbolo</p>	 <p>Alanina (Ala) A</p>	 <p>Arginina (Arg) R</p>	 <p>Asparagina (Asn) N</p>	 <p>Ácido Aspártico (Asp) D</p>
	 <p>Cisteína (Cys) C</p>	 <p>Ácido Glutâmico (Glu) E</p>	 <p>Valina (Val) V</p>	 <p>Glutamina (Glu) Q</p>
	 <p>Glicina (Gly) G</p>	 <p>Histidina (His) H</p>	 <p>Tirosina (Tyr) Y</p>	 <p>Isoleucina (Ile) I</p>
	 <p>Leucina (Leu) L</p>	 <p>Lisina (Lys) K</p>	 <p>Prolina (Pro) P</p>	 <p>Metionina (Met) M</p>
	 <p>Serina (Ser) S</p>	 <p>Treonina (Thr) T</p>	 <p>Triptofano (Trp) W</p>	 <p>Fenilalanina (Phe) F</p>