



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELA KHOURI CAVALCANTE

**ESTUDOS DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO Hs02 COM DNA POR
CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA, ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA E RESOLVIDA NO TEMPO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BRASÍLIA - DF

1º/2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

GABRIELA KHOURI CAVALCANTE

ESTUDOS DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO Hs02 COM DNA POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA, ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA E RESOLVIDA NO TEMPO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Silva Vignoli Muniz (UnB)

Coorientador: Dr. Evandro Luiz Duarte (USP)

BRASÍLIA - DF

1º/2024

Consagro este trabalho à minha avó Margareth Nasser (*In memoriam*). Com todo amor.

AGRADECIMENTOS

À minha família, sem vocês eu nada seria. Sobretudo meus irmãos Matheus, Beatriz, Vinícius e Nicole, que são ladrilhos indispensáveis na estrada da minha vida.

Ao meu melhor amigo e cônjuge Alberto, e à toda sua família que se estendeu e virou minha também. Agradeço sua comunhão, sua serenidade e por me acolher como eu sou.

Aos meus amigos e amigas de longa data Igor, Gustavo, Glauber, Thaís, Lucas, Sara, Bruna, Luís, Gideonny, Alice, Roberto, Talita, Mateus, João, Juliana, Vanessa e tantos outros que sei que posso contar. Vocês tornam a caminhada afortunada.

Aos meus colegas de trabalho, estágio e pesquisa que agregaram no meu percurso profissional.

A todos os professores que acreditaram no meu potencial. Aos professores Dr. Guilherme Dotto Brand e Dr. Leonardo Paterno agradeço a parceria. Aos prezados Dr. Gabriel e Dr. Evandro agradeço a orientação.

À minha maior incentivadora e exemplo de autenticidade, minha querida avó.

E a Ele, criador de tudo que é, foi e será.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS.....	Erro! Indicador não definido.
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 DNA.....	17
2.2 PEPTÍDEOS.....	19
2.2.1 PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS (IAPs).....	21
2.2.1.1 Hs02.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 REAGENTES.....	27
3.2 SÍNTESE PEPTÍDICA.....	27
3.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE DNA E DE HS02.....	28
3.4 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	29
3.5 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA (FE).....	29
3.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO (FRT).....	30
4 INTRODUÇÃO ÀS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....	30
4.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	31
4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	33
4.3 FENÔMENO DA FLUORESCÊNCIA.....	34
4.3.1 RELAXAÇÃO DIPOLAR OU EFEITO DO SOLVENTE.....	39
4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA (FE).....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1 RESULTADOS DE DSC.....	46
5.2 RESULTADOS DA FE.....	48
5.3 RESULTADOS DA FRT.....	50
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO.....	52
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7 REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i> (Peptídeos Antimicrobianos)
APD	<i>Antimicrobial Peptide Database</i> (Banco de dados de peptídeos antimicrobianos)
DMPC	Dimiristoil Fosfatidil Colina
DMPG	Dimiristoil Fosfatidil Glicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria Diferencial de Varredura)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FE	Fluorescência Estacionária
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
FRT	Fluorescência Resolvida no Tempo
HEPES	Ácido de N-(2-Hidroxietil) -Piperazina-N-2-Etano sulfônico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IAP	<i>Intragenic Antimicrobial Peptide</i> (Peptídeo Intragênico Antimicrobiano)
LUVs	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> (Vesículas Unilamelares Grandes)
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight</i> (Dessorção/ionização a laser assistida por matriz – tempo de voo)
RAM	Resistência Antimicrobiana
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> (Síntese de Peptídeos em Fase Sólida)
TCSPC	<i>Time-Correlated Single Photon Counting</i> (Contagem de fóton único por correlação temporal)
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1 – Representação do espectro de ação dos antimicrobianos. Fonte: Madigan, *et al.*, 2016. p. 16
- Figura 2 – À esquerda: Estrutura simplificada do DNA. À direita: Purinas e pirimidinas, Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Fonte: *Biologia Molecular do Gene*, 2015. p. 18
- Figura 3 - À esquerda: Estrutura geral de aminoácidos e ligação peptídica. À direita: Aminoácido triptofano. Fonte: *Entre sólidos e Líquidos*, 2013. p. 20
- Figura 4 – Estruturas peptídicas primária e secundária. Fonte: *Entre sólidos e Líquidos*, 2013. p. 20
- Figura 5 - Estrutura de mais baixa energia do peptídeo intragênico Hs02 na presença de micelas zwitteriônicas de DPC-c38. Fonte: *Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity*, 2019. p. 24
- Figura 6 – Ilustração de um micro calorímetro diferencial de varredura. R e A são respectivamente referência e amostra. Fonte: Tese Rafael Pianca Barroso, 2010. p. 31
- Figura 7 – Termograma típico de uma proteína hipotética. A diferença de C_p é indicada pela seta de ponta dupla. Fonte: *Entre sólidos e Líquidos*, 2013. p. 32
- Figura 8 - Ilustração de espectrofotômetros UV-Vis de feixe simples (a) e feixe duplo (b). Fonte: Skoog, 2006. p. 34
- Figura 9 - Representação do Diagrama de Jablonski. Fonte: adaptada de Valeur, 2002. p. 35
- Figura 10 - Espectro de emissão fluorescente típica, destacando o deslocamento de Stokes. Fonte: Raymond, 2006. p. 37
- Figura 11 - Diagrama de Jablonki modificado, mostrando o efeito de relaxação dipolar para a fluorescência. Adaptada de Lakowicz 2006. p. 40
- Figura 12 - Espectro de fluorescência do fluoróforo Prodan em diferentes solventes. Fonte: Tese, Cíntia Cristina de Vequi Suplicy, 2010. p. 40
- Figura 13 - Esquema do espectrômetro de FE, modelo com lâmpada de mercúrio e lentes. Fonte: Skoog, 2006. p. 41

Figura 14 - Esquema de decaimento fluorescente medido com a técnica de TCSPC. Fonte: Tese Cintia Suplicy, 2010.	p. 43
Figura 15 - Decaimento de fluorescência do peptídeo HS02 em tampão (HEPES 10 mmol L ⁻¹ , NaCl 50 mmol L ⁻¹ , 1 mmol L ⁻¹ EDTA, pH 7,4). Comprimento de onda de excitação em 284 nm. Comprimento de onda de emissão em 356 nm.	p. 44
Figura 16 - Esquemático do TCSPC. CFD = constant function discriminator (Analisador de Função Constante); TAC = <i>time-to-amplitude converter</i> (Conversor tempo-amplitude); PGA = <i>programmable gain amplifier</i> (Amplificador de ganho programável); ADC = <i>analog-to-digital converter</i> (Conversor analógico-digital); WD = <i>window discriminator</i> (Discriminador de janela). Fonte: Lakowicz, 2006.	p. 45
Figura 17 - Termograma de DSC de uma solução de DNA (250 μmol L ⁻¹) em tampão (HEPES 10 mmol L ⁻¹ , EDTA 1 mmol L ⁻¹ , NaCl 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,4) na ausência e na presença de diferentes concentrações de Hs02.....	p. 47
Figura 18 - Espectro de fluorescência do peptídeo Hs02 (10 μmol L ⁻¹) em solução aquosa (10 mmol L ⁻¹ HEPES, 1mmol L ⁻¹ EDTA, 50 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4) na ausência e na presença de diferentes concentrações de DNA. λ _{exc} = 295 nm (As linhas tracejadas são somente guias visuais).	p. 49
Figura 19 - Decaimento de fluorescência do peptídeo Hs02 (10 μmol L ⁻¹) em solução tampão (10 mmol L ⁻¹ HEPES, 1 mmol L ⁻¹ EDTA, 50 mmol L ⁻¹ NaCl, pH 7,4) na ausência e em presença de crescentes concentrações de DNA. λ _{exc} = 284 nm e λ _{emissão} = 356 nm.	p. 51
Figura 20 - Variação relativa dos parâmetros espectroscópicos: intensidade de fluorescência em 350 nm (triângulo azul) e tempo de vida longo (círculo laranja) do peptídeo Hs02 em função da concentração de DNA, utilizando a Equação 17.	p. 53
Figura 21 – Seis tipos de interações ligantes-DNA. Fonte: Adaptada de <i>DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?</i> 2017.	p. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura de aminoácidos.	p. 10
Tabela 2 - Resultados do espectro e ação de Hs02, juntamente com outros IAPs e demais medicamentos. Fonte: Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity, 2019.	p. 25
Tabela 3 - Tempos característicos dos processos apresentados no diagrama de Jablonski. Fonte: adaptado de Valeur 2002.	p. 36
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise dos termogramas de DSC.	p. 47
Tabela 5 - Resultados dos ajustes não lineares das curvas de decaimento de fluorescência.	p. 51
Tabela 6 - Resultados dos ajustes não lineares dos dados experimentais, utilizando a Eq. 17.	p. 54

Nome	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys ou Cis	C
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Glicina ou Glicocola	Gly ou Gli	G
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys, Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr ou Tir	Y
Treonina	Thr ou Tre	T
Triptofano	Trp ou Tri	W
Valina	Val	V

Tabela 1 – Nomenclatura de aminoácidos

RESUMO

Peptídeos intragênicos (IAPs) são formados por fragmentos de proteínas; muitos deles exibem propriedades anti-inflamatórias e antibióticas. Em particular, o IAP Hs02 (KWA VRIIRKFIKGFIS-NH₂), derivado do fragmento da proteína humana miosina 1h (NP_001094891.3), demonstrou uma potente ação antimicrobiana *in vitro*. O presente trabalho investiga a interação entre o Hs02 e o DNA em nível molecular, utilizando técnicas experimentais como Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectroscopia de Fluorescência do Estado Estacionário (FE) e Fluorescência Resolvida no Tempo (FRT), monitorando tanto o DNA quanto o peptídeo.

Traços de DSC mostram que a solução de DNA (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) apresenta um pico calorimétrico endotérmico ao redor de 80 °C, correspondendo à desnaturação do DNA. Concentrações crescentes de Hs02 deslocam paulatinamente o pico de transição térmica para temperaturas maiores, efeito possivelmente relacionado à blindagem das cargas negativas dos fosfatos do esqueleto do DNA. Concentrações de Hs02 acima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ reduzem a entalpia de transição de fase do DNA, e a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hs02, não se observa mais esse evento.

O resíduo de triptofano na segunda posição da cadeia peptídica foi utilizado como sonda intrínseca de fluorescência e, na presença de concentrações saturantes de DNA, observa-se um pequeno deslocamento relativo para o azul de 6 nm. Este resultado sugere que o resíduo de triptofano continua exposto às moléculas de solvente, possivelmente com a porção N-terminal associada aos grupamentos fosfatos do DNA.

Assim, a FE e o DSC sugerem uma forte interação entre os fosfatos do esqueleto do DNA e o hexacatiônico peptídeo Hs02. Outrossim, monitorar a fluorescência intrínseca do peptídeo e o seu decaimento de fluorescência na ausência e na presença de diferentes concentrações de DNA possibilitou a determinação de constantes de associação para o sistema Hs02-DNA da ordem de 10^4 L mol^{-1} .

Os resultados alcançados neste estudo podem oferecer contribuições significativas para o entendimento do mecanismo de ação do peptídeo Hs02 em células, bem como para o desenvolvimento de um possível sistema de entrega de material genético destinado à terapia gênica.

Palavras-chave: Peptídeo intragênico, DNA, Hs02, espectroscopia de fluorescência estacionária e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.

ABSTRACT

Intragenic peptides (IAPs) are formed by fragments of proteins; many of them exhibit anti-inflammatory and antibiotic properties. In particular, the IAP Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), derived from the fragment of the human protein myosin 1h (NP_001094891.3), demonstrated a potent antimicrobial action in vitro. This study investigates the interaction between Hs02 and DNA at the molecular level, using experimental techniques such as Differential Scanning Calorimetry (DSC), Steady-State Fluorescence Spectroscopy (FE), and Time-Resolved Fluorescence (TRF), monitoring both the DNA and the peptide.

DSC traces show that the DNA solution (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) exhibits a calorimetric peak around 80 °C, corresponding to DNA denaturation. Increasing concentrations of Hs02 gradually shift the thermal transition peak to higher temperatures, an effect possibly related to the shielding of the negative charges of the DNA backbone phosphates. Concentrations of Hs02 above 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ reduce the phase transition enthalpy of DNA, and at 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hs02, the calorimetric peak is no longer observed.

The tryptophan residue in the second position of the peptide chain was used as an intrinsic fluorescence probe, and in the presence of saturating concentrations of DNA, a slight blue shift of 6 nm is observed. This result strongly suggests that the tryptophan residue remains exposed to solvent molecules, possibly with the N-terminal portion strongly associated with the DNA phosphate groups.

Thus, FE and DSC strongly suggest a strong interaction between the DNA backbone phosphates and the hexacationic peptide Hs02. Additionally, monitoring the intrinsic fluorescence of the peptide and its fluorescence decay in the absence and presence of different concentrations of DNA enabled the determination of association constants for the Hs02-DNA system on the order of 10^4 L mol^{-1} .

The results obtained in this study may offer significant contributions to understanding the mechanism of action of the Hs02 peptide in cells, as well as to the development of a possible gene delivery system for gene therapy.

Keywords: Intragenic peptide, DNA, Hs02, differential scanning calorimetry, steady-state fluorescence spectroscopy, and time-resolved fluorescence spectroscopy.

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) emerge como uma das principais ameaças globais à saúde pública e ao progresso socioeconômico (OMS, 2017). Uma estimativa crítica realizada pela OMS avalia que até 2050, cerca de 10 milhões de mortes serão causadas por infecções causadas por RAM. Desde a "Era de ouro" dos antibióticos, entre as décadas de 1950 e 1970, não houve descoberta de uma nova classe significativa de antibióticos (Hutchings *et al.*, 2019).

Estratégias se voltam para vigilância da RAM e o avanço no desenvolvimento de vacinas e medicamentos, evidenciando a urgência na criação de novos agentes terapêuticos (Akram *et al.*, 2023). Uma rota bastante promissora é o uso de peptídeos ativos (Talapko *et al.* 2022).

Peptídeos bioativos podem ser encontrados em diversas espécies de animais e plantas (Datta e Roy, 2021). Certos peptídeos demonstram uma notável eficácia antimicrobiana, exibindo atividade contra uma variedade de microrganismos. Além disso, esses peptídeos podem atuar sinergicamente com outros compostos, e até mesmo entre si, amplificando sua eficácia no combate a infecções. Por isso, peptídeos bioativos tornaram-se uma alternativa significativa no contexto atual. Ademais, devido à sua atividade de amplo espectro, ação rápida e muitas vezes seletividade celular (Pirtskhalava *et al.*, 2021) são apontados como uma promissora forma de combate a RAM e como uma nova geração de fármacos (Boparai e Sharma, 2019).

Estudos recentes revelaram que determinadas sequências de aminoácidos, quando isoladas das proteínas precursoras, são capazes de manifestar atividades biológicas, como ação antimicrobiana e anti-inflamatória. (Brand *et al.* 2019; Santos *et al.* 2023).

O exato mecanismo de ação de peptídeos bioativos ainda é um tema de debate recorrente (Brogden 2005; Yan *et al.* 2013; Talapko *et al.* 2022). Muitos peptídeos bioativos interagem fortemente com a membrana de seus alvos e com agregados anfífilos *in-vitro* (Benfield e Henriques 2020). Entretanto, a ação sobre membranas pode ser um primeiro passo para a invasão do citosol celular, onde pode afetar diferentes alvos (Brogden 2005). E desta maneira, peptídeos bioativos podem afetar o processo de síntese de proteínas e a integridade dos ácidos nucleicos, como o DNA (Sarkar *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018; Stokes *et al.*, 2019; Lade e Kim, 2021).

A terapia gênica consiste na introdução ou alteração de genes em células. Para tal, é necessário um vetor capaz de carregar e entregar o material genético no interior celular. Atualmente vetores virais são os mais utilizados, porém preocupações acerca de sua toxicidade em humanos induziram a busca por vetores não virais e menos tóxicos (Bulaklak e Gersbach 2020).

Lipídios e peptídeos, ambas moléculas anfífilas, têm sido propostos como vetores não virais para a terapia gênica (Bulaklak e Gersbach, 2020). Assim, informações sobre alterações estruturais no DNA por tais moléculas têm uma fundamental importância para compreender e desenvolver vetores de alta eficiência e baixa toxicidade.

O Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) é um peptídeo antimicrobiano intragênico (IAP) que possui 16 resíduos de aminoácidos em sua sequência primária. Quando em pH fisiológico, apresenta uma carga total 6+ e amplo espectro de ação (*in vitro*) sobre bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Brand *et al.* 2019; Bessa *et al.* 2019). Ensaio preliminares indicam que Hs02 consegue se ligar a vesículas fosfolipídicas, que são matrizes de membranas sintéticas, assim mimetizando a ação do peptídeo *in vivo*. O resultado promissor aponta para inibição de crescimento de microrganismos até mesmo em baixas concentrações, como 1 µM. (Brand *et al.* 2019).

Neste trabalho, a investigação se concentrou na interação entre o peptídeo Hs02 e o DNA, visando obter informações sobre mudanças estruturais em ambos. Métodos instrumentais de análise foram empregados para avaliar quantitativamente as possíveis mudanças depois dessa interação.

O comportamento termotrópico do DNA e suas alterações na presença de Hs02 foram monitorados por meio de calorimetria diferencial de varredura (DSC), juntamente com medidas de fluorescência intrínseca do peptídeo, tanto na ausência quanto na presença de diferentes concentrações de DNA. As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando dois métodos: o modo estacionário (FE) e a fluorescência resolvida no tempo (FRT).

O presente estudo tem por objetivo investigar a potencial interação entre o DNA e o peptídeo Hs02, empregando uma variedade de técnicas experimentais que proporcionam informações, num nível molecular, acerca dessa interação. Espera-se que os resultados obtidos possam fornecer subsídios de relevância farmacológica.

1.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a interação do IAP Hs02 com o DNA por meio de diferentes técnicas experimentais, monitorando tanto o DNA quanto o peptídeo. O objetivo é obter informações sobre as alterações físico-químicas no complexo DNA-peptídeo. Esses dados podem apresentar relevância farmacológica, proporcionando novas ideias sobre os mecanismos de ação dos peptídeos e efeitos adversos; além disso, tais informações podem ser úteis para o desenvolvimento da terapia gênica.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, têm-se:

- i. Monitorar o perfil térmico do DNA pela técnica de DSC e as alterações induzidas no comportamento termotrópico do DNA por concentrações crescentes do IAP Hs02 para avaliar a transição de fase do DNA, a entalpia envolvida e cooperatividade.
- ii. Utilizar a fluorescência intrínseca do triptofano (W) presente no Hs02, por meio das técnicas de fluorescência em estado estacionário e resolvida no tempo, para sondar alterações espectrais, na presença de diferentes concentrações de DNA, e obter informações sobre a vizinhança do triptofano, deslocamentos de comprimento de onda, intensidade de fluorescência e tempo de vida de fluorescência.
- iii. Correlacionar as duas técnicas de fluorescência para determinar uma constante de associação entre o Hs02 e o DNA.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O uso inadequado de antimicrobianos em humanos, animais e plantas impulsiona o surgimento de patógenos resistentes a medicamentos, tornando as infecções mais desafiadoras e aumentando significativamente os riscos associados a procedimentos e tratamentos médicos (OPAS/OMS, 2017).

Os tipos mais comuns de resistência a antimicrobianos são (Blair *et al.*, 2015):

- Intrínseca: característica inata de espécies, quando os indivíduos apresentam resistência devido a particularidades estruturais (Exemplo: pressão seletiva);
- Adquirida: resistência por consequência de mutações gênicas, por transferência horizontal de genes (Exemplo: *Quorum sensing*);
- Adaptativa: resistências ocasionadas por concentrações subletais da droga (Exemplo: abandonar o tratamento com antibióticos).

De maneira simplificada, a resistência antimicrobiana (RAM) pode se apresentar por: impermeabilidade à droga, inativação da droga, modificação da estrutura/enzima alvo (acetilação e fosforilação), modificação metabólica ou bombeamento da droga para o meio externo (Reygaert, 2018).

O espectro de ação de alguns antimicrobianos, já bastante utilizados na área da saúde, é ilustrado na Figura 1. Cada cor representa um organismo e cada colchete um recurso aplicável. Atualmente não existe antimicrobiano de espectro irrestrito, todos são limitados em certo ponto (Madigan *et al.*, 2016).

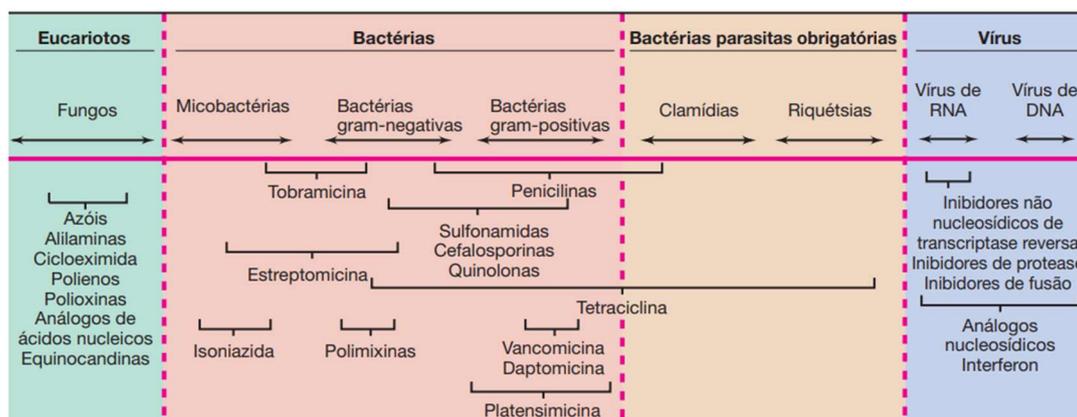


Figura 1 - Representação do espectro de ação dos antimicrobianos. Fonte: Madigan *et al.*, 2016.

Há diversas vias de atuação de um antimicrobiano na célula: pela parede celular, por desativação de síntese proteica e por inibição da replicação de DNA (Reygaert, 2018). Microrganismos apresentam uma notável versatilidade de adaptação e é possível que existam tipos de resistências que ainda não foram sequer caracterizadas.

Diante do aumento alarmante da RAM, torna-se urgente encontrar estratégias de combate a patógenos, sendo necessário repensar abordagens no desenvolvimento de agentes antimicrobianos (Reygaert, 2018).

Para novas alternativas aplicadas a antimicrobianos, é fundamental estudar novos fármacos e novas vias de atuação, incluindo as interações entre agentes e componentes celulares, dentre eles o DNA.

2.1 DNA

A informação genética, essencial à vida, é carregada pela molécula de DNA, a qual desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos. Em 1953, Watson e Crick realizaram a descoberta da sua estrutura em dupla hélice, com contribuições significativas, posteriormente reconhecidas, de Rosalind Franklin. (Pray, 2008).

O Ácido Desoxirribonucleico, designado DNA, é uma macromolécula filamentososa e enovelada, composta de subunidades de nucleotídeo. A estrutura tridimensional do DNA é representada por uma hélice de dupla fita, antiparalela, geralmente voltada para a direita (Watson *et al.*, 2015). Cada mero dessa estrutura apresenta um grupamento fosfato 3'5' ligado a um anel de açúcar com 5 carbonos, esse, por sua vez, se liga a uma base purina (anel duplo) ou pirimidina (anel simples), também conhecidas como bases nitrogenadas (Figura 2).

Cada grupamento de base nitrogenada recebe um nome: Citosina (C), Guanina (G), Adenina (A) e Timina (T) que se organizam em pares. Os esqueletos de açúcar-fosfato das fitas de DNA constituem o exterior da hélice, enquanto as bases nitrogenadas são encontradas no interior e se pareiam por ligações de hidrogênio.

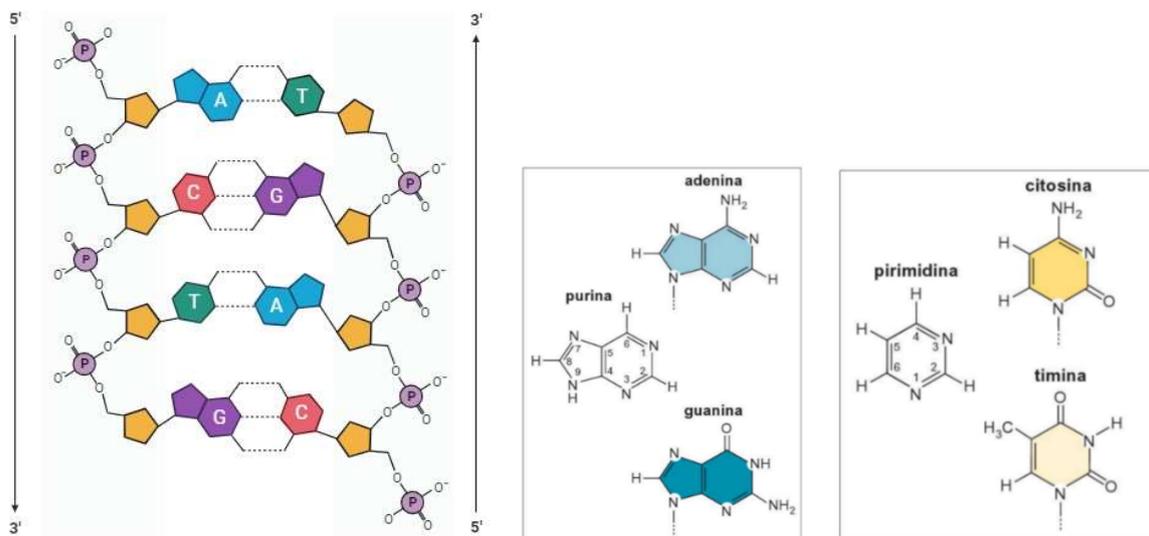


Figura 2 - À esquerda: Estrutura simplificada do DNA. À direita: Purinas e pirimidinas, estruturas fundamentais para as bases nitrogenadas. Fonte: *Biologia Molecular do Gene*, 2015.

A estrutura helicoidal do DNA é uma consequência direta da geometria dos grupos e das suas interações (Watson *et al.*, 2015). As bases nitrogenadas vizinhas ao longo de uma mesma cadeia tendem a formar uma pilha compacta devido à sobreposição das funções de onda de elétrons π , impondo um alto custo energético à penetração da água entre as bases. No esqueleto da macromolécula de DNA, encontra-se o grupo fosfato (PO_4^-) que é hidrofílico.

A conformação bem definida entre as bases e os eixos das hélices no DNA resulta em uma elevada rigidez ao arranjo. As bases nitrogenadas tendem a evitar o contato com as moléculas de água, tornando o interior da dupla hélice uma região bastante hidrofóbica (Alberts, 2008). A estabilidade da fita dupla do DNA é atribuída a várias interações, incluindo ligações de hidrogênio de emparelhamento de bases, empilhamento de bases e interações com o ambiente solvente.

O DNA é alvo de uma variedade de medicamentos antitumorais, antivirais e antibacterianos, com um histórico de várias abordagens de desenvolvimento terapêutico (Reinhold, Thomas, e Pommier 2017; Palchauthuri e Hergenrother 2007). Quando os agentes ligantes interagem com DNA, podem apresentar rigidez na macromolécula, alongamento ou abertura da dupla hélice (Sirajuddin *et al.*, 2013). Ações que modificam a estrutura do DNA alteram diretamente a regulação das funções celulares e sínteses proteicas, e indiretamente afetam a etapa de crescimento e divisão celular.

Moléculas exógenas podem interagir com o DNA por ligação covalente e não covalente, incluindo modos de ligação intercalativos, de sulco maior ou sulco menor (Green *et al.*, 2010). A ligação de moléculas biológicas a substratos, fármacos ou proteínas frequentemente induz mudanças conformacionais, aspectos que são fundamentais em estratégias de design de medicamentos.

Dada a complexidade celular, estudos físico-químicos sobre a interação entre um determinado agente ligante e o DNA fornecem dados importantes do ponto de vista farmacológico.

2.2 PEPTÍDEOS

Os peptídeos são sequências de aminoácidos ligados entre si, formando uma cadeia com um comprimento típico de dois a setenta aminoácidos. As proteínas seguem o mesmo conceito, porém são macromoléculas com cadeias mais longas, e diferente dos peptídeos, precisam passar pelo processo de enovelamento para exibirem atividade biológica (Alberts, 2008).

Cada aminoácido possui uma estrutura fundamental, que consiste em um carbono quiral (C_{α}) - exceto o aminoácido glicina - ligado covalentemente a quatro grupos químicos distintos: um átomo de hidrogênio, um grupo amônio (H_3N^+), um grupo carboxilato (COO^-) e um grupo lateral (cadeia R) (Riske e Perez, 2013). Para que a cadeia peptídica se forme, ocorrem as ligações peptídicas, quando o grupo carboxílico do primeiro aminoácido e o grupo amino do próximo ligam-se covalentemente, liberando água (Figura 3).

A cadeia lateral é o elemento distintivo entre os 20 tipos comuns de aminoácidos (conforme Tabela 1 – Lista de tabelas). A natureza química da cadeia lateral pode ser polar sem carga, polar carregada (positiva ou negativa), apolar com cadeia alifática ou apolar com cadeia aromática. Um exemplo de aminoácido apolar com cadeia aromática é o triptofano (W). O anel indol fundido presente no triptofano (W) exibe deslocalização de sua nuvem eletrônica, resultando em uma fluorescência intrínseca ao resíduo. Assim, peptídeos que contenham resíduos de W podem atuar como uma sonda intrínseca de fluorescência, fornecendo informações sobre a região em que o resíduo se encontra (Lakowicz, 2006).

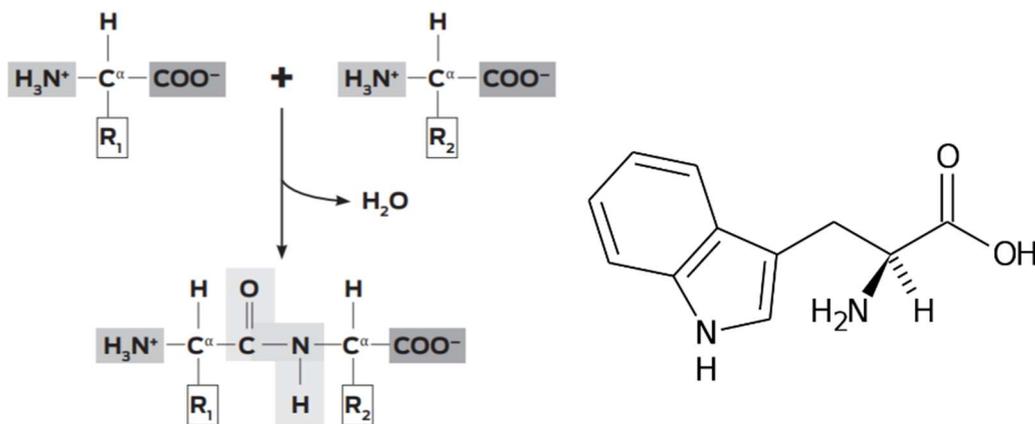


Figura 3 - À esquerda: Estrutura geral de aminoácidos e ligação peptídica. À direita: Aminoácido triptofano. Fonte: *Entre sólidos e Líquidos*, 2013.

Cada peptídeo possui uma série de estruturas que especificam suas propriedades. O nível mais simples trata da estrutura primária, que informa quais aminoácidos fazem parte da cadeia. Ao passo que a estrutura secundária determina a disposição espacial de estruturas, sendo as mais conhecidas: α -hélices e β -folhas (Berg *et al.*, 2002).

A estrutura em α -hélice é adquirida quando a molécula se enrola ao redor de um eixo longitudinal imaginário, tomando a forma de uma espiral (Figura 4). Ela também apresenta cadeias laterais que se projetam para fora da hélice. A alta estabilidade da molécula é um resultado da grande quantidade de ligações de hidrogênio intramoleculares.

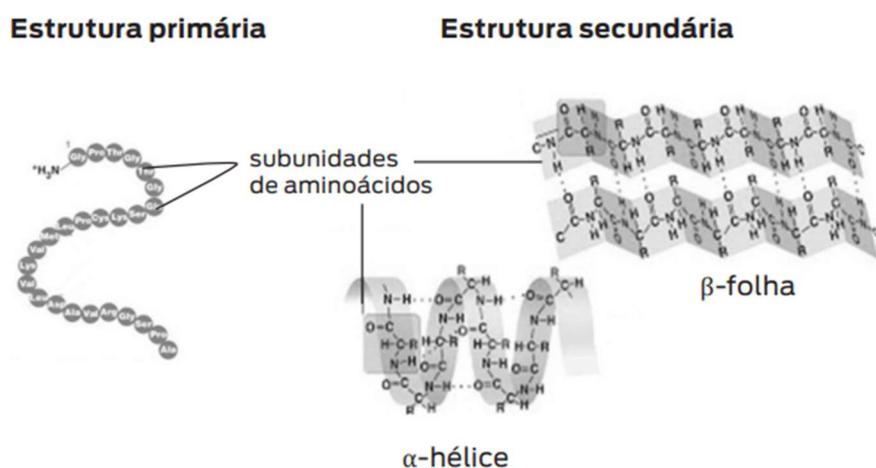


Figura 4 - Estruturas peptídicas primária e secundária. Fonte: *Adaptada do livro Entre sólidos e Líquidos*, 2013.

Dentro das diversas categorias de peptídeos, estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que constituem uma classe de pequenos peptídeos catiônicos com até 100 resíduos de aminoácidos, produzido por uma ampla variedade de organismos (Kang *et al.*, 2019). Eles são considerados mecanismos de defesa do hospedeiro (Zhu *et al.*, 2014) e têm sido reconhecidos por sua capacidade de potencializar os efeitos de outros antibióticos, oferecendo uma terapia otimizada.

Os AMPs possuem baixa toxicidade e, devido à baixa especificidade dessas moléculas, o desenvolvimento de resistência contra os peptídeos é raro (Luong *et al.*, 2022), fato que confirma uma estratégia promissora para combater a RAM. Peptídeos anfipáticos catiônicos apresentam atividade de amplo espectro, abrangendo bactérias, fungos e vírus, bem como células cancerígenas (Kang *et al.*, 2019).

Devido às suas características anfífilas, os peptídeos antimicrobianos tendem a interagir fortemente com agregados anfífilos e bicamadas lipídicas. Embora o mecanismo de ação exato dos AMPs ainda seja debatido, eles podem atuar como desestabilizadores de bicamadas lipídicas, induzindo o rompimento da membrana. A ação sobre membranas plasmáticas pode ser um primeiro passo para a invasão do citosol celular e pode induzir alterações em enzimas celulares e/ou inibir a síntese de ácido nucleico como o RNA e o DNA (Brogden, 2005; Yan *et al.*, 2013). Assim, informações sobre a interação de AMPs com estruturas intracelulares podem ajudar a melhor compreender os seus mecanismos de ação e seus efeitos citotóxicos.

2.2.1 PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS (IAPs)

De acordo com as estatísticas do *Antimicrobial Peptide Database* (APD), em janeiro de 2024, havia 3940 peptídeos cadastrados, incluindo tanto naturais quanto sintéticos. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) podem ser sintetizados quimicamente ou isolados de proteínas presentes em diversos organismos como bactérias, répteis, plantas e mamíferos (Wang *et al.*, 2016). Certas proteínas nesses organismos contêm elementos estruturais em sua cadeia de aminoácidos que exibem atividade antimicrobiana quando isolados, mesmo que, quando encriptados, não apresentem tal atividade, a estes peptídeos denominou-se o nome de peptídeos intragênicos (IPAs) (Brand *et al.* 2012; 2019).

Alguns IAPs apresentam uma ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e protozoários (Mahlapuu *et al.*, 2016). Mesmo que as proteínas precursoras não tenham qualquer relação direta com o sistema imunológico, os IAPs têm demonstrado ser tão ativos quanto alguns AMPs conhecidos, com uma seletividade semelhante e um amplo espectro antimicrobiano (Tossi, 2000). No entanto, os IAPs também podem expressar deficiências com os AMPs, tais como meia-vida baixa em meios biológicos e adsorção inespecífica em algumas células (Mariano *et al.*, 2021).

A seleção de novos IAPs, como o Hs02 estudado neste projeto, podem ocorrer *in silico*, por meio de softwares como o *Kamal*®. Desenvolvido por pesquisadores da UnB juntamente com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o software realiza a leitura de banco de dados *FASTA* e identifica fragmentos de proteína e possíveis IAPs, utilizando filtros específicos (Brand, 2007).

Alguns parâmetros são levados em conta na prospecção dos IAPs (Brand, 2012): Carga líquida (influencia na atração entre peptídeos e membranas, promove seletividade), hidrofobicidade média (induz lise na membrana, contribui para a penetração celular), e momento hidrofóbico (busca por peptídeos anfifílicos). Essas e outras configurações presentes nos IAPs já são conhecidas, o que aprimora a busca e aumentam a probabilidade de encontrar novos peptídeos com atividade antimicrobiana. O sistema se retroalimenta e realiza novas buscas cada vez mais refinadas, a partir das configurações encontradas.

Segundo Brand, a varredura do software *Kamal*® realiza a triagem de possíveis peptídeos com atividade antimicrobiana, escolhidos conforme os parâmetros listados anteriormente (Brand, 2012). Após essa triagem realizada pelo programa, as sequências são avaliadas e os peptídeos mais propensos a serem bioativos dentre os listados, seguem para a síntese em bancada. Depois da purificação, são realizados os testes *in vitro*. Apesar de vários agentes antimicrobianos serem prospectados na natureza, muitos são descartados por conta da toxicidade (Kang *et al.*, 2014).

2.2.1.1 Hs02

Confirmando a efetividade da metodologia de varredura de novos IAPs, foi descoberto pelo *KAMAL*®, o peptídeo Hs02. O nome do peptídeo advém da espécie *Homo Sapiens*, justamente por ser encontrado encriptado na proteína miosina não convencional-Ih, presente em grupos de contração musculares dos seres humanos (Brand *et al.*, 2019; Mariano *et al.*, 2021).

Nos humanos, o grupamento da miosina é composto por 40 genes, divididos em dois grupos: miosinas convencionais (incluindo as miosinas esqueléticas, cardíacas, de músculo liso e a miosina II não muscular) e miosinas não convencionais, que representam dois terços dos genes (Berg *et al.*, 2001). As miosinas não convencionais são essenciais para vários processos celulares importantes, como endocitose, exocitose, tráfego intracelular, forma das organelas e membrana plasmática, adesão celular, movimento celular e transcrição (Lanerolle e Serebryanny, 2011).

Na miosina não convencional I, notou-se um sequenciamento de peptídeo com características físico-químicas semelhantes à dos AMPs (Brand *et al.*, 2019).

Com o sequenciamento primário composto por 16 resíduos de aminoácidos e com extremidade amidada (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), o peptídeo Hs02 demonstra uma estrutura secundária em α -hélice na presença de micelas e bicamadas lipídicas zwitteriônicas e aniônicas (Brand *et al.*, 2019).

A realização de ajustes de amidação foi conduzida para aprimorar a solubilidade, mantendo propriedades anfífilas que possibilitam a interação eficaz do peptídeo antimicrobiano tanto com a solução quanto com a região apolar da membrana. Essa ação, em conjunto com a presença de resíduos de lisina e arginina, confere ao peptídeo uma carga positiva total de seis quando em pH fisiológico.

Medidas de diroísmo circular (Nunes, 2023) e ressonância magnética nuclear mostraram que o IAP de Hs02 apresenta uma estrutura helicoidal quando interage com membranas (Figura 5). Assim, o Hs02 apresenta uma α -helicoidal na adsorção da membrana e promove distúrbios na transição de fase principal do modelo das grandes vesículas unilamelares fosfolipídicas (LUVs). Esse modelo é composto unicamente de dimiristoil fosfatidil colina (DMPC) e por uma mistura de DMPC: dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) na proporção (DMPC: DMPG, 2:1 em moles) (Brand *et al.*, 2019).

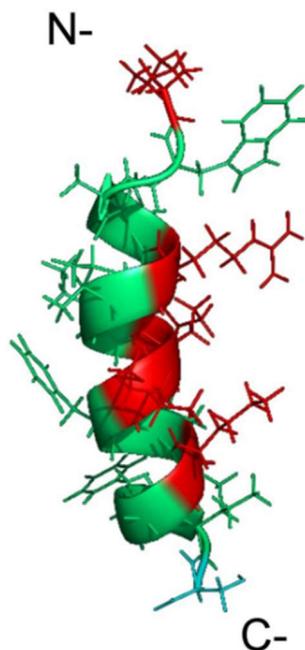


Figura 5 - Estrutura de mais baixa energia do peptídeo intragênico Hs02 na presença de micelas zwitteriônicas de Dodecilfosfolina deuterada (DPC-d₃₈). Fonte: *Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity*, 2019.

O peptídeo Hs02, e outros IAPs, foram submetidos a testes com uma série de microrganismos patogênicos humanos. As espécies avaliadas incluem a levedura *Candida albicans*, os fungos filamentosos *Trichophyton rubrum*, e as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (Brand *et al.*, 2019). Os peptídeos provenientes da pele do sapo Asc-08 e DS01 foram utilizados como controles, juntamente com agentes antifúngicos e antibióticos comerciais de referência. Os IAPs Hs02 e Hs04 exibiram concentrações inibitórias mínimas comparáveis aos AMPs Asc-08 e DS01 (Tabela 2).

O Hs02 foi o peptídeo mais potente contra todos os microrganismos avaliados, incluindo os AMPs de controle. Ademais, o Hs02 foi a única molécula que demonstrou atividade inibitória significativa contra *P. aeruginosa*, indicando um amplo espectro de atividade antimicrobiana.

	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)					Hemolytic activity SC ₅₀ *
	<i>C. albicans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Hs01	64.0 \pm 0.0	NA	128.0 \pm 0.0	64.0 \pm 0.0	NA	> 128 μM
Hs02	1.67 \pm 0.57	8.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.67 \pm 0.57	> 128 μM
Hs03	32.0 \pm 0.0	256.0 \pm 0.0	32.0 \pm 0.0	21.33 \pm 9.24	NA	> 128 μM
Hs04	8.0 \pm 0.0	32.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	5.33 \pm 2.31	NA	64 μM
Asc-8	10.67 \pm 4.61	-	1.67 \pm 0.57	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	32 μM
DS01	5.33 \pm 2.31	128.0 \pm 0.0	8.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	> 128 μM
Fluconazol	1.63 \pm 0.0	-	-	-	-	-
Amphotericin b	0.27 \pm 0.0	-	-	-	-	-
Ampicilin	-	-	5.38 \pm 0.0	43.10 \pm 0.0	NA	-
Gentamicin	-	-	0.26 \pm 0.0	0.26 \pm 0.0	0.13 \pm 0.0	-

*IAP concentration that at least 50% of red blood cells remain intact.

Tabela 2 – Resultados do espectro e ação *in vitro* de Hs02, juntamente com outros IAPs e demais medicamentos. Fonte: Adaptada de Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity, 2019.

Também foi avaliado o efeito hemolítico do Hs02 em eritrócitos humanos. Simplificadamente, o efeito hemolítico refere-se à capacidade do agente de causar a ruptura das células vermelhas do sangue, levando à liberação de hemoglobina no meio circundante. Esse teste mede a toxicidade e indica se o composto pode danificar células sanguíneas humanas. A última coluna da Tabela 2 informa qual a concentração dos agentes utilizados que causam 50% de hemólise dos eritrócitos (SC₅₀). Os dados complementares reportam que:

- i. Os IAPS Hs01, Hs02 e Hs03 causam 50% de hemólise em uma concentração similar ao AMP de referência DS01;
- ii. O Hs02 reduziu a viabilidade em macrófagos primários para 50%, mesmo na menor concentração avaliada;
- iii. As células tratadas com Hs02 não apresentaram apoptose ou necrose significativa em relação ao grupo controle com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - meio de cultura celular amplamente utilizado para o crescimento e manutenção de células em laboratório), confirmando os resultados do ensaio de viabilidade celular.

Um outro estudo avaliou a atividade antibiofilme do peptídeo Hs02 contra várias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Bessa *et al.*, 2019). O peptídeo Hs02 demonstrou influenciar a fluidez da membrana bacteriana, induzindo rigidez em ambas as espécies, conforme avaliado através da emissão fluorescente da sonda Laurdan, embebidas nas membranas plasmáticas das bactérias (Bessa *et al.*, 2019). Além disso, imagens obtidas por microscopia confocal e microscopia de força atômica mostraram que Hs02 afetou significativamente os biofilmes pré-formados de 24 horas, reduzindo a viabilidade das células bacterianas tanto em biofilmes de espécies únicas quanto em biofilmes combinados.

A proliferação e diminuição da viabilidade de biofilmes foi dificultada na presença de Hs02, provavelmente devido a um efeito direto nas células bacterianas ao romper a membrana citoplasmática, confirmando seu potencial mesmo em casos complexos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item são descritos os materiais utilizados na pesquisa e os procedimentos experimentais, abrangendo as metodologias e demais caracterizações das amostras estudadas.

3.1 REAGENTES

O DNA ss (*Salmon Sperm*) D1626 (neste trabalho com denominação simplificada para apenas “DNA”), foi adquirido da *Merck*®. O sal 4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1-etanosulfonato (HEPES), o cloreto de sódio (NaCl), o hidróxido de sódio (NaOH), e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram adquiridos da *Merck*®. Todas as soluções feitas nesta pesquisa foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade 18 MΩ.cm) obtida por um purificador Mili-Q.

3.2 SÍNTESE PEPTÍDICA

O Hs02 foi sintetizado em laboratório pelo método denominado Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS, do inglês *Solid Phase Peptide Synthesis*), purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e sequenciado por espectrometria de massas através da técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Fly*). O peptídeo foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Guilherme Dotto Brand, da Divisão de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade de Brasília. A seguir, descreveremos de forma resumida o protocolo de síntese do peptídeo Hs02.

O protocolo de síntese do Hs02 segue uma sequência de quatro etapas distintas. Inicialmente, a resina é solvatada, seguida pela desproteção do grupo N-terminal da molécula N-9-fluorenilmetoxicarbonil, estratégia denominada Fmoc. Em seguida, ocorre o acoplamento de aminoácidos, adicionando-se resíduos um a um à cadeia em crescimento. Por fim, a clivagem é realizada para permitir que a cadeia peptídica formada entre em solução, enquanto a resina é filtrada. É importante destacar que esse processo começa pelo aminoácido C-terminal e que a etapa de acoplamento é repetida a cada adição consecutiva de aminoácidos (Santos, 2022). Após a filtração o peptídeo, solubilizado em uma solução de acetonitrila/água, é liofilizado e segue para os testes subsequentes.

O peptídeo foi gentilmente cedido em colaboração com o grupo da Divisão de Química Orgânica da Universidade de Brasília (UnB) liderado pelo Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand.

3.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE DNA E DE HS02

O DNA foi diluído em tampão HEPES (10 mmol L⁻¹ HEPES, 50 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7,4). O tamponamento da solução é crucial para manter o pH estabilizado por volta de 7,4, valor que mimetiza o pH fisiológico do sangue humano. A dissolução do DNA foi realizada em intensa agitação magnética durante três dias, climatizada a 4°C para evitar desnaturação e garantir condições otimizadas. Em seguida, a solução foi armazenada em resfriamento com prazo máximo de uma semana.

A concentração de DNA foi designada pela absorbância em 260 nm após diluição de 1:20 em água, utilizando um coeficiente de extinção molar (ϵ) do DNA por concentração molar de nucleotídeo igual a 6600 L mol⁻¹ cm⁻¹ (Wolfe *et al.*, 1987). A solução estoque de DNA apresentou uma razão de absorbância UV de 260 e 280 nm superior a 1,8, indicando que o DNA estava suficientemente livre de contaminação por proteínas (Marmur 1961; Da Silva *et al.*, 2013). A solução de DNA é mantida na geladeira por no máximo uma semana, após esse período a solução é descartada.

O peptídeo Hs02 foi dissolvido em um tampão com as mesmas concentrações ao qual o DNA foi submetido (10 mmol L⁻¹ HEPES, 50 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7,4) e seguido por leve agitação com a pipeta até a completa solubilização do peptídeo. Após o preparo, a solução foi armazenada no freezer.

As concentrações (C) das soluções de Hs02 e DNA foram determinadas conforme a Lei de Lambert-Beer. Com posse dos dados de absorbância (A) do resíduo de triptofano do peptídeo em 280 nm e com coeficiente de extinção (ϵ) do resíduo de triptofano igual a 5500 L mol⁻¹ cm⁻¹ (Enoki *et al.*, 2018), calcula-se a concentração utilizando a seguinte Equação:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

Sendo b o caminho óptico da cubeta e C a concentração do analito.

Os espectros de absorção óptica foram obtidos utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Varian Cary, Santa Clara, CA) no Laboratório de BioMembranas da Universidade de São Paulo e um espectrofotômetro (Cary 5000/Varian) na Central Analítica da Universidade de Brasília. As amostras em temperatura ambiente foram colocadas em uma cubeta de quartzo com dimensões de $0,4 \times 1,0$ cm, sendo o caminho óptico de absorção (b) de 0,4 cm.

3.4 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas de DSC foram obtidos com um microcalorímetro (*Microcal VP DSC, Northampton, MA*) presente no laboratório de BioMembranas da Universidade de São Paulo (USP).

As amostras foram aquecidas de 30 °C a 100 °C a uma taxa de varredura de 20 °C por hora. A célula de amostra (500 μ L) foi preenchida com uma solução de DNA de 250 μ mol L⁻¹ com ou sem a adição da concentração desejada do Hs02. Subtrações de linha de base e integrais de picos foram realizadas usando o software *MicroCal Origin* com o módulo adicional para análise de dados de DSC fornecido pela *MicroCal*.

3.5 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA (FE)

Os espectros fluorescência em estado estacionário foram coletados usando um fluorímetro (*VarianCary, Santa Clara, CA*) disponível no Laboratório de BioMembranas da Universidade de São Paulo e o fluorímetro (*Fluorolog Horiba*) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Os experimentos de fluorescência foram realizados com soluções de 1 ml de Hs02 (10 μ mol L⁻¹) em tampão (HEPES 10 mmol L⁻¹, 50 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7,4) com incremento de solução estoque de DNA ([DNA] \sim 2 mmol L⁻¹).

A leitura de fluorescência estacionária foi conduzida com a luz do feixe de excitação em 295 nm. Os espectros de fluorescência foram corrigidos utilizando o modelo de filtro interno (Mendonça *et al.*, 2013; Lakowicz, 2006), conforme a Equação 2:

$$F_C(\lambda) = F_{obs}(\lambda)10^{A_{exc} \times 0,5} \quad (2)$$

Sendo $F_c(\lambda)$ e $F_{obs}(\lambda)$ respectivamente as intensidades de fluorescência corrigida e observada num dado comprimento de onda. A_{exc} é a absorvância no comprimento de onda de excitação das amostras, 295 nm.

3.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO (FRT)

Medições de fluorescência com resolução temporal (FRT) foram realizadas usando a técnica de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC do inglês *Time-Correlated Single-Photon Counting*). O feixe de luz de excitação provém de um laser de estado sólido modelo *J80 Millenia Pro* titânio-safira, *Tsunami 3950* da *Spectra Physics (Newport Corporation, Irvine, CA, EUA)*.

Os experimentos foram realizados com soluções de 1 ml de Hs02 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão (HEPES 10 mmol L^{-1} , 50 mmol L^{-1} NaCl, 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 7,4) com incremento de solução estoque de DNA ($[\text{DNA}] \sim 2 \text{ mmol L}^{-1}$).

A frequência do seletor de pulsos (modelo 3980-25 da *Spectra Physics*) é de aproximadamente 8 MHz. O equipamento foi regulado para fornecer uma saída de 852 nm e um cristal gerador de terceiro harmônico BBO (GWN-23PL da *Spectra Physics*) foi utilizado para gerar a luz de excitação em 284 nm.

O ajuste dos dados foi realizado com o software *FAST* fornecido pela *Edinburgh Photonics*, utilizando o modelo de decaimentos exponenciais, detalhado na Equação 14 (seção 4.3.4). Atualmente o presente equipamento faz parte do acervo do Laboratório de BioMembranas da Universidade de São Paulo (USP).

4 INTRODUÇÃO ÀS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Neste segmento são apresentadas informações necessárias para a compreensão das leituras instrumentais, bem como das estruturas, dos métodos e dos conceitos para a interpretação dos resultados obtidos.

4.1 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), também conhecida como calorimetria exploratória, é uma técnica utilizada para caracterizar materiais, fornecendo informações sobre eventos térmicos. É comumente usada para determinar a quantidade de calor envolvida em diversas mudanças de fase. Assim, esse instrumento pode ser aplicado em pesquisas sobre mudanças de fase em sistemas biológicos, tais como DNA, membranas e proteínas. No contexto do DNA, a transição de fase ocorre quando a molécula de DNA passa de uma configuração de dupla-fita para duas mono-fitas (Prenner e Chiu, 2011).

O aparelho apresenta basicamente duas células: uma contendo a amostra e outra com o material de referência. Ambas estão em um compartimento fechado para manter a pressão constante durante a medição (Barroso, 2010). O dispositivo utiliza resistências elétricas para variar a potência dentro das células e um termopar para monitorar a diferença de temperatura no sistema (Figura 6).

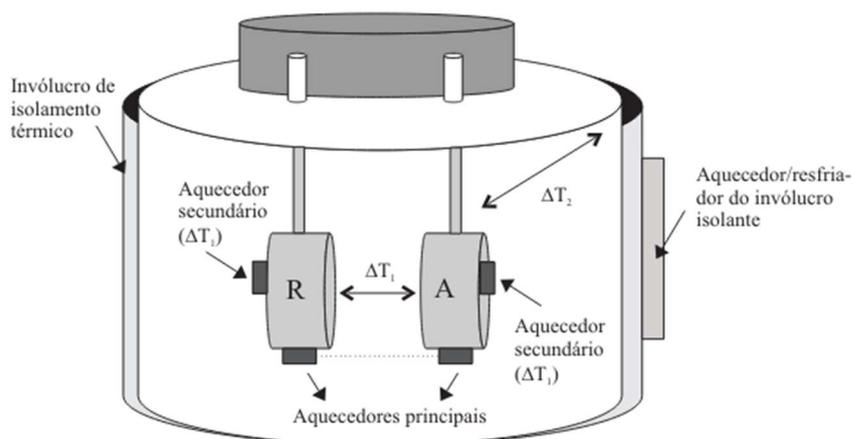


Figura 6 - Ilustração de um calorímetro de DSC com compensação de potência. Os símbolos R e A são respectivamente célula de referência e de amostra. Fonte: Tese Rafael Pianca Barroso, 2010.

Quando ocorre uma mudança de fase, com um aumento de temperatura, a amostra absorve mais calor (Heimburg, 2007). Isso é compensado pelas resistências, gerando um pico de potência que o DSC registra como um sinal positivo.

O pico do termograma (Figura 7) denota a temperatura de transição de fase, representada por T_m (Temperatura de *Melting*). A T_m do DNA depende da força iônica da solução. Soluções de DNA a baixa força iônica ($[\text{NaCl}] \sim 10 \text{ mmol L}^{-1}$) têm $T_m \sim 62 \text{ }^\circ\text{C}$ (Manyanga, 2016), enquanto soluções de DNA a alta força iônica ($[\text{NaCl}] \sim 150 \text{ mmol L}^{-1}$) têm $T_m \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ (Olsen *et al.*, 2016). Esse efeito está relacionado à blindagem das cargas negativas dos fosfatos no esqueleto do DNA, o que resulta numa menor repulsão eletrostática entre as duplas fitas e maior empacotamento.

Para o conteúdo deste trabalho, foi adotada uma solução tampão com força iônica intermediária ($[\text{NaCl}] = 50 \text{ mmol L}^{-1}$). Esta escolha se fundamenta na inviabilidade de utilização de uma solução com alta força iônica, dado que tal procedimento impediria a obtenção completa do termograma de transição de fase, considerando as limitações operacionais do calorímetro empregado, cuja faixa de operação se estende até $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

O termograma obtido por DSC fornece diretamente o calor específico molar da amostra (ΔC_p), exibido no eixo das ordenadas. Outra informação relevante é a largura à meia altura do pico ($\Delta T_{1/2}$), associada à cooperatividade da transição de fase (Riske e Perez, 2013). O dado expressa a amplitude de uma função que reflete o alargamento da curva presente no perfil de termograma.

O termograma abaixo (Figura 7) ilustra a variação do calor específico da amostra em função da temperatura, destacando o calor específico excedente.

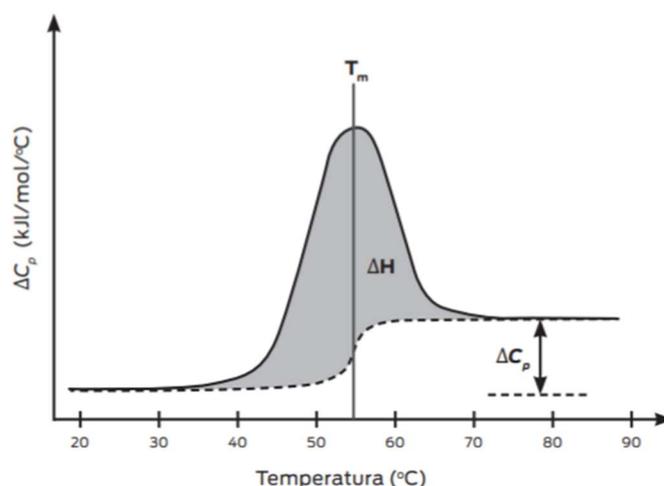


Figura 7 - Termograma típico de uma proteína hipotética. A diferença de C_p é indicada pela seta de ponta dupla. Fonte: Entre sólidos e Líquidos, 2013.

Os parâmetros termodinâmicos envolvidos nessa transição de fase, como a variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS) de transição de fase, também podem ser obtidos a partir do termograma (Castellan, 1995). A variação de entalpia da transição (ΔH) é dada pela área sob o pico, ou seja, através da integral do excesso de calor específico, ΔC_p :

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} \Delta C_p dT \quad (3)$$

Sendo T_0 e T_1 as temperaturas que definem os limites de integração.

A Figura 7 exibe o termograma derivado do estudo DSC de uma proteína fictícia (Riske e Perez, 2013). À medida que a amostra de proteína é submetida a uma taxa constante de aumento de temperatura, registra-se o calor específico da proteína (ΔC_p) em relação à temperatura.

A escolha criteriosa da linha de base visa neutralizar os valores absolutos do calor específico da amostra antes e depois da transição. Dessa maneira, apenas o calor específico excedente decorrente da transição de fase é considerado, oferecendo um resultado mais preciso.

4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A espectroscopia é uma técnica que investiga a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo empregada na análise da estrutura interna de átomos e moléculas biológicas através da análise de espectros de absorção (Skoog *et al.*, 2014).

Em relação aos ácidos nucleicos, todas as bases de purina e pirimidina apresentam um caráter aromático devido à presença de elétrons orbitais π deslocalizados. Um espectro de absorção típico de UV-vis do DNA exibe um pico em absorção característico em torno de 260 nm, referente às nucleobases, e 280 nm devido as proteínas estruturais associadas ao DNA (Da Silva *et al.*, 2013).

O procedimento experimental para obtenção dos espectros de absorção no UV-Vis envolve a exposição da amostra a radiações provenientes de lâmpadas que emitem nos comprimentos de onda do espectro visível e ultravioleta, que neste trabalho foram entre 240 nm e 800 nm. Após a emissão da lâmpada, a radiação passa por um monocromador antes de incidir na amostra e as absorbâncias são registradas em função do comprimento de onda da luz incidente, esquema ilustrado na Figura 8.

Existem diversas lâmpadas, cubetas, detectores e amplificadores no mercado, mas o princípio aplicado permanece o mesmo. Os instrumentos podem ter feixe único (a) ou feixe duplo (b), com a diferença no divisor de feixes que permite a leitura simultânea das células da amostra e da referência (Skoog *et al.*, 2014).

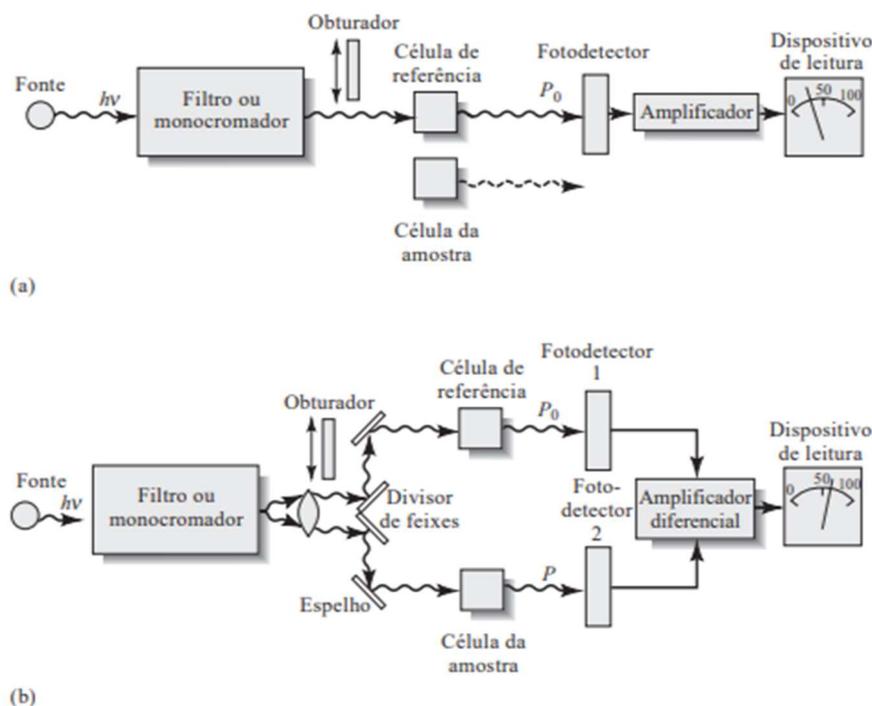


Figura 8 - Ilustração de espectrofotômetros UV-Vis de feixe simples (a) e feixe duplo (b). Fonte: Skoog, 2006.

4.3 FENÔMENO DA FLUORESCÊNCIA

A emissão fluorescente é uma relaxação eletrônica radiativa que mantém a multiplicidade de spins (Valeur, 2002). O diagrama de Jablonski ilustra os processos excitatórios e os relaxamentos de uma molécula fluorescente típica (Figura 9).

No diagrama são representados os estados singleto, níveis energéticos S_0 , S_1 e S_2 , sendo o subíndice respectivo do nível associado: estado fundamental, primeiro e segundo estado eletrônico de excitação. Também são representados os estados tripleto (T_1 e T_2), que dão origem ao fenômeno da fosforescência.

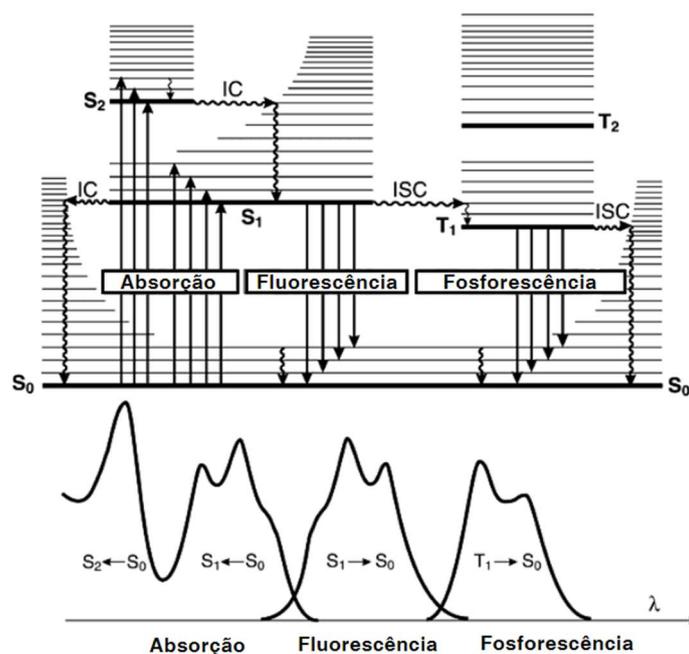


Figura 9 - Representação do Diagrama de Jablonski. Fonte: adaptada de Valeur, 2002.

Os estados são arranjados verticalmente por níveis energéticos. As setas retas representam as transições eletrônicas radiativas, ou seja, que emitem ou absorvem fótons. Ao passo que as setas onduladas mostram as transições eletrônicas provocadas por mecanismos não radiativos, tipicamente associadas a perda de energia ao meio circundante por calor (Valeur, 2002). As linhas horizontais representam os níveis vibracionais associados aos estados eletrônicos e as transições entre os diferentes níveis de energia.

O nível energético fundamental (S_0) corresponde ao nível mais ocupado pelas moléculas em equilíbrio termodinâmico. A absorção de fótons pela nuvem eletrônica promove a partícula para níveis excitados eletrônicos singletos, associados aos níveis vibracionais do fluoróforo – molécula que emite radiação após absorção - como S_1 ou S_2 , por exemplo. A partir de um estado excitado associado a um estado vibracional, a molécula perde energia devido à relaxação vibracional. Esse fenômeno é conhecido como conversão interna (IC) e leva o fluoróforo de um dado estado excitado para o menor estado vibracional de energia do primeiro estado eletrônico excitado (S_1).

Para a maioria dos fluoróforos, a fluorescência é a emissão de fótons do primeiro estado eletrônico excitado (S_1) para algum estado vibracional associado ao estado eletrônico fundamental (S_0). Isso explica por que a forma dos espectros de fluorescência depende muito pouco do comprimento de onda da luz excitatória. (Valeur, 2002).

Dentre os processos demonstrados no Diagrama de Jablonski (Figura 10), temos a absorção de radiação eletromagnética, a conversão interna (*IC*), a fluorescência, a fosforescência e o cruzamento intersistemas (*ISC*).

O cruzamento intersistemas consiste na transição não radiativa isoenergética entre um estado singleto e tripleto. No estado tripleto, a nuvem eletrônica relaxa mais lentamente e emite fótons, processo conhecido como fosforescência. A fosforescência possui baixa probabilidade de ocorrência, podendo acontecer em casos onde existe acoplamento spin-orbital. Cada um dos processos possui um tempo característico, conforme Tabela 3.

Processo	Tempo característico (s)
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 10^0$

Tabela 3 - Tempos característicos dos processos apresentados no diagrama de Jablonski. Fonte: adaptado de Valeur 2002.

O espectro de emissão fluorescente acontece sempre em maiores comprimentos de onda que o espectro de luz excitatória (Raymond, 2006), fenômeno denominado deslocamento de Stokes (Figura 10). Essa ocorrência está relacionada com a conservação energética, visto que parte da energia absorvida pela molécula é perdida por conversão interna (*IC*).

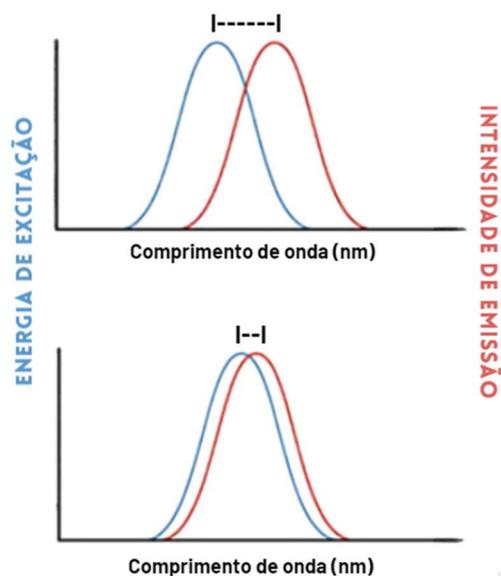


Figura 10 - Espectro de emissão fluorescente típica, destacando o deslocamento de Stokes. Fonte: Raymond, 2006.

Os processos de decaimento são típicos de uma molécula, análogo a uma “impressão digital” da estrutura, e fornecem informações sobre o meio onde ela se encontra. Todo fluoróforo possui característica de decaimento como o tempo de vida (τ) e o rendimento quântico de fluorescência (Φ), esse último é a razão entre o número de fótons absorvidos e o número de fótons emitidos (Lakowicz, 2006).

As taxas de decaimento nas transições singleto, representadas por k^s , são divididas em radiativas (r) que emitem luz e as não radiativas (nr). Outras taxas são listadas abaixo, como a taxa de conversão interna (ic) e a taxa de cruzamento intersistemas (isc):

k_r^s : taxa de emissão de fluorescência

k_{ic}^s : taxa de conversão interna do estado S_1 para S_0

k_{isc} : taxa de cruzamento intersistemas.

Para o decaimento fosforescente de um estado tripleto T_1 para o estado fundamental S_0 a representação é dada por k^T :

k_r^T : decaimento através da emissão de fótons (fosforescência)

k_{nr}^T : cruzamento intersistemas, decaimento não radiativo.

Com intuito de simplificar a análise, neste trabalho os mecanismos relacionados à fosforescência foram desconsiderados devido a seus tempos característicos lentos.

Considere $[A]$ uma espécie de fluoróforo em solução que foi excitada por um pulso de luz extremamente rápido. Depois da absorção dos fótons, e da devida relaxação (conversão interna) até o primeiro estado singleto excitado, a concentração de moléculas no estado excitado S_1 passa a ser representada por $[A^1]$. Por analogia com o decaimento radioativo, tem-se que a taxa de despopulação do estado excitado, ou a taxa de decaimento para o estado fundamental, pode ser descrita pela Equação diferencial a seguir (Lakowicz, 2006):

$$\frac{-d[A^1]}{dt} = (k_r^s + k_{nr}^s) [A^1] \quad (4)$$

A solução da Equação (4) é dada por (Lakowicz, 2006):

$$[A^1] = [A^1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (5)$$

Na solução apresentada, $[A^1]_0$ significa a concentração de moléculas no estado excitado no tempo $t=0$ e τ_s é o tempo de vida do estado excitado S_1 , dado pela razão:

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (6)$$

A intensidade de fluorescência instantânea, i_F , que se segue após a absorção de um pulso muito curto de luz, tem a sua evolução governada por uma equação similiar à mostrada em (5), pois sabe-se que a i_F num certo tempo t é proporcional à população do primeiro estado singleto excitado (S_1) (Valeur, 2002). Através uma análise dimensional, é possível perceber que a constante de proporcionalidade é a própria taxa de decaimento radiativo:

$$i_F(t) = k_r^s [A^1] = k_r^s [A^1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (7)$$

Sendo $i_F(t)$ a intensidade de fluorescência instantânea, a qual diminui seguindo a exponencial acima.

O tempo de decaimento de fluorescência, representado por τ_s , estabelece uma janela temporal na qual a dinâmica do sistema pode ser observada. Em essência, o tempo de vida pode ser concebido como o período durante o qual a molécula permanece no estado excitado, em uma analogia ao fenômeno de decaimento radioativo (Lakowicz, 2006).

Tipicamente, o tempo de vida de uma molécula é considerado independente da frequência da luz de excitação. Devido à rapidez dos mecanismos de conversão interna, especialmente para moléculas em solução, a emissão de luz ocorre do primeiro nível singleto excitado para o estado fundamental, representado pela transição $S_1 \rightarrow S_0$.

O rendimento quântico de fluorescência, representado por Φ_F , é definido como a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. O decaimento total é proporcional ao número de fótons absorvidos, resultando na Equação 8:

$$\phi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = k_r^s \tau_s \quad (8)$$

O rendimento quântico de fluorescência também pode ser interpretado como a fração de moléculas no estado excitado que retornam ao estado fundamental S_0 via emissão de fótons. Portanto a razão entre $i_F(t)$ e $[A^1]_0$ é dado por:

$$\frac{i_F(t)}{[A^1]_0} = k_r^s \exp\left(\frac{-t}{\tau_s}\right) \quad (9)$$

A integração dessa razão durante todo o decaimento fornece o rendimento quântico de fluorescência:

$$\frac{1}{[A^1]_0} \int_0^\infty i_F(t) dt = k_r^s \tau_s = \phi_F \quad (10)$$

4.3.1 RELAXAÇÃO DIPOLAR OU EFEITO DO SOLVENTE

Os efeitos da polaridade do solvente sobre os fluoróforos podem ser bastante significativos. Após a absorção da excitação, o fluoróforo pode ter um momento de dipolo de excitação (μ_E) maior do que o seu momento de dipolo no estado fundamental (μ_G). Sob essa condição, o fluoróforo pode perder energia por reorientação das moléculas de solvente, de acordo com o diagrama de Jablonski modificado (Figura 11).

Ainda no diagrama são representadas as energias de absorção ($h\nu_a$), de emissão radiativa no solvente menos polar ($h\nu_f$) e de emissão radiativa no solvente mais polar ($h\nu'_f$).

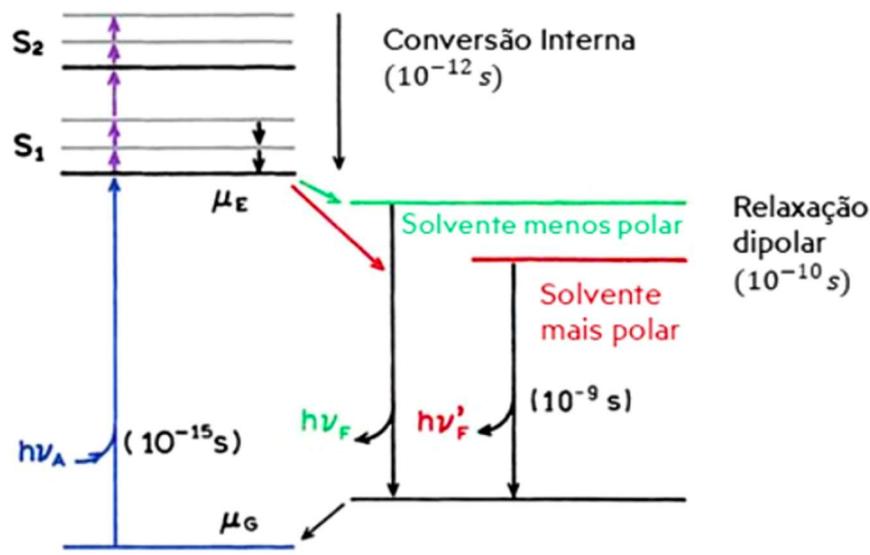


Figura 11: Diagrama de Jablonski modificado, mostrando o efeito de relaxação dipolar para a fluorescência. Adaptada de Lakowicz, 2006.

Assim, quando o espectro de emissão de um fluoróforo depende da polaridade do meio, um incremento na polaridade desse meio tende a deslocar o referido espectro de emissão para maiores comprimentos de onda, resultando em valores de energia menores (Rowe *et al.*, 2008), conforme ilustrado na Figura 12.

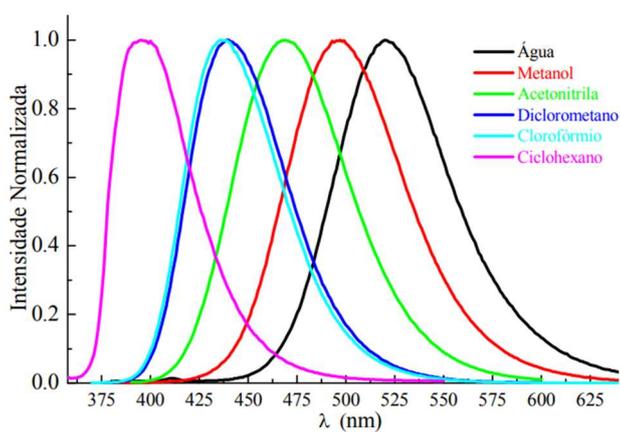


Figura 12: Espectro de fluorescência do fluoróforo Prodan em diferentes solventes. Fonte: Tese, Cíntia Cristina de Vequi Suplicy, 2010.

4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA (FE)

Uma das categorias dentro dos métodos espectrométricos é a espectroscopia de emissão do estado estacionário. Essa técnica efetua a leitura em uma faixa específica de comprimento de onda de emissão, na qual a amostra é irradiada com luz em um comprimento de onda de excitação contínuo (Atkins, 2001).

O espectrofotômetro de fluorescência estacionária (FE) assemelha-se ao espectrofotômetro UV-Vis, composto por uma lâmpada, um monocromador, uma área destinada à amostra e um detector, conforme esquematizado na Figura 13. Todavia, as emissões são registradas em ângulo reto em relação à fonte de excitação (90°), a fim de evitar a interferência direta da fonte no detector (Lakowicz, 2006).

O analito absorve a luz e, em seguida, emite fótons em um comprimento de onda maior do que o da excitação. Esses fótons emitidos são então capturados pelo equipamento, no qual uma fotomultiplicadora converte-os em uma corrente elétrica mensurável. Posteriormente, o equipamento registra a intensidade dos fótons em relação ao seu comprimento de onda, fornecendo assim o espectro de emissão do analito.

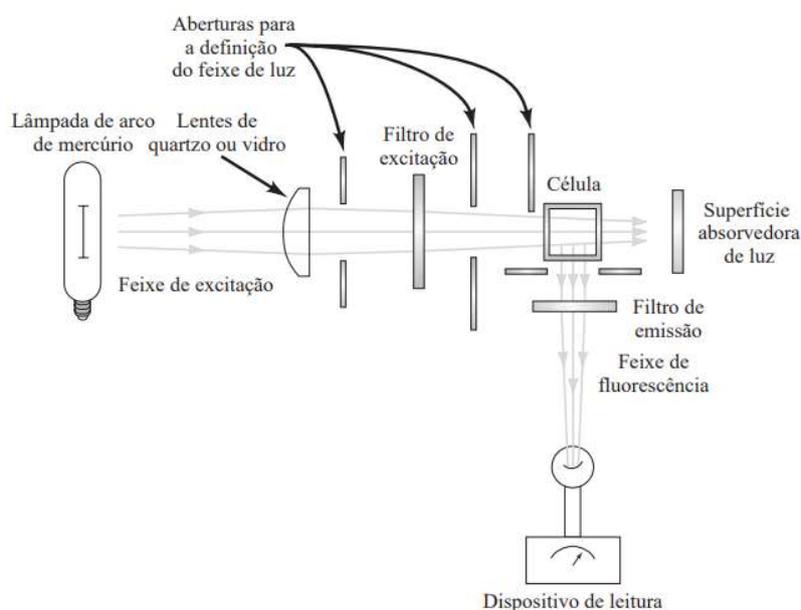


Figura 13: Esquema do espectrômetro de FE, modelo com lâmpada de mercúrio e lentes. Fonte: Skoog, 2006.

4.3.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO (FRT)

Neste estudo, foram empregadas duas abordagens distintas de fluorescência: a realizada em estado estacionário (*FE*) e a resolvida no tempo (*FRT*). As medidas de fluorescência em estado estacionário consistem na aplicação de um feixe de luz de excitação constante, conforme delineado no subitem anterior. Na *FRT*, a amostra é intermitentemente exposta à radiação luminosa e registra-se a intensidade da luz, num dado comprimento de onda, emitida pelo fluoróforo em função do tempo.

A técnica de *FRT* consiste em avaliar os decaimentos de fluorescência, permitindo a determinação do tempo de vida do estado excitado (O'Connor e Phillips, 1984). Essas medições implicam a exposição da amostra a um laser de luz pulsada e o registro da diminuição subsequente na intensidade de emissão ao longo do tempo, particularmente na escala de nanossegundos para a fluorescência e milissegundos para a fosforescência.

As medições de *FE* são, essencialmente, uma média dos fenômenos resolvidos no tempo ao longo do decaimento da intensidade da amostra (Valeur, 2002). Embora mais complexo em termos de instrumentação, as medidas de *FRT* fornecem informações sobre as dinâmicas moleculares importantes que podem ser perdidas ao calcular médias temporais.

A emissão fluorescente é um processo aleatório e poucas moléculas emitem os seus fótons com um tempo exatamente igual a τ . O tempo de vida é o intervalo em que 63% dos fluoróforos demoram para decair (Valeur, 2002). Os processos de decaimentos obedecem a uma exponencial simples, sendo a intensidade de fluorescência dada por:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (11)$$

Sendo I_0 a intensidade em $t = 0$, ou seja, imediatamente após o pulso de excitação. A intensidade é proporcional ao tempo de vida do fluoróforo. Essa relação faz sentido se considerado que o rendimento quântico é proporcional ao tempo de vida.

O rendimento quântico fluorescente (Φ_F) é dado pela razão do número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos, conforme já apresentado na Equação (8). O total de fótons absorvidos é dado pela soma de todos os decaimentos do estado excitado, ou seja, processos radiativos (k_r) e não radiativos (k_{nr}), então:

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (12)$$

Quanto menor a taxa não radiativa, maior o valor do rendimento quântico, de modo que $0 \leq \Phi_F \leq 1$. O rendimento quântico pode ser muito próximo de 1 se $k_{nr} \ll k_r$, mas ele raramente será 1 devido às taxas de relaxação não radiativas (Lakowicz, 2006). O tempo de vida do estado excitado é definido como inverso das taxas de decaimento do estado excitado, dada por:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (13)$$

O tempo de vida do estado excitado pode ser determinado por meio de duas técnicas distintas: modulação de fase ou por meio da Contagem de fóton único por correlação temporal (*TCSPC*, do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*), essa última utilizada neste trabalho.

A técnica de FRT *TCSPC* utiliza uma luz excitatória pulsada, na ordem de mega-hertz (MHz). Quando um pulso é emitido, um sistema aciona um sinal de "*START*", indicando o início da operação. Em seguida, o laser viaja até a amostra, que absorve o pulso de luz e emite fótons (O'Connor e Phillips, 1984). Os fótons emitidos são encaminhados até a fotomultiplicadora, onde um sinal de "*STOP*" é acionado.

O intervalo de tempo entre o "*START*" e o "*STOP*" é registrado em um histograma (Weber, 1966). O conjunto de dados é agrupado em faixas de tempo em nanossegundos (ns) por intensidade de fluorescência, conforme ilustrado na Figura 14.

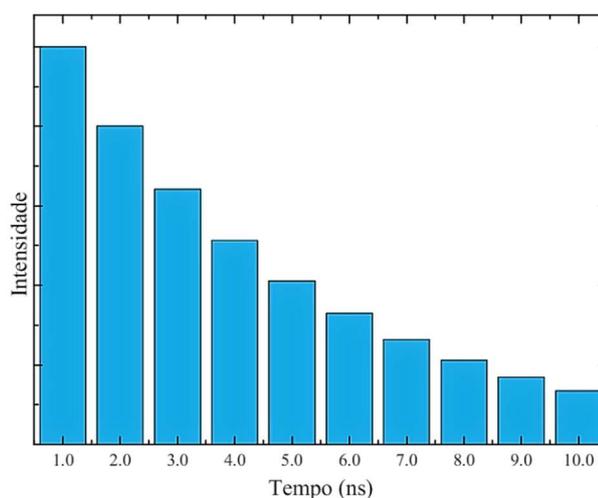


Figura 14: Esquema de decaimento fluorescente medido com a técnica de *TCSPC*. Fonte: Tese Cintia Suplicy, 2010.

No eixo das abscissas, o instante em que a amostra foi excitada pela luz pulsada e resultou na emissão fluorescente é indicado pelo ponto em que o tempo é igual a zero. No eixo das ordenadas, a escala de intensidade representa o número de fótons contados um a um em cada intervalo de tempo. Ao final da leitura, os dados coletados apresentam uma curva de contagens em relação ao tempo (Valeur, 2002). No entanto, devido à escala de tempo envolvida, fica inviável contar e armazenar os dados. Algumas considerações sobre essa técnica são:

- i. Para um dado evento fluorescente, somente um fóton é detectado por vez.
- ii. Para esse fóton, mede-se a diferença temporal entre o momento em que o pulso de excitação chegou à amostra e o momento em que o fóton é emitido por ela.
- iii. No intervalo de tempo correspondente a essa diferença, se adiciona uma contagem no eixo x.

Os três passos mencionados são executados de forma repetida, milhares de vezes, estimulando a amostra em cada etapa do procedimento (Lakowicz, 2006). Considerando que a contagem engloba valores elevados, o eixo y é representado em uma escala logarítmica.

Em virtude da natureza randômica da emissão de fótons após a estimulação, a curva resultante desse procedimento retrata a relação entre a contagem e o tempo de decaimento, como exemplo apresentado no decaimento da fluorescência do peptídeo Hs02 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão na Figura 15.

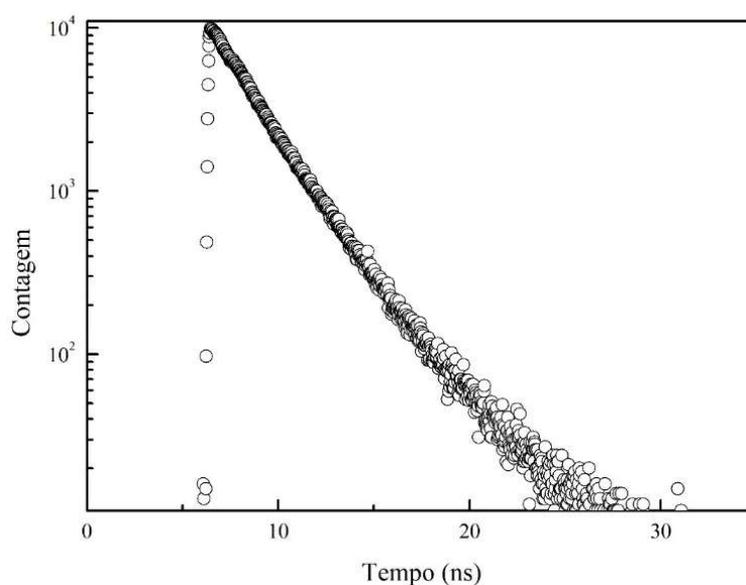


Figura 15 - Decaimento de fluorescência do peptídeo HS02 em tampão (HEPES 10 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 7,4). Comprimento de onda de excitação em 284 nm. Comprimento de onda de emissão em 356 nm.

Após acumular muitos eventos de excitação-deteccção, é gerado um histograma dos fótons detectados e, em seguida, a curva de diminuição da fluorescência (Figuras 16 e 17). Quanto maior o número de eventos, melhor é a precisão da curva de decaimento.

A Figura 16 a seguir mostra um esquemático das etapas do processamento dos sinais na técnica de FRT TCSPC.

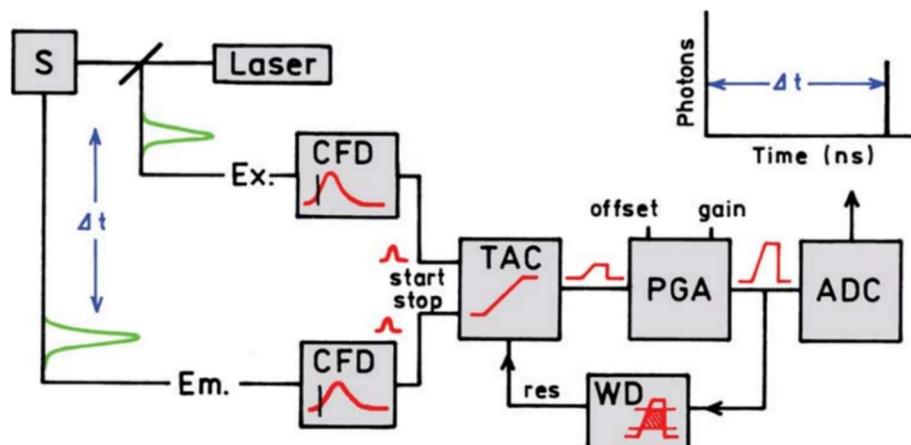


Figura 16 - Esquemático do TCSPC. CFD = constant function discriminator (Analisador de Função Constante); TAC = time-to-amplitude converter (Conversor tempo-amplitude); PGA = programmable gain amplifier (Amplificador de ganho programável); ADC = analog-to-digital converter (Conversor analógico-digital); WD = window discriminator (Discriminador de janela). Fonte: Lakowicz, 2006.

Para a determinação dos tempos de vida a partir do decaimento de fluorescência, é necessário empregar um modelo matemático para ajustar os dados experimentais. Neste estudo, adotou-se o modelo de decaimentos exponenciais:

$$F(t, \lambda) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{\left(\frac{-t}{\tau_i}\right)} \quad (14)$$

Sendo α_i e τ_i os enésimos fatores pré-exponenciais e enésimos tempos de vida, respectivamente. Os ajustes dos dados foram conduzidos utilizando o software disponibilizado pela *Edinburgh Photonics*.

Os valores foram determinados através dos melhores ajustes, resultando em parâmetros estatísticos qui-quadrado (χ^2) situados no intervalo: $0,95 \leq \chi^2 \leq 1,35$. Optou-se por utilizar o menor número possível de exponenciais, em conformidade com o critério estatístico pré-estabelecido. Importante salientar que a *FRT* apresenta uma menor sensibilidade em relação a amostras com alta absorção ou que induzem um espalhamento de luz significativo. (Matos *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico os resultados experimentais obtidos são dispostos, seguidos por discussões sobre as possíveis interpretações. Todos os dados foram tratados utilizando o software *ORIGIN*® versão 7, com licença universitária.

5.1 RESULTADOS DE DSC

Na calorimetria diferencial de varredura (DSC), são monitoradas as transições de fase do DNA, passando de uma dupla fita para duas fitas simples. Outrossim, a transição de fase de macromoléculas, como proteínas e DNA, é extremamente dependente de interação entre os seus monômeros, bem como do pH do meio, força iônica e interações com moléculas exógenas. Assim, a técnica de DSC é apropriada para investigar a interação DNA-peptídeo (Duguid *et al.*, 1996; Manyanga, 2016).

Através da análise dos perfis de DSC, é possível obter dados como: a entalpia de transição de fase (ΔH), que é obtida pela integração do termograma de DSC; a temperatura de transição de fase (T_m), correspondente ao valor máximo de ΔC_p ; e a largura a meia altura da banda ($\Delta T_{1/2}$), que representa a cooperatividade da transição de fase (Heimburg, 2007; Manyanga, 2016).

A Figura 17 exhibe os termogramas de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA na ausência e na presença de diferentes concentrações de Hs02. Em temperaturas abaixo da banda calorimétrica, o DNA está em conformação de dupla fita, enquanto em temperaturas após a banda de fase, o DNA está separado em duas fitas simples, provavelmente devido à perda das ligações de hidrogênio que mantêm os pares de base nitrogenados unidos. A fase mais estável do DNA a uma dada temperatura será aquela que corresponder a um mínimo na energia livre de Gibbs do sistema.

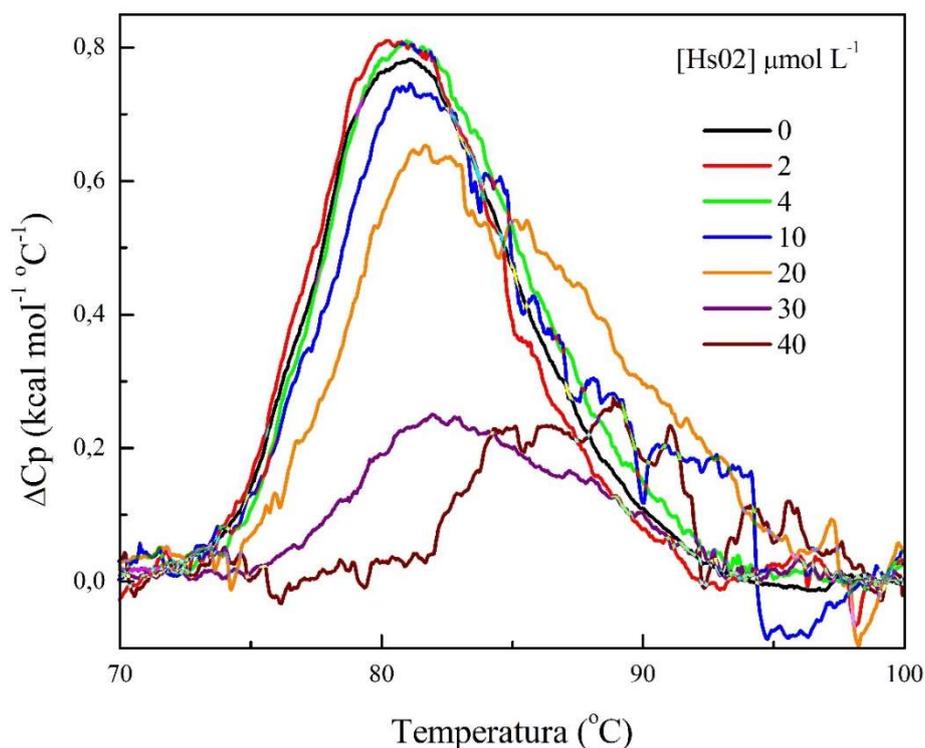


Figura 17 - Termograma de DSC de uma solução de DNA ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão (HEPES 10 mmol L^{-1} , EDTA 1 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , pH 7,4) na ausência e na presença de diferentes concentrações de Hs02.

A Tabela 4 apresenta os dados termodinâmicos obtidos pela análise dos resultados da calorimetria diferencial de varredura, representados na Figura 17.

[Hs02] $\mu\text{mol L}^{-1}$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (kcal mol^{-1})	$\Delta T_{1/2}$ ($^{\circ}\text{C}$)
0	81,1	7,5	8,7
2	80,3	7,5	8,2
4	80,9	7,9	9,0
10	81,1	7,7	8,36
20	81,7	7,7	11,0
30	82,0	2,6	10,3
40	88,9	2,5	8,2

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos obtidos através da análise dos termogramas de DSC (Fig. 18).

A temperatura de transição de fase do DNA, sem adição de Hs02, ocorre em 81,1 °C (Fig. 17). A entalpia de transição de fase neste ponto tem o valor de 7,5 kcal mol⁻¹ e a banda calorimétrica apresenta uma largura a meia altura ($\Delta T_{1/2}$) igual a 8,7 °C (Tabela 4). Importante ressaltar que $\Delta T_{1/2}$ representa a cooperatividade da transição de fase do sistema, sistemas lipídicos podem apresentar $\Delta T_{1/2} \sim 0,1$ °C, enquanto macromoléculas como proteínas e DNAs apresentam tipicamente $\Delta T_{1/2} \sim 10$ °C (Prenner e Chiu 2011).

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação do DNA dependem de diversas condições, como pH, força iônica e características do próprio DNA, como tamanho e tipo (sequências, DNA genômico ou plasmídeo). Por exemplo, soluções de DNA com [NaCl] = 8 mmol L⁻¹ (baixa força iônica) apresentam uma T_m de aproximadamente 70 °C, enquanto soluções de alta força iônica ([NaCl] = 120 mmol L⁻¹) apresentam uma T_m de cerca de 90 °C (Olsen et al. 2016).

As alterações termotrópicas do DNA são dependentes da concentração de Hs02 (Fig. 17). Concentrações de Hs02 ≤ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ induzem pequenas alterações com a T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ quase constantes. A presença de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ induz um pequeno aumento na T_m e um aumento significativo na $\Delta T_{1/2}$. Já concentrações acima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ induzem um significativo aumento na T_m e $\Delta T_{1/2}$ com uma significativa redução na ΔH (Tabela 4). O aumento na T_m pode estar associado à neutralização das cargas negativas dos fosfatos no esqueleto do DNA pela ligação com o peptídeo Hs02. Esse efeito é semelhante ao aumento da força iônica e à subsequente blindagem das cargas dos fosfatos pelos contraíons da solução (Olsen *et al.* 2016). Por fim, solução de DNA na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hs02 não apresentou banda de transição calorimétrica. Devido ao alto nível de ruído nos dados e para otimizar a visualização da Figura 17, o traço de DSC obtido para a solução de DNA com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi desconsiderado neste trabalho.

5.2 RESULTADOS DA FE

O IAP Hs02 apresenta um resíduo de triptofano (W) na segunda posição de sua estrutura primária (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂). Como o triptofano é um aminoácido naturalmente fluorescente, ele foi utilizado neste estudo como sonda intrínseca para investigar a interação entre o Hs02 e o DNA.

A Figura 18 exibe os espectros de emissão do Hs02 em solução tampão, mimetizando o pH fisiológico, na ausência e em diversas concentrações de DNA.

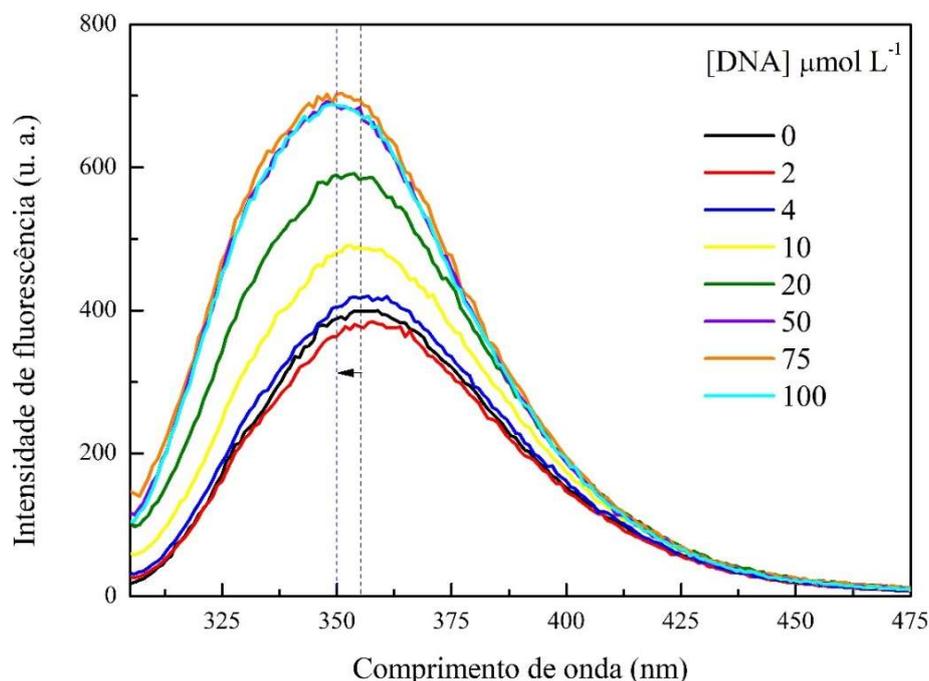


Figura 18 - Espectro de fluorescência do peptídeo Hs02 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução aquosa (10mmol L^{-1} HEPES, 1mmol L^{-1} EDTA, 50mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4) na ausência e na presença de diferentes concentrações de DNA. $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{nm}$ (As linhas tracejadas são somente guias visuais).

O DNA apresenta um perfil de absorção já caracterizado, com uma banda em 260 nm devido a presença de grupos cromóforos localizados nas bases nitrogenadas (Barra, 2015). Dessa forma, ao expor o DNA a concentrações diferentes de um possível agente de ligação, nesse caso o Hs02, são observadas mudanças em seu espectro de absorção.

A fluorescência estacionária fornece informações sobre a nanoregião da sonda fluorescente, no presente caso, o resíduo de W na cadeia peptídica do Hs02. Em solução aquosa, o espectro de emissão do Hs02 tem um máximo em 357 nm (Valeur, 2002). Quando o Hs02 é titulado com DNA, um aumento na intensidade de fluorescência é registrado (Fig. 19), com um pequeno deslocamento para menores comprimentos de onda (Figura 18, seta tracejada). Sob concentração saturante de DNA ($[\text{DNA}] \sim 100 \mu\text{mol L}^{-1}$), observa-se que a intensidade máxima de fluorescência ocorre em 350 nm, um deslocamento de 7 nm em relação à emissão do peptídeo em tampão.

Intrigante observar que se trata de um pequeno deslocamento para o azul, possivelmente indicando que o W continua exposto nas moléculas do solvente e não se adentra muito na dupla hélice. Comparativamente, Vignoli Muniz *et al.* (2020) estudando o peptídeo antimicrobiano K⁰W⁶Hylin, observou, sob condições saturantes de DNA, um deslocamento para o azul de 17 nm, apontando que o W no peptídeo K⁰W⁶Hylin se encontra inserido na dupla hélice, região mais hidrofóbica do DNA.

O aminoácido triptofano (W) é o segundo resíduo presente na sequência primária de Hs02 (⁺K⁺WAVR⁺IIR⁺K⁺FIK⁺GFIS-NH₂), seguindo imediatamente após uma lisina (K) com carga parcial positiva. Uma explicação plausível para o pequeno deslocamento observado é a ideia de que essa ponta positiva do Hs02 está sendo atraída por forças eletrostáticas, que são advindas da carga residual negativa presente no grupamento fosfato (PO₄⁻) do esqueleto do DNA, inviabilizando o resíduo de triptofano (W) de se inserir na região hidrofóbica da dupla hélice de DNA.

As informações obtidas por FE fornecem uma média dos dados (Lakowicz, 2006) sobre a nanoregião do resíduo de triptofano no peptídeo Hs02. Portanto, o restante do peptídeo pode estar intercalado na dupla fita, sendo necessárias outras abordagens experimentais para investigar esse fenômeno. Ademais, a associação com o DNA aumenta o rendimento quântico de fluorescência (Φ) do peptídeo Hs02, indicando uma redução das taxas de decaimento não radiativo (k_{nr}), o que pode estar associado a maior restrição de movimento de um fluoróforo (W) associado a uma macromolécula como o DNA.

5.3 RESULTADOS DA FRT

A fluorescência resolvida no tempo (FRT) permite determinar os tempos de vida do estado excitado (τ) de um fluoróforo. Os tempos de vida de fluorescência são uma “impressão digital” da molécula, sendo dependentes da estrutura do fluoróforo e das interações com a sua vizinhança (Lacowicz, 2006). Esse intervalo de tempo é extremamente sensível, dependendo das interações - intramoleculares e/ou intermoleculares – e dos graus de mobilidade do fluoróforo.

A Figura 19 exhibe o decaimento da fluorescência do peptídeo Hs02 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão com algumas concentrações de DNA. Os valores de concentração de DNA iguais a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram suprimidos do gráfico para melhor observação das cores, mas seguem descritos na Tabela 5.

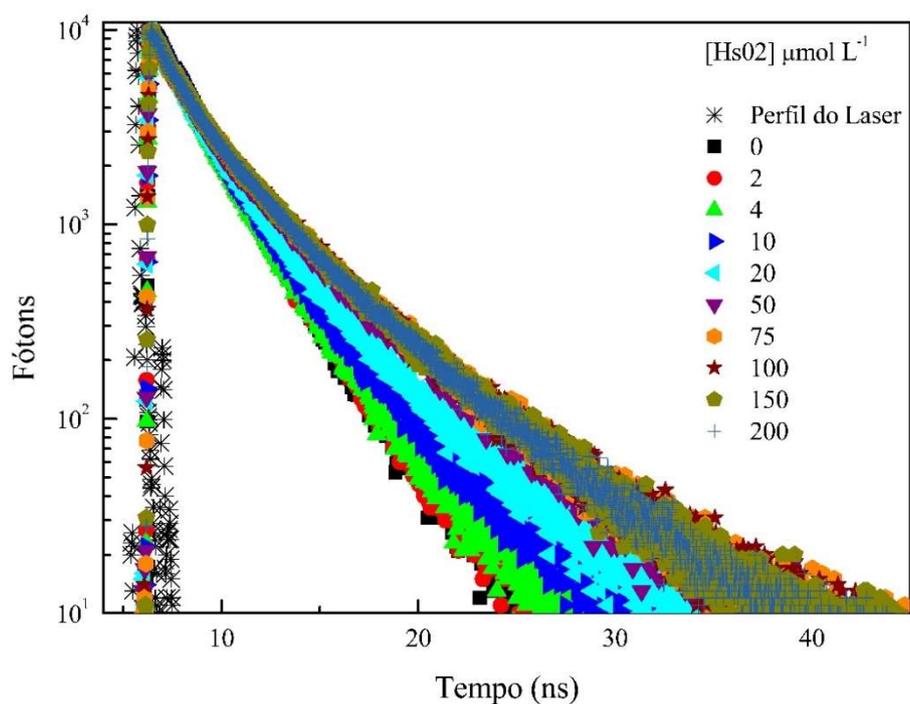


Figura 19 - Decaimento de fluorescência do peptídeo Hs02 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão (10 mmol L^{-1} HEPES, 1 mmol L^{-1} EDTA, 50 mmol L^{-1} NaCl, pH 7,4) na ausência e em presença de crescentes concentrações de DNA. $\lambda_{\text{exc}} = 284 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 356 \text{ nm}$.

O modelo de decaimento biexponencial (Eq. 14) foi empregado para ajustar todos os dados experimentais (Lacowicz, 2006), seguindo o critério estatístico $0,95 \leq \chi^2 \leq 1,35$. Os resultados dos ajustes estão exibidos na Tabela 5, fornecendo dois tempos de vidas: τ_1 (tempo curto de vida), e τ_2 (tempo longo de vida).

[DNA] $\mu\text{mol L}^{-1}$	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	χ^2
0	0,0754	1,443	0,0776	2,800	1,15
2	0,0731	1,329	0,0774	2,833	1,08
4	0,0856	1,534	0,0625	3,052	1,18
10	0,1012	1,711	0,0428	3,699	1,12
20	0,1169	1,809	0,0405	4,341	1,12
50	0,0980	1,698	0,0510	4,808	1,20
75	0,0986	1,771	0,0524	4,946	1,07
100	0,0979	1,780	0,0519	4,936	1,18

Tabela 5 – Resultados dos ajustes não lineares das curvas de decaimento de fluorescência, conforme figura 19.

Conforme o gráfico de decaimento de fluorescência (Fig. 19 e Tabela 5), a associação do peptídeo com DNA induz um aumento nos tempos de vida do resíduo de W presente na sequência primária do Hs02, em consonância com os resultados apresentados no tópico de FE (Fig. 18), correlacionando diretamente o tempo de vida e o rendimento quântico de fluorescência.

Os respectivos crescimentos no tempo de vida e no rendimento quântico de fluorescência podem ter relação com a redução nas taxas de decaimento não-radiativo quando um fluoróforo se associa a uma macromolécula.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO

Visto que as técnicas de fluorescência avaliadas perceberam certa interação entre Hs02 e o DNA, é interessante encontrar uma medida quantitativa que represente a força de tal interação. O valor é útil para comparar moléculas com estruturas diferentes, bem como para indicar os meios de ligação ao DNA.

Para encontrar a constante de associação (K_b), assume-se que a interação entre o peptídeo Hs02 e o DNA seja descrita pela seguinte reação:



No qual também é assumido que todo o Hs02 presente na amostra está associado ao DNA ou disperso em solução. A constante de associação (K_b) dessa interação seria:

$$K_b = \frac{[Hs02_DNA]}{[Hs02] \times [DNA]} \quad (16)$$

Além disso é utilizado o modelo de sítio único de ligação como premissa para determinar a constante de associação (K_b) entre o Hs02 e o DNA (Bisswanger, 2017). Considerando que há conservação da concentração de Hs02, durante a titulação com DNA, encontra-se:

$$\frac{(I - I_0)}{(I_{max} - I_0)} = \frac{K_b[DNA]}{1 + K_b[DNA]} \quad (17)$$

Sendo I_0 , I , e I_{max} as propriedades espectroscópicas do peptídeo, em que: I_0 é a intensidade de fluorescência, em 350 nm, ou o tempo de vida longo do peptídeo na ausência de DNA; I a intensidade de fluorescência, em 350 nm, ou o tempo de vida longo do peptídeo na presença de certa concentração de DNA; e I_{max} é a intensidade de fluorescência, em 350 nm ou o tempo de vida longo em condições saturantes de DNA.

A Figura 20 exibe a variação relativa dos parâmetros espectroscópicos do peptídeo Hs02 em função da concentração de DNA. A curva exibe pontos experimentais das duas técnicas de fluorescência, descritas em intensidade de fluorescência obtida da FE (azul) e tempo de vida longo obtido da FRT (laranja). Utilizando a Eq. 17 e o software *ORIGIN*, curvas foram traçadas com base nos melhores resultados dos ajustes não-lineares.

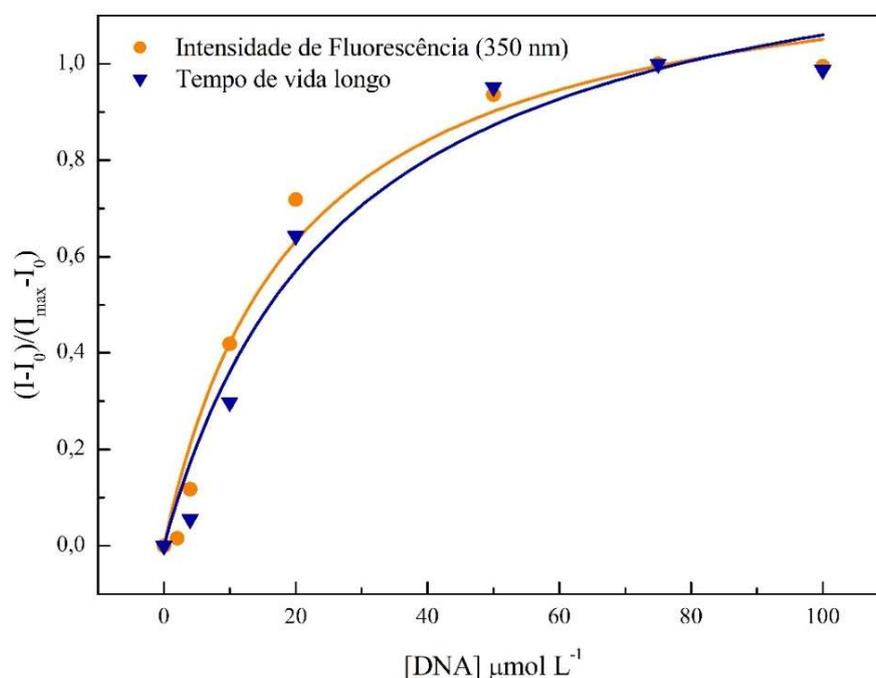


Figura 20 - Variação relativa dos parâmetros espectroscópicos: intensidade de fluorescência em 350 nm (triângulo azul) e tempo de vida longo (círculo laranja) do peptídeo Hs02 em função da concentração de DNA. As linhas contínuas são os ajustes não lineares realizados utilizando a Eq. 17.

Os resultados dos ajustes lineares podem ser visualizados na Tabela 6.

Técnica Experimental	K_b (L mol⁻¹)	χ^2
FE	$(4 \pm 1) \times 10^4$	0,96
FRT	$(5 \pm 1) \times 10^4$	0,97

Tabela 6 – Resultados dos ajustes não lineares dos dados experimentais (Fig. 20) utilizando a Eq. 17.

Ambas as técnicas experimentais revelaram uma considerável afinidade entre o peptídeo e o DNA, com um K_b da ordem de 10^4 L mol⁻¹, ademais, os valores são os mesmos se considerados as barras de incerteza (Tabela 6).

A literatura descreve valores de constante de ligação no intervalo 10^4 a 10^6 L mol⁻¹ como possíveis agentes intercaladores de DNA, enquanto valores entre 10^5 e 10^9 L mol⁻¹ geralmente indicam que os agentes se ligam a um dos sulcos do DNA, sulco menor ou sulco maior (Almeida *et al.*, 2017). Os resultados de FE (Fig. 18) indicam que resíduo de triptofano está ancorado ao esqueleto de DNA, porém não temos informações sobre restante do peptídeo. Julgando pelos valores de K_b , o restante do peptídeo pode estar intercalado na dupla hélice. Além disso, é importante ressaltar que moléculas podem se associar ao DNA por mais de um modo de ligação (Vignoli Muniz *et al.*, 2020). Para maior clareza, a Figura 21 classifica os tipos de interação em seis categorias: atração eletrostática, interação com sulco maior, interação com sulco menor, intercalação entre as fitas, intercalação através dos sulcos e dupla-intercalação.

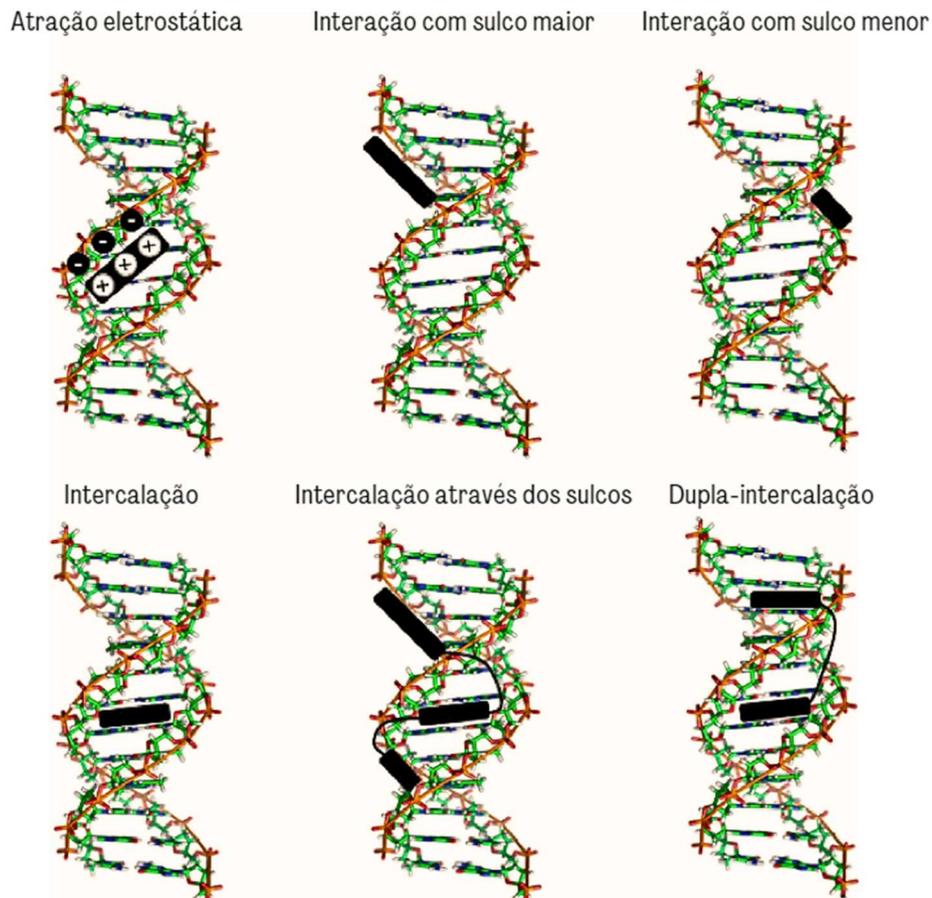


Figura 21 – Seis tipos de interações ligantes-DNA. Fonte: Adaptada do *DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?* 2017.

Portanto, como as constantes de associação encontradas neste trabalho apresentam valores intermediários, são necessários estudos adicionais para determinar com exatidão os modos de associação entre Hs02 e o DNA.

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de interação DNA-Hs02 revelaram descobertas significativas. Os resultados de DSC apontam que o incremento da concentração de Hs02 afeta a transição de fase do DNA, deslocando paulatinamente o pico de transição de fase (T_m) para maiores temperaturas, sugerindo que a associação com o peptídeo hexacatiônico está neutralizando as cargas negativas do grupamento fosfato do esqueleto do DNA. Além disso, em altas concentrações de Hs02 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), a ausência de um pico de transição de fase sugere a desestabilização do DNA e sua possível desnaturação.

Na FE, observa-se um aumento no rendimento quântico de fluorescência do Hs02 pela associação com o DNA. Ademais, sob condições saturantes de DNA, observa-se um pequeno deslocamento do espectro de emissão para menores comprimentos de onda, de 356 nm para 350 nm. Isto indica que o resíduo de triptofano associado ao DNA ainda continua exposto às moléculas de solvente, ainda sujeito à relaxação dipolar. Isto possivelmente decorre da forte atração eletrostática entre as cargas positivas na porção N-terminal, do primeiro resíduo de lisina (K^+) e o grupamento fosfato (PO_4^-) presente no DNA. Isto sugere que Hs02 esteja "ancorado" no esqueleto do DNA, sem a inserção profunda do triptofano (W) na dupla hélice.

O decaimento de fluorescência mostrou um aumento nos tempos de vida do estado excitado do triptofano do Hs02 na presença de DNA, corroborando com os resultados da FE. O aumento nos tempos de vida pode ser devido à redução nas taxas de decaimento não-radiativo quando o Hs02 está associado ao DNA.

Foram determinadas as constantes de associação (K_b): $K_b = (4 \pm 1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ e $K_b = (5 \pm 1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ utilizando alterações espectrais observadas pelas técnicas FE e FRT, respectivamente. Estes valores podem indicar além de uma associação eletrostática, mas também podem indicar que o peptídeo pode se intercalar na dupla fita de DNA. Para determinar com exatidão os modos de ligação do peptídeo Hs02 ao DNA são necessárias outras abordagens experimentais.

As informações obtidas neste trabalho podem ter implicações significativas para a compreensão da ação biológica do Hs02, o seu modo de ação. Outrossim, as informações obtidas podem auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxico, assim como podem ser relevantes para um possível mecanismo de entrega de material genético a células-alvos.

7 REFERÊNCIAS

Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. “*Molecular biology of the cell*”. 5th ed. New York: Garland Science.

Ali, I., Lone, M. N., Alothman, Z. A., Alwarthan, A. 2017. “*Insights into the pharmacology of new heterocycles embedded with oxopyrrolidine rings: DNA binding, molecular docking, and anticancer studies*”. *Journal of Molecular Liquids*, v. 234, p. 391-402. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.03.112>

Almeida, S. M. V., Ribeiro, A. G., de Lima, G. C. S., Ferreira, J. E. A., Beltrão E. I. C., de Oliveira, J. F., de Carvalho, L. B. J., Alves, M. D. C. L. 2017. “*DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?*”. *Biomed Pharmacother*, 96:1538-1556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.054>.

Akram F., Imtiaz M., Haq I. U. 2023. “*Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century*”. *Microb. Pathog.* 174, 105923. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105923>.

Amblard, M, Fehrentz, A., Matrinez, J.Subra, G., 2006. “*Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis*”. *Revista Molecular Biotechnology* (7): 239–254. <https://doi.org/10.1385/mb:33:3:239>.

Atkins, P., Jones, L. 2001. “*Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*”. Ed. Bookman.

Barra, C. V., Netto, A.V. G. 2015. “*Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores*”. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 1998-201. <https://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>.

Barroso, R. P. 2010. “*Dispersões lipídicas de dimiristoil fosfatidilglicerol: um estudo termo-estrutural*”. Tese de Doutorado pela Universidade de São Paulo - SP.

Benfield, A. H., Henriques, S. T. 2020. “*Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms*”. *Front Med Technol.* Dec 11; 2:610997. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.610997>.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L., 2002. “*Secondary structure: Polypeptide chains can fold into regular structures such as the alpha helix, the beta sheet, and turns and loops*”. *Biochemistry* (5th ed., section 3.3). New York, NY: W. H. Freeman.

Berg J.S., Powell B.C., Cheney R.E. 2001. “*A millennial myosin census*”. *Mol. Biol. Cell*: 780–794. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.780>.

Bessa, L.J.; Manickchand, J.R.; Eaton, P.; Leite, J.R.S.A.; Brand, G.D.; Gameiro, P. 2019. “*Intragenic Antimicrobial Peptide Hs02 Hampers the Proliferation of Single- and Dual-Species Biofilms of P. aeruginosa and S. aureus: A Promising Agent for Mitigation of Biofilm-Associated Infections*”. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3604. <https://doi.org/10.3390/ijms20143604>.

Bisswanger, H. 2017. “*Enzyme Kinetics: Principles and Methods*”. Third, Enlarged and Improved edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V. 2015. “*Molecular mechanisms of antibiotic resistance*”. *Nat Rev Microbiol.* 13 (1): 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

Boparai, J. K., Sharma, P; K. 2019. “*Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications*”. *Protein & Peptide Letters;* 27:4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>.

Brand, G. D. 2007. “Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos”. Tese de Doutorado pela Universidade de Brasília, Brasília/DF.

Brand, G. D., Magalhães, M. T. Q., Tinoco, M. L. P., Aragão, F. J. L. Nicoli, J., Kelly, S. M., Cooper, A., Bloch, C. 2012. “*Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides*”. *PLoS One*, 7 (9), e45848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045848>.

Brand, G. D., Ramada, M. H. S., Manickchand, J. R., Correa, R., Ribeiro, D. J. S., Santos, M. A., Vasconcelos, A. G. 2019. “*Intragenic Antimicrobial Peptides (IAPs) from Human Proteins with Potent Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity*”. *PLOS ONE* 14 (8): e0220656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>.

Brogden, Kim A. 2005. “*Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?*” *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

Barroso, R. P. 2010. “Dispersões lipídicas de dimiristoil fosfatidilglicerol: um estudo termo-estrutural”. Tese de Doutorado pela Universidade de São Paulo - SP.

Bulaklak, K., Charles, A. G. 2020. “*The Once and Future Gene Therapy*”. *Nature Communications* 11 (1): 5820. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19505-2>.

Castellan, G. 1995. “Fundamentos de Físico-Química”. 1ª Edição. Rio de Janeiro, LTC.

Champ, P. C., Harvey, R. A. 2006. “Bioquímica Ilustrada”, 3ª edição, capítulo 2. Editora: Artmed, Porto Alegre/RS.

Chan, W.; White, P. 1999. “*Solid phase peptide synthesis: a practical approach*”. Editora Oxford University.

Da Silva, J. G., Despaigne, A. A. R., Louro, S. R. W., Bandeira, C. C., Fagundes, E. M. S., Beraldo, H. 2013. “*Cytotoxic Activity, Albumin and DNA Binding of New Copper (II) Complexes with Chalcone-Derived Thiosemicarbazones*”. *European Journal of Medicinal Chemistry* 65 (7):415–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.036>.

Da Silva, E. F. T.; Barbosa, M. A. P.; Marinho, T. A. F.; Lima, G. C.; Dos Santos, W. L.; Espíndola, M. T. A.; Soares, L. B. F. Gomes, J. E. G.; Moreira, K. A. 2023. “*Ten years of research on bioactive peptides in Brazil: a scientometric analysis*”. Revista Food Science and Technology, Campinas/SP. <https://fstjournal.com.br/revista/article/view/68>.

Datta, S., Roy, A. 2021. “*Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review*”. Int. J. Pept. Res. Ther 27, 555–577. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10110-x>.

De Freitas, A. C. P. 2021. “*Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos por extração em disco rotatório, espectrofluorimetria e calibração de ordem superior*”. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal da Paraíba - PB.

Dos Santos, M. A. 2022. “*Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas*”. Tese de Doutorado pela Universidade de Brasília, Brasília - DF.

Duguid, J. G., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., Thomas G. J. 1996. “*DNA Melting Investigated by Differential Scanning Calorimetry and Raman Spectroscopy*”. Biophysical Journal 71 (6) : 3350–60. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79528-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79528-0).

Enoki, T. A., Silva, I. M., Lorenzon, Cilli, E. M., Perez, K. R., Riske, K. A., Lamy, M. T. 2018. “*Antimicrobial Peptide K⁰-W⁶-Hyal Induces Stable Structurally Modified Lipid Domains in Anionic Membranes*”. Langmuir 34 (5): 2014–25. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03408>.

Fox, J. L. 2013. “*Antimicrobial peptides stage a comeback*”. Revista Nature Biotechnology, v. 31, n. 5, (12) p. 379–382. <https://doi.org/10.1038/nbt.2572>.

Gill, P.; Moghadam, T. T.; Ranjbar, B. 2010. “*Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience*”. Revista Biomolecular Techniques, Irã, v. 21, (12) 167–193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2977967/>.

Green, R. E., Krause J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M. H., Hansen, N. F., Durand, E. Y., Malaspinas, A. S., Jensen, J. D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H. A., Good, J. M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E. S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Ž., Gušić, I., Doronichev, V. B., Golovanova, L. V., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R. W., Johnson, P. L. F., Eichler, E. E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J. C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso, J., Lachmann, M., Reich, D., Pääbo, S. 2010. “*A Draft Sequence of the Neandertal Genome*”. Science. 328(5979):710-722. <https://doi.org/10.1126/science.1188021>.

Heimburg, T. 2007. “*Thermal biophysics of membranes*”. Tutorials in biophysics. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Hollmann, A., Martinez, M., Maturana, P., Semorile, L. C., and Maffia, P. C. 2018. “*Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics*”. Front. Chem. 6, 204. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00204>.

Hutchings, M. I., Truman, A. W., and Wilkinson, B. 2019. “Antibiotics: Past, present and future”. *Curr. Opin. Microbiol.* 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

Junior, J. V. 2008. “Estudo da fluorescência de ácidos hidróxi-naftóicos”. Trabalho de Conclusão de Curso pela Universidade Federal de Santa Catarina - SC.

Kang, S. J.; Park, S. J.; Mishig-Ochir, T.; Lee, B. J. 2014. “Antimicrobial Peptides: Therapeutic Potentials”. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12 (12), 1477–1486. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.976613>.

Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., Li, H., Xu, H., Lao, X., Zheng, H. 2019. “DRAMP 2.0, an Updated Data Repository of Antimicrobial Peptides”. *Sci Data.* 13;6(1):148. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0154-y>.

Lade, H., and Kim, J.-S. 2021. “Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *Antibiotics* 10, 398. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040398>.

Lakowicz, Joseph R. 2006. “Principles of Fluorescence Spectroscopy”. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.

Lanerolle P., Serebryanny L. 2011. “Nuclear actin and myosins: Life without filaments”. *Nat. Cell Biol.* 1282–1288. <https://doi.org/10.1038/ncb2364>.

Lima, M. M. 2021. “Síntese e estudo de novos compostos luminescentes contendo complexos de rênio com ligantes nitrogenados”. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal de Minas Gerais - MG.

Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., and Gagnon, M. G. 2018. “Ribosome-targeting antibiotics: Modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design”. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 451–478. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011942.

Luong, H. X., Ngan, H. D., Thi Phuong, H. B., Quoc, T. N., Tung, T. T. 2022. “Multiple roles of ribosomal antimicrobial peptides in tackling global antimicrobial resistance”. *R Soc Open Sci.* 26;9(1):211583. <https://doi.org/10.1098/rsos.211583>.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., Fonseca, G. F. 2016. “Microbiologia de Brock”. 14^a ed. Porto Alegre/RS: Artmed.

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C. 2016. “Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents”. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.

Manyanga, F. 2016. “Use of Differential Scanning Calorimetry (DSC) to Study the Thermodynamics of DNA-Based Interactions and Nucleic Acid-Based Therapeutics”. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* 2 (2). <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.02.00013>.

Mariano, G. H.; Sá, L. G. G. de; Carmo, E. M.; Santos, M. A.; Fh, J. L. C.; Lira, B. O. V.; Barbosa, E. A.; Almeida, P. F.; Santos, N. A.; Vasconcelos, A. G.; Oliveira, A. L.; Bloch, C.; Ramada, M. H. S.; Brand, G. D. 2020. “Characterization of novel human intragenic antimicrobial peptides, incorporation and release studies from ureasil-polyether hybrid matrix”. *Revista Materials Science and Engineering: C.* <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111581>.

Marmur, J. 1961. “*A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms*”. *Journal of Molecular Biology* 3 (2): 208-IN1. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8).

Matos, P. M., Franquelim, H. G., Castanho, M. A. R. B., Santos, N. C. 2010. “*Quantitative Assessment of Peptide–Lipid Interactions*.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798 (11): 1999–2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.012>.

Mendonça, A., Rocha, A. C., Duarte, A. C., Santos, E. B. H. 2013. “*The Inner Filter Effects and Their Correction in Fluorescence Spectra of Salt Marsh Humic Matter*”. *Analytica Chimica Acta* 788 (7): 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.051>.

Nelson, David L., e Michael M. Cox. 2011. “*Princípios de Bioquímica de Lehninger*”. 5ª ed. Porto Alegre/RS: Sarvier-Artmed.

Nunes, J. B. 2023. “*Desenho racional de peptídeos análogos ao Hs02 com ampliação de seletividade como agentes antimicrobianos*”. Dissertação de Mestrado pela Universidade de Brasília – DF.

O'Connor Von D. V., Phillips, D. 1984. “*Time-Correlated Single Photon Counting*”. Academic Press, London - New York.

Olsen, C. M., Shikiya, R., Ganugula, R., Reiling-Steffensmeier, C., Khutsishvili I., Johnson, S. E., Marky, L. A. 2016. “*Application of Differential Scanning Calorimetry to Measure the Differential Binding of Ions, Water and Protons in the Unfolding of DNA Molecules*”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860 (5): 990–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.002>.

Palchadhuri, R., Hergenrother, P. J. 2007. “*DNA as a Target for Anticancer Compounds: Methods to Determine the Mode of Binding and the Mechanism of Action*”. *Current Opinion in Biotechnology* 18 (6): 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.09.006>.

Pires, P. V. B. C. 2018. “*Deleções seletivas para a determinação do tamanho mínimo do peptídeo Hs02 com manutenção de atividade antimicrobiana*”. Trabalho de Conclusão de Curso pela Universidade de Brasília - DF.

Pirtskhalava, M., Vishnepolsky, B., Grigolava, M., and Managadze, G. 2021. “*Physicochemical features and peculiarities of interaction of AMP with the membrane*”. *Pharmaceuticals* 14, 471. <https://doi.org/10.3390/ph1405047>.

Pray, L. A. 2008. “*Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick*”. *Nature Education* 1(1):100.

Prenner, E. J., Chiu, M. H. 2011. “*Differential Scanning Calorimetry: An Invaluable Tool for a Detailed Thermodynamic Characterization of Macromolecules and Their Interactions*”. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 3 (1): 39. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76463>.

Raymond, A. S., Jewett, J. W. 2006. “*Principles of physics*” 4th Ed. Cengage Learning. p. 404, 440.

Reinhold, W. C., Thomas, A., Pommier, Y. 2017. “DNA-Targeted Precision Medicine; Have We Been Caught Sleeping?” Trends in Cancer 3 (1): 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.002>.

Reygaert, W. C. 2018. “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria”. Revista AIMS Microbiology, EUA, v. 4, n. 3, (10) p. 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.

Riske, K. A., Perez, K. R. 2014. “Entre Sólidos e Líquidos”. Capítulo XI, Calorimetria aplicada a membranas e proteínas. 1ª ed. São Paulo/SP: Livraria da Física.

Rowe, B. A., Roach, C. A., Lin J., Asiago V., Dmitrenko O., Neal, S. L. 2008. “Spectral heterogeneity of PRODAN fluorescence in isotropic solvents revealed by multivariate photokinetic analysis”. J Phys Chem A. (12);112(51):13402-12. <https://doi.org/10.1021/jp802260y>.

Sales, A. B. 2017. “Estudo das propriedades termodinâmicas do DNA via coeficientes de Wavelets”. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal de Ouro Preto - MG.

Santos, N. C., Prieto, M., Castanho, M. A. R. B., 2003. “Quantifying Molecular Partition into Model Systems of Biomembranes: An Emphasis on Optical Spectroscopic Methods”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1612 (2): 123–35. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00112-3).

Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C., and Haldar, J. 2017. “A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics”. Med. Chem. Commun. 8, 516–533. doi:10.1039/c6md00585c.

Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. 2013. “Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry”. J. Photochem Photobiol B.5; 124:1-19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>.

Skoog, D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch, S. R. . 2014. “Fundamentos de Química Analítica”. 9ª ed. São Paulo: Cengage Learning.

Stokes, J. M., Lopatkin, A. J., Lobritz, M. A., and Collins, J. J. 2019. “Bacterial metabolism and antibiotic efficacy”. Cell metab. 30, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>.

Sturtevant, J. M. 1987. “Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry”. Ann. Rev. Review of Physical Chemistry, 38: 463-488. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.38.100187.002335>.

Suplicy, Cíntia Cristina de Vequi. 2010. “Estudos experimentais e teóricos dos espectros eletrônicos das sondas fluorescentes Prodan e Laurdan em solventes e bicamadas lipídicas”. Tese de Doutorado pela Universidade de São Paulo - SP.

Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A. 2000. “Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides”. Biopolymers, 55 (1), 4–30. <https://doi.org/10.1002/1097>.

Talapko J., Meštrović T., Juzbašić M., Tomas M., Erić S., Horvat Aleksijević L., Bekić S., Schwarz D., Matic S., Neuberger M., Škrlec I. 2022. “Antimicrobial Peptides-Mechanisms of Action, Antimicrobial

Effects and Clinical Applications". Antibiotics (Basel). Oct 16;11(10):1417. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101417>.

Valeur, B. 2002. "*Molecular Fluorescence: Principles and Applications*". Weinheim; New York: Wiley-VCH.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. 2008. "Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular". 2ª ed. Porto Alegre/RS: Artmed.

Wan, F., Lenardo, M.J. 2009. "*Specification of DNA Binding Activity of NF- κ B Proteins*". Journal Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,1(4): a000067. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000067>.

Wang, Q., Zhang, Y., Yao, X., Xian, H., Liu, Y., Li, H., 2016. "*Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infections*". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 35, 1679–1689. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2710-0>.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2015. "Biologia Molecular do Gene". 7ª ed. Porto Alegre: Artmed.

Weber, G. 1966. "*Polarization of the fluorescence of solutions*". Ed. D. M. Hercules. Fluorescence and Phosphorescence Analysis. New York: John Wiley & Sons.

Wolfe, A., Shimer, G. H. Jr., Meehan, T. 1987. "*Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA*". Biochemistry. 6; 26 (20): 6392-6. <https://doi.org/10.1021/bi00394a013>.

World Health Organization (2017). "*WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*". Geneva. <https://www.who.int/news>.

Yan, J., Wang, K., Dang, W., Chen, R., Xie, J., Zhang, B., Song, J., Wang, R. 2013. "*Two Hits Are Better than One: Membrane-Active and DNA Binding-Related Double-Action Mechanism of NK-18, a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin*". Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57 (1): 220–28. <https://doi.org/10.1128/AAC.01619-12>.

Yang, S. 2023. "*Isolation, structural characterization and synthesis of cyclic peptides from the Australian tree, Albizia lebbekoides (Benth)*". Dissertação de Mestrado pela Universidade de Brandeis, Austrália. <https://www.researchgate.net/publication/352486738>.

Zhu, X.; Dong, N.; Wang, Z.; Ma, Z.; Zhang, L.; Ma, Q.; Shan, A. 2014. "*Design of Imperfectly Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Cell Selectivity*". Acta Biomater, 10 (1), 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.043>.