



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Química Tecnológica

GUILBER LUIZ ARAUJO

**ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO
HS02 E SEU ANÁLOGO 13.2 COM MODELOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS
POR RESSONÂNCIA DE MARCADORES PARAMAGNÉTICOS**

Brasília
2024

Guilber Luiz Araujo

**ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO
HS02 E SEU ANÁLOGO 13.2 COM MODELOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS
POR RESSONÂNCIA DE MARCADORES PARAMAGNÉTICOS**

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(a): Prof. Dr. Gabriel Silva Vignoli
Muniz

Coorientador(a): Prof. Dr. Evandro Luiz
Duarte

Brasília

2024

CIP - Catalogação na Publicação

AAR663e Araujo, Guilber Luiz.
ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO
HS02 E SEU ANÁLOGO 13.2 COM MODELOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS
POR RESSONÂNCIA DE MARCADORES PARAMAGNÉTICOS / Guilber Luiz
Araujo; orientador Gabriel Vignoli Muniz; co-orientador
Evandro Luiz Duarte. -- Brasília, 2024.
48 p.

Monografia (Graduação - Química Tecnológica) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Membranas modelo. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3.
Ressonância Paramagnética Eletrônica.. I. Vignoli Muniz,
Gabriel, orient. II. Duarte, Evandro Luiz, co-orient. III.
Titulo.

Guilber Luiz Araujo

**ESTUDO COMPARATIVO DAS INTERAÇÕES DO PEPTÍDEO INTRAGÊNICO
HS02 E SEU ANÁLOGO 13.2 COM MODELOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS
POR RESSONÂNCIA DE MARCADORES PARAMAGNÉTICOS**

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.

Data da aprovação: 19/09/2024

Nome completo — Prof. Dr. Gabriel Silva Vignoli Muniz
Mestre/Doutor em XXXXXXXXXXXXX
Professor(a) da Faculdade/Instituto/Departamento (UnB)

Nome completo — Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Mestre/Doutor em XXXXXXXXXXXXX
Professor(a) da Faculdade/Instituto/Departamento (UnB)

Nome completo — Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno
Mestre/Doutor em XXXXXXXXXXXXX
Professor(a) da Faculdade/Instituto/Departamento (UnB)

*Dedico este trabalho ao meus pais, Regiane
e Osvaldo.*

RESUMO

Peptídeos intragênicos (IAPs), formados por fragmentos de proteínas, apresentam propriedades anti-inflamatórias e antibióticas. Para estudar suas interações com membranas biológicas, foram utilizadas vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DPPC para mimetizar membranas de mamíferos saudáveis, e uma mistura de DPPC e POPS para representar membranas tumorais. A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) foi utilizada para caracterizar termoestruturalmente esses modelos de membranas e monitorar as alterações induzidas pelos peptídeos Hs02 e 13.2. O peptídeo 13.2 mostrou uma interação modesta, afetando principalmente a região central da bicamada DPPC na fase gel e aumentando a fluidez da membrana POPS na fase fluida. Essas observações sugerem uma afinidade limitada por membranas lipídicas, com interações em regiões específicas e sob condições particulares. Já o peptídeo Hs02 demonstrou uma interação modulada pela fase lipídica e composição da membrana, influenciando tanto o empacotamento quanto a fluidez em diferentes regiões, sugerindo um potencial de interação seletiva com membranas biológicas e impacto nas suas propriedades físico-químicas.

Palavras-chave: Membranas modelo; Peptídeos antimicrobianos; Ressonância Paramagnética Eletrônica.

ABSTRACT

Intragenic peptides (IAPs), formed from protein fragments, exhibit anti-inflammatory and antibiotic properties. To study their interactions with biological membranes, large unilamellar vesicles (LUVs) composed of DPPC were used to mimic healthy mammalian membranes, and a mixture of DPPC and POPS was used to represent tumor membranes. The technique of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) was employed to thermostructurally characterize these membrane models and monitor the structural changes induced by peptides Hs02 and 13.2. Peptide 13.2 showed modest interaction, primarily affecting the central region of the DPPC bilayer in the gel phase and increasing the fluidity of the POPS membrane in the fluid phase. These observations suggest a limited affinity for lipid membranes, with interactions occurring in specific regions under particular conditions. In contrast, peptide Hs02 exhibited interaction modulated by lipid phase and membrane composition, influencing both the packing and fluidity in different regions of the bilayer. This behavior suggests a potential for selective interaction with biological membranes, impacting their physicochemical properties.

Keywords: Model membranes; Antimicrobial peptides; Electron Paramagnetic Resonance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Resistencia Antimicrobiana	9
1.2	Peptídeos antimicrobianos	9
1.2.1	Peptídeo Hs02.	12
1.2.2	Peptídeo 13.2	13
1.3	Estudo com membranas modelo	14
1.3.1	Modelo de membrana cancerosa	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.	21
3.1	Reagentes	21
3.2	Preparações das dispersões lipídicas	22
3.3	Processo de extrusão das dispersões lipídicas	22
3.4	Síntese dos Peptídeos	23
3.5	Concentração dos peptídeos	23
3.6	Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	24
3.6.1	Introdução Instrumental	24
3.6.2	Análise dos espectros de EPR	26
4	RESULTADOS	28
4.1	. FASE GEL	30
4.2	. FASE FLUIDA	36
5	CONCLUSÃO	43
6	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistencia Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno pelo qual microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, adquirem a capacidade de resistir aos efeitos de medicamentos que antes eram eficazes no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. Uma estimativa crítica realizada pela OMS avalia que até 2050, cerca de 10 milhões de mortes serão causadas por infecções causadas por RAM (ALEKSHUN; LEVY, 2007). A RAM representa um dos mais graves desafios de saúde pública global atualmente. O uso excessivo e, em muitos casos, inadequado de antibióticos, aliado à interrupção prematura dos tratamentos, permite que os microrganismos sobrevivam, adquiram resistência e continuem a se proliferar, agravando o problema.

Por exemplo, durante a pandemia de COVID-19, a RAM aumentou devido ao uso excessivo de antibióticos. A doença é causada pelo coronavírus, SARS-CoV-2, um vírus com RNA identificado pela primeira vez no final de 2019, após um surto de pneumonia na China (WANG et al., 2020). Devido a esse quadro clínico específico, os médicos muitas vezes prescrevem antibióticos para tratar a infecção, mesmo que não confirmem uma infecção bacteriana, porque os sintomas são semelhantes aos da pneumonia bacteriana (CORRÊA et al., 2022).

1.2 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos são moléculas formadas por cadeias de aminoácidos, com o seu tamanho variando tipicamente entre de dois a setenta aminoácidos. Cada peptídeo possui uma sequência específica que determina suas características. A estrutura primária descreve a ordem dos aminoácidos na cadeia, enquanto a estrutura secundária refere-se à organização espacial dessas cadeias, incluindo as estruturas mais comuns, como α -hélices e β -folhas (BAHAR; REN, 2013).

Entre as várias categorias de peptídeos, destacam-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs). AMPs são geralmente carregados positivamente quando em pH fisiológico e são produzidos por uma ampla gama de organismos (KANG et al., 2014). Eles atuam como mecanismos de defesa de eucariotos superior e

sua versatilidade tem sido destacada para uso em terapias combinadas com outros antibióticos, proporcionando um tratamento mais eficiente (ZHU et al., 2014).

Os peptídeos podem ter diversas aplicações interessantes, como o uso mencionado anteriormente como agentes terapêuticos, além de atuarem como vetores para a entrega de fármacos e material genético em células vivas (HORVÁTI et al., 2017). Desta forma, podem desempenhar papéis importantes em diversos processos celulares. Um peptídeo que combine alta capacidade de penetração intracelular com atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade em células humanas pode potencializar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (HORVÁTI et al., 2017).

Os AMPs, apesar de sua grande diversidade, compartilham algumas características comuns: apresentam uma alta concentração de resíduos hidrofóbicos e cargas positivas em pH fisiológico, o que lhes confere propriedades anfífilas e catiônicas.(OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016). Na literatura já foi descrito diversas atividades para diferentes AMPs, como ações antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, antiparasitárias, entre outras (HUAN et al., 2020). No entanto, a maioria dos AMPs são conhecidos por sua capacidade bactericida, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BECHINGER; ZASLOFF; OPELLA, 1993; HUAN et al., 2020).

Os AMPs desempenham um papel crucial na defesa de diversos organismos. Devido à sua natureza anfífila e catiônica, propõe-se que os AMPs atuem preferencialmente sobre lipídios ácidos presentes na monocamada externa de membranas procarióticas e de células tumorais (ZHANG; GALLO, 2016). Durante essa interação, as cadeias laterais dos AMPs se organizam em regiões distintas dentro da estrutura enovelada, geralmente formando estruturas como hélices α e folhas β . Estas estruturas se inserem na membrana plasmática dos alvos, o que pode levar à sua ruptura e, conseqüentemente, à morte das células (BECHINGER; ZASLOFF; OPELLA, 1993; WANG; LI; WANG, 2016).

As interações entre AMP com a membrana não se baseia somente em uma sequência específica de aminoácidos, mas resultam de uma combinação de propriedades físico-químicas e padrões estruturais, como o tamanho, a composição de resíduos, a carga líquida total, a estrutura secundária, a

hidrofobicidade e o caráter anfifílica tanto dos peptídeos quanto das membranas alvos (BOMAN, 2003; HALL; MOZSOLITS; AGUILAR, 2003). A capacidade dos AMPs de adotar conformações anfipáticas ou anfifílicas, muitas vezes induzidas pela interação com membranas lipídicas (POWERS; HANCOCK, 2003), permite que as cadeias laterais catiônicas/hidrofílicas e hidrofóbicas se organizem em regiões ou faces distintamente opostas na estrutura enovelada. Estas formas parecem ser cruciais para a inserção e ruptura da membrana. Este mecanismo físico simples de ação contribui para uma baixa propensão ao desenvolvimento de resistência bacteriana (CAO et al., 2023).

Diversos mecanismos de ação de peptídeos bioativos têm sido propostos, os peptídeos membrano-ativos são conhecidos por se associarem à membrana plasmática de seus alvos, considerando a ação de peptídeos com alta seletividade para a membrana de bactérias e células tumorais, tem se proposto que o processo começa com a ligação dos AMPs à membrana celular através de interações eletrostáticas entre as regiões catiônicas dos peptídeos e os lipídios aniônicos presentes na membrana, o mecanismo de interação desses AMPs com a membrana celular é o primeiro passo para a invasão do citosol (LE; FANG; SEKARAN, 2017). Esta interação pode desestabilizar a estrutura da bicamada lipídica, permitindo que os peptídeos penetrem e formem poros na membrana. Esses poros rompem a bicamada lipídica, causando o vazamento de íons, pequenas moléculas e até mesmo do conteúdo celular, levando à morte celular (ZHANG; GALLO, 2016).

Pesquisadores da UnB desenvolveram uma metodologia para identificar sequências de aminoácidos dentro do proteoma animal que, quando isoladas, podem resultar em peptídeos bioativos com potencial antimicrobiano e terapêutico (BRAND et al., 2019). A estes peptídeos convencionou-se chamar de peptídeos intragênicos (IPAs) (BRAND et al., 2019)

Assim foi introduzida uma abordagem baseada na filtragem *in silico* de suposto fragmentos antimicrobianos, complementada por testes biológicos e biofísicos, permitindo classificar os peptídeos em grupos com diferentes graus de afinidade por membranas biológicas e selecionar novas sequências de peptídeos bioativos codificadas em proteínas maiores. Foi utilizado o *Kamal*, um software exploratório, como ferramenta principal para descobrir essas sequências

antimicrobianas encriptadas, com base na semelhança físico-química com AMPs já conhecidos (BRAND et al., 2012; NUNES, 2023).

1.2.1 Peptídeo Hs02.

O Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) é derivado da proteína humana miosina 1h não convencional (NP_001094891.3), este peptídeo foi descoberto utilizando-se o software *Kamal*. O Hs02 é composto de 16 resíduos de aminoácidos e com extremidade amidada, apresenta seis cargas positivas em pH fisiológico.

Dados de dicroísmo circular mostraram que o Hs02 está desestruturado em solução aquosa, entretanto em presença de micelas e bicamadas lipídicas exibe uma estrutura secundária em α -hélice (NUNES, 2023).

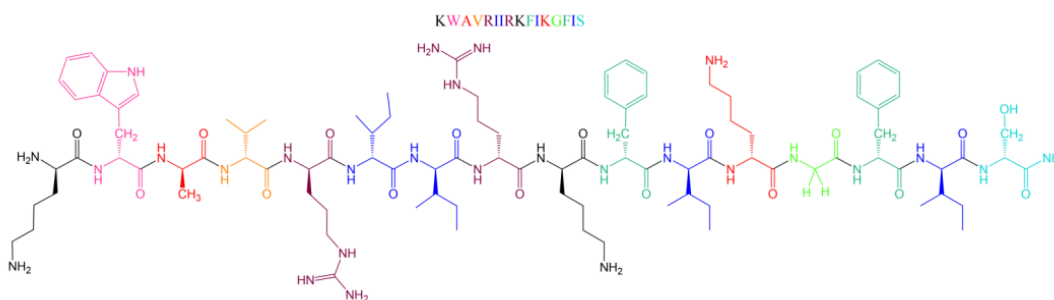


Figura 1: Estrutura primária do peptídeo Hs02. Diferentes cores foram utilizadas para destacarem os diferentes resíduos que compõe este peptídeo. Fonte: (NUNES, 2023)

O peptídeo Hs02, juntamente com outros IPAs, foram testados contra uma variedade de microrganismos patogênicos humanos. Peptídeos provenientes da pele de anuros, como Asc08 e DS01, foram utilizados como controles, junto com agentes antifúngicos e antibióticos comerciais de referência. Entre todos os peptídeos avaliados, o Hs02 se destacou como o mais potente contra todos os microrganismos testados, superando até mesmo os AMPs de controle. Além disso, o Hs02 foi o único peptídeo a demonstrar atividade inibitória significativa contra *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa, sugerindo um amplo espectro de atividade antimicrobiana. (BRAND et al., 2019).

Além do mais, foi avaliado o efeito hemolítico do Hs02 em eritrócitos humanos. O efeito hemolítico é a capacidade do agente de causar a ruptura das células vermelhas do sangue, levando à liberação de hemoglobina no meio circundante. Este teste mede a toxicidade e indica se o composto pode danificar

células sanguíneas humanas (BRAND et al., 2019). Os resultados obtidos mostraram que o Hs02 reduziu a viabilidade em macrófagos primários para 50% e não apresentaram apoptose ou necrose significativas (BRAND et al., 2019).

Com o intuito de manter a atividade antimicrobiana e reduzir o seu efeito deletério sobre células humanas, três peptídeos análogos ao Hs02 foram sintetizados e suas atividades antimicrobianas foram testadas contra diversos microrganismos. Cada análogo teve três resíduos removidos de diferentes regiões do Hs02, as modificações resultaram em uma redução de aproximadamente uma volta nas α -hélices (NUNES, 2023).

Tabela 1: Informações sobre a estrutura do peptídeo Hs02 e seu análogos.

Peptídeo	Sequência	Massa monoisotópica (Da)
Hs02	KWAVRIIRKFIKGFIS - NH ₂	1960.214
13.1	VRIIRKFIKGFIS - NH ₂	1575.003
13.2	KWAVRIIRKFIKG - NH ₂	1613.030
10.0	VRIIRKFIKG - NH ₂	1227.818

Fonte: (NUNES, 2023)

Foi avaliado as diferenças nas atividades antimicrobianas entre o Hs02 e seus análogos, testando-os contra três linhagens de bactérias e duas de leveduras para determinar suas concentrações inibitórias mínimas (MICs). Em todos os ensaios, a atividade antimicrobiana do Hs02 foi de 8 a 64 vezes superior à de seus análogos, indicando uma possível dependência estrutural para sua eficácia antimicrobiana (NUNES, 2023). Estes resultados sugerem que a atividade do Hs02 pode estar relacionada ao seu tamanho, uma vez que todos os análogos apresentaram valores de MIC mais elevados.

1.2.2 Peptídeo 13.2

O peptídeo 13.2 (KWAVRIIRKFIKG-NH₂) é um análogo do Hs02, com a mesma carga, mas com a remoção dos 3 resíduos do C-terminal, conforme ilustrado na Tabela 1. Em testes comparativos com o Hs02, o dicroísmo circular revelou que a retirada 3 aminoácidos foi determinante para a ausência de estrutura definida da molécula na presença das vesículas estudadas. Os motivos dessas variações podem estar relacionados tanto com a redução do tamanho do peptídeo, quanto com a redução de hidrofobicidade, levando a conclusão que não apenas a composição de aminoácidos da estrutura primária é crucial para a

interação com membranas zwitteriônicas, mas também o tamanho do peptídeo. Isto é destacado pelo fato de que AMPs com atividade antimicrobiana potente e compostos por 10 a 13 resíduos de aminoácidos são pouco comuns. Além disso, nos testes de toxicidade, o peptídeo 13.2 demonstrou uma redução significativa na citotoxicidade devido à remoção de uma das terminações do Hs02 (NUNES, 2023).

O peptídeo 13.2 foi utilizado como modelo para otimização do Hs02 no desenvolvimento e síntese de novos análogos. Sua menor atividade antimicrobiana, possivelmente relacionada à redução do tamanho em comparação com o peptídeo original, destacou aspectos importantes para ajustes estruturais (NUNES, 2023).

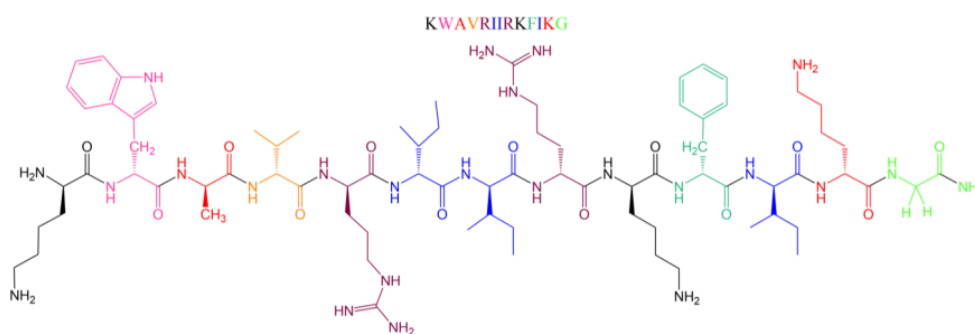


Figura 2: Estrutura primária do peptídeo 13.2. Diferentes cores foram utilizadas para destacarem os diferentes resíduos que compõe este peptídeo. Fonte: (NUNES, 2023)

1.3 Estudo com membranas modelo

As membranas biológicas são estruturas muito complexas (Fig. 3) e dinâmicas, essenciais para a vida celular. Elas desempenham um papel fundamental na divisão e proteção celular, além de permitirem a comunicação e o transporte seletivo de substâncias entre o meio intracelular e o meio externo (SIMONS; SAMPAIO, 2011). Consiste principalmente em uma bicamada lipídica assimétrica contendo diferentes moléculas (Fig. 3). Esta bicamada é composta por lipídios anfipáticos, como fosfolipídios e esfingolipídios, que possuem uma cabeça polar, que interage com o meio, e caudas apolares que estão contidas na bicamada, que criam a famosa barreira semipermeável. A bicamada é fluida e flexível, o que permite que lipídios e outras moléculas se movam lateralmente, o

que é muito importante para a funcionalidade da membrana (SIMONS; SAMPAIO, 2011).

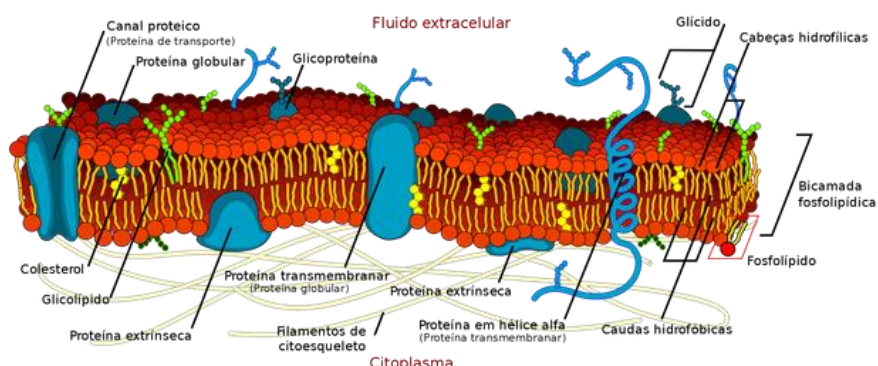


Figura 3: Representação da membrana de uma célula eucariótica. Fonte: Neupe, UFPR.

Diante dessa complexidade, torna-se desafiador obter informações sobre a ação de uma molécula específica com um dado componente de membrana plasmática. Assim, são utilizadas em estudos membranas modelos, vesículas compostas por uma mistura de lipídios específicos, que permitem um controle preciso da composição das membranas e de suas propriedades físico-químicas. Graças a uso de membranas modelos é possível reproduzir com exatidão as condições experimentais, garantindo assim que os resultados sejam comparáveis entre os experimentos (HUANG, 2000; MATSUZAKI, 2009). Embora mais simples, as membranas são projetadas para mimetizar as características mais importantes das membranas biológicas reais, como carga, fluidez e organização lipídica. Isto permite que a interação seja estudada em um ambiente simplificado que permanece biologicamente relevante (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; MATSUZAKI, 2009).

Sistemas lipídicos podem existir em várias fases sendo as mais comuns a gel e a fluida. A transição entre as fases gel e fluida depende das interações entre os lipídios e de suas características, como a natureza da cabeça polar e o comprimento das cadeias apolares (HEIMBURG, 2007). Em lipídios saturados, a temperatura de transição de fase tende a aumentar com o comprimento das cadeias de carbono (HEIMBURG, 2007).

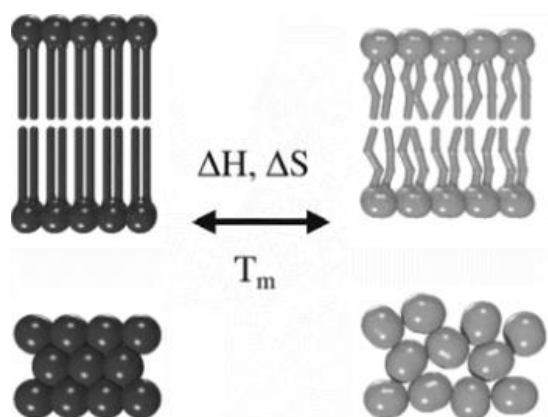


Figura 4: Representações do comportamento dos lipídeos na bicamada nas fases sólida e gel, respectivamente apresentadas. Fonte: Adaptada de Heimburg (2007).

1.3.1 Modelo de membrana cancerosa

O desenvolvimento do câncer pode ter uma ligação genética, sendo caracterizado por uma proliferação celular descontrolada (ALVES et al., 2016). Nesta condição, as células de divisão acelerada necessitam de várias biomoléculas, como ácidos graxos e lipídios de membrana, para atender às suas demandas (HSU; SABATINI, 2008). As células cancerosas exibem diversas características químicas, estruturais, metabólicas e biofísicas que as diferenciam das células normais.

A maioria dos medicamentos visa macromoléculas para matar as células cancerígenas. Em doenças como o câncer, durante a transformação das células em malignas, ocorrem alterações nos sistemas lipídicos e nas propriedades da membrana, podendo aumentar a resistência das células tumorais as terapias atuais (PEETLA et al., 2010).

Nessas circunstâncias, muitos fármacos anticâncer têm seus efeitos terapêuticos influenciados pelo ambiente das membranas tumorais. As implicações dos parâmetros biofísicos das membranas na interação entre esses fármacos e a membrana celular podem ser bastante significativas, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de novos medicamentos (HOLOHAN et al., 2015; LLADÓ et al., 2014).

As membranas celulares são estruturas dinâmicas e complexas, com fosfolipídios distribuídos de maneira assimétrica na bicamada lipídica. Esta assimetria é mantida e finamente controlada pela maquinária celular (OHMANN et al., 2018). As propriedades físico-químicas das membranas biológicas podem modular a penetração dos fármacos, a conformação, a localização dentro da

membrana e, assim, o efeito do fármaco no alvo terapêutico (HENDRICH; MICHALAK, 2003). Ao utilizar membranas modelos, podemos, escolhendo os lipídios apropriados, compreender como as características das membranas impactam na interação com um dado fármaco, sendo esses modelos fundamentais para entender as interações em nível molecular (ALVES et al., 2016).

As membranas celulares normais possuem uma monocamada externa composta principalmente por lipídios zwitteriônicos, como fosfatidilcolina (PC) e esfingomiélin (SM). A monocamada interna, por sua vez, é composta tanto por lipídios zwitteriônicos, como PC e fosfatidiletanolamina (PE), quanto por lipídios aniônicos, como fosfatidilserina (PS) ((ZWAAL; COMFURIUS; BEVERS, 2005). Contudo, em várias células cancerosas, ocorre uma alteração na distribuição assimétrica de suas bicamadas lipídica, resultando na exposição do PS, carregado negativamente, na monocamada externa das membranas (RIEDL et al., 2011). Estas mudanças na composição das membranas tumorais podem impactar diretamente a forma como os fármacos interagem com as células cancerosas. A exposição de moléculas de PS além de servirem de sinalização para o sistema imunológico, podem também ser alvos de medicamentos anticâncer (ALVES et al., 2016; BIRGE et al., 2016; ZWAAL; COMFURIUS; BEVERS, 2005)

Além das mudanças na composição da bicamada lipídica, que altera a densidade superficial de carga das membranas, a fluidez da membrana também parece ser alterada nas células cancerosas (BARITAKI et al., 2007). Estas diferenças estruturais, biofísicas e funcionais entre as membranas de células tumorais e saudáveis podem influenciar na atividade e/ou toxicidade e pode ser exploradas para o desenvolvimento de medicamentos, mais eficazes e menos tóxicos (ALVES et al., 2016; MINGEOT-LECLERCQ; DÉCOUT, 2016).

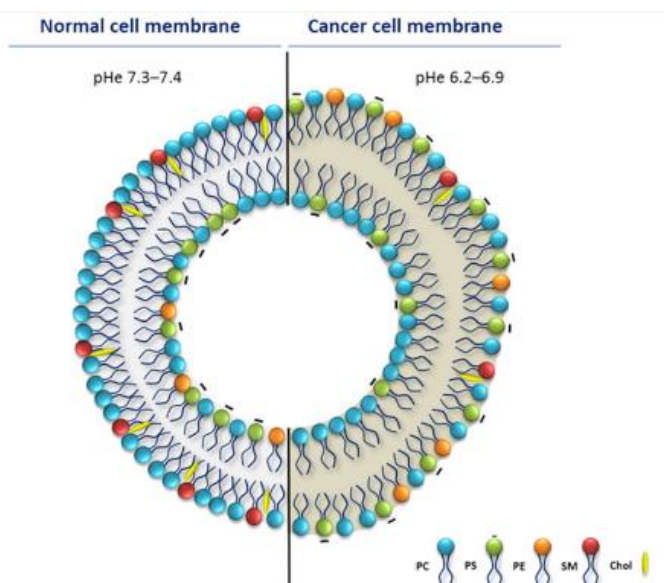


Figura 5: Representação de algumas características das membranas celulares saudáveis e tumorais em relação à composição lipídica. Fonte: (ALVES et al., 2016)

Com isso, diversas técnicas estão disponíveis para analisar as interações entre um possível medicamento e a membranas modelo, fornecendo informações tanto sobre o impacto do fármaco nas propriedades físico-químicas da membrana quanto sobre a influência da própria membrana na atividade do medicamento (ALVES et al., 2016).

1.4 Modificações de peptídeos em membranas biológicas

1.4.1 O Peptídeo KHyal

O estudo utilizando a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) para investigar o comportamento do peptídeo KHyal em diferentes tipos de membranas lipídicas revela diferenças notáveis nas interações com membranas zwitteriônicas e aniônicas (ENOKI, 2016).

Quando interage com vesículas compostas por membranas zwitteriônicas, o peptídeo KHyal causa poucas perturbações na região do carbono 16 da cadeia lipídica, especialmente na fase gel da membrana. Este resultado sugere uma interação superficial e limitada do peptídeo com essas membranas. No entanto, quando KHyal interage com vesículas aniônicas, observa-se um aumento significativo no grau de empacotamento da membrana na fase gel, particularmente na região do carbono 16. Isso indica uma interação mais

profunda e perturbadora em membranas carregadas negativamente (ENOKI, 2016).

Na fase gel, observou-se que na região do carbono 5, o peptídeo KHyal aumenta a ordem das cadeias lipídicas e diminui a mobilidade dos sistemas lipídicos, sugerindo que o peptídeo causa um empacotamento mais rígido nessa região da bicamada. No entanto, na fase fluida, o peptídeo apresenta um efeito de fluidificação na região central da bicamada, principalmente na região do carbono 16. À medida que a concentração do peptídeo aumenta, há também um aumento no grau de empacotamento das membranas nessa região (ENOKI et al., 2018).

Curiosamente, na fase fluida, na região do carbono 5, o aumento da concentração do peptídeo não resultou em um aumento efetivo da ordem das cadeias lipídicas, indicando que a influência do peptídeo nessa região é menos pronunciada em comparação com a fase gel (ENOKI et al., 2018).

Os resultados de EPR sugerem que o peptídeo KHyal, quando interage com membranas compostas por DPPC (lipídios zwitteriônicos), se localiza próximo à superfície da membrana, perturbando de forma mais evidente a região do carbono 5 e afetando minimamente a região do carbono 16. A pequena fluidificação causada pelo peptídeo em DPPC é atribuída à sua penetração na região da interface da membrana, afastando levemente as cadeias lipídicas no centro da bicamada (ENOKI, 2016).

Por outro lado, quando o KHyal interage com lipídios carregados negativamente, como o PG (fosfatidilglicerol), ele perturba tanto a região do carbono 5 quanto a do carbono 16, sugerindo que o peptídeo pode adotar uma posição transmembranar, inserindo-se mais profundamente na bicamada. Essa interação mais extensa com membranas aniônicas reflete a afinidade do peptídeo por ambientes carregados negativamente, com efeitos significativos tanto na superfície quanto no centro da membrana (ENOKI et al., 2018).

1.4.2 peptídeo antimicrobiano Hylin a1 e análogo

Foi investigado os efeitos estruturais provocados pelo peptídeo antimicrobiano Hylin a1 e um análogo mais positivamente carregado sobre

membranas lipídicas, utilizando uma combinação de técnicas físicas, sendo o EPR uma dessas técnicas (VIGNOLI MUNIZ et al., 2022).

Os resultados indicaram que o Hylin a1 e o análogo mais positivamente carregado causam perturbações significativas na estrutura da membrana, mas de maneiras distintas. O peptídeo Hylin a1 mostrou causar desordem na região central da bicamada, enquanto o análogo carregado tem um efeito mais pronunciado na superfície da membrana, promovendo o aumento da ordem efetivo dos sistemas lipídicos (VIGNOLI MUNIZ et al., 2022). Os peptídeos da família Hylin a1 apresentaram baixa afinidade por membranas zwitteriônicas causando poucas perturbações na organização dessas membranas. Isso sugere que os peptídeos podem ser seletivos para alvos bacterianos, minimizando a toxicidade para células eucarióticas (VIGNOLI MUNIZ et al., 2020).

Foi demonstrado que o aumento da carga positiva no análogo amplifica sua interação com as cabeças polares dos lipídios, resultando em perturbações estruturais mais intensas, comparadas ao peptídeo Hylin a1 original (VIGNOLI MUNIZ et al., 2020).

2 OBJETIVOS

Considerando a complexidade das membranas biológicas e as diferenças entre as membranas de células de mamíferos saudáveis e células tumorais, utilizamos vesículas unilamelares grandes (LUVs) compostas unicamente pelo lipídio zwitteriônico 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) para mimetizar membranas de mamíferos. Por outro lado, para mimetizar membranas tumorais, foram utilizadas LUVs aniônicas compostas por uma mistura de DPPC e do lipídio aniônico 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilserina (POPS), na proporção molar DPPC:POPS (9:1). Este trabalho tem como objetivo inicial caracterizar termoestruturalmente os diferentes modelos de membranas. Em seguida, busca-se monitorar as alterações estruturais induzidas nestes modelos por diferentes concentrações dos peptídeos Hs02 e 13.2. O propósito final é comparar as alterações induzidas pelos peptídeos nas membranas.

2.1 Objetivos específicos

- Explorar a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

- Analisar a região da interface entre a cabeça polar e a cauda hidrofóbica
- Analisar a região da e o carbono 16, localizado no cerne das bicamadas lipídicas
- Monitorar as perturbações que os peptídeos Hs02 e seu análogo 13.2 induzem nos diferentes modelos de membranas biológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

Nesta seção foram descritos todos os materiais necessários para a execução bem como a o método utilizado.

3.1 Reagentes

O sal 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfonato (HEPES), o cloreto de sódio (NaCl), o hidróxido de sódio (NaOH), e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os marcadores de spin (Fig. 6), 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (5-PCSL) e 1-palmitoil-2-estearoil-(16-doxil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (16-PCSL) e os lipídios DPPC e POPS (Fig. 6) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids. As soluções foram preparadas utilizando água ultra obtida de um purificador do tipo Mili-Q.

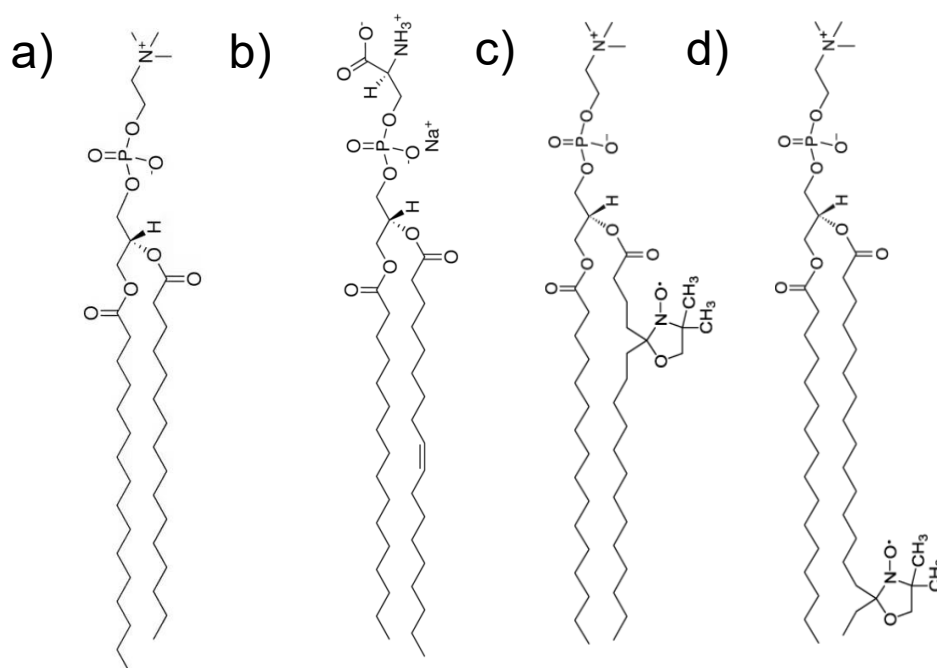


Figura 6: Representação esquemática das moléculas de (a) DPPC, (b) POPS e dois marcadores de spin (c) 5-PCSL e (d)16-PCSL.

3.2 Preparações das dispersões lipídicas

Os lipídios foram pesados e solubilizados em uma solução de clorofórmio e metanol (4:1, v/v). Os marcadores paramagnéticos, 5-PCSL ou 16-PCSL, foram adicionados à solução lipídica, nas concentrações de 0,8 mol% e 0,3 mol%, respectivamente, em relação à concentração total de lipídios. Então, a solução lipídica foi submetida a um fluxo de nitrogênio ultrapuro até a completa evaporação do solvente e a obtenção de uma película lipídica na parede do tubo de ensaio. Logo em seguida, os filmes lipídicos são submetidos a condições de baixa pressão por no mínimo duas horas a fim de garantir a total remoção de solventes orgânicos residuais.

Para a obtenção de uma dispersão lipídica, os filmes lipídicos são hidratados com tampão (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), seguido de intensa agitação com o agitador vórtex.

3.3 Processo de extrusão das dispersões lipídicas

Neste processo, a dispersão lipídica descrita acima é colocada em um extrusor (Fig. 7) (Avanti Polar Lipids, Inc.), no qual a dispersão é forçada através de uma membrana de policarbonato (Nuclepore) com poros de 100nm de diâmetro. Este procedimento é repetido 31 vezes com o objetivo de formar vesículas unilamelares grandes (LUVs).



Figura 7: Fotografia do equipamento para a extrusão das vesículas.

3.4 Síntese dos Peptídeos

O Hs02 e seu análogo, 13.2, foram sintetizados em laboratório pelo método denominado Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (CHAN; WHITE, 1999), em seguida purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e sequenciado por espectrometria de massas para identificação e caracterização (NUNES, 2023).

Os peptídeos foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand da Divisão de Química Orgânica da Universidade de Brasília.

3.5 Concentração dos peptídeos

Os peptídeos foram solubilizados diretamente em tampão, e suas concentrações foram determinadas por meio da absorção ultravioleta do resíduo de triptofano presente na segunda posição da cadeia peptídica de ambos os peptídeos. O coeficiente de extinção molar do triptofano a 280 nm, igual a $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, O coeficiente de extinção molar do triptofano a 280 nm foi utilizado, igual a $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANTHIS; CLORE, 2013).

Em todos os experimentos, a concentração de lipídios foi mantida constante e igual a 3 mM. Quando necessário, os peptídeos foram previamente incubados por meia hora com as vesículas. Neste trabalho, utilizamos três concentrações de peptídeos: 1 mol%, 2 mol% e 4 mol%, em relação à concentração total de lipídios.

Para os experimentos de EPR, as dispersões lipídicas são inseridas em um capilar com volume aproximado de 50 μL . Todas as dispersões lipídicas utilizadas eram frescas, preparadas no mesmo dia dos experimentos e descartadas após 24 horas.

3.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

3.6.1 Introdução Instrumental

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), também conhecida como Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR), é uma técnica espectroscópica usada para estudar materiais com elétrons desemparelhados. Estes elétrons estão presentes em radicais livres, íons metálicos, defeitos em sólidos e outros sistemas paramagnéticos (GOLDFARB; STOLL, 2018).

Seu funcionamento é baseado no fato de que elétrons desemparelhados possuem um momento magnético associado ao seu spin. Quando esses elétrons são submetidos a um campo magnético externo, seus spins podem alinhar-se paralelamente ou antiparalelamente ao campo, criando diferentes níveis de energia.

Ao aplicar uma radiação de micro-ondas de uma frequência específica, é possível induzir a transição entre esses níveis de energia. Estas transições ocorrem quando a energia dos fótons da radiação de micro-ondas corresponde à diferença de energia entre os níveis de spin. A ressonância é detectada quando há absorção de energia pela amostra.

Essa técnica possui diversas aplicações como em reações químicas, degradação de polímeros, processos biológicos, entre outros. No entanto, não é comum encontrar moléculas paramagnéticas estáveis em sistemas biológicos. Deste modo, no presente trabalho foram utilizados marcadores de spin, que no presente caso são centros paramagnéticos, grupo nitróxido, ligados covalentemente aos sistemas lipídicos.

Entre os radicais orgânicos, os nitróxidos destacam-se como uma das classes mais versáteis de sondas de spin, e foi usado no presente trabalho. Estes radicais são amplamente utilizados na técnica EPR devido à sua estabilidade e à capacidade de interagir com diversos sistemas biológicos e materiais. O sistema de spin de um radical nitróxido possui como um spin eletrônico $S=1/2$ acoplado a um spin nuclear $I=1$, advindo do nitrogênio no grupo nitróxido. Isso resulta em um desdobramento

hiperfino, dividindo cada nível de energia em três subníveis, com números quânticos magnéticos $m_I = +1, 0, \text{ e } -1$, gerando três linhas principais no espectro de EPR.

Na EPR, a detecção das transições entre esses níveis de energia por meio da absorção de radiação na faixa de micro-ondas. Embora as micro-ondas sejam usadas para excitar essas transições, é muito mais simples variar o campo magnético, mantendo a frequência das micro-ondas constante, até que a condição de ressonância seja atingida. O resultado é um espectro típico que mostra as variações na absorção à medida que o campo magnético é ajustado. Geralmente, as análises são feitas utilizando a primeira derivada do espectro de absorção, o que facilita a identificação das linhas espectrais e melhora a resolução.

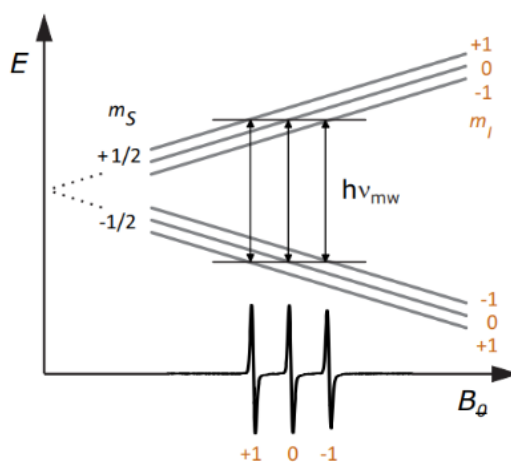


Figura 8: Os subníveis hiperfinos correspondentes aos três possíveis. Fonte: (JENSCHKE, 2014)

O campo magnético pode não estar alinhado com um dos eixos do orbital com o spin desemparelhado, com isso os espectros de absorção poderão ser diferentes quanto a sua forma, altura e largura.

Devido às particularidades dos sinais de EPR em função dos diferentes tempos de correlação rotacional (ϕ), a aplicação de um modelo geral para descrever o comportamento dos espectros é bastante complexa. Assim, com base em estudos anteriores, foram definidos perfis espectrais, organizados em grupos conforme o tempo de correlação (ENOKI, 2016). Na Figura 9 são apresentados os espectros simulados do TEMPOL, considerando variações nos tempos de correlação rotacional.

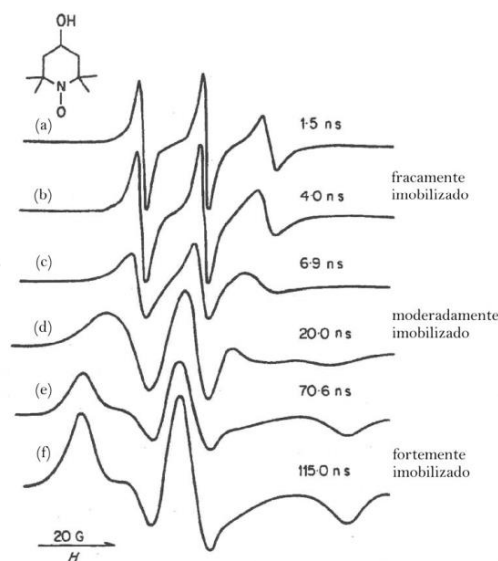


Figura 9: Espectros simulados de EPR da sonda TEMPOL com diferentes valores de tempos de correlação rotacional. Adaptada de (GRELL, 1981)

Perceba que podemos classificar os espectros de diferentes maneiras, com respeito ao tempo de correlação rotacional e a forma dos espectros:

- **Movimento isotrópico:** neste caso o sinal de EPR é representado por três linhas de igual intensidade, não está presente na figura 9. $\phi < 10^{-11}$ s.
- **Motional narrowing:** neste caso, as linhas referentes às transições eletrônicas h_{+1} , h_0 e h_{-1} apresentam diferentes alargamentos, e correspondem aos números quânticos magnéticos do radical nitróxido. 10^{-11} s $< \phi < 3 \times 10^{-9}$ s.
- **Movimento lento:** neste caso, as linhas se alargam e também mudam de posição. 3×10^{-9} s $< \phi < 10^{-7}$ s.
- **Espectro de pó:** neste caso, o sinal de EPR é dado pela soma de todos os sinais do marcador em todas as direções relativas ao campo externo. $\phi > 10^{-7}$ s.

3.6.2 Análise dos espectros de EPR

Os espectros de EPR na banda X foram obtidos com um espectrômetro Bruker EMX usando uma cavidade ER4119HS de alta sensibilidade. A frequência de modulação foi de 100 kHz, a potência de micro-ondas foi de 13,4 mW e a amplitude de modulação foi de 1 G. Todos os experimentos foram feitos pelo menos em duplicata.

Uma maneira de interpretar os espectros de EPR é recorrer a parâmetros empíricos, os quais são extraídos diretamente dos próprios espectros. Estes parâmetros fornecem informações quantitativas que permitem avaliar as mudanças de estrutura e dinâmica da região ao redor dos marcadores paramagnéticos (Rozenfeld et al., 2017). Exemplos típicos desses dados incluem: os máximos e mínimos dos desdobramentos hiperfinos ($2 A_{max}$ e $2 A_{min}$), as razões entre as amplitudes entre as linhas de campo alto e campo central (h_{-1} e h_0), e, no caso da fase fluida, um parâmetro de ordem efetiva (S_{eff}) (Rozenfeld et al., 2017).

A figura 10 ilustra um exemplo de espectro de EPR em que é mostrado o h_{+1} , h_0 e o h_{-1} , que são as medidas das amplitudes dos picos de absorção, em que as razões h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 poderão dar uma indicativa do empacotamento e fluidez da membrana, estas razões tendem a unidade quando a sonda paramagnética está em movimento livre, completamente isotrópico. O a_0 é o desdobramento hiperfino isotrópica, que irá dar a informação se ocorreu uma mudança na polaridade no sistema lipídico. Uma informação importante no presente estudo, tendo em vista as membranas de células tumorais.

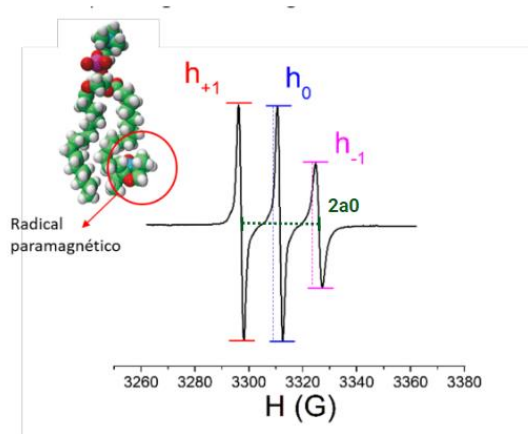


Figura 10: Espectro típico da sonda 16-PCSL incorporada em membranas fluidas de DPPC. Os parâmetros empíricos estão indicados na figura. Fonte: (ENOKI, 2016)

O desdobramento hiperfino máximo ($2 A_{max}$) é exemplificado na figura 11. Este parâmetro é usado para observar mudanças no empacotamento da bicamada lipídica. Quanto maior o valor de $2 A_{max}$ maior é a viscosidade e, portanto, as restrições de movimento da sonda paramagnética do 5-PCSL.

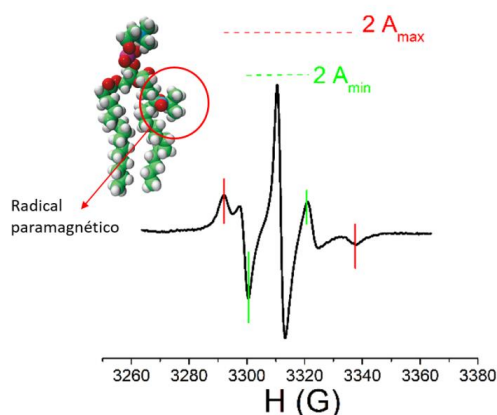


Figura 11: Espectro típico da sonda -PCSL incorporada em membranas fluidas de DPPC. Os parâmetros empíricos $2 A_{max}$ e do $2 A_{min}$ estão indicados na figura. Fonte: (ENOKI, 2016)

Para a realização das medidas na fase fluida com o marcador 5-PCSL, é calculado o parâmetro de ordem efetivo, S_{eff} , de acordo com a equação:

$$S_{eff} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} * \frac{a'_0}{a_0} \quad (1)$$

$$a_0 = \frac{1}{3}(A_{//} + A_{\perp}) \quad (2)$$

$$a'_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (3)$$

Em que $A_{xx} = 5.9$, $A_{yy} = 5.4$, $A_{zz} = 32.9$ (BARTUCCI, 2013)

O valor de $A_{//}$ equivale ao desdobramento máximo, $A_{//} \approx A_{max}$ e A_{\perp} é calculado a partir da equação descrita abaixo. (McConnell and Hubbell 1971)

$$A_{\perp} = A_{min} + 1.4 \left[1 - \frac{A_{max} - A_{min}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \right] \quad (4)$$

a medida $2 a_0$ (desdobramento hiperfino isotrópico), em que possibilita analisar se houve mudança de polaridade (hidratação) da membrana na altura do quinto carbono da cadeia parafínica.

O S_{eff} é um parâmetro de ordem quando seu valor é 1, a sonda está completamente alinhada com a normal da bicamada lipídica.

4 RESULTADOS

Vesículas compostas de poucos componentes lipídicos apresentam tipicamente duas fases: um fase gel, no qual os lipídios apresentam um grande empacotamento, e ordem lateral com respeito as cadeias alquílicas e uma ordem cristalina com respeito às cabeças polares e uma fase fluida, na qual os lipídios

perdem tanto a ordem lateral quanto a cristalina e os lipídios estão em rápido movimento (HEIMBURG, 2007).

Particularmente, o lipídio DPPC apresenta uma transição de fase gel-fluida em 41 °C, enquanto POPS apresenta uma transição de fase gel-fluida em 14 °C. Vesículas compostas de DPPC:POPS (9:1) apresentam um único pico de transição de fase (Fig. 12), centrado em $T = 39,4$ °C, a presença de único pico de transição de fase e a uma temperatura entre os picos de transição gel-fluida dos lipídios puros fortemente indica que os lipídios são completamente miscíveis e estão aleatoriamente distribuídos dentro das vesículas (HEIMBURG, 2007).

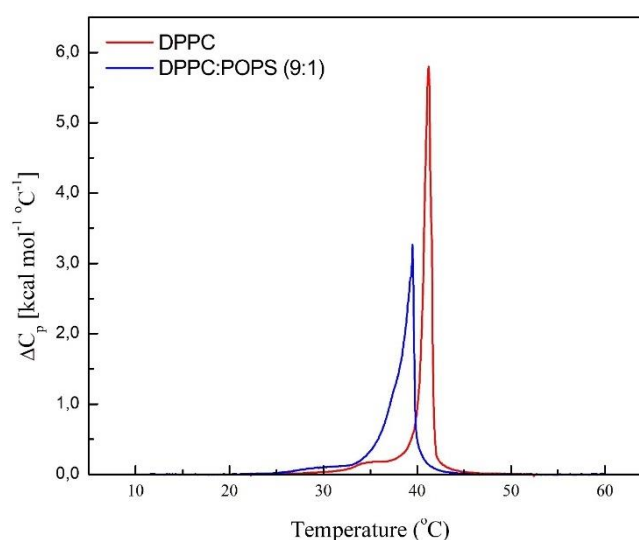


Figura 12: Termogramas de calorimetria diferencial de varredura de dispersões lipídicas extrusadas (100 nm) de DPPC (linha vermelha) e DPPC:POPS (linha azul) em tampão (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). A concentração de lipídios é igual a 3 mM.

Foram coletados espectros dos marcadores presentes na membrana de membranas lipídicas, DPPC e DPPC:POPS, com diferentes concentrações dos peptídeos Hs02 e de seu análogo mais curto o 13.2. As medidas foram feitas variando a temperatura, possibilitando caracterizar termoestruturalmente os modelos de membranas celulares e investigar a interação dos peptídeos com membranas em duas configurações: gel, na qual há um grande empacotamento dos lipídios e baixa hidratação das bicamadas lipídicas, e fluida, na qual há uma grande hidratação das bicamadas lipídicas e os lipídios apresentam muita mobilidade. Ao todo foram coletados um total de 672 espectros, fazendo com o que sejam dados complexos a serem analisados.

Como mencionado na seção anterior, foram usadas duas sondas paramagnéticas, dispostos em diferentes regiões dos sistemas lipídicos. A sonda 5-PCSL, tem o radical nitróxido ligado covalentemente ao carbono 5 da cadeia carbônica, enquanto a sonda 16-PCSL tem o grupo sonda ligado ao 16º carbono da cadeia parafínica, o que pode fornecer informações sobre o cerne das bicamadas lipídicas. Considerando as diferentes fases das bicamadas lipídicas, os resultados experimentais foram divididos em fase gel, com temperaturas indo de 5°C a 35 °C e a fluida com temperaturas indo de 40°C a 60 °C.

4.1 . FASE GEL

5-PCSL

OS espectros da sonda 5-PCSL incorporada em vesículas na fase gel DPPC (Fig 13) e DPPC:POPS (Fig. 14) na ausência ou na presença dos peptídeos não exibem sinais de mais de um sítio, indicando que os marcadores estão homoganeamente distribuídos nas vesículas. Sob esta condição é possível medir parâmetros empíricos que fornecem informações sobre a estrutura e a dinâmica das bicamadas lipídicas (ROZENFELD et al., 2017).

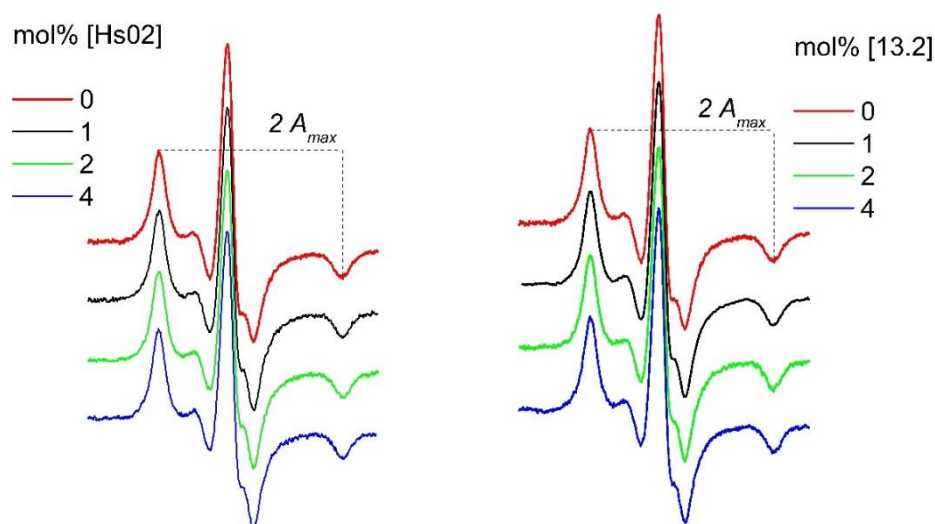


Figura 13: Espectros da sonda 5-PCSL incorporadas em 3 mM vesículas de DPPC na fase gel (10 °C) na ausência dos peptídeos linhas vermelhas e na presença de diferentes concentrações do peptídeo Hs02 (espectros a esquerda) e do peptídeo 13.2 (coluna da direita).

É importante salientar que, como não há presença de diferentes sítios paramagnéticos (Fig. 14), os marcadores estão distribuídos homogeneamente nas vesículas de DPPC, sustentando fortemente que os lipídios estão completamente miscíveis e distribuídos aleatoriamente.

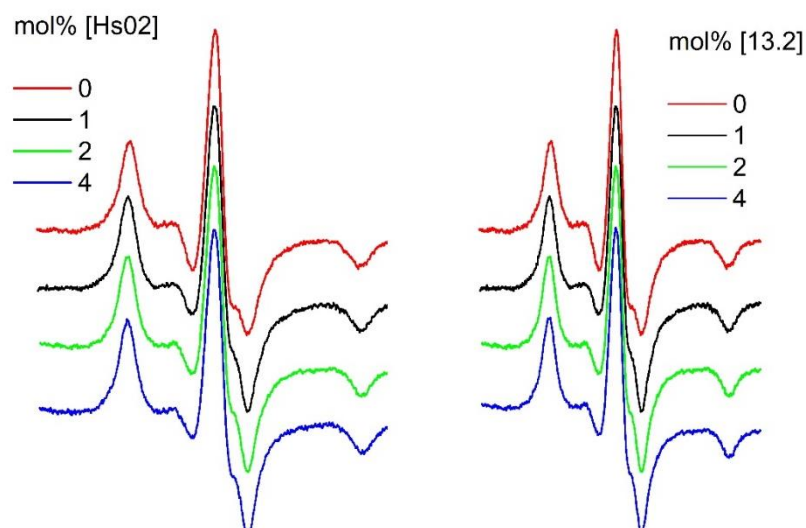


Figura 14: Espectros da sonda 5-PCSL incorporadas em 3 mM vesículas de DPPC:POPS na fase gel (10 °C) na ausência dos peptídeos (linhas vermelhas) e na presença de diferentes concentrações do peptídeo Hs02 (espectros à esquerda) e do peptídeo 13.2 (coluna da direita).

O desdobramento hiperfino máximo ($2 A_{max}$) fornece informações sobre o empacotamento da região onde a sonda paramagnética se encontra. Quanto maior o seu valor, maior é o grau de empacotamento da bicamada lipídica (ROZENFELD et al., 2017). A Fig. 15 exibe os valores de $2 A_{max}$, medidos diretamente nos espectros da sonda 5-PCSL embebidas em bicamadas lipídicas zwitteriônicas de DPPC, em função da temperatura. Note que ao aquecermos as dispersões de DPPC, observamos uma diminuição dos valores de $2 A_{max}$, o que mostra um aumento da fluidez causada pelo incremento na temperatura.

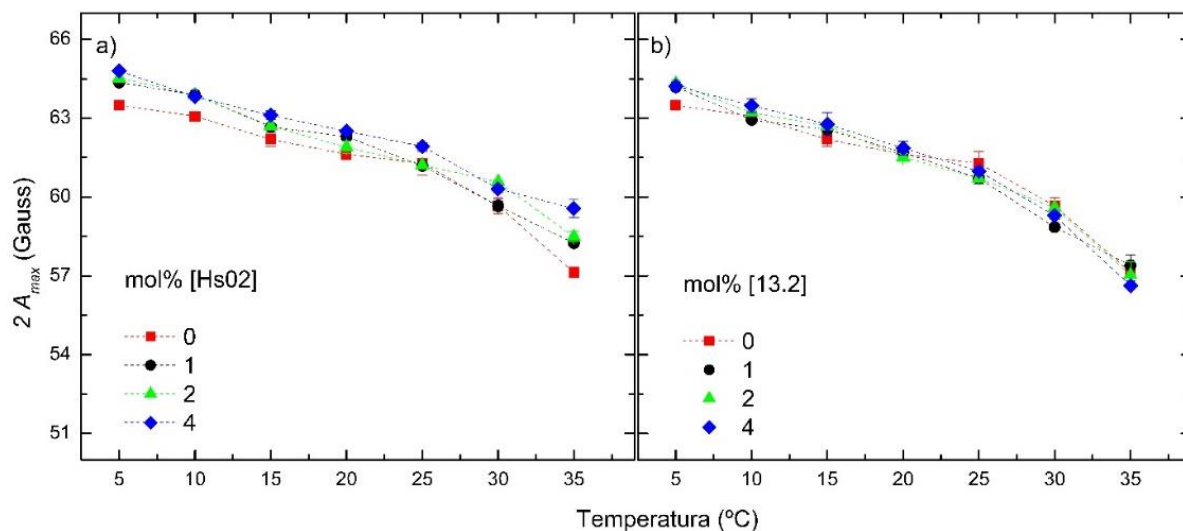


Figura 15: Dependência do desdobramento hiperfino máximo ($2 A_{max}$) medido diretamente dos espectros de 5-PCSL incorporado em 3mM de vesículas de DPPC na fase gel, na ausência e na presença de crescentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

Na figura 15a é observado um aumento dos valores de $2 A_{max}$ com o aumento da concentração do IPA Hs02, indicando que este peptídeo está modificando a mobilidade na altura do quinto carbono das vesículas gel de DPPC. Em contraste, a presença do peptídeo análogo induziu apenas mudanças marginais nos valores de $2 A_{max}$ (Fig. 15b). Note que, ao comparar esses valores com aqueles obtidos para as dispersões puras de DPPC, eles se mostram equivalentes dentro das barras de incerteza.

Considerando os modelos de membranas tumorais (DPPC:POPS), os valores obtidos de $2 A_{max}$ (Fig. 16) são ligeiramente menores que aqueles obtidos para dispersões puras de DPPC, indicando que a presença de POPS induz uma relativa fluidificação nas bicamadas lipídicas. A presença de diferentes concentrações do IPA Hs02 paulatinamente aumenta os valores de $2 A_{max}$, indicando que este peptídeo induz também um empacotamento em vesículas na fase gel na altura do quinto carbono. Em contraste, a presença do análogo mais curto somente causa pequenas modificações no $2 A_{max}$.

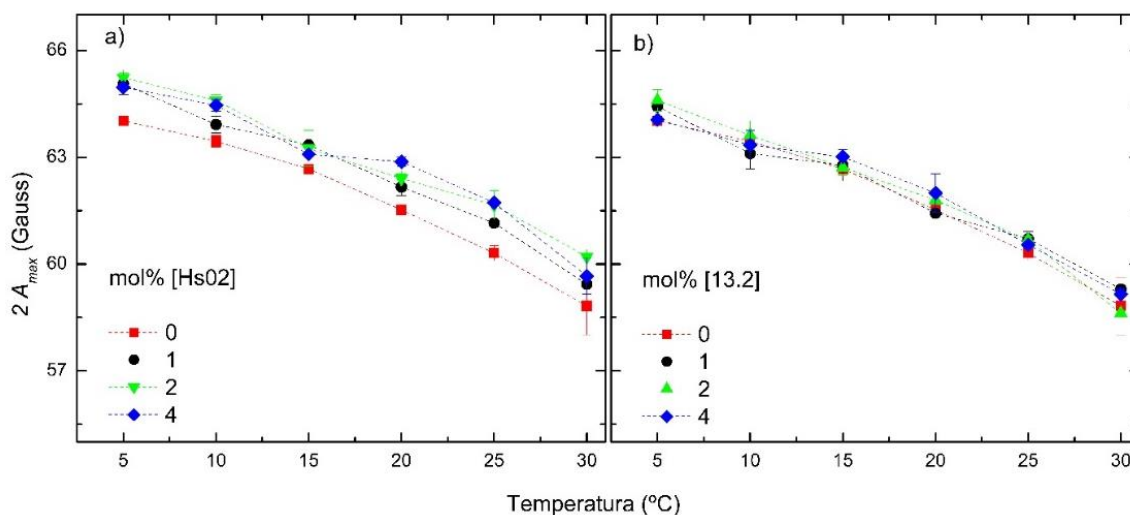


Figura 16: Dependência do desdobramento hiperfino máximo ($2 A_{max}$) medido diretamente dos espectros de 5-PCSL incorporado em 3mM de vesículas aniônicas de DPPC:POPS (9:1) na fase gel, na ausência e na presença de crescentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

Os dados apresentados na Figura 16a também mostram um aumento dos valores de $2 A_{max}$ com o aumento crescente do peptídeo Hs02, alterando a fluidez da membrana lipídica, DPPC:POPS, composição aniônica, apresentando um mesmo resultado geral que o sistema neutro (Figura 15a), um aumento do empacotamento da membrana. Já os dados apresentados com o peptídeo 13.2 (Fig. 16b), apresentam os mesmos resultados que apresentados no sistema anterior (Fig. 15b), pouca interação entre o peptídeo e a membrana, nesta região, não ocorrendo alteração em seu empacotamento.

16 – PCSL

A figura 17 exibe sinais paramagnéticos da sonda 16-PCSL embebida em vesículas zwitteriônicas de DPPC na fase gel (10 °C) na ausência e na presença do Hs02 e de seu análogo mais curto, 13.2.

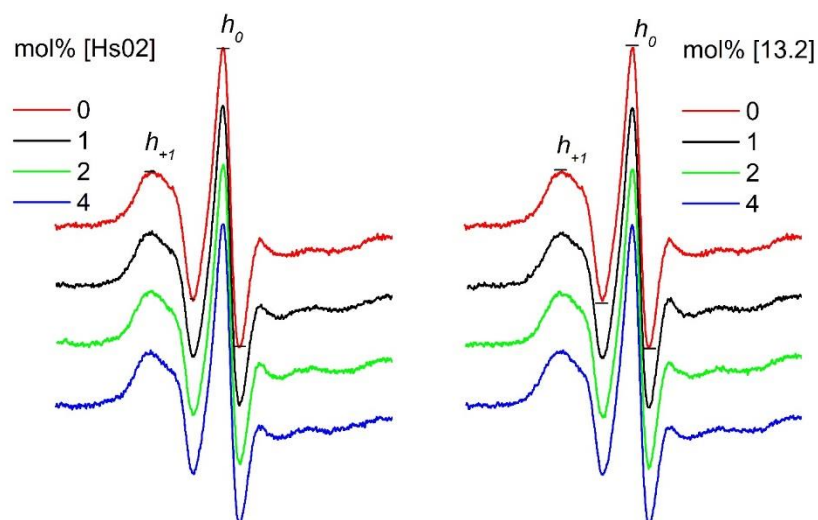


Figura 17: Espectros da sonda 16-PCSL incorporadas em 3 mM vesículas de DPPC na fase gel (10 °C) na ausência dos peptídeos linhas vermelhas e na presença de diferentes concentrações do peptídeo Hs02 (espectros a esquerda) e do peptídeo 13.2 (coluna da direita).

A figura 18 exibe sinais paramagnéticos da sonda 16-PCSL embebida em vesículas aniônicas de DPPC:POPS na fase gel (10 °C) embebida em vesículas aniônicas de DPPC:POPS na fase gel (10 °C) na ausência e na presença do Hs02 e de seu análogo mais curto, 13.2.

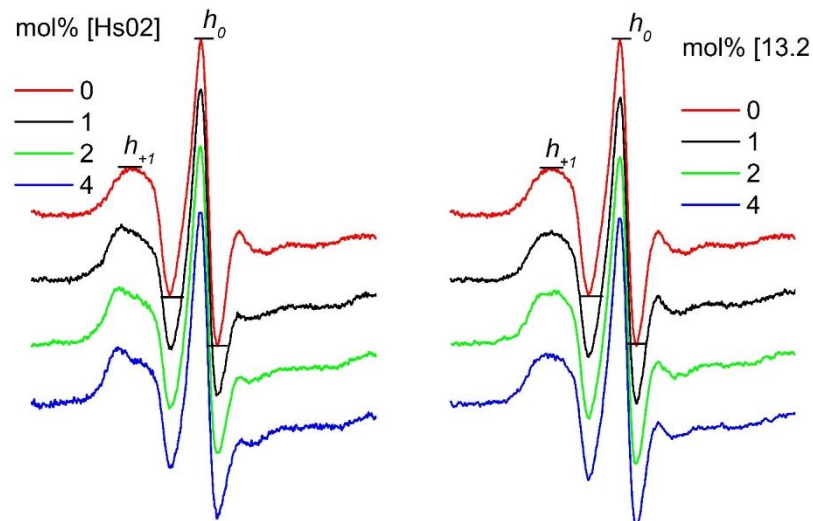


Figura 18: Espectros da sonda 16-PCSL incorporadas em 3 mM vesículas aniônicas de DPPC:POPS na fase gel (10 °C) na ausência dos peptídeos linhas vermelhas e na presença de diferentes concentrações do peptídeo Hs02 (espectros a esquerda) e do peptídeo 13.2 (coluna da direita).

Novamente observamos sinais de somente um sítio paramagnético indicando que a sonda está homogeneamente distribuída, como as mudanças induzidas pelos peptídeos nos espectros não são muito evidentes utilizamos os parâmetros empíricos medidos diretamente dos espectros para quantificar as modificações.

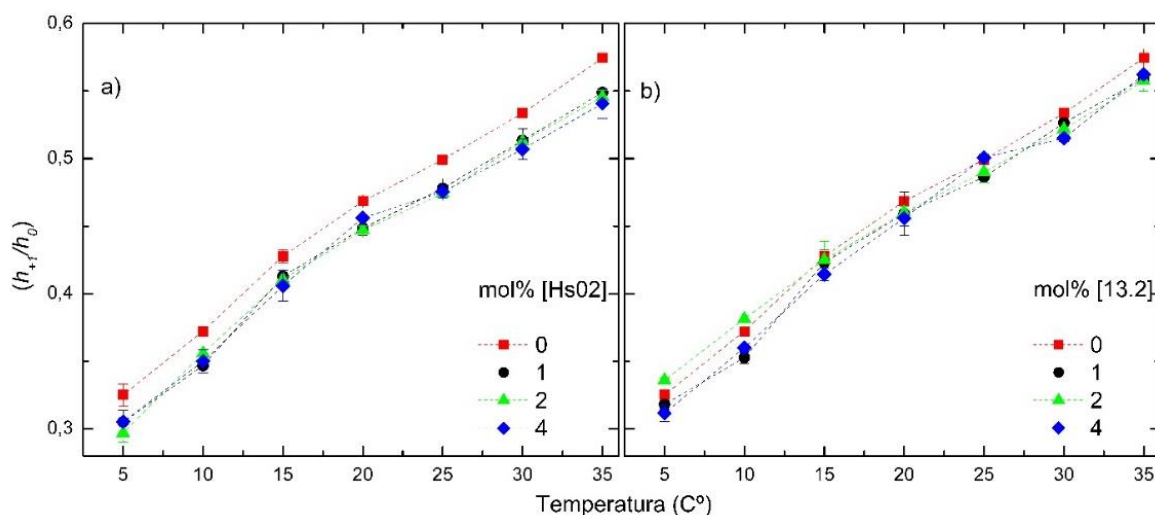


Figura 19: Razão entre as amplitudes das linhas de baixo campo e da linha central (h_{+1}/h_0), medidas diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada de vesículas DPPC (3mM) na fase gel, em função da temperatura, na ausência e presença dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

A Figura 19 exhibe a razão h_{+1}/h_0 , que como apresentado na sessão anterior é um parâmetro empírico que permite aferir a mobilidade do centro da bicamada lipídica, quanto mais próximo da unidade mais fluida está a região da sonda, note que o aumento da temperatura aumento os valores de h_{+1}/h_0 , mostrando que há um aumento na mobilidade com o incremento da temperatura. A presença do Hs02 diminui os valores deste parâmetro (Fig. 19a), assim mostrando que o Hs02 induz um empacotamento do centro das bicamadas lipídicas de DPPC na fase gel. Note que o Hs02 empacota a região próxima da superfície das vesículas e o seu centro (Fig. 15a e 19a).

Como observado para a sonda de 5-PCSL, o peptídeo 13.2 induziu somente alterações pequenas na mobilidade da bicamada, Fig. 19b. Estes resultados podem indicar que o peptídeo 13.2 tem pouca afinidade por vesículas zwitteriônicas na fase gel.

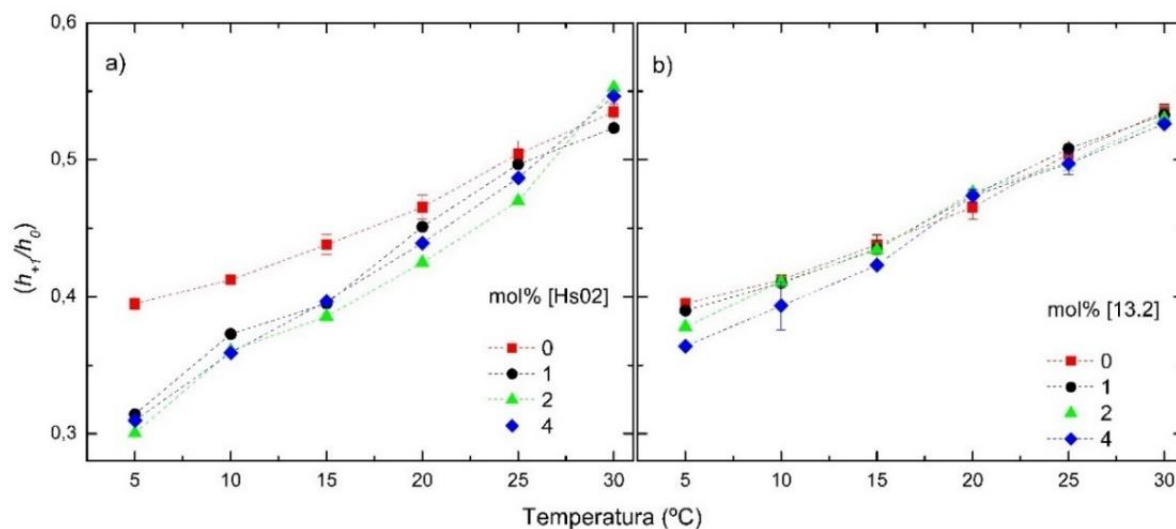


Figura 20: Razão entre as intensidades das linhas de baixo campo e da linha central (h_{+1}/h_0), medidas diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada de vesículas aniônicas de DPPC:POPS (3mM) na fase gel, em função da temperatura, na ausência e presença dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

A Fig. 20 exibe as razões (h_{+1}/h_0) para o sistema DPPC:POPS, note que os valores de h_{+1}/h_0 para esse sistema são sempre maiores que para as vesículas de DPPC, mostrando que os lipídios de POPS induzem uma relativa fluidez no centro da bicamada, possivelmente pela a insaturação deste lipídio e pela repulsão entre as cabeças polares negativamente carregado de POPS.

O Hs02 enrijece o centro das bicamadas de DPPC:POPS (Fig 17a), reduz os valores de (h_{+1}/h_0) , já que diminui os valores de h_{+1}/h_0 .

Os resultados do peptídeo 13.2, exibidos na Figura 20b, demonstram que somente na concentração de 4 mol% há uma mudança na mobilidade, apesar da atração eletrostática o 13.2 parece ter pouca afinidade por membranas na fase gel.

4.2 . FASE FLUIDA

5-PCSL

Os espectros de EPR são muito sensíveis a fase da membrana, note que os espectros apresentados do 5-PCSL a (60 °C), Fig. 21, são da mesma amostra, que obtivemos os espectros da fase gel, porém em 60 °C.

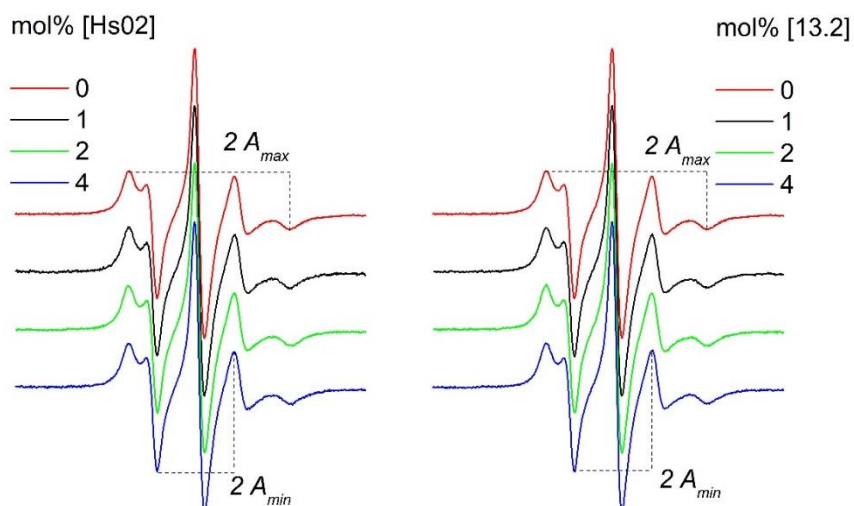


Figura 21: Espectros da sonda 5-PCSL incorporada em 3 mM de vesículas fluidas de DPPC (60 °C) na ausência dos peptídeos (linhas vermelhas) e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos Hs02 (coluna esquerda) e 13.2 (coluna direita).

Como demonstrado na sessão anterior, S_{eff} foi calculado utilizando parâmetros (Eq. 1) medidos diretamente dos espectros de 5-PCSL (em membranas fluidas). S_{eff} parâmetro de ordem efetiva é uma medida da ordem das cadeias alquílicas, na região próxima do quinto carbono, com respeito a normal da bicamada lipídica, o aquecimento do sistema reduz a ordem nesta região, como esperado (Fig. 22).

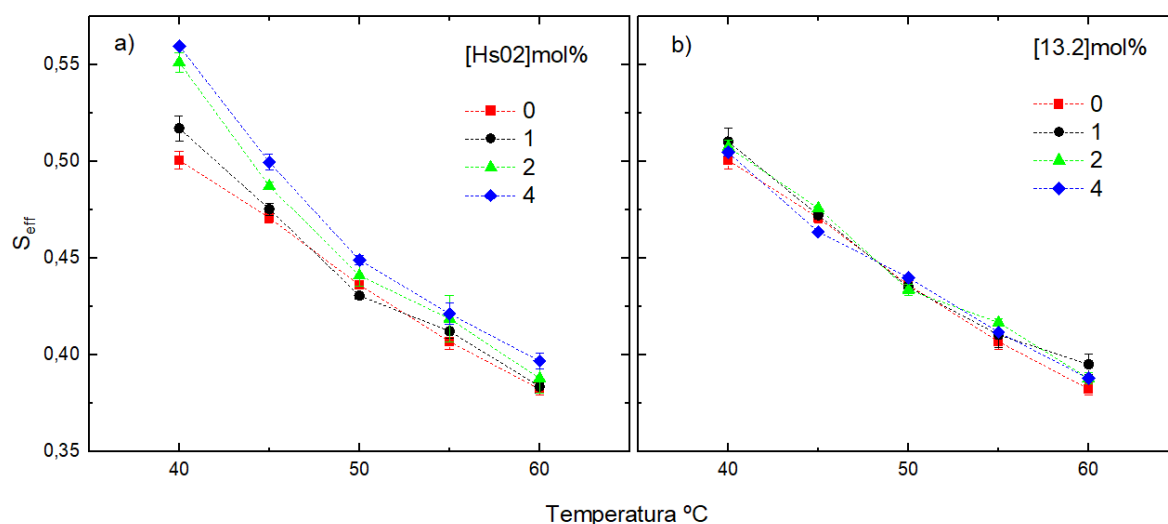


Figura 22: Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}) calculado com os parâmetros medidos diretamente dos espectros da sonda 5-PCSL incorporadas em vesículas fluidas (3mM) de DPPC na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

O Hs02 organiza a região do quinto carbono em vesículas fluidas de DPPC, os valores de S_{eff} aumentam (Fig. 22a). Por outro lado, o peptídeo 13.2 somente causa modificações pequenas neste parâmetro, similar do observados para vesículas gel de DPPC (Fig.22b) indicando a baixa afinidade deste peptídeo por vesículas zwitteriônicas tanto na fase gel quanto na fluida.

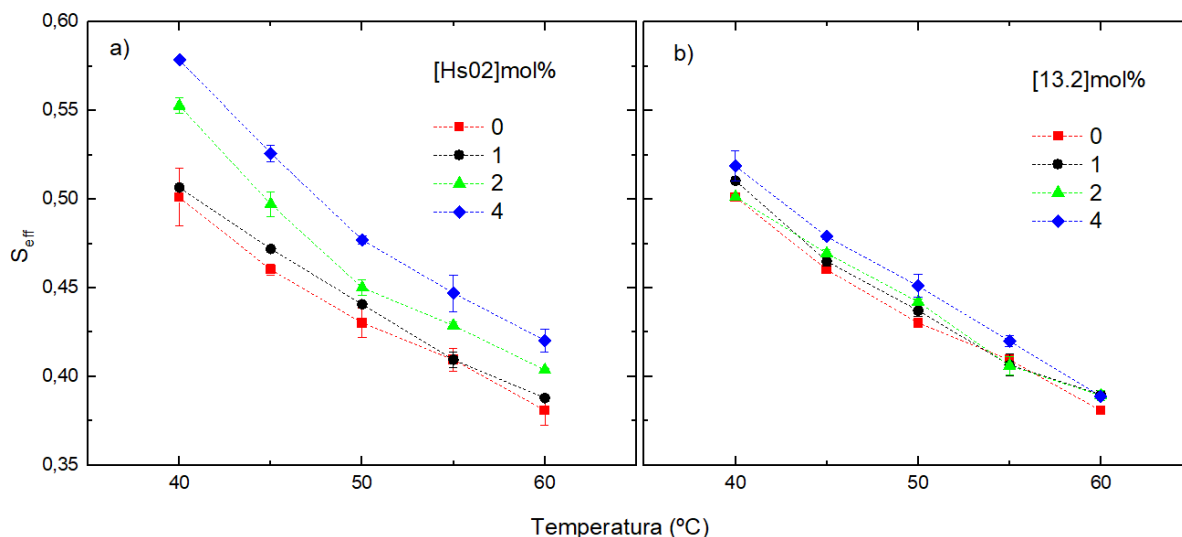


Figura 23: Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}) calculado com os parâmetros medidos diretamente dos espectros da sonda 5-PCSL incorporadas em vesículas fluidas (3mM) de DPPC:POPS na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

Para o sistema lipídico aniônico DPPC:POPS, grandes modificações na membrana foram observadas com a presença do peptídeo Hs02. O aumento de sua concentração eleva a ordem efetiva da bicamada em sua superfície (Fig 23a), resultando em ordem da membrana. O mesmo comportamento foi observado com o peptídeo 13.2, embora em menor intensidade. Ambos os peptídeos indicam um aumento da ordem efetiva do sistema lipídico à medida que suas concentrações são elevadas.

Para medições do $2a_0$ com a partir dos espectros com a sonda 5-PCSL, é feito por meio da Eq. 2. As figuras 24, mostram os gráficos de $2a_0$, visando identificar monitor a polaridade das membranas na fase fluida. Não foi observado alterações na polaridade, tendo em vista a região da perto superfície da bicamada por conta da interação com Hs02 (Fig. 24a) tampouco com o 13.2 (Fig. 24b).

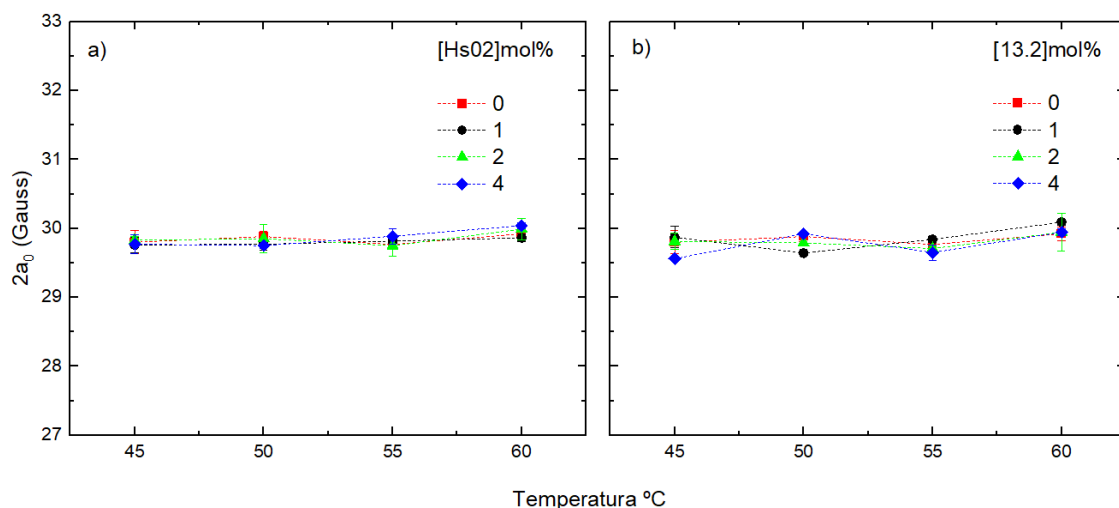


Figura 24: Desdobramento isotrópico ($2 a_0$) medido diretamente dos espectros da sonda 5-PCSL incorporada em vesículas fluidas de DPPC (3mM) em função da temperatura na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo

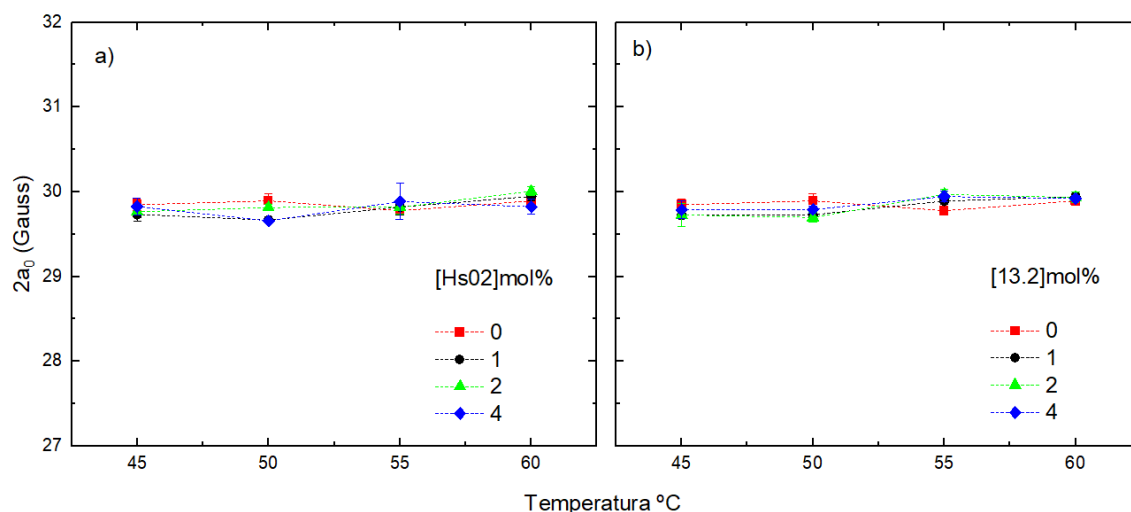


Figura 25: Desdobramento isotrópico ($2 a_0$) medido diretamente dos espectros da sonda 5-PCSL incorporada em vesículas fluidas de DPPC:POPS (3mM) em função da temperatura na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo

16-PCSL

As figuras 26 e 27 exibem os espectros de EPR da sonda 16-PCSL incorporadas em 3mM de vesículas fluidas (60 °C) de DPPC, respectivamente. Os espectros obtidos mostram que numa região de alta mobilidade. As modificações induzidas pelos peptídeos não são evidentes (Fig. 26 e 27), então utilizamos os parâmetros empíricos como discutido anteriormente.

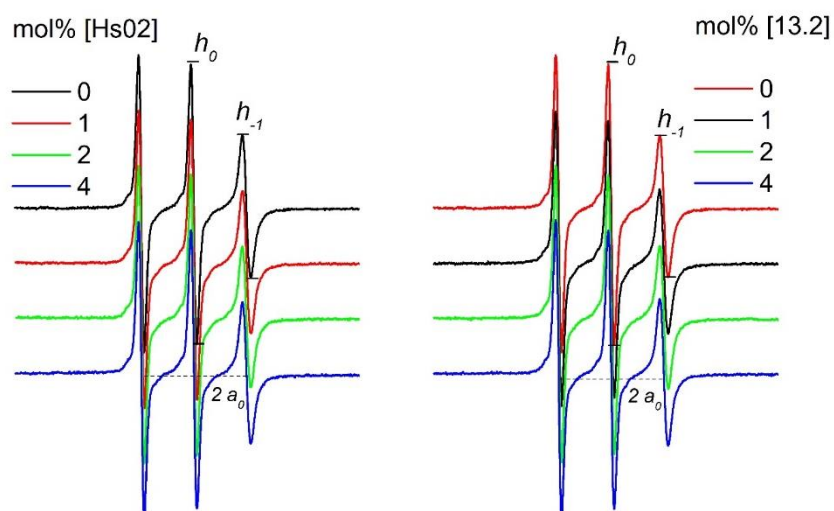


Figura 26: Espectros da sonda 16-PCSL incorporadas em vesículas fluidas (60 °C) de DPPC na ausência (linhas vermelhas) e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos Hs02 (coluna esquerda) e 13.2 (coluna direita).

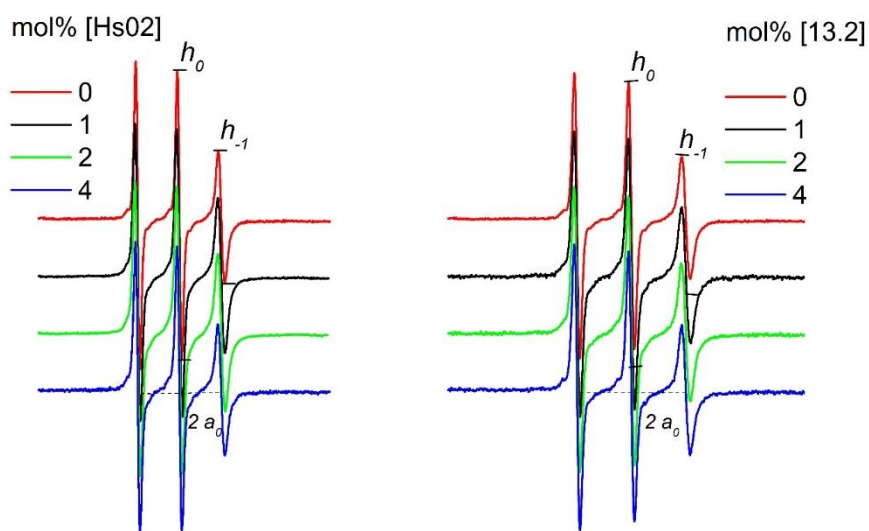


Figura 27: Espectros da sonda 16-PCSL incorporadas em vesículas fluidas (60 °C) de DPPC:POPS na ausência (linhas vermelhas) e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos Hs02 (coluna esquerda) e 13.2 (coluna direita).

A Figuras 28 expõe os dados obtidos a partir da razão das alturas relativas dos picos a alto campo e da linha central h_{-1}/h_0 para os dois peptídeos no sistema lipídico DPPC. É observado em ambos os peptídeos, ocorrendo em mais intensidade com o Hs02, que a razão h_{-1}/h_0 inicialmente aumenta, fluidificando a membrana e em seguida diminui os valores diminuem, mostrando um enrijecimento da membrana.

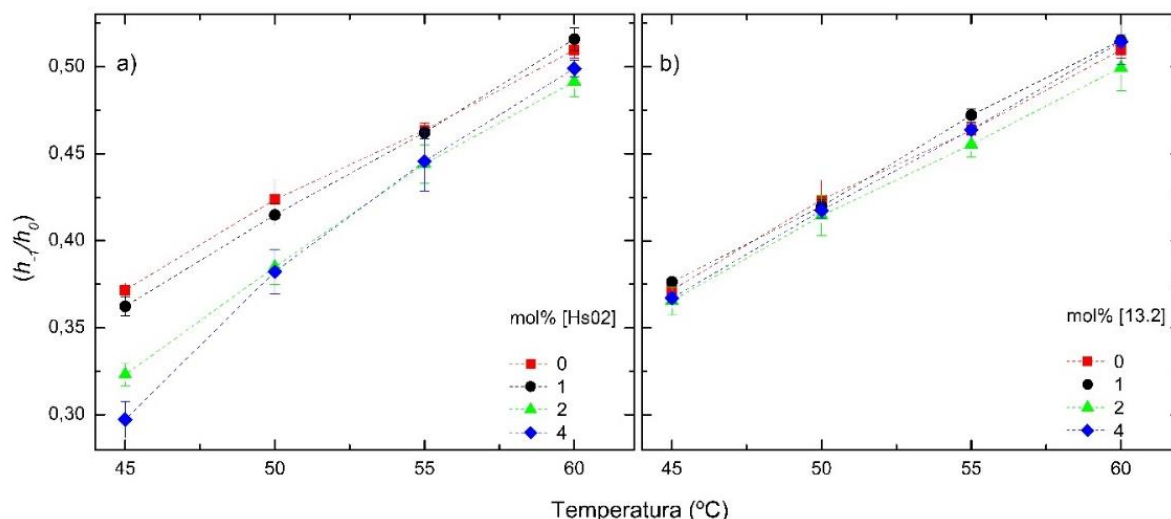


Figura 28: Razão entre as intensidades das linhas de alto campo e da linha central (h_{-1}/h_0), medidas diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada de vesículas DPPC (3mM) na fase fluida, em função da temperatura, na ausência e presença dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

No sistema lipídico DPPC:POPS é observado que com o peptídeo Hs02 ocorre uma fluidificação até a concentração de 2mol% e com 4mol% um enrijecimento da membrana, na região monitorada pelo 16-PCSL. Como contraponto a presença do peptídeo 13.2 ocorreu um pequeno aumento na fluidez em temperaturas mais elevadas no sistema DPPC:POPS na região central da bicamada. As moléculas que que aderem na superfície de uma membrana pode aumentar o empacotamento da bicamada próximo a superfície e fluidificar o centro da bicamada (ENOKI, 2016).

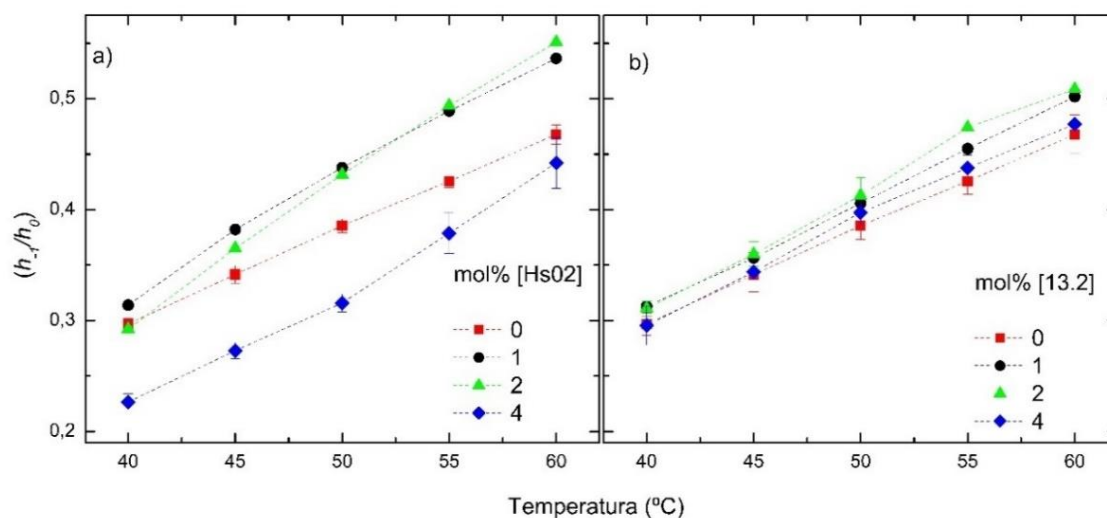


Figura 29: Razão entre as intensidades das linhas de alto campo e da linha central (h_{-1}/h_0), medidas diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada de vesículas aniônicas de DPPC:POPS

(3mM) na fase fluida, em função da temperatura, na ausência e presença dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo.

As figuras 30 e 31, apresentadas a seguir, expõem os gráficos de $2a_0$, que teve como objetivo analisar se houve mudança na polaridade das membranas na fase fluida. Não observando alterações na polaridade, tendo em vista a região do marcador no carbono 16.

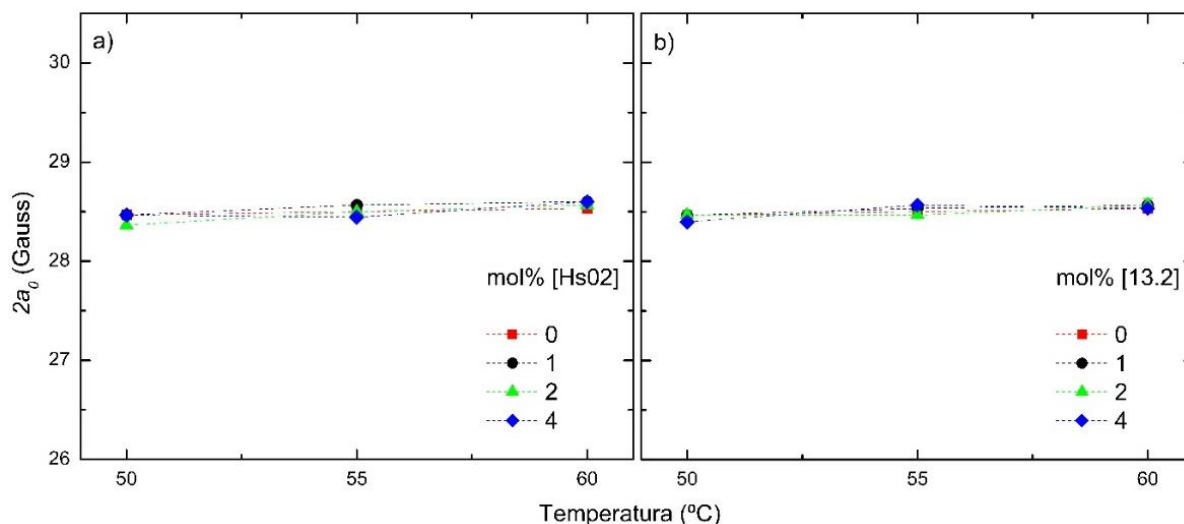


Figura 30: Desdobramento isotrópico ($2 a_0$) medido diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada em vesículas fluidas de DPPC (3mM) em função da temperatura na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo

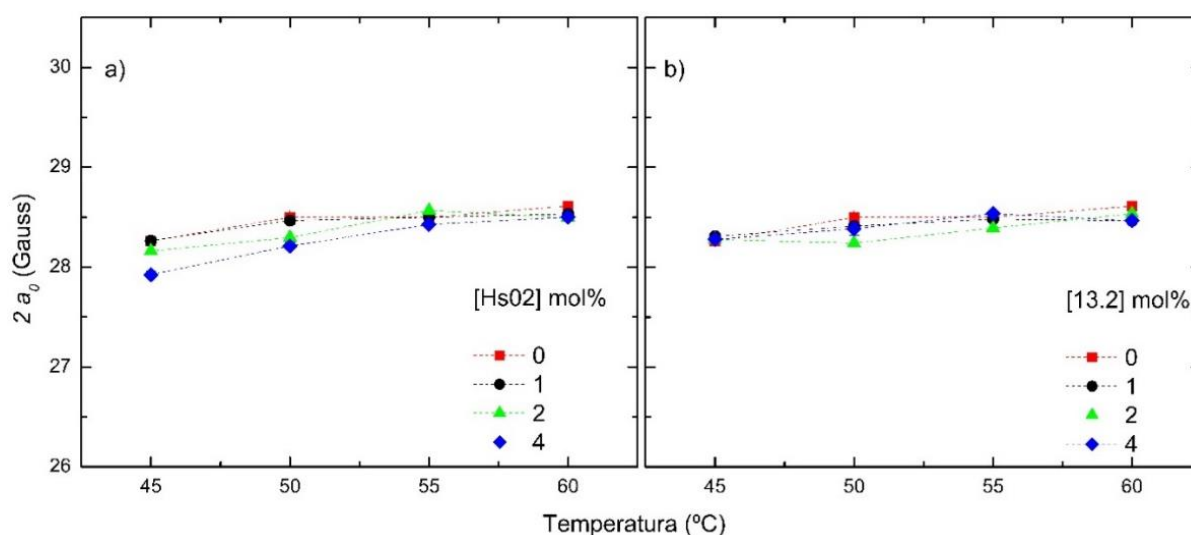


Figura 31: Desdobramento isotrópico ($2 a_0$) medido diretamente dos espectros da sonda 16-PCSL incorporada em vesículas fluidas de DPPC:POPS (3mM) em função da temperatura na ausência e na presença de diferentes concentrações dos peptídeos (a) Hs02 e (b) 13.2. As barras de erro indicam o desvio padrão e quando não exibidas, o desvio foi menor que o tamanho do símbolo

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o peptídeo Hs02 exerce efeitos distintos sobre as diferentes membranas lipídicas modelo. Na fase gel, o peptídeo Hs02 apresentou uma clara capacidade de modificar a mobilidade e o empacotamento das membranas. No sistema DPPC, o aumento da concentração do peptídeo levou a um empacotamento crescente na região superficial da membrana, conforme indicado pelo marcador 5-PCSL. Esse fenômeno também foi observado na membrana DPPC:POPS, onde o empacotamento foi ainda mais pronunciado. Na região central da bicamada (sonda 16-PCSL), o peptídeo Hs02 provocou o enrijecimento da membrana DPPC, embora o aumento da concentração do peptídeo não tenha causado variações significativas. No sistema POPS, o peptídeo também afetou o empacotamento na região central, especialmente em temperaturas mais baixas, sugerindo que sua ação é mais intensa em condições de maior ordem estrutural.

Na fase fluida, a ação do peptídeo Hs02 também varia. No sistema DPPC, a interação com o peptídeo resultou em um aumento na ordem efetiva na superfície da membrana (região do marcador 5-PCSL). O comportamento observado foi semelhante no sistema POPS, onde o aumento da concentração do peptídeo levou a uma maior fluidez da superfície da bicamada. No entanto, na região central da bicamada DPPC, o peptídeo provocou um aumento no empacotamento, dificultando a fluidez da membrana, conforme indicado pela sonda 16-PCSL. Já no sistema POPS, foi observado um comportamento bifásico: a membrana apresentou uma fluidificação até a concentração de 2 mol% de Hs02, seguida por um enrijecimento a 4 mol%, sugerindo um efeito de concentração dependente nessa região.

Podemos concluir, com os dados analisados, que o peptídeo 13.2 apresentou interações limitadas com as membranas lipídicas, tanto na fase gel quanto na fase fluida, com algumas diferenças entre as membranas DPPC e POPS, e dependendo da região da bicamada analisada. Na fase gel, o peptídeo 13.2 não mostrou perturbações significativas na região superficial da bicamada (marcador 5-PCSL) em nenhum dos sistemas lipídicos, com todos os resultados dentro da margem de erro experimental. No entanto, na região central da bicamada DPPC (marcador 16-PCSL), observou-se um pequeno empacotamento da membrana, sugerindo que o peptídeo modifica o sistema preferencialmente com essa região em vez da

superfície. No sistema POPS, porém, o peptídeo 13.2 não causou nenhuma alteração notável na região central da bicamada, indicando uma interação mínima com essa membrana.

Na fase fluida, o peptídeo 13.2 apresentou uma interação discreta com o sistema DPPC, sem causar modificações significativas na superfície da membrana, conforme indicado pelos resultados com o marcador 5-PCSL. Em contraste, no sistema POPS, o aumento da concentração do peptídeo levou a um aumento da ordem efetiva da membrana, resultando em uma maior fluidez na superfície da bicamada. Na região central da bicamada DPPC, monitorada pelo marcador 16-PCSL, também não foram observadas grandes alterações com a presença do peptídeo 13.2, reforçando sua baixa interação com essa membrana. No entanto, no sistema POPS, houve um pequeno aumento na fluidez da região central em temperaturas mais elevadas, sugerindo uma resposta dependente da temperatura nesse sistema específico.

Além disso, é relevante destacar que nenhuma alteração significativa na polaridade foi observada nas superfícies das bicamadas, independentemente do tipo de membrana ou e do peptídeo.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho, será possível compreender melhor a ação dos peptídeos Hs02 e de seu análogo 13.2 em diferentes membranas celulares. Além disso, o estudo com outras técnicas já estabelecidas para a interação de possíveis fármacos com membranas biológicas continua sendo válido, a fim de aprimorar essa compreensão.

6 REFERÊNCIAS

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, mar. 2007.

ALVES, A. C. et al. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 9, p. 2231–2244, set. 2016.

ANTHIS, N. J.; CLORE, G. M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. **Protein Science**, v. 22, n. 6, p. 851–858, jun. 2013.

BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.

BARITAKI, S. et al. Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications. Em: **Advances in Cancer Research**. [s.l.] Elsevier, 2007. v. 98p. 149–190.

BARTUCCI, R. Spin-Labeling EPR of Lipid Membranes. Em: ROBERTS, G. C. K. (Ed.). **Encyclopedia of Biophysics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 2431–2439.

BECHINGER, B.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Protein Science**, v. 2, n. 12, p. 2077–2084, dez. 1993.

BIRGE, R. B. et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 962–978, jun. 2016.

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45848, 28 set. 2012.

BRAND, G. D. et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220656, 6 ago. 2019.

CAO, Q. et al. Designing antimicrobial peptides using deep learning and molecular dynamic simulations. **Briefings in Bioinformatics**, v. 24, n. 2, p. bbad058, 19 mar. 2023.

CHAN, W.; WHITE, P. (EDS.). **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. [s.l.] Oxford University Press, 1999.

CORRÊA, J. S. et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, p. e20210589, 2022.

ENOKI, T. **Estudos da interação do peptídeo antimicrobiano KHya1 com membranas modelo**. [s.l.: s.n.].

ENOKI, T. A. et al. Antimicrobial Peptide K⁰-W⁶-Hya1 Induces Stable Structurally Modified Lipid Domains in Anionic Membranes. **Langmuir**, v. 34, n. 5, p. 2014–2025, 6 fev. 2018.

GOLDFARB, D.; STOLL, S. **EPR Spectroscopy: Fundamentals and Methods**. [s.l.: s.n.].

GRELL, E. (ED.). **Membrane Spectroscopy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981. v. 31

HEIMBURG, T. **Thermal biophysics of membranes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007.

HENDRICH, A.; MICHALAK, K. Lipids as a Target for Drugs Modulating Multidrug Resistance of Cancer Cells. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 1, p. 23–30, 1 jan. 2003.

HOLOHAN, B. et al. Perifosine as a potential novel anti-telomerase therapy. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 21816–21826, 9 set. 2015.

HORVÁTI, K. et al. Comparative analysis of internalisation, haemolytic, cytotoxic and antibacterial effect of membrane-active cationic peptides: aspects of experimental setup. **Amino Acids**, v. 49, n. 6, p. 1053–1067, jun. 2017.

HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 703–707, set. 2008.

HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 582779, 16 out. 2020.

HUANG, H. W. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347–8352, 1 jul. 2000.

JENSCHKE, B. Nitroxide spin probes and labels. 2014.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, jul. 2006.

KANG, S.-J. et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 12, p. 1477–1486, dez. 2014.

LE, C.-F.; FANG, C.-M.; SEKARAN, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02340-16, abr. 2017.

LLADÓ, V. et al. Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaChOleate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 6, p. 1619–1627, jun. 2014.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, ago. 2009.

MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; DÉCOUT, J.-L. Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides. **MedChemComm**, v. 7, n. 4, p. 586–611, 2016.

NUNES, J. B. **Desenho racional de peptídeos análogos ao HsO2 com ampliação de seletividade como agentes antimicrobianos.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2023.

OHMANN, A. et al. A synthetic enzyme built from DNA flips 107 lipids per second in biological membranes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2426, dez. 2018.

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. J. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, 14 out. 2016.

PEETLA, C. et al. Drug Resistance in Breast Cancer Cells: Biophysical Characterization of and Doxorubicin Interactions with Membrane Lipids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2334–2348, 6 dez. 2010.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, nov. 2003.

RIEDL, S. et al. In search of a novel target — Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 11, p. 2638–2645, nov. 2011.

ROZENFELD, J. H. K. et al. Structural insights on biologically relevant cationic membranes by ESR spectroscopy. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 633–647, out. 2017.

SIMONS, K.; SAMPAIO, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 10, p. a004697–a004697, 1 out. 2011.

VIGNOLI MUNIZ, G. S. et al. Interaction of synthetic antimicrobial peptides of the Hylin a1 family with models of eukaryotic structures: Zwitterionic membranes and DNA. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 24, p. 100827, dez. 2020.

VIGNOLI MUNIZ, G. S. et al. What different physical techniques can disclose about disruptions on membrane structure caused by the antimicrobial peptide Hylin a1 and a more positively charged analogue. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 243, p. 105173, mar. 2022.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 4 jan. 2016.

WANG, X. et al. Nosocomial outbreak of COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 6, p. 2000544, jun. 2020.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. G. Antimicrobial peptides. jan. 2016.

ZHU, X. et al. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 244–257, jan. 2014.

ZWAAL, R. F. A.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 9, p. 971–988, maio 2005.