



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS
MULTIFUNCIONAIS COM MODELOS DE
BIOMEMBRANAS**

JÉSSICA MIRANDA DO NASCIMENTO

**Recife
2014**

JÉSSICA MIRANDA DO NASCIMENTO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS
MULTIFUNCIONAIS COM MODELOS DE
BIOMEMBRANAS**

Tese submetida ao Doutorado do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

**Recife
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Jéssica Miranda do

Estudo da interação de peptídeos multifuncionais com modelos de biomembranas / Jéssica Miranda do Nascimento. – Recife: O Autor, 2014.

149 f.: il., fig., tab.

Orientadores: César Augusto Souza de Andrade, Maria Danielly Lima de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Peptídeos 2. Membranas (Biologia) I. Andrade, César Augusto Souza de (orient.) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorient.) III. Título.**

572.65

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-213

JÉSSICA MIRANDA DO NASCIMENTO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS MULTIFUNCIONAIS COM
MODELOS DE BIOMEMBRANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção
do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

APROVADA em 25/04/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo (1º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Física

Profª. Drª. Maria Tereza dos Santos Correia (2º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Bioquímica

Profª. Drª. Idjane Santana de Oliveira (3º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Centro Acadêmico de Vitória

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues (4º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (5º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Suplente Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Suplente Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Engenharia Mecânica

*Às pessoas mais importantes da minha vida,
minha família, com amor dedico.*

*“Aos outros eu dou o
direito de ser como são,
a mim, dou o dever de ser
cada dia melhor.”*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pelo seu infinito amor, por sempre estar guiando meu caminho, proporcionando alegrias e conforto nos momentos difíceis e por permitir a concretização de mais uma etapa da minha vida profissional.

À minha família pelo amor, confiança, dedicação e apoio, sem o qual certamente eu não teria conseguido chegar até aqui! Em especial, às pessoas mais importantes da minha vida: meus avós, Maria e José Miranda; minha mãe, Letícia; meus irmãos, Jonatha e Rebecca; meus tios, Betânia, Júlio, Otoniel (Tano), Kelly, Socorro e Will; meus primos Gabriel, Túlio, Maurício, Otoniel (Taninho), Elisângela e Josy, minha cunhada Diene e aos meus pequenos Matheus, Arthur e José Alencar.

Ao Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade pela oportunidade, orientação, disponibilidade, ensinamentos e pela confiança que me fez seguir para conclusão deste objetivo.

À Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira pela oportunidade, co-orientação, disponibilidade, apoio e ensinamentos durante estes quatro anos de caminhada.

Aos colegas e ex-colegas do Grupo de Biodispositivos Nanoestruturados que me acompanharam durante esses quatro anos: Alisson, Beatriz, Débora, Elton, Estéfani, Gilcélia, Karen, Jadilson, Jair, Jordana, Maurília e Tallita. Obrigada pela amizade, incentivo, apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

A Vinícius Jackes, meu anjo da guarda e guarda-costas (rsrs..), pela amizade, ajuda no laboratório, pelo incentivo e, sobretudo, pelo carinho.

A todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Inovação Terapêutica.

A Prof^a. Suely Galdino (*in memorian*) pelo exemplo, pela dedicação ao programa, pela força, incentivo e ensinamentos.

Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano, por ser esse funcionário exemplar, sempre disposto a ajudar a todos os alunos sem medir esforços. Meu muito obrigado por sua dedicação e disponibilidade.

À Rede Nanobiotecnologia-CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Octávio Luiz Franco e a todos o Grupo de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília pelos peptídeos cedidos e pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Celso Pinto de Melo por disponibilizar o laboratório para realização dos experimentos e a todos do Grupo de Polímeros Não-Convencionais pelos ensinamentos e ótimos momentos durante minha estadia no laboratório.

A Sandro Lima pela amizade, força e pelos seus preciosos conhecimentos físicos.

Aos funcionários do Departamento de Física pela disponibilidade e ensinamentos. Em especial, aos técnicos Virgínia, Sérgio e Tarcyla.

Ao Prof. Dr. Miguel Castanho pela oportunidade, disponibilidade e preocupação para que sempre eu esteja bem e que tudo ocorra da melhor maneira possível durante meu estágio no Instituto de Medicina Molecular na Universidade de Lisboa. A todos que fazem parte da Unidade de Bioquímica Física e da Unidade de Biomembranas, pela excelente recepção e disponibilidade durante o período que passei em Lisboa. Em especial, à Prof^ª. Salomé, a Diana e a Antônia, pelos ensinamentos, acompanhamento e pelo incentivo.

A todos da Residência Universitária do ISCTE-IUL, minha família portuguesa, pela recepção, amizade, momentos de descontração, pelo apoio e abraços nos momentos difíceis que certamente me deram força nos momentos finais da conclusão da tese. Em especial, a Drielle, Tammye, João, Núbia, Neuzi, Gefra, Sarah e Fernanda.

A Renata Santos, minha amiga doutora, por ter se tornado uma amiga tão especial, pelas longas conversas, pela disponibilidade e apoio nos momentos difíceis e pelos almoços e picolés 100% gordura *trans*! (rsrsrs...)

A Helena Bastos (Biel) pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos destes quatro anos.

As minhas ex-professoras e ex-orientadoras, Marília França, Rita Moura, Neide Santos e Maria José por ter me motivado a entrar na carreira acadêmica, pela torcida e amizade que me acompanha até hoje e pelos conselhos e ensinamentos que certamente refletiram para que eu concluísse esta etapa.

As minhas amigas da faculdade, Camilla, Érika, Luzete, Manuela, Marcia, Maria Juliana e Naara, pela amizade, torcida, apoio e momentos de descontração.

À Aliny Almeida e Flávia Arruda pela amizade, companheirismo, disponibilidade, farras, pelas palavras de incentivo e pelo apoio nos momentos que eu mais precisei.

Aos meus amigos Ana Lúcia, Bruna, Cristiane, Érica, Cristiane, Francimary, Ituza, Leila, Marilian, Marko e Merilane, pela amizade e apoio durante a minha caminhada.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
CÓDIGOS DOS AMINOÁCIDOS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO 2	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Infecções hospitalares e seus principais patógenos	6
2.2. Peptídeos com atividade antimicrobiana	8
2.3. Organização das membranas biológicas	13
2.4. Interação peptídeo-membrana e mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	16
2.5. Fundamentação teórica das técnicas analíticas utilizadas no estudo da interação peptídeo-membrana	19
2.5.1. Espectroscopia de Impedância	19
2.5.2. Voltametria Cíclica	26
2.5.3. Espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície	29
2.5.4. Espalhamento dinâmico de luz e Potencial zeta	34
2.5.5. Espectroscopia de Fluorescência	37
CAPÍTULO 3	41
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
CAPÍTULO 4	43
4. METODOLOGIA	44

4.1. Materiais	44
4.2. Métodos	45
4.3. Infraestrutura	50
CAPÍTULO 5	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CAPÍTULO 6	84
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	85
CAPÍTULO 7	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO 8	100
8. ANEXOS	101
8.1. Anexo 1	102
8.2. Anexo 2	110
8.3. Anexo 3	124

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Estrutura de uma enterobactéria. Fonte: www.sobiologia.com.br. 7
- Figura 2.** Estrutura α -helicodal da magainina I. Fonte: <http://www.agtcbioproducs.com/magainin-1-11238729.html>. Disponível em 20/03/2014. 9
- Figura 3.** Classes estruturais dos peptídeos antimicrobianos. Estruturas em α -hélice (a), folha- β (b), estrutura dobrada (c) e estrutura estendida (d). Fonte: Jenssen et al., 2006. 9
- Figura 4.** Estrutura do peptídeo anticongelante tipo I obtido da solha de inverno. Fonte: Kuiper et al., 2002. 12
- Figura 5.** Membrana plasmática (modelo do mosaico fluido) de eucariotos. Fonte: <http://www.enemvirtual.com.br/membrana-plasmatica-2/>. 14
- Figura 6.** Membrana plasmática de bactérias. A) Bactéria Gram-negativa; B) Bactéria Gram-positiva. Fonte: www.infoescola.com.br. 15
- Figura 7.** Estrutura de um lipossoma (a) e bicamada lipídica plana automontada sobre suporte sólido (b). Fonte: <http://djalmasantos.wordpress.com/2011/02/26/clonagem-genica-2/> (adaptada). Disponível em 31/07/2013. 16
- Figura 8.** Diagrama esquemático de diferentes mecanismos de associação peptídeo-membrana. O peptídeo (em laranja) em solução aquosa se adapta a uma estrutura em α -hélice. Na primeira etapa, os peptídeos se ligam a membrana (em azul) por interações eletrostática. Subsequentemente, na segunda etapa, os peptídeos se auto-organizam na bicamada lipídica, induzindo a formação de poros seguindo o modelo barril (a) ou poro toroidal (b), ou desestabilizando a membrana seguindo modelo carpete (c) ou detergente (d). 18
- Figura 9.** Representação esquemática de um circuito equivalente sobre a interface eletrodo/solução. O elemento R_{CT} corresponde a resistência à transferência de carga, o C_{dl} , a capacitância da dupla camada elétrica e R_{Ω} , a resistência da solução. Fonte: Figura adaptada de Damos et al., 2004. 21
- Figura 10.** Gráficos da impedância. (A) Gráfico de Nyquist; (B) Gráficos de Bode. $-Z''$ = componente imaginária da impedância; Z' = componente real da impedância; ω = frequência; R_{Ω} = resistência de solução; R_{CT} = resistência de transferência de carga; $|Z|$ = módulo da impedância. Fonte: Damos et al. (2004). 22

Figura 11. Modelo do circuito de Randles. R_s = resistência de solução; C_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_e = resistência de transferência de carga do eletrodo; W = elemento de Warburg.	23
Figura 12. Distribuição de íons em solução mostrando diferentes camadas representativas (acima) e comparação da interface eletrodo/solução com um capacitor do circuito elétrico (modelo de Helmholtz) (abaixo). Fonte: Lima, 2010, com modificações.	24
Figura 13. Representação esquemática de um potentiostato/galvanostato (esquerda) e uma célula eletroquímica de três eletrodos (direita). ET = eletrodo de trabalho; ER = eletrodo de referência e CE = contra-eletrodo.	25
Figura 14. Variação da aplicação do potencial com varredura linear <i>versus</i> o tempo em voltametria cíclica (A) e esquema representativo de um voltamograma cíclico (B). E_{p+} e E_{p-} são os picos de potencial anódico e catódico, e i_{p+} e i_{p-} são os picos de corrente anódico e catódico, respectivamente.	28
Figura 15. Fenômeno de ressonância de plásmons superficiais. Após a incidência de uma fonte de luz sobre a partícula de ouro (em vermelho) ocorre a interação da luz com os elétrons livres (em amarelo) resultando numa oscilação de densidade de carga, ou seja, o fenômeno de RPS. Fonte: http://www.olharnano.com/artigos/4001/21001/Resson%C3%A2ncia-plasm%C3%B4nica-e-as-cores-das-nanopart%C3%ADculas . Disponível em 30/07/2013.	30
Figura 16. Exemplo esquemático de um perfil de adsorção de uma proteína monitorado por RPS. Fonte: Green et al. (2000).	31
Figura 17. Representação esquemática da RPS e formação do campo evanescente baseado na configuração de Kretschmann. Os ângulos de RPS θ_{SPR_1} e θ_{SPR_2} representam a fonte de luz na presença e ausência de espécimes sobre o filme metálico, respectivamente. K_{ps} é o vetor de onda de uma superfície de plasma.	32
Figura 18. Representação esquemática da dupla camada que circunda uma partícula em meio aquoso. O potencial que existe no plano de cisalhamento é conhecido como potencial zeta. Fonte: http://nanocomposix.com/kb/general/characterization-techniques . Disponível em 25/03/2014.	36
Figura 19. Diagrama de Jablonski, representando os fenômenos de absorção e relaxação de uma molécula. Fonte: Sotomayor et al., 2008.	38
Figura 20. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto. Fonte: Coelho, 2004.	38
Figura 21. Princípio do vazamento de vesículas com um marcador que	40

apresenta auto-supressão.

CAPÍTULO 4

Figura 1. Representação esquemática da adsorção de lipossomas (com ou sem Synp) sobre um eletrodo de ouro modificado com MPTS e a posterior ação da MagI. 46

CAPÍTULO 5

Figura 1. Imagens de MEV da CF (a), CF-MagI (c), CF-Synp (e) e CF-Synp-MagI (g) e suas imagens 3D correspondentes: CF (b), CF-MagI (d), CF-Synp (f) e CF-Synp-MagI (h). Em rosa são as regiões com maior altura e em roxo representa menor altura. As setas mostram os poros formados após a ação da MagI. 54

Figura 2. Voltamograma cíclico do eletrodo em diferentes estágios de modificação. 55

Figura 3. Gráficos de Nyquist do eletrodo em diferentes estágios de modificação. Os símbolos mostram os resultados obtidos através de EIS e as linhas representam os dados após ajuste. 56

Figura 4. Circuito equivalente utilizado no ajuste dos dados da impedância. R_s = resistência de solução; C_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_{CT} = resistência de transferência de carga; W = elemento de Warburg. 57

Figura 5. Gráfico de Bode do eletrodo em diferentes estágios de modificação. 60

Figura 6. R_{CT} versus tempo para CF e CF-Synp exposta à MagI. 61

Figura 7. Resposta em tempo real da adsorção dos lipossomas (com ou sem Synp) sobre o eletrodo modificado na presença da MagI. 62

Figura 8. Diagramas de Nyquist após diferentes etapas de modificação: eletrodo limpo e após a deposição da membrana de DPPC (a), camada de lipídio após a adição dos peptídeos *Pa*-MAP (b) e LL-37 (c) em diferentes concentrações (os quadrados cheios representam a concentração de 10 µg/mL e os quadrados vazios 100 µg/mL) e potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0.5V e em verde, 1V). 66

Figura 9. Representação esquemática do eletrodo modificado pela camada lipídica (esquerda) e o circuito equivalente correspondente (direita). Os elementos R_s e C_m corresponde a resistência da solução e a capacitância da dupla camada elétrica, respectivamente. Os elementos em série R_m e CPE 68

corresponde à resistência da membrana e ao elemento de fase constante, e os elementos em paralelo C_e e R_e corresponde à capacitância da dupla camada elétrica e resistência do eletrodo.

Figura 10. Resistência da membrana *versus* o tempo em diferentes potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0.5V e em verde, 1V). Em (a,b) a concentração usada foi de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (quadrados cheios) e em (c, d) de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (quadrados vazios). *Pa*-MAP e LL-37 foi adicionado no 30º minuto. 69

Figura 11. Gráfico de Bode do eletrodo modificado pela membrana lipídica antes (a) e após a adição do *Pa*-MAP (b) e do LL-37 (c) em diferentes concentrações (os quadrados cheios representam a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ e os quadrados vazios $100 \mu\text{g/mL}$) e potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0.5V e em verde, 1V). 73

Figura 12. Imagens de MEV da camada de DPPC antes (a) e após a exposição de *Pa*-MAP (b) e LL-37 (c). 75

Figura 13. Análise de *docking in silico* do *Pa*-MAP com a membrana de DPPC. (A) *Box plot* de 335 modelos de interação classificados de acordo com a energia livre. (B) visualização de *Pa*-MAP frente a membrana de DPPC mostrando a inserção dos peptídeos e (C) visualização aumentada mostrando a interação do peptídeo com a membrana lipídica sendo visualizado detalhes da interação, na tabela é apresentado a posição dos lipídios e dos aminoácidos com os respectivos nomes de átomos e o comprimento da interação. 77

Figura 14. Distribuição de tamanho das vesículas de POPC e POPC:POPG antes e após a exposição dos peptídeos ClavA (a) e ClavX (b). O detalhe é o aumento da região que apresenta partículas de até 500nm de diâmetro. 80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5(6)-CF	5(6)-carboxifluoresceína
AC	Corrente alternada (do inglês <i>Alternating Current</i>)
AFP	Antifreeze peptide
AMP	Antimicrobial peptide
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Contra-eletrodo
CF	Camada fosfolipídica de Epikuron
ClavA	Clavanina A
ClavX	Clavanina X
CMC	Concentração micelar crítica
COL	Colesterol
CPE	Elemento de fase constante (do inglês <i>Constant Phase Element</i>)
Da	Dalton
dc	Corrente direta (do inglês <i>Direct current</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPG	Difosfatidilglicerol (do inglês <i>diphosphatidylglycerol</i>)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (do inglês <i>Dipalmitoylphosphatidylcholine</i>)
EDL	Espalhamento dinâmico de luz
EIE	Espectroscopia de impedância elétrica
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EP	Epikuron
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	Hexacianoferrato
Fmoc	N-9-fluorenilmetiloxycarbonilo
Hz	Hertz

He-Ne	Helium-Neon
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>)
Lip	Lipossomas
lisilPG	Fosfatidilglicerol esterificados com L-lisina
LPS	Lipopolissacarídeos
LUV	Vesículas unilamelares grandes (do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
MagI	Magainina I
MagII	Magainina II
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MLV	Vesículas multilamelares (do inglês <i>Multilamellar Vesicles</i>)
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPTS	3 –mercaptopropiltrimetoxisilano
MRP	Modelo de reações paralelas
nm	Nanômetro
PACs	Peptídeos anticongelantes
<i>Pa</i> -MAP	Peptídeo anticongelante multifuncional de <i>Pleuronectes americanus</i>
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Fosfatidilcolina (do inglês <i>Phosphatidylcholine</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (do inglês <i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PEO	Poli(óxido de etileno) (do inglês <i>Poly(ethylene oxide)</i>)
PG	Fosfatidilglicerol (do inglês <i>Phosphatidylglycerol</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPO	poli(óxido de propileno) (do inglês <i>Poly(propylene oxide)</i>)
PS	Fosfatidilserina (do inglês <i>Phosphatidylserine</i>)

RPM	Rotação por minuto
RPS	Espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície
SM	Esfingomielina (do inglês <i>Sphingomyelin</i>)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês Small <i>Unilamellar Vesicles</i>)
Synp	Synperonic
VC	Voltametria cíclica
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio

LISTA DE SÍMBOLOS

ω	Frequência angular
%	Percentual
$ Z $	Módulo da impedância
ϕf	Eficiência quântica de fluorescência
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
A	Área
α	Coeficiente de transferência
c	Velocidade da luz no vácuo
C	Concentração
C_{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica
C_m	Capacitância da membrana
d	Espessura da membrana
D	Coeficiente de difusão
E	Potencial
E_p	Pico de pontecial
ε	Permissividade
$\mathcal{E}$	Constante dielétrica
F	Faraday
i	Corrente elétrica
i_p	Pico de corrente
I_A	Intensidade da radiação absorvida
I_F	Intensidade da radiação fluorescente

K_{ev}	Vetor de onda do campo evanescente
K_{ps}	Vetor de onda de uma superfície de plasma
m^o	Miligraus
N	Constante de transferência de elétrons do par redox
n	Homogeneidade da membrana
R	Constante dos gases
R_{CT}	Resistência à transferência de carga
R_h	Raio hidrodinâmico
R_e	Resistência à passagem de corrente elétrica
R_m	Resistência de transferência de carga da membrana
R_s	Resistência da solução
T	Temperatura
U	Mobilidade
V	Volt
W	Elemento de Warburg
w_0	Frequência da luz incidente
Z	Impedância
Z'	Componente real da impedância
Z''	Componente imaginária da impedância
ΔR_{CT}	Variação da resistência à transferência de carga
ζ	Zeta
η	Viscosidade
η_g	Índice de refração do meio denso (vidro)
η_s	Índice de refração do meio dielétrico

Ω	Ohm
θ	Ângulo de incidência da luz
κ^0	Constante da taxa de transferência de carga
λ	Comprimento de onda
ϕ	Ângulo de fase

CÓDIGOS DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código (1 letra)	Código (3 letras)
Alanina	A	Ala
Fenilalanina	F	Phe
Glutamina	Q	Gln
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Triptofano	W	Trp
Valina	V	Val
Asparagina	N	Asn
Cisteína	C	Cys
Glicina	G	Gly
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Arginina	R	Arg
Histidina	H	His
Lisina	K	Lys
Aspartato	D	Asp
Ácido glutâmico	E	Glu

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Peptídeos estudados e suas respectivas sequências.	44
Tabela 2. Infraestruturas utilizadas no desenvolvimento do trabalho.	50

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados e dos picos de corrente dos voltamogramas.	59
Tabela 2. Potencial zeta e tamanho de partículas com ou sem Synp em função da presença da MagI.	64
Tabela 3. Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados.	71
Tabela 4. Valores de potencial zeta (ζ) para as vesículas de POPC e POPC:POPG antes e após a exposição da ClavA e ClavX.	81
Tabela 5. Valores percentuais dos ensaios de permeabilização de vesículas após a atuação dos peptídeos antimicrobianos.	83

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) e os peptídeos anticongelantes (PACs) constituem uma nova classe de agentes antimicrobianos que desempenham sua função através da desestabilização das membranas, levando à morte do microrganismo. Este fato tem direcionado vários estudos para a compreensão dos mecanismos de ação destes peptídeos. Por outro lado, um dos principais problemas na utilização dos PAMs como princípio ativo é devido a eles serem compostos lábeis, podendo ser facilmente degradados. O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada (SLC), como por exemplo, lipossomas capazes de carrear esses PAMs, seria uma alternativa promissora para o uso desses peptídeos como agentes antimicrobianos. Desta forma, nesta tese utilizamos diferentes técnicas espectroscópicas (voltametria cíclica, impedância, ressonância de plásmons de superfície, espalhamento de luz e fluorescência) para elucidar os mecanismos de ação dos PAMs MagaininaI, LL-37, Clavanina A e Clavanina X e do PAC *Pa*-MAP usando modelos de membranas e estudamos um SLC revestido com o copolímero em bloco Synperonic. Todos os PAMs estudados apresentaram grande capacidade para desestabilizar membranas, demonstrando o potencial desses peptídeos como agentes antimicrobianos. O *Pa*-MAP apresentou a habilidade em desestabilizar as membranas lipídicas no primeiro minuto de exposição, atuando através do modelo carpete, sendo este mecanismo descrito pela primeira vez para este PAC. Foi mostrado, também pela primeira vez, um possível SLC para PAMs utilizando vesículas lipídicas revestidas com o copolímero Synperonic. A importância do copolímero tribloco para estabilizar lipossomas foi demonstrada, uma vez que os lipossomas sem o revestimento foram instáveis, devido à formação de poros pelo peptídeo, o que não foi observado para os lipossomas revestidos. Os resultados obtidos fornecem contribuições importantes para a compreensão da interação peptídeo-membrana através de parâmetros eletroquímicos, dielétricos, ópticos e morfológicos, além de poder contribuir para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de drogas para peptídeos antimicrobianos baseados em lipossomas.

Palavras-chave: peptídeo antimicrobiano; peptídeo anticongelante; membranas biológicas; mecanismo de interação; técnicas espectroscópicas.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) and antifreeze peptides (AFPs) constitute a new class of antimicrobial agents that perform their function through the destabilization of the membranes, leading to death of the microorganism. This fact has directed several studies to understand the mechanisms of action of these peptides. Moreover, a major problem in using AMPs as the active ingredient is because they are labile compounds and can be easily degraded. The development of a controlled release system (CRS), as for example, liposomes capable of carrying these PAMs would be a promising alternative to the use of these peptides as antimicrobials. Thus, this thesis used different spectroscopic techniques (cyclic voltammetry, impedance, surface plasmon resonance, light scattering and fluorescence) to elucidate the mechanisms of action of PAMs Magainin I, LL -37, Clavanin A e Clavanin X and of AFP *Pa*-MAP using model membranes and studied a CRS coated with block copolymer Synperonic. All APMs studied showed great ability to destabilize membranes, demonstrating the potential of these peptides as antimicrobial agents. *Pa*-MAP had the ability to destabilize lipid membranes in the first minute of exposure, acting through the model carpet, and this mechanism first described for this AFP. It has been shown, again for the first time, a possible CRS to PAMs using lipid vesicles coated with the copolymer Synperonic. The importance of triblock copolymer to stabilize liposomes was demonstrated, since the coating without liposomes were unstable due to pore formation by the peptide, which was not observed for the coated liposomes. The results provide important information for the understanding of peptide/membrane interaction contributions through electrochemical, dielectric and optical parameters, and can contribute to the development of new drug delivery systems for antimicrobial peptides based on liposomes.

Keywords: antimicrobial peptide, antifreeze peptide; biological membranes; interaction mechanism; spectroscopic techniques.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos pela população é um fator de risco de extrema relevância para o surgimento e disseminação de resistência dos microrganismos. Desta forma, há uma crescente e intensa busca por novas classes de agentes antimicrobianos (Oren e Shai, 1998; Mandal et al., 2009). Nos últimos anos, um grande número de compostos proteicos com efeitos deletérios para microrganismos, conhecidos como peptídeos antimicrobianos (PAMs), tem sido isolado de numerosas fontes, tais como plantas e animais, incluindo o homem. Estes peptídeos são componentes essenciais da imunidade inata, constituindo um mecanismo de defesa ancestral encontrado em diversos organismos (Hancock, 1997; Ganz e Lehrer, 1998; Mihajlovic e Lazaridis, 2010).

Outra classe de peptídeos multifuncionais que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral são os peptídeos anticongelantes (PACs), os quais são encontrados em organismos que habitam regiões congeladas (Gong, et al., 1996; Zhang et al., 2001). Os PACs têm sido comumente caracterizados a partir do peixe solha de inverno (*Pleuronectes americanus*) pela presença de dois peptídeos, os quais apresentam baixas massas moleculares, nomeados HPLC-6 (4000 Da) e HPLC-8 (3300 Da) (Gong et al., 1996). O *Pa*-MAP (Peptídeo Anticongelante Multifuncional de *P. americanus*) foi projetado e construído a partir de HPLC-8 (Gong et al., 1996). A estrutura tridimensional do *Pa*-MAP consiste de uma α -hélice rica em alanina (Hew et al., 1985). Estudos anteriores mostram que o *Pa*-MAP foi capaz de controlar o desenvolvimento de vários patógenos, incluindo vírus, fungos e bactérias, mas não promoveram danos as células de mamíferos (Tomczak et al., 2002, Migliolo et al, 2012; Teixeira et al., 2013).

Em geral, os PAMs e PACs interagem com as membranas dos microrganismos levando à formação de poros e/ou desestabilização das mesmas e, posteriormente, resultando na morte microbiana (Tomczak et al., 2002; Wang et al., 2004; Migliolo et al., 2012). Desta forma, o estudo da interação peptídeo-membrana torna-se importante para determinar o mecanismo de ação dos peptídeos. No entanto, as membranas biológicas são estruturas complexas e heterogêneas compostas por centenas de lipídios e proteínas e com domínios de composição distinta (Feigenson, 2007; van Meer et al., 2008). Por essa razão, modelos de membranas simples são comumente usados para distinguir o papel dos diferentes componentes celulares sobre o modo de ação dos

peptídeos, dentre os quais se podem destacar as membranas suportadas e os lipossomas (pequenas vesículas formados por agregados lipídicos) (Simon e McIntosh, 2002; Jelinek e Kolusheva, 2005; Lohner et al., 2008).

O uso de lipossomas como sistemas de liberação controlada (SLC) também seria uma opção para o emprego de PAMs e PACs como agentes antimicrobianos em medicamentos, pois poderia facilitar a introdução dos peptídeos no organismo, uma vez que, os peptídeos são compostos labéis que podem ser facilmente degradados pelo organismo antes mesmo de sua atuação (Tan et al., 2010). Porém, uma das dificuldades para o uso de vesículas lipídicas para liberação de PAMs ou PACs é devida aos seus mecanismos de ação, os quais provocam a desestabilização e/ou formação de poros nas membranas. Desta forma, uma alternativa para o uso destes peptídeos como agentes antimicrobianos seria através do uso de formulações lipossomais resistentes à ação dos mesmos, mas com a capacidade de transportá-los.

Vários estudos têm avaliado a estabilização estérica de lipossomas por adsorção de glicolípídios e polímeros solúveis em água (incluindo os copolímeros triblocos) sobre a superfície externa dessas vesículas lipídicas (Kostarelos et al., 1998; Barenholz, 2001; Vasir e Labhasetwar, 2007). O Synperonic F68 (Synp), também conhecido como pluronic ou poloxamer, é um copolímero tribloco fortemente hidrofílico de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) aplicado em sistemas de liberação de drogas e de genes como adjuvantes biológicos (Bromberg et al, 2006; Fusco et al, 2006).

Apesar das numerosas pesquisas direcionadas para o estudo dos mecanismos de ação dos peptídeos (Papo e Shai, 2003; Brogden, 2005; Nicolas, 2009; Jelinek e Kolusheva, 2005; Nguyen et al., 2011), diversas questões sobre estes mecanismos necessitam ser elucidadas. A técnica mais tradicional usada para o estudo da desordem de membranas por PAMs é a espectroscopia de fluorescência, empregada em ensaios de vazamento de vesículas, os quais utilizam sondas fluorescentes para examinar a fuga de compostos polares através das membranas de vesículas lipídicas, como um resultado da ação do PAM (Ladokhin e White, 2001, Torcato et al., 2012). As técnicas com base na teoria de dispersão de luz, tais como a técnica de espalhamento dinâmico de luz (EDL) e a de potencial zeta (ζ), também têm sido utilizadas para determinar o tamanho e o comportamento de agregação de peptídeos em solução, quer isoladamente ou interagindo com outras partículas, tais como vesículas lipídicas (Santos et al., 1997; Philo, 2006; Domingues et al., 2008; Freire et al., 2011; Torcato et al., 2012).

Nos últimos anos, outras técnicas espectroscópicas vêm sendo empregadas como técnicas alternativas nos estudos de interações peptídeo-membrana, dentre as quais destaca-se a espectroscopia de impedância (dielétrica ou eletroquímica), ressonância de plásmons de superfície e voltametria cíclica. Estas técnicas têm apresentado grande sucesso nos estudos de interação, uma vez que são técnicas sensíveis, permitindo o monitoramento de interações moleculares em tempo real (Mozsolits et al., 2001; Hall et al., 2003; Chang et al., 2008b; Sugihara et al., 2012; Oliveira et al., 2013).

Portanto, a partir do exposto, foram utilizadas diferentes técnicas espectroscópicas para elucidar os mecanismos de ação entre modelos de membranas e os peptídeos antimicrobianos Magainina I, *Pa*-MAP, LL-37, Clavanina A e Clavanina X, além de estudar um SLC revestido com o copolímero em bloco Synperonic. Desta forma, a Tese foi estruturada em oito capítulos, como seguem:

- No primeiro capítulo é apresentada a introdução, a qual consta a importância do uso dos PAMs e PACs e sua interação com membranas, a relevância do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para peptídeos, além das principais técnicas empregadas nestes estudos.
- O segundo capítulo é referente à revisão da literatura sobre infecções hospitalares e seus principais patógenos, peptídeos com atividade antimicrobiana, organização das membranas biológicas, interação peptídeo-membrana e mecanismos de ação dos PAMs, além da fundamentação teórica das técnicas analíticas para o estudo da interação peptídeo-membrana (espectroscopia de impedância, voltametria cíclica e espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície, espectroscopia de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta).
- No terceiro e quarto capítulo estão descritos os objetivos geral e específicos e a metodologia, respectivamente.
- Os capítulos 5 e 6 são referentes aos resultados e discussão e às conclusões e perspectivas futuras da tese, respectivamente.
- No capítulo 7 constam as referências bibliográficas.
- Finalmente, no capítulo 8 encontram-se os anexos.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Infecções hospitalares e seus principais patógenos

Infecção hospitalar é um importante problema de saúde pública, porque ocorrem com elevada frequência e afeta todos os países, causando morbidade e mortalidade (WHO, 2009). No Brasil, a infecção hospitalar é causa de grande preocupação das instituições de saúde. Segundo o Ministério da Saúde a média mundial de índice de infecção é 5%, enquanto o Brasil apresenta o percentual de 15,5% (Bibliomed, 2010). De acordo com o Panorama do Controle da Infecção Hospitalar no Brasil, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a incidência de infecção hospitalar no país é de nove ocorrências a cada 100 pessoas internadas, um número que preocupa bastante as instituições de saúde (Duo, 2009).

Agravando esta situação, a resistência dos microrganismos ao tratamento com antimicrobianos vem aumentando rapidamente em todo o mundo com grande impacto na efetividade da assistência à saúde, principalmente no âmbito hospitalar (WHO, 2009). Neste contexto, o uso indiscriminado de antibióticos pela população é um fator de risco importante para o aparecimento e disseminação dessa resistência. Dentre os microorganismos causadores de infecções hospitalares, estão as bactérias da família Enterobacteriaceae que inclui os gêneros *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia sp.*, *Enterobacter sp.*, entre outros. Além disso, também estão inclusos os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Anaissie et al., 2002; Paterson, 2006).

As enterobactérias (Fig. 1) são bacilos gram-negativos encontrados amplamente na natureza e em mamíferos, habitando o intestino e fazendo parte da microbiota normal ou como agentes de infecção (Murray et al., 2006). As enterobactérias podem ser causadoras de infecções intestinais e extra-intestinais. As causadoras de infecções intestinais são normalmente denominadas de enteropatogênicas e incluem diversas cepas de *Escherichia coli*, sorotipos de *Shigella* e *Salmonella*, e alguns sorotipos de *Yersinia*. Todavia, algumas cepas de *Salmonella* e *Yersinia* podem atravessar a mucosa intestinal provocando inúmeras bacteremias, bem como infecções em diferentes órgãos. Os fatores determinantes para a virulência das enterobactérias no intestino de humanos incluem as adesinas, exotoxinas e outras substâncias ainda não identificadas que promovem a invasão do epitélio intestinal a depender do gênero patogênico (Trabulsi e Alterthum, 2008).

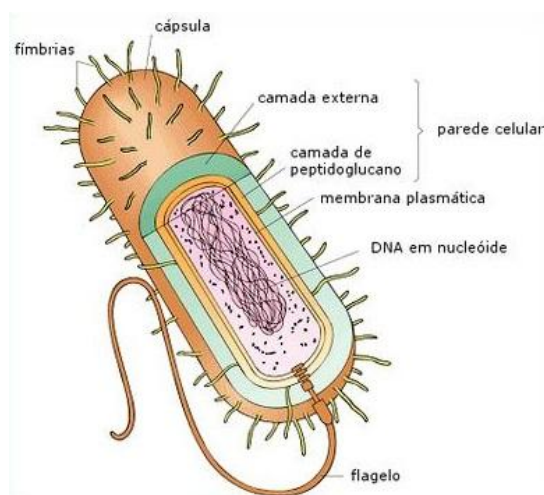


Figura 1. Estrutura de uma enterobactéria. Fonte: www.sobiologia.com.br. Disponível em 28/01/2014.

Bactérias dos gêneros *Citrobacter*, *Hafnia* e *Providencia* podem eventualmente também ser enteropatogênicas (Nascimento e Araújo, 2013). As enterobactérias dos demais gêneros podem causar infecções não-intestinais, tais como bacteremias, meningites, infecções do trato urinário e respiratório ou, ainda, as infecções secundárias que ocorrem após ferimentos. Os principais fatores de virulência deste grupo de bactérias são os antígenos K (polissacarídeos capsulares que envolvem a parede celular) e as endotoxinas, uma vez que, além de protegerem as bactérias contra fagocitose, podem ser responsáveis pelas manifestações que acompanham as infecções (Murray et al., 2006; Trabulsi e Alterthum, 2008).

A maioria das enterobactérias é geralmente sensível as ampicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol e aos derivados quinolônicos (Garbati e Godhair, 2013). No entanto, estas bactérias podem facilmente adquirir resistência a qualquer droga utilizada no tratamento das infecções. Deste modo, a principal forma de resistência das enterobactérias é mediada por fatores R (fatores de resistências transmissíveis), com exceção da resistência às quinolonas que é determinada por mutação. Aparentemente, os fatores R não transportam genes de resistência às drogas com ação antimicrobiana. A resistência adquirida pelas enterobactérias é geralmente múltipla, isto é, torna a bactéria simultaneamente resistente a várias drogas antimicrobianas. Assim, não é raro encontrar amostras de enterobactérias simultaneamente resistentes a dez ou mais drogas. A resistência se deve a dois ou mais fatores R e também às mutações cromossômicas. De modo geral, as enterobactérias adquirem resistência com grande facilidade, sendo bastante elevado o

número de infecções causadas por enterobactérias resistentes (Trabulsi e Alterthum, 2008).

2.2. Peptídeos com atividade antimicrobiana

A resistência das bactérias aos antibióticos pode se desenvolver rapidamente, logo que são introduzidos novos agentes terapêuticos (Maria-Neto et al., 2012). Portanto, as tentativas para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos com mecanismos de ação não usuais podem conduzir a uma melhor eficácia no controle das bactérias com elevada resistência aos antibióticos comerciais (Oren e Shai, 1998). Desta forma, os PAMs são promissores candidatos a novos fármacos anti-infecciosos devido a sua eficácia contra bactérias resistentes a antibióticos (Mandal et al., 2009).

Os PAMs foram descobertos na década de 70 em moscas do gênero *Drosophila* (Boman et al., 1972) e, posteriormente, um grande número de novas moléculas foram descobertas e isoladas de diversas fontes, tais como outros insetos, bactérias, plantas, crustáceos, anfíbios e mamíferos, incluindo o homem (Hancock, 1997; Ganz e Lehrer, 1998; Zhang et al., 2001).

Os PAMs são peptídeos multifuncionais de reduzido tamanho, compostos por 12 a 50 aminoácidos de comprimento e exibem um largo espectro da atividade antimicrobiana, atuando contra bactérias, fungos, alguns vírus envelopados, e até mesmo células cancerosas (Hancock, 1997; Ganz e Lehrer, 1998; Mihajlovic e Lazaridis, 2010). Geralmente, os PAMs são compostos por regiões estruturais anfipáticas e catiônicas, as quais podem atuar como permeabilizantes das membranas celulares eficazes que levam à morte do patógeno. Estes peptídeos possuem propriedades anfifílicas e motivos hidrofóbicos (Fig. 2) que lhe permitem permanecer inseridos na camada da membrana, de modo que as regiões peptídicas hidrofóbicas ficam imersas nas caudas hidrocarbonadas dos lipídios da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas se associam às cabeças polares (Khandelia et al., 2008; Huang et al., 2010; Nascimento et al., 2012). Além disso, a hidrofobicidade, a anfipaticidade, a carga do peptídeo e a estrutura secundária também mostraram desempenhar um papel importante nas propriedades líticas (capacidade de causar lesões nas membranas) dos peptídeos (Mozsolits et al., 2001; Fernandes et al., 2012; Torrent et al., 2012).

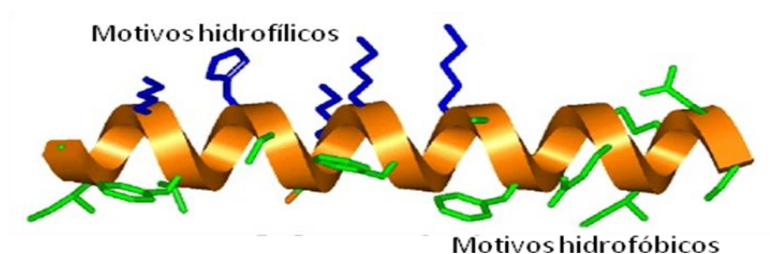


Figura 2. Estrutura α -helicoidal da magainina I. Em azul estão representados os motivos hidrofílicos e em verde, os motivos hidrofóbicos. Fonte: <http://www.agtcbioproducts.com/magainin-1-11238729.html>. Disponível em 20/03/2014.

Em geral, os PAMs podem apresentar uma grande diversidade estrutural, sendo as estruturas secundárias mais estudadas as α -hélices, as folhas- β , uma mistura de estruturas em α -hélices/folhas- β e as estruturas estendidas (Fig. 3) (Jenssen et al., 2006). As estruturas mais comumente observadas são as α -hélices (Fig. 3a), as quais são formadas apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana. Os peptídeos em folhas- β (Fig. 3b) e os que apresentam uma mistura de α -hélices/folhas- β (Fig. 3c) são compostos por vários resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto. Por outro lado, as estruturas estendidas (Fig. 3d) são caracterizadas pela predominância de um aminoácido específico e são menos comuns (Brodgen, 2005; Resende et al., 2008).

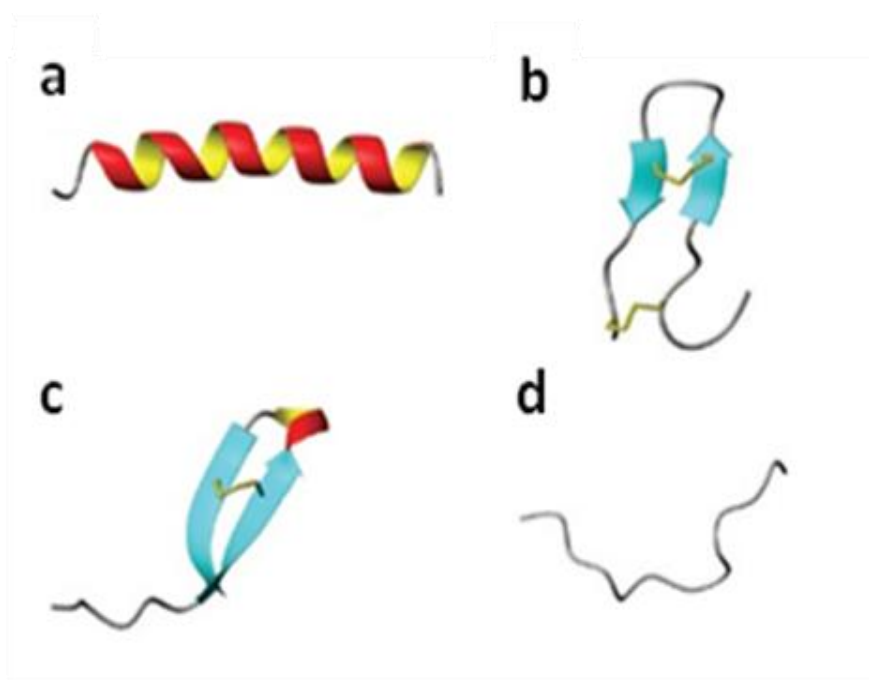


Figura 3. Classes estruturais dos peptídeos antimicrobianos. Estruturas em α -hélice (a), folha- β (b), estrutura dobrada (c) e estrutura estendida (d). Fonte: Jenssen et al., 2006.

As magaininas constituem um grupo de peptídeos antimicrobianos, extraídas do sapo africano *Xenopus laevis*, que vem sendo extensivamente estudado, sendo os mesmos extraídos do sapo africano *Xenopus laevis* (Matsuzaki et al., 1999; Wieprecht et al., 2000; Brogden, 2005; Jelinek e Kolusheva, 2005; Humblot et al., 2009). A Magainina I (MagI) é um PAM catiônico constituído por 23 aminoácidos (GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS) e apresenta uma estrutura α -helicoidal anfipática (Matsuzaki et al., 1999). Este peptídeo apresenta múltiplas funções como, por exemplo, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral, estando relacionadas às interações com membranas (Zasloff, 1987; Matsuzaki et al., 1989; Maria-Neto et al., 2012).

A família das catelicidinas é um grupo de antimicrobianos estruturalmente diversos encontrado em várias espécies de mamíferos (Ramanathan et al., 2002). O LL-37 é o primeiro PAM helicoidal isolado de humanos, pertencente a esta família, sendo considerado importante para a resposta imune devido a sua participação no processo inflamatório (Oren et al. 1999, Sevcsik et al. 2007). O LL-37 é composto por 37 aminoácidos (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES), dentre os quais 16 são carregados em pH fisiológico, sendo 11 positivos e 5 negativos resultando uma carga líquida +6 (Sevcsik et al. 2007). O LL-37 possui capacidade de ligar e permeabilizar efetivamente fosfolipídios zwitteriônicos e carregados negativamente, sendo esta uma característica que o distingue da maioria dos PAMs, os quais agem seletivamente sobre células bacterianas (Johansson et al. 1998, Oren et al. 1999).

As clavaninas são uma família constituída por PAMs isolados dos hemócitos do tunicado marinho *Styela clava* (Lee et al., 1997a). Estes peptídeos exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São caracterizados por serem peptídeos catiônicos, anfipáticos e consistirem de 23 aminoácidos (Lee et al., 1997b, van Kan et al., 2001). A clavanina A (ClavA) apresenta uma sequência de aminoácidos rica em glicina, histidina e fenilalanina (VFQFLGKIIH HVGNFVHGFSHFV). Em contraste com a maioria dos PAMs, a ação deste peptídeo é dependente do pH (Lee et al., 1997a; van Kan et al., 2003). Em pH neutro, a ClavA apresenta uma carga ligeiramente positiva e atua desestabilizando as membranas microbianas de maneira não específica. Em condições ácidas (pH 5,5), este peptídeo torna-se mais carregado positivamente, devido a protonação das suas histidinas, e sua atividade aumenta cerca de 10 vezes em relação ao pH neutro (van Kan et al., 2002; 2003). A ClavX é uma modificação da ClavA, através da adição de cinco

resíduos de aminoácidos apolares na região C-terminal do peptídeo (FLPIIVFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV) (Silva, 2011).

As bactérias também são capazes de produzir e secretar PAMs, os quais podem matar ou inibir o crescimento de cepas taxonomicamente próximas ou não das que produziram os peptídeos (Blondelle e Pérez-Payá, 1996; Rosa e Franco, 2002). Estes PAMs são denominados bacteriocinas e podem ser divididos em três classes: os lantibióticos ou de classe I, os quais são caracterizados por serem catiônicos, hidrofóbicos, apresentam até 5kDa e são produtos de modificações pós-tradicionais; os de classe II são moléculas catiônicas, hidrofóbicas, apresentam de 5 a 10kDa e são mais semelhantes aos peptídeos produzidos por eucariontes, não sendo produtos de modificações pós-tradicionais e apresentando um amplo espectro de ação; e os de classe III que, por suas vez, são moléculas grandes (maiores que 30kDa), hidrofílicas e termicamente instáveis (Cleveland et al., 2001; Bauer e Dicks, 2005; Lopes, 2010). As bacteriocinas de classe I e II são as mais estudadas e são fortes candidatas ao emprego na indústria alimentícia. Muitos desses peptídeos são carregados positivamente e formam uma estrutura em α -hélice anfipática na presença de membranas lipídicas, sugerindo que a interação peptídeo-membrana é importante para sua atividade (Lopes, 2010).

Outra classe de peptídeos com caráter multifuncional que tem sido estudada, porém com menos intensidade, são os peptídeos anticongelantes. Estes são encontrados no sangue e/ou nos tecidos de organismos que vivem em ambientes congelados, tais como peixes árticos e antárticos, ligando-se aos cristais de gelo e inibindo o crescimento dos mesmos em seus fluidos. Dois tipos distintos de anticongelantes têm sido caracterizados a partir de uma variedade de peixes: os glicopeptídeos anticongelantes e os PACs, sendo os últimos divididos em quatro tipos (tipo I, II, III e IV) que diferem pela sua composição e estrutura secundária (Gong, et al., 1996; Zhang et al., 2001).

O PAC tipo I (Fig. 4), obtido a partir do peixe solha de inverno (*Pleuronectes americanus*), tem sido extensivamente estudado em termos da sua estrutura, função proteica, e expressão e regulação gênica (Scott et al., 1985; Gong et al., 1996; Tomczak et al., 2002; Kun et al., 2008). O genoma da solha de inverno contém múltiplas cópias de genes do PAC, a maioria dos quais são dispostas como regulares repetições em *tandem* (Scott et al., 1985). Estes peptídeos são pequenos (3,3 a 4,5 kDa), ricos em aminoácidos alanina e α -helicoidal (sequência HTASDAAAAAALTAANAAAAAASMA) (Kun et al., 2008; Migliolo et al., 2012).

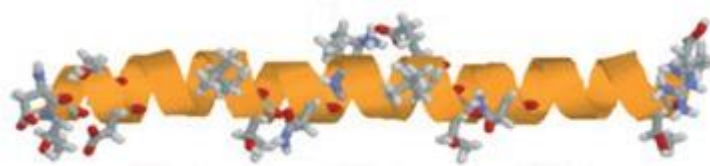


Figura 4. Estrutura do peptídeo anticongelante tipo I obtido da solha de inverno. Fonte: Kuiper et al., 2002.

Experimentos realizados no início da década de 90 demonstraram que os PACs podem interagir com as membranas biológicas, tendo a composição de fosfolípidios da membrana celular como um fator determinante na interação do peptídeo com os constituintes da mesma (Hinch, 1993). Tomczak et al. (2002) propuseram que os mecanismos de estabilização e proteção da membrana causada pelo PAC tipo I podem estar relacionados e orientados pela inserção do peptídeo na membrana.

Uma comparação entre os PACs e os PAMs revelou semelhanças estruturais e das propriedades físico-químicas, tais como a hidrofobicidade, comprimento da cadeia do polipeptídeo e composição de aminoácidos (Wang & Wang, 2004). A partir dessas características em comum é que se questiona sobre a função única de criopreservação que foi atribuída por muitos anos aos PACs, revelando as múltiplas funções desses peptídeos, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral (Nobeli et al., 2009; Franco, 2011).

Recentemente, Migliolo et al. (2012) mostraram que o PAC *Pa*-MAP apresenta atividade contra diferentes alvos, tais como células tumorais, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos. Foi observado também que este PAC não apresenta atividade citotóxica contra células de mamíferos (Migliolo et al., 2012). A atividade do *Pa*-MAP foi testada *in vivo*, em ratos infectados intraperitonalmente com uma concentração sub-letal de *E. coli* através do tratamento com este peptídeo nas concentrações de 1 e 5 mg.kg⁻¹. Em ambas as concentrações, o *Pa*-MAP exibiu a capacidade de prevenir a infecção por *E. coli* e aumentou a sobrevivência dos ratos, semelhante ao resultado observado em ratos tratados com ampicilina na concentração de 2 mg.kg⁻¹ (Teixeira et al., 2013). Desta forma, diante do potencial dos peptídeos com atividade antimicrobiana, a compreensão da interação peptídeo-membrana pode permitir a descoberta e desenvolvimento de novos produtos biofarmacêuticos com alta eficiência antimicrobiana.

2.3. Organização das membranas biológicas

A membrana biológica é crucial para a sobrevivência dos seres procariontes e eucariontes, servindo como uma barreira celular de permeabilidade seletiva para o transporte de moléculas para o interior e exterior da célula. Portanto, a ruptura da membrana resulta na morte celular (Andersen e Koeppe, 2007).

Os elementos estruturais das membranas celulares são os lipídios e as proteínas. Existem centenas de diferentes espécies de lipídios, sendo que os principais lipídios estruturais das membranas são os glicerofosfolipídios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatofatidilserina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico (Parton e Hancock, 2004; van Meer et al., 2008). O colesterol é o mais abundante lipídio constitutivo da membrana depois dos fosfolipídios (Jafurulla et al., 2011). A estrutura de colesterol permite reduzir a mobilidade das cadeias acil dos fosfolipídios, promovendo o enrijecimento da membrana, o que pode ter um relevante impacto sobre a função da mesma. O colesterol é um dos principais componentes da membrana celular dos eucariotas superiores e é fundamental na organização da membrana, na dinâmica, função e classificação da mesma (Boesze-Battaglia e Schimmel, 1997; Jafurulla et al., 2011). Em adição, a constituição das proteínas pode variar de 20 a 80% do peso total das membranas. Estas apresentam muitas funções importantes para manutenção celular e estão inseridas integralmente (entre as bicamadas lipídicas) ou periféricamente, ficando aderidas à superfície da membrana. Algumas proteínas, bem como lipídios das membranas apresentam carboidratos ligados à superfície da membrana, os quais desempenham uma função protetora, além de serem importantes para as interações entre as células (Unwin, 1984; Paulson, 1989; Alberts et al., 1994).

Um passo importante no estudo de membranas foi realizado por Singer e Nicholson (1972) com o desenvolvimento do modelo do mosaico fluido, que reuniu descobertas e idéias formuladas na década anterior. Este modelo tornou-se o padrão de concepção da arquitetura da membrana, demonstrando a distribuição dos lipídios como um mar contendo proteínas dispostas de maneira aleatória estando a superfície da bicamada diretamente exposta ao meio aquoso (Fig. 5). No entanto, o surgimento de novas descobertas nas últimas décadas sobre as estruturas e funções das proteínas de membrana, resultou em algumas mudanças no entendimento em relação à organização da membrana (Simons e Vaz, 2004; Engelman, 2005; Feigenson, 2007).

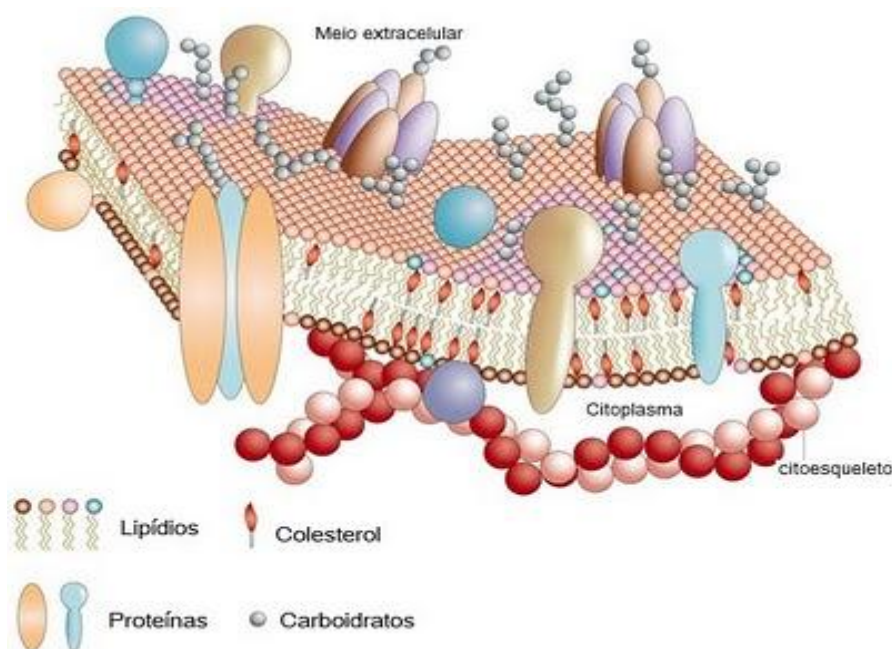


Figura 5. Membrana plasmática (modelo do mosaico fluido) de eucariotos. Fonte: Pietzsch (2004).

As membranas das células eucarióticas e as membranas bacterianas possuem funções similares, mas diferem na composição global, tanto em termos de fosfolipídios como nos demais componentes (Zimmerberg e Kozlov, 2006). As membranas bacterianas são altamente complexas, resultando na divisão das bactérias em duas classes distintas: bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Fig. 6). As bactérias Gram-negativas possuem duas membranas separadas por uma camada de peptidoglicano (um heteropolissacarídeo que confere rigidez a membrana), sendo a membrana externa coberta por lipopolissacarídeos (LPS) ancoradas ao lipídio A da membrana (Kabanov e Prokhorenko, 2010). Os LPS são responsáveis pela patogenicidade dessa classe bacteriana. As bactérias Gram-positivas, por sua vez, contêm apenas uma membrana coberta por uma camada espessa de peptidoglicano e ácido teicóico, estrutura fibrilar que conferência a aderência das bactérias (Murray et al., 2006). A membrana citoplasmática é negativamente carregada devido à presença do fosfatidilglicerol (PG), bem como difosfatidilglicerol (DPG). As diferenças estruturais apresentadas pelas membranas bacterianas é o que permite a distinção das bactérias pela coloração de Gram. Contudo, apenas as bactérias Gram-positivas possuem a capacidade de reter o corante cristal violeta (Barros et al., 2009).

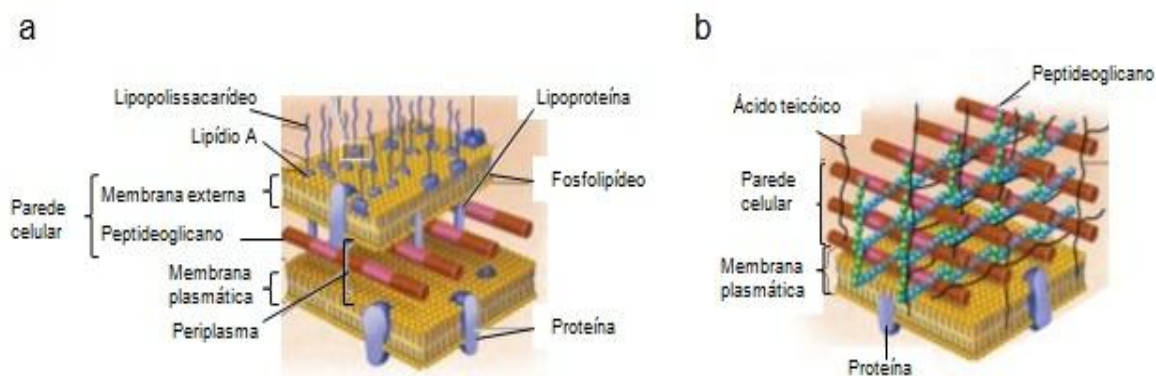


Figura 6. Membrana plasmática de bactérias. A) Bactéria Gram-negativa; B) Bactéria Gram-positiva. Fonte: Tortora, Funke e Case, 2010 (adaptado).

Em relação ao tipo e a quantidade de fosfolípidios presentes nas membranas bacterianas, há uma grande diferença entre as espécies de bactérias (Ratledge e Wilkinson, 1988). No caso da *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa, a membrana externa é composta por cerca de 91% de fosfatidiletanolamina (PE), 3% de PG, 6% de DPG, enquanto que a membrana citoplasmática contém 82% de PE, 6% de PG e 12% de DPG (Lugtenberg e Peters, 1976). Por outro lado, a membrana da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* contém 36% de PG, 7% de DPG e 57% lisilPG (PG esterificados com o aminoácido L-lisina) (O'Donnell et al., 1985).

Devido à complexidade das membranas plasmáticas bacterianas, os estudos de interação peptídeo-membrana vêm sendo realizados com modelos de membranas mais simples, compostos por diferentes composições lipídicas que mimetizam a composição original das membranas bacterianas. Dentre os modelos mais utilizados destacam-se os baseados em lipossomas (Fig. 7a) e membranas suportadas sobre suportes sólidos (Fig. 7b) (Simon e McIntosh, 2002; Jelinek e Kolusheva, 2005; Lohner e Sevcsik, 2008).

Os lipossomas são estruturas nanométricas ou micrométricas compostas por uma bicamada ou múltiplas bicamadas lipídicas e um compartimento aquoso no seu interior que mimetiza as membranas biológicas (Fig. 7a) (Lasic, 1989). A importância dos lipossomas como modelo de membranas biológicas deriva do fato de que eles são constituídos por elementos capazes de formar uma bicamada semelhante à membrana natural (Chonn e Cullis, 1998).

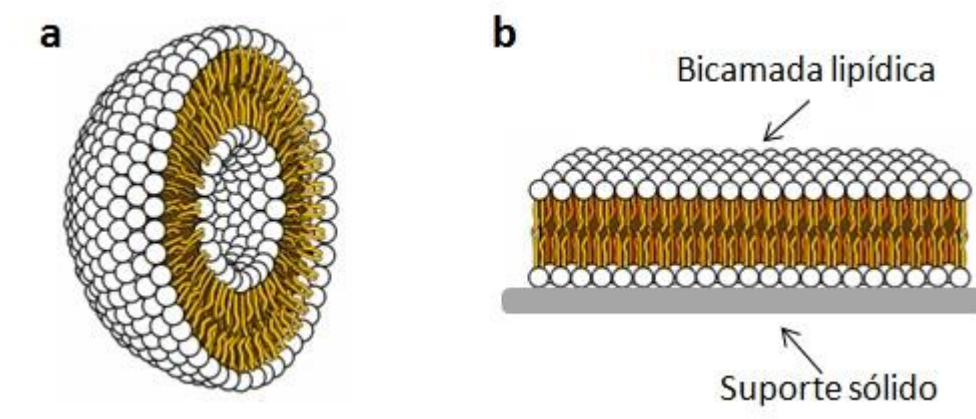


Figura 7. Estrutura de um lipossoma (a) e bicamada lipídica plana automontada sobre suporte sólido (b).
Fonte: <http://djalmasantos.wordpress.com/2011/02/26/clonagem-genica-2/> (adaptada). Disponível em 31/07/2013.

Os lipossomas, além de serem comumente utilizados como modelo para membranas plasmáticas podem ser utilizados como carreadores de drogas, podendo incorporar moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas nas bicamadas lipídicas ou seu compartimento aquoso, respectivamente (Lasic, 1998). A estabilidade apresentada por este sistema tem sido um atributo relevante para a investigação das características farmacêuticas e farmacológicas *in vivo* e *in vitro* dos medicamentos baseados em lipossomas (Andrade et al., 2004). Do ponto de vista estrutural, a estabilidade do lipossoma depende primariamente das suas propriedades físico-químicas e, em especial, das interações moleculares entre os constituintes na bicamada (Baszkin et al., 2000).

2.4. Interação peptídeo-membrana e mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

Um grande número de estudos tem sido direcionado para avaliar as interações entre peptídeos bioativos e membranas lipídicas, uma vez que essas interações desempenham um papel fundamental em diversos processos celulares (Papo e Shai, 2003; Brogden, 2005; Nicolas, 2009; Jelinek e Kolusheva, 2005; Nguyen et al., 2011). A interação peptídeo-membrana pode ocorrer de diferentes formas e a termodinâmica dessa interação parece ser governada por forças distintas, tais como interações

eletrostáticas e hidrofóbicas, que dependem tanto das propriedades dos peptídeos como da composição da membrana (Zhang et al., 2001; Hall et al., 2003).

A carga catiônica e a presença de resíduos hidrofóbicos, características comuns à maioria dos PAMs, parecem desempenhar um papel crucial no processo de interação peptídeo-membrana. Geralmente, a seletividade dos PAMs está relacionada com as diferenças entre as membranas procariotas e eucariotas (Hall et al., 2003). As membranas aniônicas dos microrganismos em geral são alvo dos peptídeos catiônicos. Por outro lado, as membranas de mamíferos são compostas predominantemente por lipídios zwitteriônicos e colesterol, o qual não está presente nas membranas dos microrganismos. O colesterol aumenta a rigidez da membrana e, desta forma, oferece um bloqueio no processo de atuação dos PAMs. Em adição, os resíduos hidrofóbicos dos PAMs facilitam a interação com as cadeias acila dos ácidos graxos (Lohner, 2001; Nguyen et al., 2011).

Vários modelos foram propostos para explicar o modo de ação dos PAMs, tendo em comum a interação em duas etapas, como seguem:

- Etapa 1 - ligação do PAM à membrana através de interação eletrostática; e,
- Etapa 2 - penetração do peptídeo facilitada por interações hidrofóbicas (Fig. 8) (Hall et al., 2003; Nguyen et al., 2011). Muitos PAMs lineares tornam-se estruturas em α -hélice ou β -folha em solução aquosa e requerem o ambiente da membrana para adotar uma conformação anfipática estável (Hwang e Vogel, 1998).

Dentre os modelos propostos, os que apresentam maior consistência com resultados experimentais são os modelos de barril, poro toroidal, carpete e detergente (Fig. 8) (Hall et al., 2003; Brogden et al., 2005; Sanderson, 2005; Bechinger e Lohner, 2006; Melo et al., 2009).

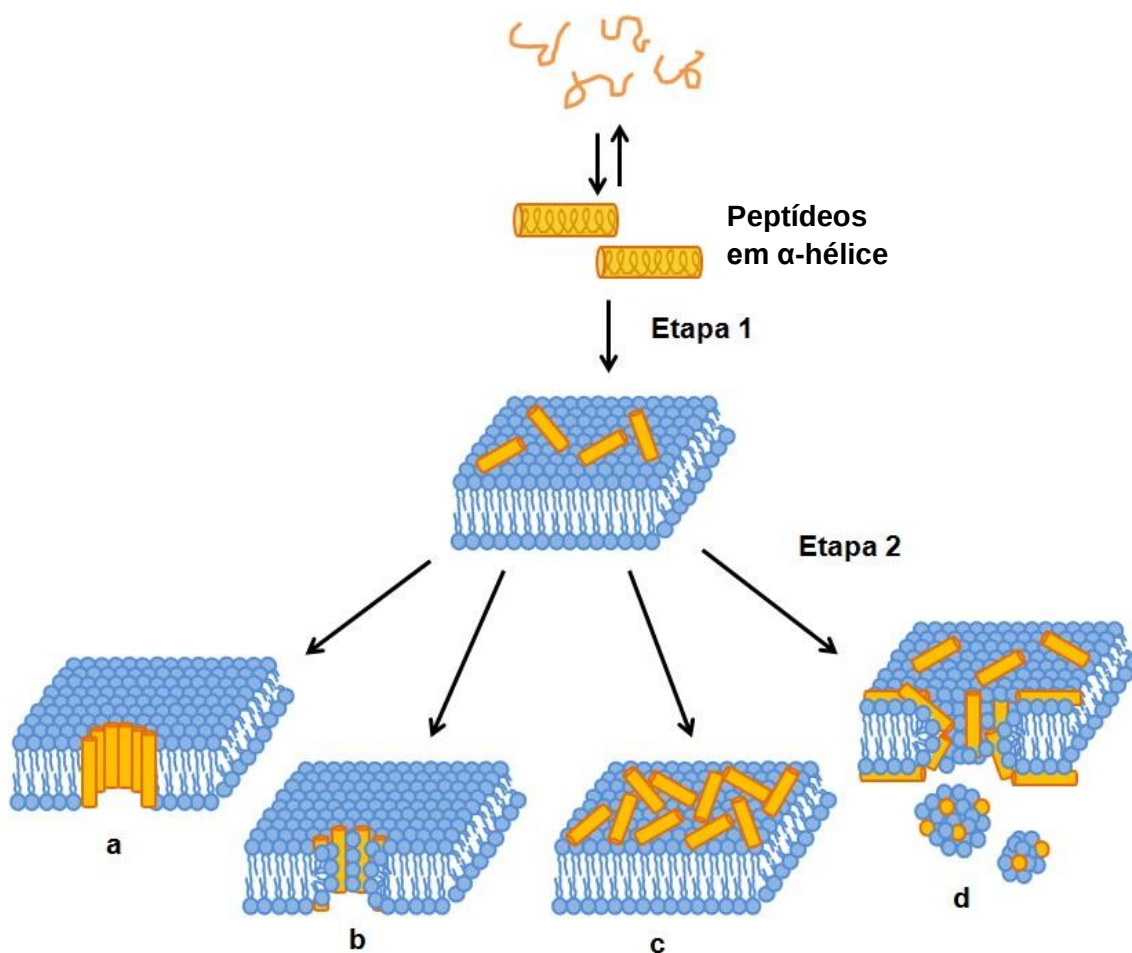


Figura 8. Diagrama esquemático de diferentes mecanismos da associação peptídeo-membrana. O peptídeo (em laranja) em solução aquosa se adapta a uma estrutura em α -hélice. Na primeira etapa, os peptídeos se ligam a membrana (em azul) por interações eletrostáticas. Em seguida, na segunda etapa, os peptídeos se auto-organizam na bicamada lipídica, induzindo a formação de poros seguindo o modelo barril (a) ou poro toroidal (b), ou desestabilizando a membrana seguindo modelo tapete (c) ou detergente (d).

No modelo barril (Fig. 8a), os PAMs ligam-se a superfície da bicamada lipídica através de interação eletrostática e ao atingir uma determinada concentração na superfície da membrana, monômeros dos peptídeos agregam-se e inserem-se dentro do núcleo hidrofóbico da membrana formando um poro perpendicular. O poro toroidal (Fig. 8b) é bastante similar ao modelo barril, no entanto, neste modelo o peptídeo anfipático é incorporado na membrana, formando um poro perpendicular de peptídeo e lipídio. No modelo tapete (Fig. 8c), os PAMs são adsorvidos paralelamente na superfície da membrana, formando um agregado que cobre a superfície da bicamada lipídica semelhante a um “tapete” de moléculas. Ao alcançar uma determinada

concentração, a membrana é destruída/solubilizada. Por fim, o modelo detergente (Fig. 8d) é baseado na intercalação de PAMs nas bicamadas lipídicas, de modo que ao atingirem uma concentração micelar crítica (CMC) formam estruturas micelares de modo similar a um detergente. Por este motivo, o efeito detergente também é descrito como sendo uma extensão do modelo carpete (Hall et al., 2003; Brogden et al., 2005; Sanderson, 2005; Bechinger e Lohner, 2006; Melo et al., 2009).

Embora, o modo de ação dos PAMs envolva geralmente a perturbação da integridade da membrana citoplasmática das bactérias, outros mecanismos antimicrobianos que visam processos celulares importantes, tais como síntese proteica e de DNA, enovelamento de proteínas, atividade enzimática e síntese da parede celular, vêm sendo descritos (Papo e Shai, 2003; Brogden, 2005; Nicolas, 2009). Contudo, até mesmo para peptídeos que apresentam alvos intracelulares, a interação com as membranas é o meio de translocação dos peptídeos para o interior da célula (Nguyen et al., 2011), sendo esta propriedade essencial para a função antibiótica do peptídeo.

Adicionalmente, a carga positiva dos PAMs também promove interações com as porções negativamente carregadas de outras biomoléculas, tais como os ácidos nucleicos e as proteínas fosforiladas. Durante uma infecção, o animal hospedeiro pode liberar várias isoformas dos peptídeos ou estruturas similares aos PAMs que atuam através de mecanismos distintos para conseguir um efeito global sinérgico (Mangoni e Shai, 2009). Alguns peptídeos, como a indolicidina, apresentam múltiplos modos de ação, sugerindo que esses PAMs podem utilizar diferentes estratégias para aumentar sua eficiência e evitar possíveis mecanismos de resistência (Peschel e Sahl, 2006).

2.5. Fundamentação teórica das técnicas analíticas utilizadas no estudo da interação peptídeo-membrana

2.5.1. Espectroscopia de Impedância

A espectroscopia de impedância é um método eficaz para estudar as características de superfície de eletrodos modificados (Katz e Willner, 2003). A técnica tem sido aplicada em estudos de reações eletroquímicas, soluções iônicas, semicondutores, materiais dielétricos, sensores, entre outros (Chinaglia et al., 2008).

A espectroscopia de impedância baseia-se na aplicação de um estímulo elétrico entre os eletrodos dispostos em uma amostra de interesse e a observação da resposta. Este estímulo é tipicamente um potencial elétrico periódico no tempo na forma senoidal (cossenoidal) com uma pequena amplitude de oscilação. Este método possibilita que o sistema seja perturbado com o emprego de pequenos valores do potencial elétrico, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos próximos ao estado de equilíbrio (MacDonald, 1987; Damos et al., 2004). Adicionalmente, uma vez que a onda de potencial é senoidal, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência (tipicamente na faixa de 10 μ Hz – 10 GHz) obtendo-se uma corrente alternada (AC) de natureza senoidal. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase, que é definido como sendo a defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado (Bard e Faulkner, 2001; Damos et al., 2004). A partir desses dois parâmetros, é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros (Jiang e Kucernak, 2002).

Originalmente, o conceito de impedância descreve a resposta de sistemas compostos por diferentes elementos de um circuito, tais como resistores, capacitores e indutores. Em termos da energia, um resistor é definido como um elemento que dissipa energia elétrica na forma de calor e que está relacionado ao transporte de cargas elétricas em um dado meio. Um capacitor é definido como um elemento que impede a circulação da corrente elétrica devido ao armazenamento periódico da energia devido ao acúmulo de cargas em dada região do sistema. E um indutor, por sua vez, armazena a energia em um campo magnético (Chinaglia et al., 2008; Lima, 2010). A impedância de cada elemento é chamada de reatância e é uma função da frequência, sendo definida em termos do potencial elétrico e da corrente elétrica no domínio do tempo da seguinte forma:

$$Z(t) = \frac{V(t)}{i(t)}, \quad \text{Eq. 1.}$$

onde $Z(t)$ é a impedância, $V(t)$ o potencial elétrico $i(t)$ a corrente elétrica e t é o tempo (Chinaglia et al., 2008).

Os dados obtidos através da análise de impedância fornecem informações que podem ser avaliadas mediante a utilização de circuitos equivalentes ou modelos

matemáticos. A aplicação/análise de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico (Fig. 9).

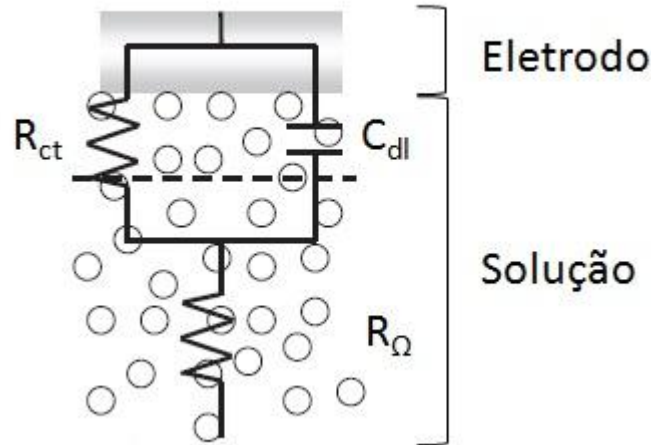


Figura 9. Representação esquemática de um circuito equivalente sobre interface eletrodo/solução. O elemento R_{CT} corresponde a resistência à transferência de carga, o C_{dl} , a capacitância da dupla camada elétrica e R_{Ω} , a resistência da solução. Fonte: Figura adaptada de Damos et al., 2004.

Em uma representação comum para a impedância, temos uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva) (Damos et al., 2004; Lima, 2010). Para o circuito equivalente apresentado (Fig. 9) as componentes real (Z') e imaginária (Z'') da impedância do sistema são dadas pelas seguintes equações:

$$Z' = R_s + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}, \quad \text{Eq. 2.}$$

$$Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}, \quad \text{Eq. 3.}$$

onde, R_s - resistência da solução, R_{CT} - resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_{dl} - capacitância da dupla camada elétrica.

A representação gráfica Z'' (componente imaginária da impedância) vs Z' (componente real da impedância), também denominada diagrama de Nyquist ou semi-circulo de Cole-Cole (Fig. 10a), pode fornecer informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância total do sistema. No diagrama de Nyquist,

cada ponto representa a impedância em dada frequência (Zoltowski, 1994; Alves e Brett, 2002).

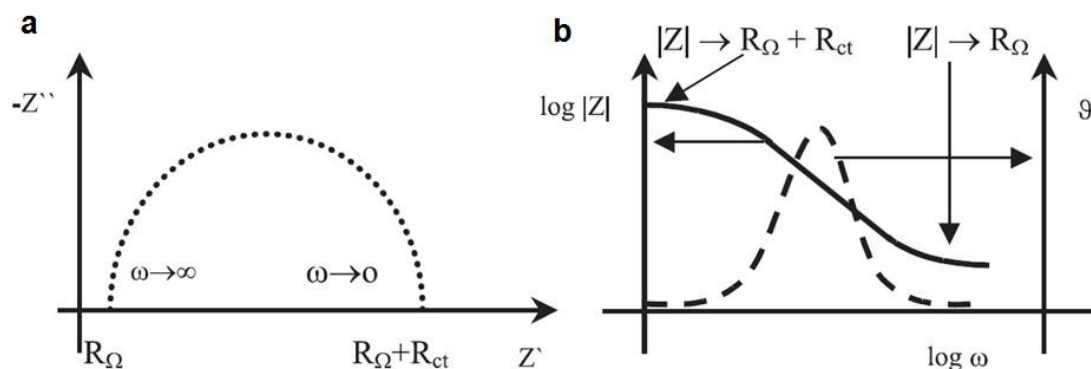


Figura 10. Gráficos da impedância. (A) Gráfico de Nyquist; (B) Gráficos de Bode. $-Z''$ = componente imaginária da impedância; Z' = componente real da impedância; ω = frequência; R_Ω = resistência de solução; R_{CT} = resistência de transferência de carga; $|Z|$ = módulo da impedância. Fonte: Damos et al. (2004).

A partir da Fig. 10a é observado que em regiões de altas frequências a componente real da impedância fornece informações sobre a R_Ω e em regiões de baixa frequência sobre $R_\Omega + R_{ct}$. Avaliando o comportamento dielétrico em função da frequência, é possível inferir como obter informações sobre a resistência da solução na região de altas frequências e na região de baixas frequências sobre o processo de resistência à transferência de carga que ocorre no eletrodo (Damos et al., 2004).

As representações de $\log |Z|$ ($|Z|$ - módulo da impedância) e ϕ (ângulo de fase) *versus* $\log \omega$ (ω - frequência), chamadas de curvas de Bode (Fig. 10b), fornecem informações sobre processos de relaxação que ocorrem em uma dada frequência chamada de frequência de relaxação, complementando as informações obtidas no diagrama de Nyquist. Os processos de relaxação têm relação com as diferenças entre o potencial aplicado e defasagem da resposta ao estímulo devido à reorientação dos dipolos permanentes do sistema (Barsoukov e Macdonald, 2005). As alterações no módulo da impedância indicam os efeitos da resistência à transferência de carga no sistema. Por outro lado, à medida que há aumento da frequência do sistema observam-se alterações no ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente resultante. Esta alteração no ângulo de fase possibilita a obtenção de informações sobre a componente

capacitiva do sistema, uma vez que as componentes capacitivas introduzem um comportamento cossenoidal na corrente (Sluyters-Rehbach e Sluyters, 1970).

Outros elementos podem ser necessários para descrever o comportamento da interface, tais como: a capacitância de dupla camada (C_{dl}), o elemento de fase constante (CPE), a resistência de transferência de carga (R_{CT}), o elemento de Warburg (W), entre outros. Os dois primeiros elementos estão relacionados a processos de polarização molecular ou iônica que ocorrem na interface, enquanto que os dois últimos estão relacionados à cinética das moléculas na interface devido ao fluxo de íons e a difusão de massa na mesma. O CPE está relacionado a processos de absorção não-uniforme e difusão na interface eletrodo/eletrólito de íons que atravessam a dupla camada elétrica, sendo extremamente dependente da frequência no regime de baixas frequências (Lima, 2010).

Um dos circuitos equivalentes mais utilizados em estudos de interações de superfície (interface eletrodo/eletrólito) é o circuito de Randles (Fig. 11). Neste circuito é possível observar os elementos que representam os processos que ocorrem nos eletrodos e na solução: a capacitância de dupla camada elétrica (C_{dl}), que surge na interface eletrodo/solução devido à distribuição de cargas na interface; a resistência ôhmica da solução (R_s) ao transporte de íons entre os eletrodos; a resistência à passagem de corrente elétrica (R_e), a qual está relacionada ao movimento de íons na interface quando um potencial é aplicado; e a impedância de Warburg (W) que representa a resistência no transporte de massa das espécies eletroativas (Brett & Brett, 1996).

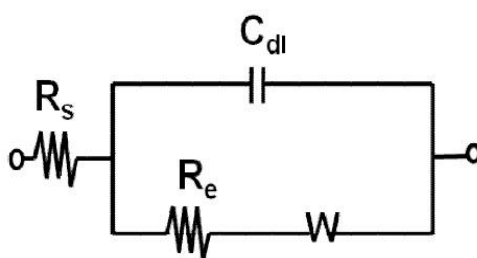


Figura 11. Modelo do circuito de Randles. R_s = resistência de solução; C_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_e = resistência de transferência de carga do eletrodo; W = elemento de Warburg.

A C_{dl} possui um comportamento similar a de um capacitor de placas paralelas (modelo Helmholtz), devido à distribuição dos íons na interface eletrodo/solução. Próximo à interface, as cargas estão ligadas devido a ação do potencial aplicado (camada de Helmholtz). Em regiões mais distantes da interface, os íons são ditos semi-

ligados e distribuídos de forma difusa (camada de Gouy-Chapman) (Shaw, 1992; Myers, 1999). Os íons livres estão distribuídos no volume da solução e são responsáveis pela condutividade iônica que está associada à resistência da solução (Araújo et al., 2010). A camada de Helmholtz é pronunciada no regime de baixa agitação térmica onde as cargas estão sobre ação do potencial do eletrodo e uniformemente distribuídas na interface formando um típico capacitor de placas paralelas (Fig. 12) (Perelman e Ginosar, 2008).

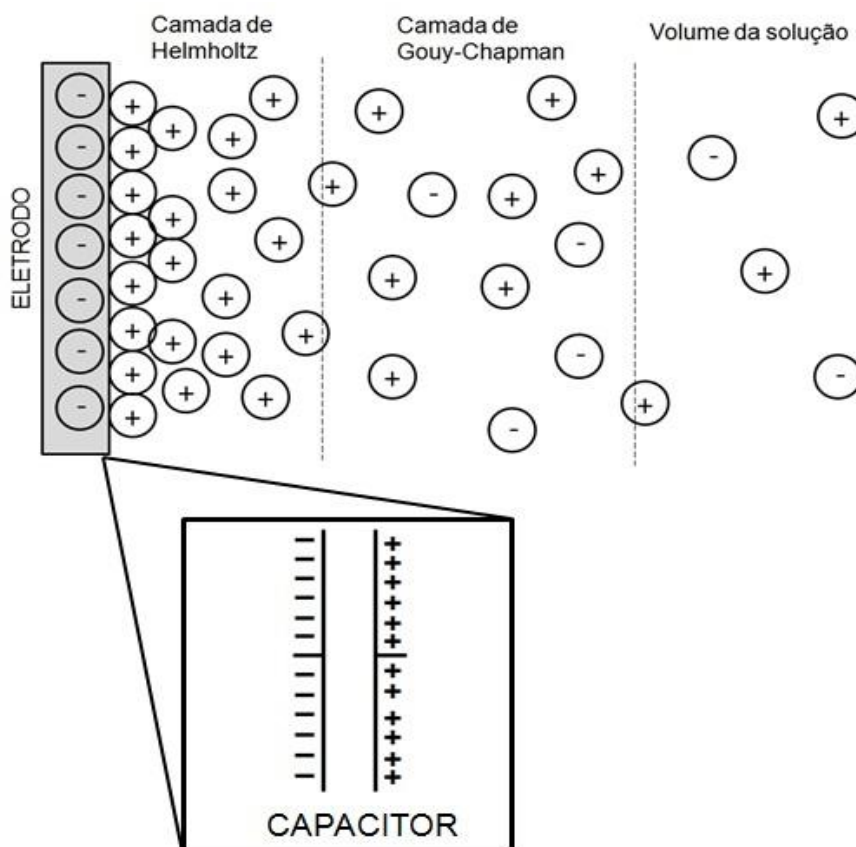


Figura 12. Distribuição de íons em solução mostrando diferentes camadas representativas (acima) e comparação da interface eletrodo/solução com um capacitor do circuito elétrico (modelo de Helmholtz) (abaixo). Fonte: Lima, 2010, com modificações.

Apesar da espectroscopia de impedância ter sido originada no campo da engenharia elétrica, a técnica ganhou força e se tornou uma ferramenta de caracterização devido à possibilidade de mensurar constantes dielétricas de soluções eletrolíticas e de fluidos orgânicos. A partir daí a espectroscopia de impedância tem sido empregada nos mais diversos estudos, tais como avaliação de membranas, suspensão sanguínea, tecidos biológicos, reações eletroquímicas em interfaces, corrosões, sistemas

coloidais, construção de sensores, entre outros (MacDonald, 1992; Orazem e Tribollet, 2008). Essas análises vêm sendo realizadas através de espectroscopia de impedância elétrica (EIE) ou eletroquímica (EIS), onde ambas possuem basicamente a mesma fundamentação teórica e algumas diferenças experimentais. Para mensurar amostras em soluções, a EIE geralmente utiliza um sistema de eletrodos metálicos de placas paralelas atuando como um capacitor, o qual recebe diretamente o estímulo elétrico (Lima, 2010). A EIS, por sua vez, é realizada em uma célula eletroquímica contendo uma solução redox e três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho (ET), um contra-eletrodo (CE) e um eletrodo de referência (ER) (Fig. 13). O ET é o que sofrerá a modificação com a (bio)molécula a ser estudada para posterior análise. O CE é constituído de um material inerte na faixa de potencial que se deseja trabalhar, tendo como função atuar como fonte de elétrons. O ER fornece um valor de potencial constante à célula eletrolítica, o mesmo é necessário por que a diferença de potencial entre o ET e CE varia devido à mudança na resistência elétrica da solução, o que ocorre devido à cinética de transferência de massa e redução dos íons (Neckel, 2009). O potencial é aplicado sobre o ER e o estímulo é passado para os demais eletrodos. Neste tipo de sistema, a resistência é associada à passagem de elétrons entre o par redox e a interface do eletrodo de trabalho (Andrade et al., 2011).

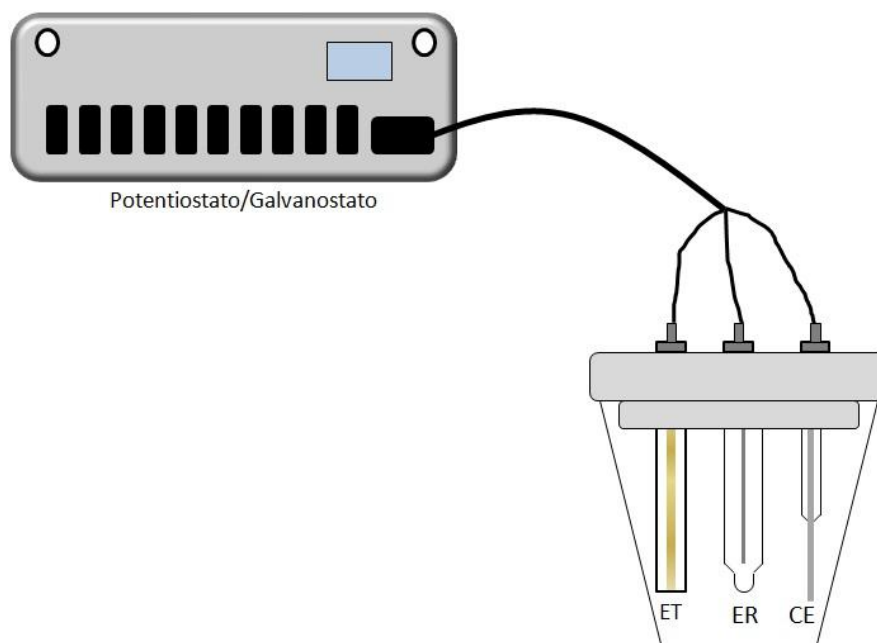


Figura 13. Representação esquemática de um potenciostato/galvanostato (esquerda) e uma célula eletroquímica de três eletrodos (direita). ET = eletrodo de trabalho; ER = eletrodo de referência e CE = contra-eletrodo.

A espectroscopia de impedância é uma técnica útil que pode ser aplicada para monitorar a integridade das membranas lipídicas sobre um eletrodo em modo estacionário ou em tempo real. Esta técnica é sensível a pequenas alterações nas propriedades da membrana, tais como a espessura e heterogeneidade da membrana e permeação de íons (Nascimento et al., 2012). Além disso, as características dos peptídeos formadores de poros e proteínas que interagem com as membranas podem ser avaliadas por espectroscopia de impedância, uma vez que a resistência das bicamadas lipídicas é conhecida por ser extremamente sensível à formação de poros (Cornell et al., 1997; Vockenroth et al., 2008; Sugihara et al., 2012).

Chang e colaboradores (2008b) demonstraram que parâmetros elétricos podem ser usados para descrever o comportamento impedimétrico da membrana, por adotarem: (i) os valores da resistência da membrana (R_m) como uma medida de vazamento da membrana, ou seja, o grau de ordem dos lipídios e a presença de canais de íons ou defeitos da membrana, (ii) o expoente n referente à homogeneidade da membrana, e (iii) a capacitância de membrana (C_m) como uma medida da espessura da membrana. Estes autores aplicaram a EIS como uma nova abordagem experimental para estudar a superfície de bicamadas suportadas visando o monitoramento das alterações nas propriedades da membrana, tais como a espessura, permeabilidade iônica e homogeneidade, após a exposição aos PAMs.

2.5.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície (Brett & Brett, 1993). A VC é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência da VC resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (Brett & Brett, 1996; Bard e Faulkner, 2001). Os sinais de correntes fornecidos pela VC são baseados nas espécies eletroquímicas consumidas e/ou geradas durante o processo de interação biológica e química de uma substância biologicamente ativa e um substrato (Oliveira et al., 2011).

Para que seja possível determinar um analito por VC é necessário que o analito em questão seja eletroativo, ou seja, que ele oxide ou reduza em uma região de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (Brett & Brett, 1996; Bard e Faulkner, 2001). As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. O parâmetro aplicado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma (Fig 14), e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução (Eq. 4) pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo.



onde O é a forma oxidada do analito e R, a forma reduzida (Pacheco et al., 2013).

O potencial aplicado na VC é varrido linearmente na forma de onda triangular em função do tempo (Fig. 14a), e a depender da informação desejada é possível realizar ciclos simples ou múltiplos (Pacheco et al., 2013). Durante a varredura do potencial, o potenciostato mensura a corrente resultante. No modo galvanostato, por sua vez, ocorre a varredura da corrente e a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência é medida (Lojou e Bianco, 2006).

A VC fundamenta-se na aplicação de um valor de potencial no qual nenhuma redução ocorre. Posteriormente, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente (i_p) proporcional à concentração do mesmo. Por conseguinte, quando o potencial atingir um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial (Fig. 14b). No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (localizados próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico de potencial (E_p) simétrico ao pico da redução (Pacheco, 2004; Lojou e Bianco, 2006).

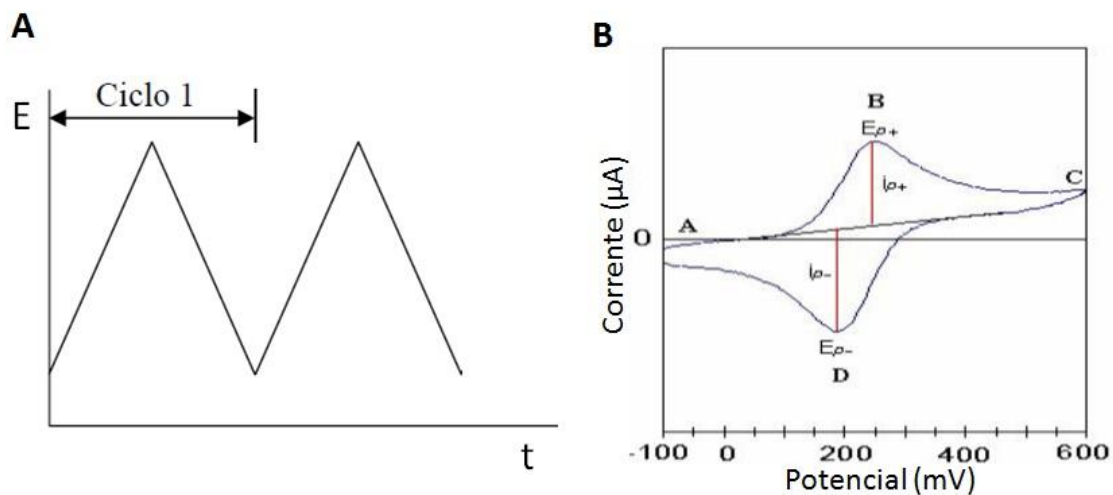


Figura 14. Variação da aplicação do potencial com varredura linear *versus* o tempo em voltametria cíclica (A) e esquema representativo de um voltamograma cíclico (B). E_{p+} e E_{p-} são os picos de potencial anódico e catódico, e i_{p+} e i_{p-} são os picos de corrente anódico e catódico, respectivamente.

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho atua como a força motriz para a reação eletroquímica. O potencial aplicado possibilita a espécie presente na solução estar no estado oxidado ou reduzido na superfície do eletrodo. Na medida em que o potencial se torna mais negativo, o eletrodo se torna uma fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface eletrodo-solução. No caso de potenciais positivos, a oxidação das espécies será favorecida. Por esta razão, quando se faz uma varredura de potencial no sentido negativo usa-se a denominação de varredura catódica, enquanto que uma varredura de potencial no sentido positivo é a varredura anódica (Brett & Brett, 1996; Lojou e Bianco, 2006; Pacheco et al., 2013).

As reações que ocorrem no eletrodo são determinadas por dois componentes principais: a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo. Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, apenas a etapa de transferência de massa irá contribuir para o processo oxirredução e o pico de corrente (i_p) é dada por:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad , \quad \text{Eq. 5}$$

onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) e C_0 é a concentração da espécie em solução ($\text{mol}.\text{cm}^{-3}$), v é a velocidade de varredura ($\text{V}.\text{s}^{-1}$).

Por outro lado, quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura, as concentrações das espécies oxidadas (O) e reduzida (R) não serão apenas função do potencial. Neste caso, os termos α (coeficiente de transferência) e K_s (velocidade de transferência de carga) devem ser considerados. Nestas circunstâncias, a equação que descreve o pico de corrente (i_p) é dada por

$$i_p = (2,99.10^5)n(\alpha n)^{1/2}AC_0D_0^{1/2}v^{1/2} \quad , \quad \text{Eq. 6}$$

Na última situação, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, o qual se desloca com o aumento da velocidade de varredura, sendo ainda variável em função do α e K_s (Pacheco et al., 2013).

Apesar de não ser muito utilizada, a VC tem desmonstrado ser uma técnica sensível e útil no estudo da interação PAM-membrana, através do monitoramento da resposta amperométrica da modificação da membrana sobre o eletrodo induzida pela ação dos PAM (Nascimento et al., 2012).

2.5.3. Espectroscopia de Ressonância de Plásmons de Superfície

A espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (RPS) é uma técnica poderosa para a caracterização de (bio)materiais, a qual permite a análise em tempo real de interações moleculares sem o uso de marcadores específicos (Oliveira et al., 2011). A RPS é um fenômeno quântico electromagnético resultante da interação da luz com elétrons livres em uma interface metal-dielétrico, resultando numa oscilação de onda de propagação de densidade de carga ao longo da interface entre dois meios com constantes dielétricas distintas (Fig. 15) (Abdulhalim et al., 2008; Andrade et al., 2011).

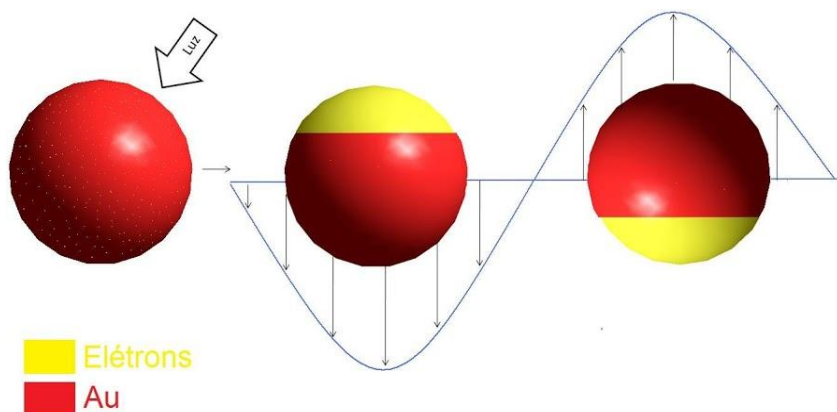


Figura 15. Fenômeno de ressonância de plásmons superficiais. Após a incidência de uma onda eletromagnética sobre a partícula de ouro (em vermelho) ocorre a interação da luz com os elétrons livres (em amarelo) resultando numa oscilação de densidade de carga, ou seja, o fenômeno de RPS. Fonte: <http://www.olharnano.com/artigos/4001/21001/Resson%C3%A2ncia-plasm%C3%B4nica-e-as-cores-das-nanopart%C3%ADculas>. Disponível em 30/07/2013.

A RPS também pode ser usada para estudar fenômenos de superfície através do monitoramento das mudanças do índice de refração devido a alterações na superfície do metal (Green et al. 2000). O metal deve exibir um comportamento de elétrons livres, sendo os mais adequados prata, ouro, cobre ou alumínio (Carvalho et al., 2003).

A RPS é uma técnica de análise de superfície em que o ligante é imobilizado sobre um suporte sólido e o soluto está em solução. Neste ponto de vista, o evento de ligação pode ser facilmente detectado e analisado (Abdulhalim et al., 2008). O fenômeno de RPS provoca uma alteração na intensidade da luz refletida e estas alterações podem ser detectadas. A figura 16 mostra o esquema de um perfil de adsorção de uma monocamada de proteína sobre uma superfície metálica monitorada por RPS. Inicialmente, uma linha de base é obtida a partir de uma solução tampão. A proteína ao ser adicionada à superfície metálica é rapidamente adsorvida até atingir o equilíbrio ou saturação da superfície, resultando no aumento do ângulo de ressonância de RPS. Após atingir este patamar, o sistema é lavado com a solução tampão para retirada das proteínas fracamente ligadas (Fig. 16). A extensão da adsorção é medida através da diferença entre o ângulo de ressonância inicial e o final (Green et al., 2000).

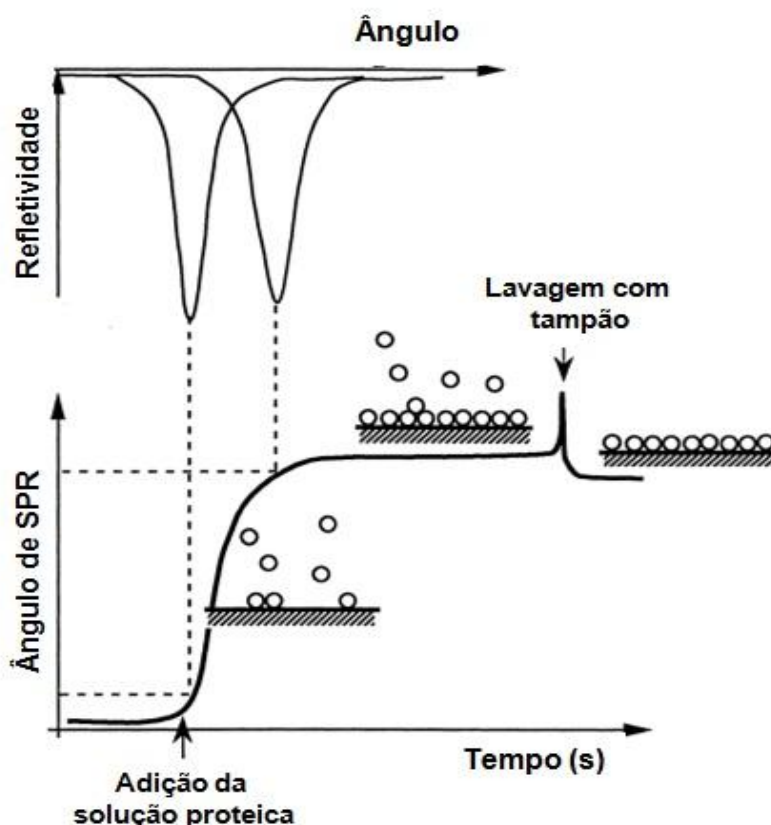


Figura 16. Representação esquemática de um perfil de adsorção de uma proteína monitorado por RPS. Fonte: Green et al. (2000).

As mudanças nas propriedades ópticas dependem de vários fatores, tais como a espessura da camada do metal, comprimento de onda da luz e da massa adsorvida na superfície do sensor (Hall et al., 2003). Otto e Kretschmann desenvolveram de forma independente dois diferentes sistemas experimentais para excitação do plasma de superfície. Porém a configuração de refletância total atenuada, desenvolvida por Kretschmann, é normalmente usada na maior parte dos instrumentos de RPS (Carvalho et al., 2003). Neste sistema ocorre uma condição de reflexão interna total, a qual se baseia na dispersão de uma fração da onda incidente na interface resultando em um campo electromagnético evanescente. Esta fração da radiação incidente acopla-se aos elétrons livres oscilantes do metal, de forma que alterações nas proximidades da interface metal/ambiente promovem uma alteração nas condições de ressonância do sistema, resultando num deslocamento no ângulo de RPS (Fig. 17).

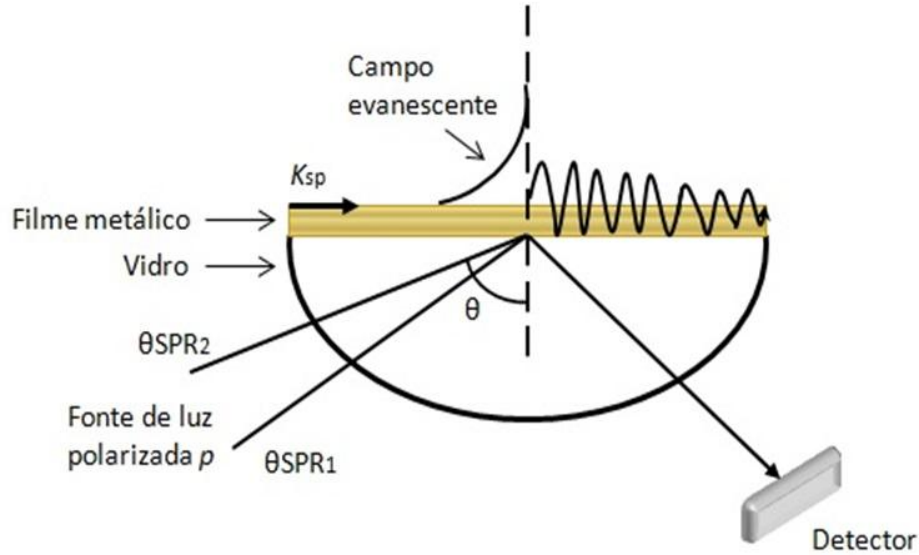


Figura 17. Representação esquemática da RPS e formação do campo evanescente baseado na configuração de Kretschmann. Os ângulos de RPS θ_{SPR1} e θ_{SPR2} representam a fonte de luz na presença e ausência de espécimes sobre o filme metálico, respectivamente. K_{ps} é o vetor de onda de uma superfície de plasma.

A relação entre o vetor de onda do campo evanescente (K_{ev}) e o ângulo de incidência da luz é dada pela equação

$$K_{ev} = w_0/c \cdot \eta_g \sin \theta \quad , \quad \text{Eq. 7}$$

onde w_0 é a frequência da luz incidente, η_g o índice de refração do meio denso (vidro), θ o ângulo de incidência da luz e c a velocidade da luz no vácuo (Green et al., 2000; Carvalho et al., 2003). O vetor de onda de uma superfície de plasma (K_{ps}) pode ser aproximadamente

$$K_{sp} = w_0/c \cdot (\epsilon_m \eta_s^2 / \epsilon_m + \eta_s^2)^{1/2} \quad , \quad \text{Eq. 8}$$

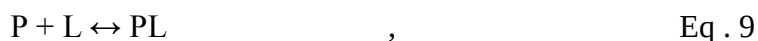
onde ϵ_m é a constante dielétrica do filme metálico e η_s é o índice de refração do meio dielétrico (Green et al., 2000; Carvalho et al., 2003).

Na equivalência entre os vetores de onda da componente paralela do fóton incidente de luz e do plasma de propagação, isto é, $K_{ev} = K_{sp}$ (Eq. 7 e 8), existe uma redução na refletância devido à formação da onda evanescente que se propaga através

da superfície do metal e interage com o ambiente externo (Green et al., 2000; Carvalho et al., 2003). Estas alterações no ângulo de ressonância podem ser detectadas por uma matriz bidimensional de fotodiodos, tornando possível utilizar o fenômeno de RPS para o monitoramento das alterações temporais na superfície do sensor através da ressonância do ângulo em função do tempo (Daghestani e Day, 2010). Os plásmons de superfície são gerados na superfície do metal em função de um ângulo crítico de incidência, sendo as alterações da resposta óptica proporcionais à quantidade de moléculas ligadas à superfície do metal. Peptídeos com massa molecular reduzida como, por exemplo, 500 Da, podem interagir na superfície de membranas lipídicas depositadas na superfície metálica e provocar mudanças no índice de refração (Stenberg et al., 1991; Besenicar et al., 2006).

A técnica de RPS tem sido utilizada para avaliar os mecanismos de associação peptídeo-membrana através da observação da taxa e quantidade de peptídeo adsorvido e dessorvido sobre as bicamadas lipídicas imobilizadas (Fernandez et al., 2009; Nascimento et al., 2012). A espectroscopia de RPS combina a capacidade de monitorar a quantidade de moléculas adsorvidas continuamente com alta sensibilidade, dando informações valiosas da cinética e termodinâmica da interação peptídeo-lipídio (Huber e Mueller, 2006).

O processo de ligação peptídeo-membrana pode ser considerado como uma ligação simples de peptídeos (P) e lipídios (L) e a inserção adicional dentro das membranas (Mozsolits et al., 2001), como se segue



Mozsolits et al. (2001) propuseram que a equação da taxa diferencial correspondente para este modelo de reação é

$$dR/dt = k_a \times [C_p] \times R_{\max} - (k_a \times [C_p] + k_d) \times R, \quad \text{Eq. 10}$$

onde k_a e k_d são as constantes das taxas de associação e dissociação, respectivamente; $R_{\max}$ é o sinal máximo (proporcional à concentração inicial de L); $[C_p]$ é a concentração do peptídeo e R é o sinal óptico, o qual é proporcional à quantidade de Peptídeo/Lipídio (PL). Em adição, também é possível considerar o modelo de reação de duas etapas

(onde o primeiro passo é a ligação e o segundo é a inserção do peptídeo na membrana) (Mozsolits et al., 2001; Papo e Shai, 2003) que corresponde à



Na segunda etapa PL é alterado para PL*, onde peptídeos e lipídios não podem se dissociar diretamente para P + L, correspondendo a uma inserção parcial do peptídeo na membrana lipídica (Mozsolits et al., 2001). Inicialmente, a ligação pode ser regida principalmente por atração eletrostática do peptídeo iônico à cabeça polar do lipídio. No entanto, algumas exceções podem ser observadas, onde a inserção do peptídeo depende da conformação estrutural das cadeias de hidrocarbonetos e pode ser governada pelo equilíbrio hidrofóbico/hidrofílico da associação peptídeo-membrana (Seelig, 2004; Migliolo et al., 2012).

2.5.4. Espalhamento dinâmico de luz e Potencial zeta

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) é uma técnica bastante utilizada na determinação de tamanhos de partículas (Domingues et al., 2008). A técnica baseia-se no princípio de dispersão de luz após a colisão da mesma com pequenas partículas. Utilizando um laser como fonte de luz é possível observar uma flutuação na intensidade do espalhamento que varia em função do tempo, devido ao movimento Browniano das partículas (movimento aleatório das moléculas). Através de procedimentos matemáticos é possível associar essa variação de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo ao tamanho das partículas dispersas em solução (Berne e Pecora, 1990; Brown, 1996; Domingues et al., 2008).

Partículas menores movem-se mais rapidamente que partículas grandes, e portanto possuem coeficiente de difusão (D) maior. Para uma dispersão de partículas esféricas, o coeficiente de difusão (D) é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico (R_h) das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Eq. 12}$$

onde k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade e T é a temperatura (Cardoso, 2001).

Além do raio hidrodinâmico, a carga superficial de partículas em solução também pode ser medida. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Schaffazick e Guterres, 2003).

Esta técnica pode ser usada para prever a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais, oferecendo insumos sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação de partículas. Desta forma, o potencial zeta tem tido diversas aplicações nas indústrias farmacêuticas, de agroquímicos, de tintas, de mineração, bem como no tratamento de água.

Partículas carregadas suspensas em solução atraem íons de sinais opostos para sua superfície. Estes íons são fortemente ligados formando uma camada sobre a superfície da partícula, chamada de camada de Stern. Outra camada ligada à camada de Stern é formada por íons difusos mais livremente. Dentro dessa camada difusa existe um limite ideal no qual a partícula se torna estável. Quando uma partícula se move na presença de um campo elétrico os íons fortemente ligados movem-se com ela. No entanto, os íons da fronteira difusa não se movem juntamente com a partícula. O potencial elétrico que existe neste limite, no plano de cisalhamento, é então denominado de potencial zeta (Fig. 18) (Domingues et al., 2008; Kaszuba et al., 2010). Este potencial é calculado através da mobilidade eletroforética das partículas em solução, sob um campo elétrico, para um eletrodo de carga oposta, a qual pode ser medida utilizando aproximação de Smoluchowski:

$$U = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad \text{Eq. 13}$$

onde U é a mobilidade, η é a viscosidade, ε é a constante dielétrica da água pura e ζ é o potencial zeta.

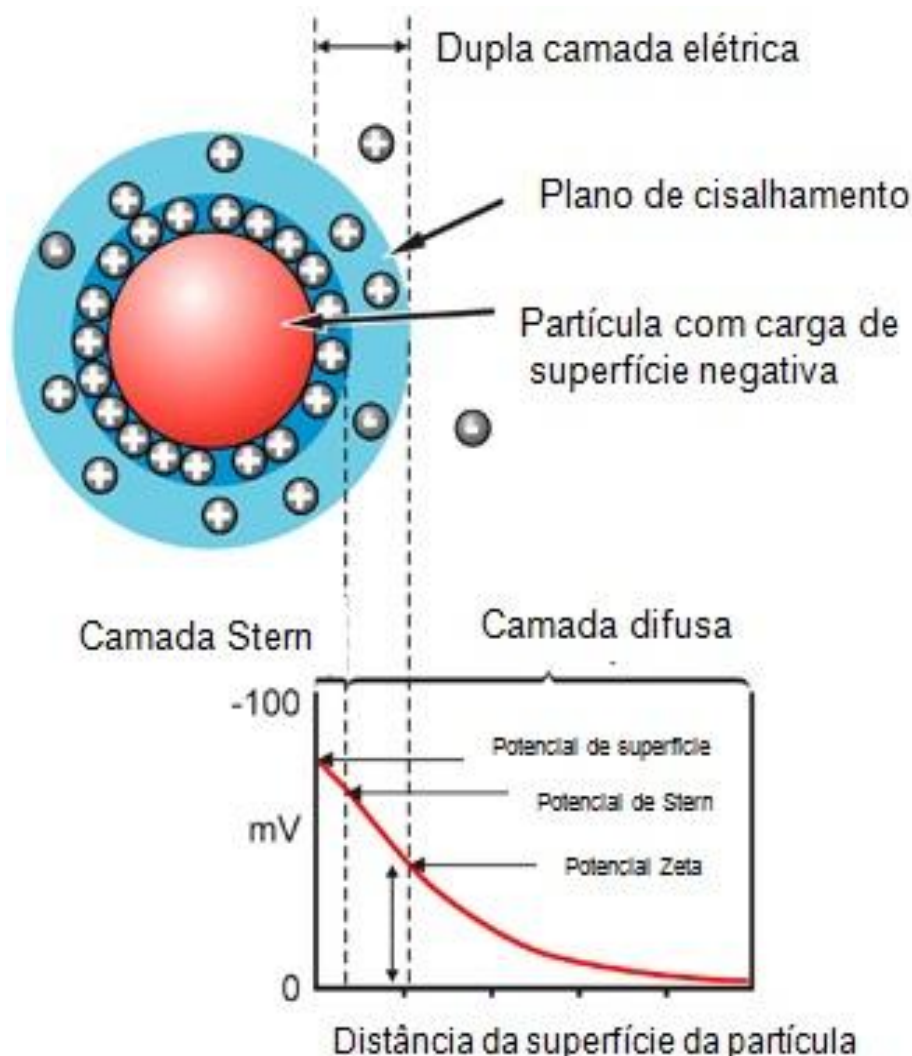


Figura 18. Representação esquemática da dupla camada que circunda uma partícula em meio aquoso. O potencial que existe no plano de cisalhamento é conhecido como potencial zeta. Fonte: <http://nanocomposix.com/kb/general/characterization-techniques>. Disponível em 25/03/2014.

As técnicas baseadas na dispersão de luz são uma das possíveis abordagens não invasivas para estudar as interações peptídeo/membrana (Domingues et al., 2008). O EDL e o potencial- ζ tem tido grande aplicabilidade em trabalhos com PAMs, uma vez que: (i) a técnica de EDL é bastante sensível às mudanças na forma, tamanho e agregação de partículas, sendo a agregação de vesículas lipídicas induzida por peptídeos facilmente detectadas, e (ii) quando peptídeos carregados interagem com vesículas carregadas, a mobilidade eletroforética resultante das entidades supramoleculares é alterada, permitindo que a carga superficial das membranas envolvidas na interação

sejam medidas através do potencial ζ (Santos et al., 1997; Philo, 2006; Domingues et al., 2008; Freire et al., 2011; Torcato et al., 2012).

2.5.5. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica baseada no uso de ondas eletromagnéticas que analisa a fluorescência de uma amostra, sendo esta resultante da absorção de energia radiante e emissão de parte desta energia na forma de luz, com menor energia que a luz incidente (Valeur, 2001). Duas características são essenciais na espectroscopia de fluorescência: o comprimento de onda em que uma dada substância absorve (comprimento de onda de excitação) e o comprimento de onda onde a substância emite (comprimento de onda de emissão) (Atvars e Martelli, 2002; Lima, 2010).

Uma molécula ao absorver radiação tem os estados eletrônicos modificados, isto é, os elétrons que absorvem a radiação são excitados do estado fundamental para um excitado. Posteriormente, relaxa novamente para o estado fundamental na forma de calor, passando pelos níveis vibracionais, ou fazendo conversões internas até atingir nível de menor energia. A partir deste estado três fenômenos podem ser associados os seguintes comportamentos físicos:

- A molécula perderá energia através da emissão de um fóton, voltando ao estado fundamental, sendo este fenômeno dito fluorescência;
- A molécula passará para um estado tripleto excitado através de um cruzamento intersistema e voltará ao nível vibracional de menor energia, fenômeno chamado de fosforescência;
- A molécula perderá energia de uma forma não radiativa, ou seja, não emitirá nenhum fóton e retornará ao estado fundamental (Lakowicz, 2006; Archilha, 2008).

Esses fenômenos estão representados no diagrama de Jablonski (Fig. 19).

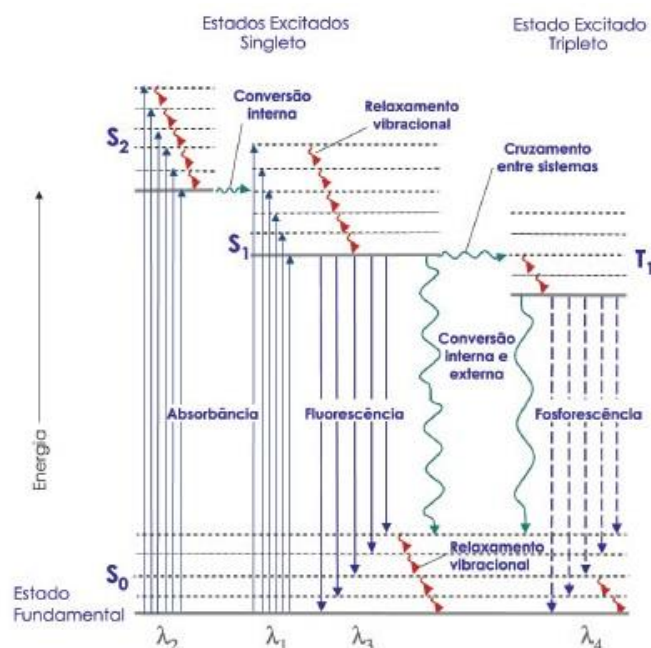


Figura 19. Diagrama de Jablonski, representando os fenômenos de absorção e relaxação de uma molécula. Fonte: Sotomayor et al., 2008.

O processo de relaxação por fluorescência tem um tempo de vida muito curto ($\sim 10^{-8}$ s) e é dito permitido, pois envolve o estado singlete, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original (Fig. 20). Por outro lado, na fosforescência a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto). Em consequência da retenção da orientação original, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples (Luiz, 2009).

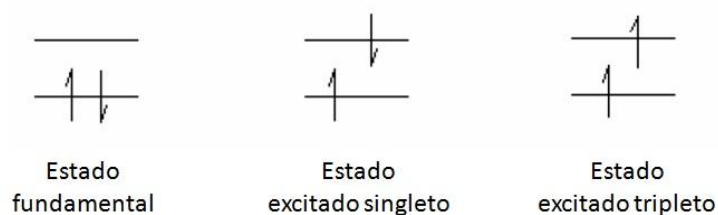


Figura 20. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto. Fonte: Coelho, 2004.

A técnica de fluorescência usa os espectros de emissão e excitação para analisar e interpretar os resultados na busca de padrões como deslocamento do pico de emissão, aumento da intensidade de fluorescência e supressão da fluorescência. Com essa identificação é possível obter informações como conformação da molécula e suas interações com solventes (Lima, 2010).

Para que ocorra a fluorescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa, sendo esses dois fatores críticos na magnitude da eficiência quântica fluorescente (ϕ_f) de uma substância. A eficiência quântica fluorescente de uma substância é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos (Equação 14). Uma molécula será significativamente fluorescente se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável (entre 0,1 e 1).

$$\phi_f = I_F/I_A \quad , \quad \text{Eq. 14}$$

onde I_F e I_A são respectivamente as intensidades da radiação fluorescente e absorvida (Coelho, 2004).

A fluorescência sofre uma forte influência do microambiente ao redor da molécula fluorescente, podendo assim ser utilizada para investigações físico-químicas, bioquímicas e em sistemas biológicos. Sondas fluorescentes referem-se a uma variedade de moléculas e íons que, sob apropriada excitação eletromagnética, emitem luz (Winnik e Regismond, 1996). A 5(6)-carboxifluoresceína (5(6)-CF) é uma sonda fluorescente hidrossolúvel caracterizada por apresentar o fenômeno conhecido como auto-supressão da fluorescência quando se encontra em alta concentração (>50 mM), tendo seus comprimentos de excitação e emissão em torno de 490nm e 512nm, respectivamente (Chen e Knutson, 1988). Isto significa que quando preparada a uma concentração alta, a 5(6)-CF não fluoresce, mas se preparada em baixas concentrações apresentará fluorescência. Este fenômeno auxilia no estudo da permeabilização de vesículas lipídicas. Vesículas preparadas com 5(6)-CF em seu interior numa concentração alta não apresentam fluorescência. Contudo, através da lesão originada na vesícula por qualquer agente que altere a sua barreira de permeabilidade resulta na saída da 5(6)-CF para o meio extravesicular a favor do gradiente de concentração e, desta forma, resulta na diluição da 5(6)-CF no meio externo e aumento da fluorescência (Fig. 21). Este aumento pode ser medido em função do tempo e da concentração do agente lítico (isto

é, responsável pela lesão na membrana) e assim obter o curso temporal e a dose dependência da permeabilização (Ambroggio et al. 2005; Torcato et al., 2012).

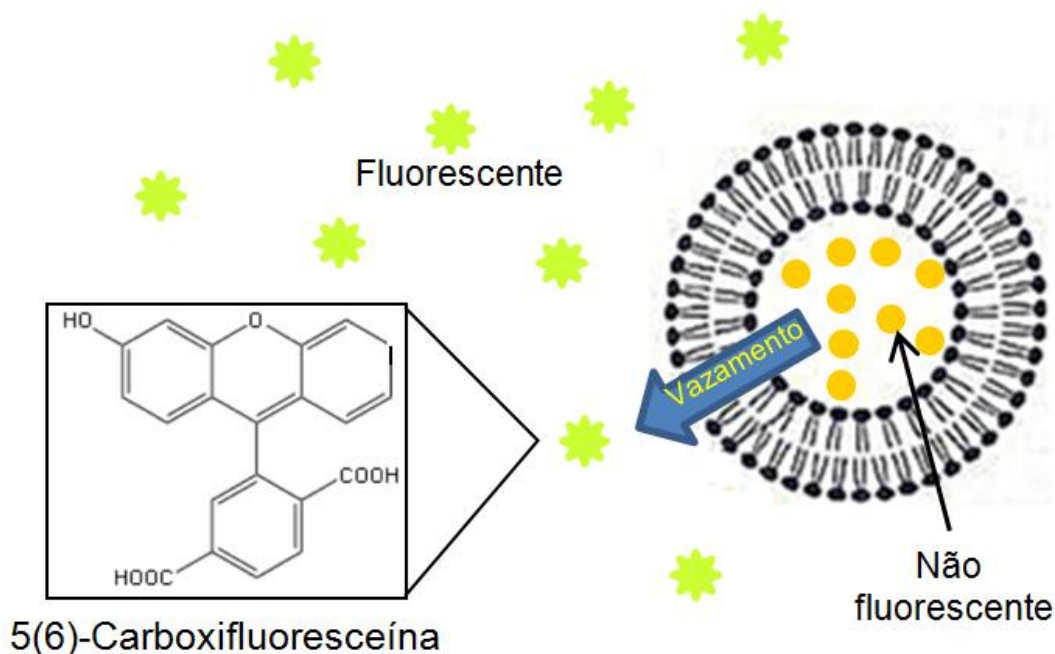


Figura 21. Princípio do vazamento de vesículas com um marcador que apresenta auto-supressão.

Devido à capacidade dos PAMs interagirem com as membranas biológicas, os experimentos de vazamento de vesículas induzido por peptídeos têm se tornado uma experiência padrão para investigar a interação peptídeo/membrana e o potencial de toxicidade dos peptídeos (Ambroggio et al. 2005; Andersson et al., 2007; Domingues et al., 2012; Torcato et al., 2012). A habilidade do PAM em induzir a permeação ou ruptura de membranas pode ser quantificada através do emprego de vesículas lipídicas contendo algum corante fluorescente como descrito no parágrafo anterior. A porcentagem de vazamento induzido é inferida pelo aumento de fluorescência no meio após a ação do PAM. Um detalhe importante nestes ensaios de vazamento é conhecer a fluorescência máxima do corante fluorescente encapsulado, para estimar qual percentual de fluorescência foi induzido pelo peptídeo. Para isto após o tempo de ação do peptídeo é usado um detergente, em geral o triton ou polidodecanol, para certificar que todas as membranas foram rompidas (Torcato et al., 2012).

CAPÍTULO 3

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar parâmetros eletroquímicos e ópticos para elucidar o mecanismo de ação dos peptídeos com atividade antimicrobiana Magainina I, *Pa*-MAP, LL-37, Clavanina A e Clavanina X, empregando modelos de biomembranas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar lipossomas revestidos e não revestidos pelo copolímero tribloco Synperonic;
- Encapsular a MagI nos lipossomas com e sem o revestimento de Synperonic para avaliação da estabilidade dos mesmos;
- Determinar o tamanho e a carga superficial dos lipossomas;
- Obter monocamadas automontadas, a partir de lipossomas com e sem revestimento de Synperonic, sobre eletrodo de ouro modificado com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS);
- Utilizar a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica para avaliar o processo de adsorção da MagI sobre o eletrodo modificado com as membranas revestidas ou não com o Synperonic;
- Analisar as propriedades interfaciais da interação MagI-membrana;
- Determinar a resistência de transferência de carga e a dupla camada elétrica das membranas antes e após a exposição aos peptídeos *Pa*-MAP e LL-37;
- Utilizar a espectroscopia de impedância elétrica para elucidar o mecanismo de ação do *Pa*-MAP e do LL-37;
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a morfologia das membranas depositadas em suporte sólido antes e após a exposição do *Pa*-MAP e do LL-37;
- Avaliar a interação peptídeo-membrana utilizando as ClavA e ClavX e vesículas lipídicas;
- Produzir um manuscrito a partir da revisão da literatura realizada.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGIA

4.2. MATERIAIS

Os peptídeos utilizados neste trabalho foram a Magainina I sintética obtida da Sigma Chemical (St. Louis, EUA), o LL-37, adquirido da China Peptides (Hong-Kong, China) e a Clavanina A, da JPT Peptide Technologies (Berlin, Alemanha); todos com 95% de pureza. O *Pa*-MAP e a Clavanina X foram sintetizados e cedidos pelo grupo de pesquisa em Proteômica da Universidade Católica de Brasília, que atua sob a coordenação do professor Octávio Luiz Franco. A síntese do *Pa*-MAP e da ClavX foi realizada pelo método de fase sólida utilizando a estratégia de N-9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) (Chan e White, 2000). Na Tabela 1 encontram-se as sequências dos peptídeos estudados.

Tabela 1. Peptídeos estudados e suas respectivas sequências.

Peptídeo	Sequência
Clavanina A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF
Clavanina X	FLPIIVFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES
Magainina I	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
<i>Pa</i> -MAP	HTASDAAAAAALTAANAAAAAASMA

A fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200, 98%) foi obtida da Lucas Meyer (Hamburgo, Alemanha). O 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC, 99%) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-(fosfo-rac-(1-glicerol)) (POPG, 99%) foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). O 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC, 99%), o colesterol e o 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) foram obtidos da Sigma Chemical (St. Louis, EUA). O Synperonic F68 foi adquirido da Serva Electrophoresis (Heidelberg, Alemanha). O ferri- e ferrocianeto de potássio foram obtidos da VETEC (Brasil). O ácido 2-(4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfônico (HEPES) e o cloreto de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes químicos e solventes foram de grau analítico e utilizados como recebidos, sem purificação adicional. A água utilizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

4.2. MÉTODOS

Formulação de lipossomas revestidos e não revestidos

Os lipossomas (Lip) foram obtidos através de um filme lipídico formado pela evaporação do solvente a partir de uma solução orgânica de lipídios (Andrade et al., 2004). Para a formulação, o fosfolipídio Epikuron 200 (EP) e o colesterol (COL) foram utilizados numa razão molar de 7:1. O EP e o COL foram dissolvidos separadamente numa solução de clorofórmio/metanol (9:1, v/v), em agitação magnética à temperatura ambiente e, posteriormente, misturados e agitados por 10 minutos. Subsequentemente, a formulação foi sujeita à baixa pressão (100 mm.Hg⁻¹) e agitação (100 rpm, 37 °C) para a evaporação do solvente e obtenção dos filmes lipídicos. Posteriormente, os filmes foram hidratados com tampão citrato-fosfato (10⁻³M, pH 7,4) e submetidos à agitação magnética em temperatura ambiente durante 45 minutos para se obter vesículas multilamelares (MLV – do inglês *multilamellar vesicles*). Em seguida, as suspensões de MLV foram submetidas à sonicação durante 120 segundos utilizando uma sonda de ultrassom (Unique DES500) na frequência de 17 kHz, e vesículas unilamelares grandes e pequenas (LUV e SUV – do inglês *large unilamellar vesicles* e *small unilamellar vesicles*, respectivamente) foram formadas. Os lipossomas revestidos com Synp foram obtidos de acordo com Kostarelos et al. (1998). 0,5% de Synp foi adicionado numa solução contendo lipossomas (1:1, v/v) sob agitação magnética à temperatura ambiente durante duas horas. Finalmente, as formulações obtidas foram armazenados a 4 °C.

Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

As medições de tamanho de partícula e potencial zeta (ζ) foram realizadas utilizando um instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). O diâmetro médio hidrodinâmico foi determinado por espalhamento dinâmico de luz detectado em um ângulo de 90° com um laser de He-Ne operando em $\lambda = 633$ nm. O ζ foi medido pela técnica de mobilidade eletroforética por meio da aproximação de Smoluchowski. Todas as medições foram realizadas a 25°C e os resultados apresentados correspondem à média de três medidas independentes.

Camadas auto-montadas

Para a avaliação da interação da camada fosfolipídica de EP (CF) com a MagI, um eletrodo de ouro modificado com MPTS foi utilizado para a obtenção de camadas

lipídicas automontadas. As medições óticas foram realizadas utilizando um substrato revestido com ouro para a automontagem da monocamada de MPTS devido a associação do grupo –SH (sulfidril ou tiol) com a superfície metálica. Uma solução de MPTS em etanol com concentração final de 10^{-4} mol.L⁻¹ foi utilizada para o revestimento da superfície metálica. O substrato foi imerso nesta solução durante 30 minutos e, em seguida, lavado com água destilada e etanol. Na sequência, o substrato foi incubado a 60°C por 1 hora (Piwonski et al., 2005). A Fig. 1 mostra esquematicamente as etapas de modificação da superfície do eletrodo e formação da CF sobre a superfície com MPTS. As vesículas unilamelares adsorvem espontaneamente sobre a superfície do MPTS hidrofóbico para formar uma CF automontada, proporcionando uma superfície de membrana modelo plana (Fig. 1).

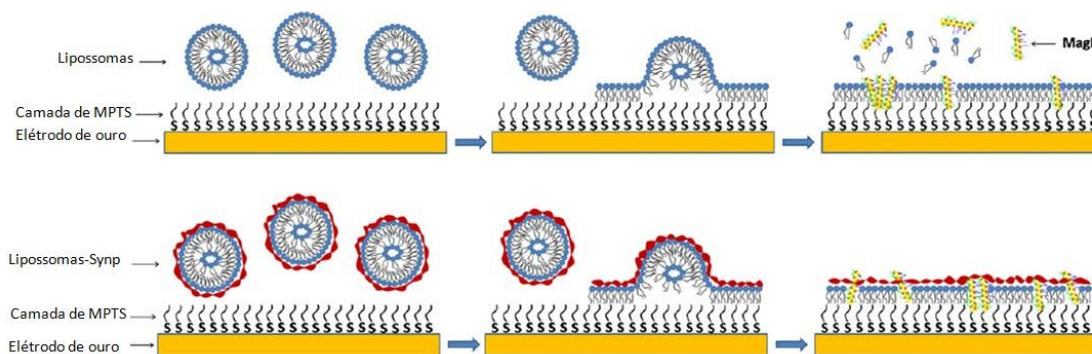


Figura 1. Representação esquemática da adsorção de lipossomas (com ou sem Synp) sobre um eletrodo de ouro modificado com MPTS e a posterior ação da MagI.

Medidas eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato PGSTAT 302N (Autolab, Eco Chemie, Holanda) interfaceado com um analisador controlado por computador. Uma configuração de três eletrodos, tendo como eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado com KCl), foi empregada ao longo das análises. Todos os potenciais foram referidos a este eletrodo. Eletrodos de platina e de disco de ouro ($\phi = 2$ mm) foram usados como contra-eletrodo e eletrodo de trabalho, respectivamente. Os espectros de impedância foram registrados numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz. A amplitude do potencial de onda senoidal aplicado foi de 10 mV, enquanto o potencial de corrente direta (dc) foi limitado ao potencial de circuito aberto, mensurado imediatamente antes da aplicação do potencial de onda senoidal.

A voltametria cíclica (VC) foi realizada com um potencial de varredura entre 0,7 e -0,2 V a uma taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹. As medidas de VC e EIS foram realizadas na presença de uma solução de K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) a 10 mM, utilizada como uma sonda redox em tampão fosfato salina (PBS, pH 7.4), em diferentes fases de preparação do eletrodo modificado. O eletrodo de ouro foi polido mecanicamente com Al₂O₃ (granulosidade de 0,05 µm) e submetido a sonicação em água destilada antes de cada experimento. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente dentro de uma gaiola de Faraday.

Medidas Dielétricas

As medidas de impedância elétrica foram realizadas em um analisador de impedância SI 1260 (Solartron, Reino Unido), variando a frequência de 1Hz-1MHz. As medidas dielétricas foram realizadas em diferentes potenciais (0V, 0.5V e 1V) e amplitude de 100 mV. Para a determinação das partes real (Z') e imaginária (Z'') da impedância foi utilizado um aparato instrumental composto por duas placas de aço inoxidável em paralelo com as dimensões de 64 × 21 mm a uma distância de 10 mm. A escolha do aço inoxidável foi devida à estabilidade fornecida pelo material para a montagem de membranas lipídicas (Sejdárková et al., 1997). A limpeza do eletrodo foi realizada sequencialmente em clorofórmio e água deionizada em banho ultrassônico. Todos os passos experimentais foram realizados em temperatura ambiente e com pelo menos três repetições.

As membranas de fosfolipídios de DPPC foram obtidas por automontagem sobre o eletrodo de aço inoxidável, utilizando o método de revestimento *dip-coating* (Tien e Ottova-Leitmannova, 2003). Inicialmente, o eletrodo foi imerso numa solução de clorofórmio contendo o DPPC (1 mg.mL⁻¹) e as medições foram realizadas em intervalos de 5 minutos. Depois de alcançar o tempo máximo de deposição (30 minutos), o eletrodo contendo a membrana de lipídios foi imersa num béquer contendo 5 mL de *Pa*-MAP ou LL-37 em duas distintas concentrações padrões (10 e 100 µg.mL⁻¹), e as medições elétricas foram realizadas em intervalos de 5 minutos. Antes de cada deposição da membrana lipídica, uma medição de EIE com o eletrodo limpo (não modificado) foi realizada em água deionizada, a qual serviu como referência de comparação para avaliar cada etapa de modificação subsequente.

Instrumentação e medições de Ressonância de Plásmons de Superfície

As medidas foram realizadas em um instrumento de RPS de duplo canal Esprit (Autolab, Eco Chemie, Holanda) instalado com a configuração de Kretschmann (Oliveira et al., 2011). Para as medições de RPS foi utilizado um eletrodo de vidro ótico revestido com um filme fino de ouro (Autolab, Eco Chemie, Holanda), sendo o sinal obtido registrado em função do tempo. Inicialmente, o sinal de RPS foi registrado utilizando uma solução de corrida para estabilizar o eletrodo e permitir o estabelecimento da linha de base. Durante cada leitura, os primeiros 200 segundos representam a linha de base, após o qual a amostra foi adicionada e deixada para interagir com o eletrodo.

Medidas de microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas utilizando um microscópio JSM 5900 (JEOL Instruments, Japão) a uma voltagem de aceleração de 15 kV e distância de trabalho de 5 µm. As amostras foram preparadas na superfície de lâminulas de vidro, sendo estas colocadas na superfície de um suporte de alumínio estabilizada por fita de carbono. Após secagem à temperatura ambiente, uma fina camada de ouro foi depositada nas amostras utilizando um metalizador Bal-Tec MSC 050 (EUA) (de Oliveira et al., 2008). As imagens 3D foram obtidas utilizando software ImageJ versão 1.31 (Abramoff et al., 2004).

Modelagem Molecular de Pa-MAP

O modelo tridimensional para o Pa-MAP foi construído de acordo com Migliolo e colaboradores (2012), usando a estrutura do PDB 1jb5 como molde. A estrutura peptídica tridimensional teórica foi construída através do programa Modeller v.9.8 (Eswar et al., 2007). O modelo final foi escolhido após avaliação utilizando o programa PROSA II (Wiederstein e Sippl, 2007) para a análise do empacotamento e as características de exposição aos solventes, e o PROCHECK para a análise da qualidade estereoquímica. As estruturas peptídicas foram visualizadas e analisadas no Delano Scientific's PYMOL <http://pymol.sourceforge.net/> (DeLano, 2002).

Interação in silico membrana/Pa-MAP

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa AUTODOCK 4.2 (Morris et al., 2009). A simulação por docking de Pa-MAP foi realizada para uma

membrana de DPPC (constituída por 64 lipídios) e 3864 moléculas de água (Marrink et al., 1998). Posteriormente, todas as moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados utilizando o Auto Dock Tool. Um algoritmo genético lamarckiano foi utilizado para encontrar o melhor complexo peptídeo-membrana. Cinquenta corridas de docking foram implementadas totalizando 335 possíveis modelos para o *Pa*-MAP versus as membranas de DPPC, sendo limitado o grau de liberdade para as cadeias laterais. As 335 estruturas geradas foram organizadas em um Box Plot para identificar a maior quantidade de interações com menor energia livre, e a análise mostrou tolerância de 4 Å (Jitonnom et al., 2012). O programa Pymol (DeLano, 2010) foi usado para caracterizar as interações peptídicas com a membrana. As análises estatísticas foram realizadas através do pacote R para computação estatística (<http://www.r-project.org>).

Preparação das vesículas para as medidas de carga superficial, agregação de vesículas e ensaios de permeabilidade

As LUVs com diâmetro de aproximadamente 100 nm foram obtidas por extrusão de MLVs, segundo Mayer et al. (1986). Para a obtenção dos filmes lipídicos foi utilizado o POPC e o POPC:POPG (8:2, p/p) dissolvidos separadamente em clorofórmio e misturados sob agitação magnética à temperatura ambiente. Inicialmente, as MLVs foram obtidas a partir da hidratação de um filme lipídico seco a vácuo com tampão HEPES (pH 7,4) com NaCl 150 mM. Em seguida, a solução contendo as MLVs foi submetida a extrusão utilizando seringas 1001RN (Hamilton, Reno, NV) com filtros de membrana de 13 mm de diâmetro (poro de 400 nm) e membranas de polycarbonato de 10 mm (poro de 100 nm) obtidas da Nucleopore - Wathman (Kent, Reino Unido), sendo obtidas vesículas de 100 nm de diâmetro. As medidas de espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta foram realizadas como anteriormente descritas.

Ensaio de permeabilidade de vesículas

A permeabilidade de vesículas lipídicas induzida por ação dos peptídeos ClavA e ClavX foi medida por espectroscopia de fluorescência utilizando um espectrofotômetro Varian Cary Eclipse (Mulgrave, Austrália). Neste ensaio foi monitorada a liberação da 5(6)-CF encapsulada em LUVs (100µM). Os LUVs foram obtidos como descrito na seção anterior, com exceção de que o filme lipídico foi hidratado em tampão HEPES (pH 7,4) com de NaCl 150 mM contendo 5(6)-CF 100

mM (pH 7,4 ajustado com NaOH). A 5(6)-CF livre foi removida utilizando cromatografia por exclusão de tamanho em uma coluna Econo-Pac 10 DG Bio-Rad (Richmond, CA). As medições de intensidade de fluorescência foram realizadas em alíquotas de LUVs contendo a 5(6)-CF encapsulada. As medidas foram registradas continuamente durante 25 minutos, utilizando um comprimento de onda de excitação de 492 nm e um comprimento de onda de emissão de 517 nm (Domingues et al., 2012). Os peptídeos foram utilizados nas concentrações de 1, 5 e 10 μ M. No final de cada experimento, a liberação total da CF foi determinada após a lise das LUVs com Triton X-100 a 1%. As taxas de vazamento da CF são expressos como a percentagem de liberação máxima da 5(6)-CF (Domingues et al. 2009):

$$\% \text{ Permeabilidade} = \frac{F - F_0}{F_{100\%} - F_0}$$

onde F é a intensidade de fluorescência medida após 15 minutos da adição do peptídeos, F_0 é a intensidade de fluorescência medido após 5 minutos sem adição dos peptídeos e $F_{100\%}$ é a fluorescência medida após rompimento das vesículas com o Triton X-100. As intensidades de fluorescência foram corrigidas devido à diluição causada pela adição do peptídeo e do Triton X-100.

4.3. INFRAESTRUTURA

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando a infraestrutura de três universidades:

Tabela 2. Infraestruturas utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

UNIDADE	METODOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	
Lab. Biodispositivo Nanoestruturado	Formulação de lipossomas revestidos e não revestidos Camadas auto-montadas Medidas eletroquímicas Instrumentação e medições de RPS
Lab. Polímeros Não Convencionais	Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta Medidas Dielétricas
Lab. Microscopia do Departamento de Física	Medidas de MEV

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA Lab. Análises Proteômicas e Bioquímicas	Síntese e purificação dos peptídeos Modelagem Molecular de Pa-MAP
UNIVERSIDADE DE LISBOA Lab. Bioquímica Física – Instituto de Medicina Molecular	Preparação das LUVs Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta Ensaio de permeabilidade de vesículas

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises morfológicas de Camada Fosfolipídica-Magainina I

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a morfologia da superfície do eletrodo modificada pela camada fosfolipídica (CF), resvestidas ou não com o Synp, antes e após a ação da MagI (Fig. 1). A CF aparece como uma superfície plana e lisa (Fig. 1a,b), em contraste com o sistema CF-MagI, que tem uma superfície relativamente heterogênea nas imagens de MEV (Fig. 1c,d). Em particular, houve o surgimento de poros na superfície da CF após a interação com a MagI (Fig. 1c). Adicionalmente, a ação de formação de poros da MagI sobre a CF é claramente observada na Fig. 1d e algumas partículas de forma irregular também foram identificadas. A morfologia do filme CF-Synp apresentou-se como uma superfície plana e lisa (Fig. 1e,f). Este aspecto típico da superfície sugere que o Synp está completamente disperso na matriz do filme da CF. Nenhuma diferença estrutural significativa pôde ser observada após a adição da MagI ao sistema CF-Synp (Fig. 1g,h). Assim, os resultados obtidos para interação da MagI com o sistema CF-Synp indicam que o copolímero tribloco pode ajudar a selar as membranas da CF estruturalmente danificadas. Maskarinec et al. (2005) demonstraram que a inserção de PEO-PPO-PEO em filme lipídico leva a um maior empacotamento das moléculas lipídicas através da ocupação física da parte danificada do filme lipídico. Subsequentemente, o copolímero tribloco é expelido quando a integridade da membrana é restaurada (Wu et al., 2004; Maskarinec et al., 2005; Chang et al., 2008a).

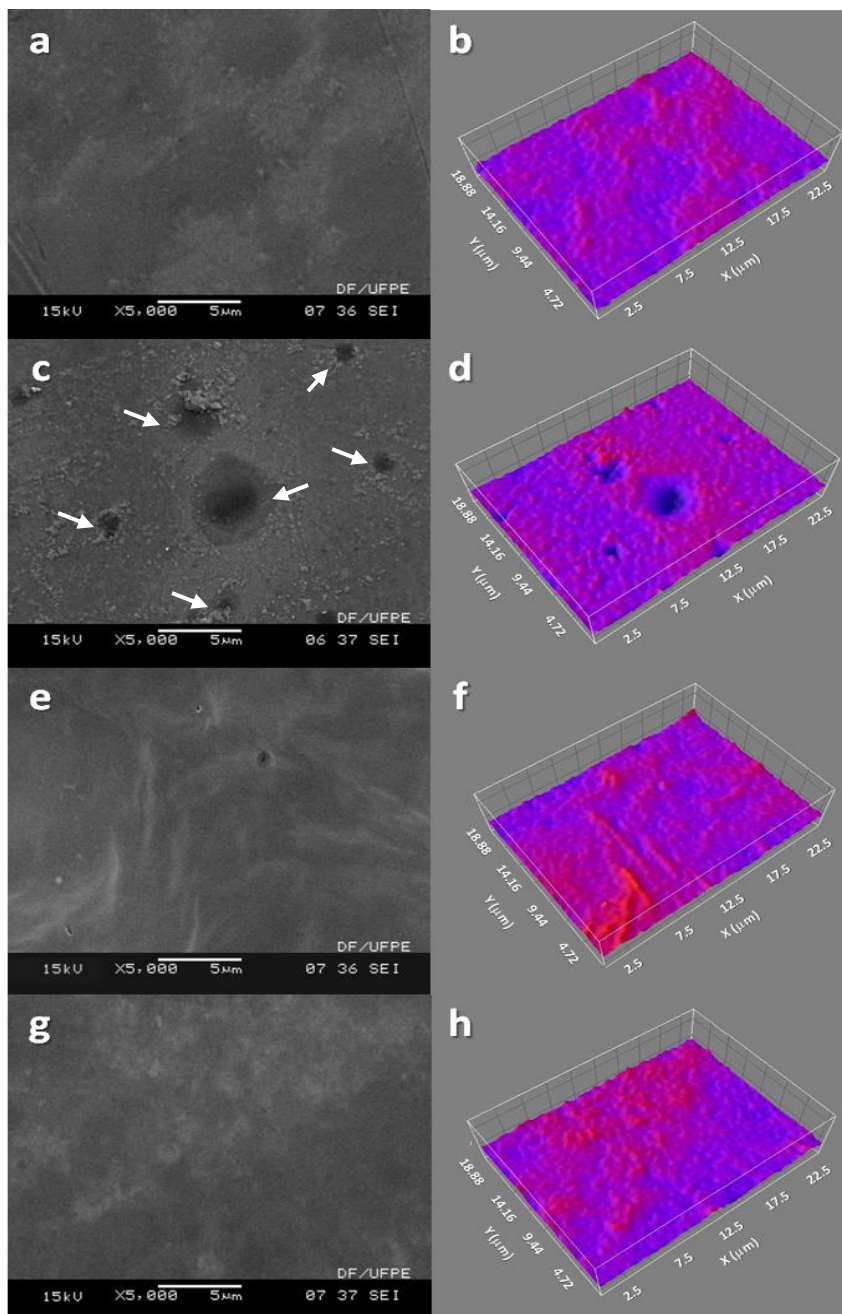


Figura 1. Imagens de MEV da CF (a), CF-MagI (c), CF-Synp (e) e CF-Synp-MagI (g) e suas imagens 3D correspondentes: CF (b), CF-MagI (d), CF-Synp (f) e CF-Synp-MagI (h). Em rosa são as regiões com maior altura e em roxo representa menor altura. As setas mostram os poros formados após a ação da MagI.

Comportamento eletroquímico do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sobre a superfície do eletrodo modificado com CF-MagI

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um processo de modificação gradual para os eletrodos na presença de um par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} para monitorar a modificação do eletrodo (Fig. 2).

O voltamograma cíclico do eletrodo de ouro limpo mostrou um par de picos redox bem definido, demonstrando o processo reverso do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ na solução. A CF automontada na superfície do eletrodo diminuiu a corrente de pico anódica e catódica do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Isto poderia ser facilmente interpretado como uma CF relativamente compacta formada sobre o eletrodo de ouro, a qual impede a difusão do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ através da superfície do eletrodo. A membrana lipídica sobre um suporte sólido tem a vantagem de fácil preparação, reprodutibilidade, estabilidade e possibilidade de utilizar um suporte eletricamente condutor.

Após a interação da MagI sobre a superfície da CF, ocorreu um aumento dos picos anódicos e catódicos, o que poderia sugerir a formação de poros na CF. Estes resultados demonstram que MagI mantém sua ação biológica após a exposição na superfície do eletrodo. No entanto, nenhum aumento na resposta amperométrica do sistema CF-MagI foi observada na presença de Synp, sugerindo que a perturbação da membrana provavelmente não está ocorrendo. Os resultados confirmaram que a MagI exibiu uma interação sutil com o sistema CF-Synp sem modificações significativas na resposta voltamétrica.

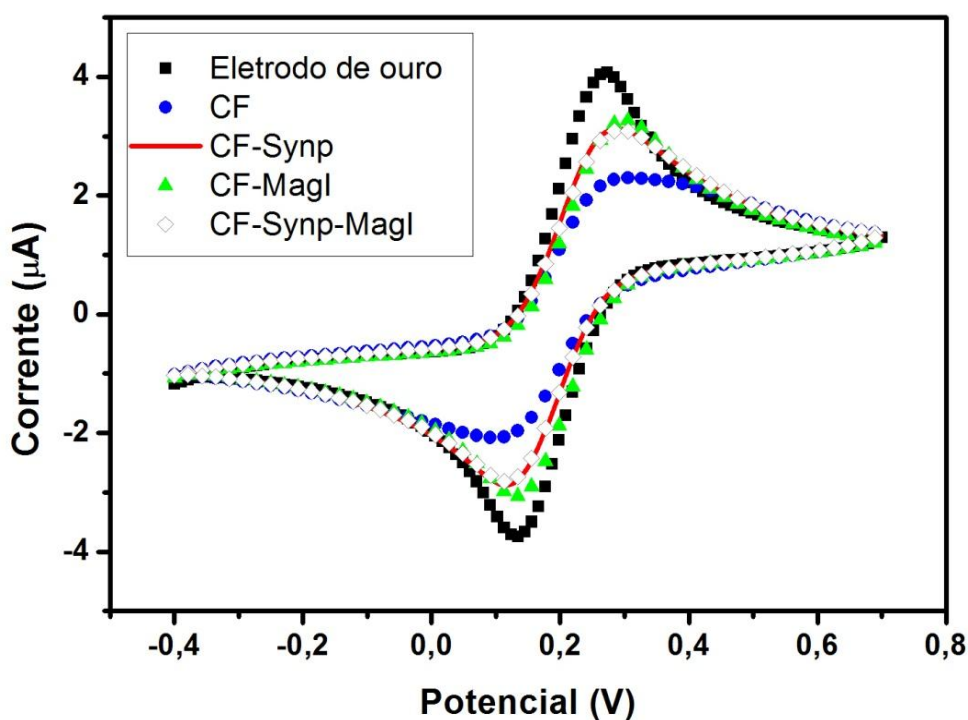


Figura 2. Voltamograma cíclico do eletrodo em diferentes estágios de modificação.

Análises eletroquímicas da interação CF-MagI

A Fig. 3 mostra o espectro de impedância Faradaica observado durante o processo de modificação gradual da superfície do eletrodo. O eletrodo de ouro limpo é um semicírculo de reduzida dimensão, o que significa uma transferência de resistência de carga (R_{CT}) da sonda redox muito baixa, confirmando assim os resultados obtidos por VC. A R_{CT} foi aumentada após a modificação do eletrodo com a CF, devido à deposição de lipídios na superfície do eletrodo, a qual fornece uma barreira eletrostática que impede a passagem do par redox através da CF e retarda a cinética de transferência de elétrons entre a sonda redox e o eletrodo.

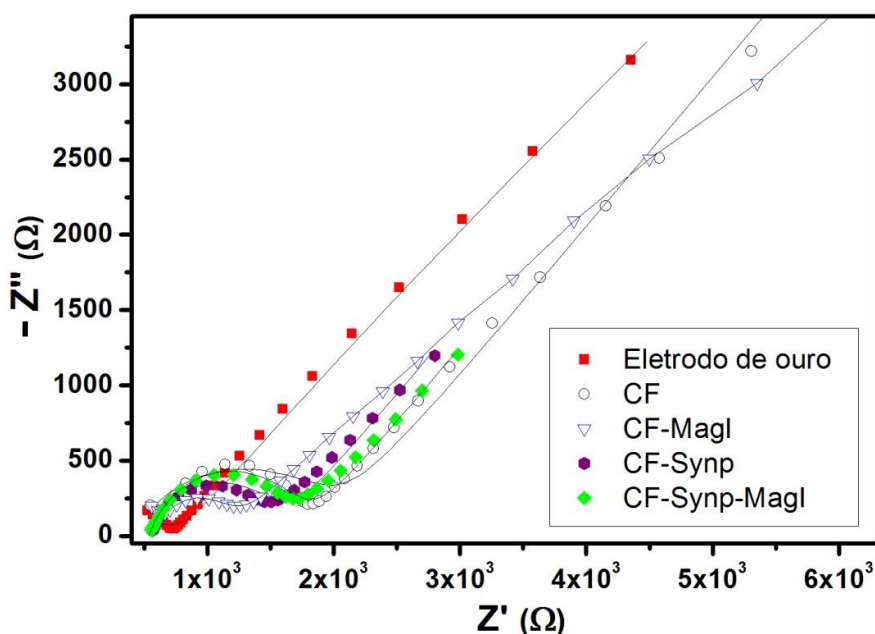


Figura 3. Gráficos de Nyquist do eletrodo em diferentes estágios de modificação. Os símbolos mostram os resultados obtidos através de EIS e as linhas representam os dados após ajuste.

Os espectros teóricos de impedância se ajustaram aos resultados experimentais, os quais incluem uma porção semicircular, observadas em frequências mais elevadas, que corresponde ao processo limitado de transferência de elétrons, seguido por uma parte linear característica de frequências mais baixas atribuída a uma transferência de elétrons de difusão limitada (Fig. 3). Os dados de impedância foram ajustados usando o método não linear de mínimos quadrados (programa desenvolvido por Boukamp) (Oliveira et al., 2011), a partir do circuito equivalente de Randles (Fig. 4), que inclui a resistência da solução (R_s), a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), o elemento de

impedância de Warburg (W) e a R_{CT} . Idealmente, W e R_s representam as propriedades de carga da solução eletrolítica e as características de difusão da sonda redox em solução e, assim, não são afetadas por alterações na superfície do eletrodo. A R_{CT} depende da característica de isolamento na interface eletrodo/eletrólito. As mudanças na R_{CT} foram muito maiores do que nos outros componentes de impedância. Desse modo, a R_{CT} foi o elemento do circuito mais adequado para a detecção das propriedades interfaciais do biossistema preparado durante todos estes procedimentos de montagem.

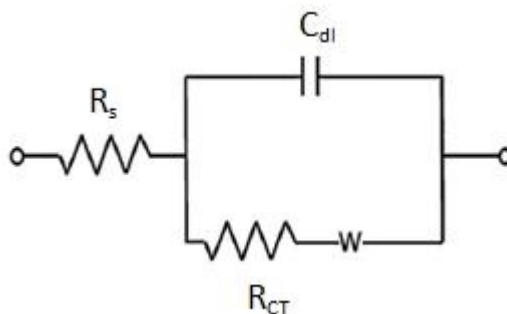


Figura 4. Circuito equivalente utilizado no ajuste dos dados da impedância. R_s = resistência de solução; C_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_{CT} = resistência de transferência de carga; W = elemento de Warburg.

As mudanças da C_{dl} mostram uma relação direta e sensível com a taxa de transferência de elétrons e com as respostas da interação entre a MagI e a monocamada lipídica. Deste modo, o R_{CT} foi utilizado como o principal sinal do sensor. Em elevadas frequências o semicírculo demonstrou uma cinética de transferência de carga heterogênea, de acordo com as equações

$$R_{CT} = \frac{RT}{nFi_0} \quad , \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{e} \quad i_0 = nFA\kappa^0 C \quad , \quad \text{Eq.2}$$

onde R é a constante dos gases, T é a temperatura, n é a constante de transferência de elétrons do par redox ($n = 1$, para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$), F é a constante de Faraday, i_0 é a variação da corrente entre o eletrodo de ouro e o par redox, A é a área do eletrodo de ouro, κ^0 é a constante da taxa de transferência de carga e C é a concentração do par redox. A constante da taxa de transferência de carga foi obtida a partir das equações acima.

A curva simulada pelo circuito equivalente ficou ajustada aos gráficos de impedância experimental, o que indica a precisão do circuito equivalente. O complexo CF-MagI provoca a ruptura da camada lipídica na superfície do eletrodo, o que diminui o diâmetro do semicírculo, resultando em uma baixa R_{CT} . O diâmetro torna-se menor e a constante da taxa de transferência de carga κ^0 aumenta de $0,66 \times 10^{-10}$ m/s para $1,13 \times 10^{-10}$ m/s, na seguinte ordem: eletrodo modificado pela CF, eletrodo modificado por CF-MagI e pelo complexo CF-Synp-MagI.

A Tabela 1 lista os parâmetros dos resultados de impedância ajustados, mostrando os valores de R_{CT} , C_{dl} e κ^0 para cada processo de modificação. A R_{CT} do eletrodo de ouro limpo é 0,286 k Ω , uma resposta pequena em comparação com os valores de R_{CT} dos outros sistemas analisados, exceto para o sistema CF-MagI. O aumento observado para κ^0 está de acordo com o fato de que a interação da MagI com a CF resulta numa diminuição significativa do R_{CT} (0,673 k Ω), devido à geração de defeitos na membrana lipídica. Após a interação da MagI com o eletrodo modificado com CF-Synp, um aumento significativo no R_{CT} de 0,846 k Ω para 1,024 k Ω foi observado (Tabela 1). Este dado reflete a imobilização/adsorção do peptídeo, o que leva ao aumento muito significativo da massa sobre a superfície do eletrodo. A sequência das medidas do eletrodo modificado pela CF pura, CF-Synp e CF-Synp-MagI é consistente com a ocorrência de um bloqueio progressivo da interface, o que confirma que a quantidade de material imobilizado e/ou adsorvido sobre a superfície do eletrodo correlaciona-se diretamente com a resposta de impedância.

É importante salientar que o revestimento de Synp permaneceu na CF após a ação da MagI e a estrutura da membrana foi preservada, sem alterações aparentes na resposta de EIS. Os resultados apresentados na Fig. 20 mostram claramente que a MagI foi capaz de romper a CF, como pode ser visto pela diminuição da transferência de carga, R_{CT} .

O desempenho do eletrodo modificado por análise da ação da MagI foi avaliada através da variação relativa deste parâmetro (ΔR_{CT}). Esta variação pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(CF) - R_{CT}(MagI)}{R_{CT}(MagI)}, \quad \text{Eq. 3}$$

onde o $R_{CT}(CF)$ é o valor da resistência de transferência de carga do eletrodo modificado pela CF ou CF-Synp e o $R_{CT}(MagI)$, o valor da resistência de transferência de carga do eletrodo modificado pela CF após a exposição à solução contendo MagI.

Um resumo dos resultados da ação da MagI em cada um dos sistemas analisados, tais como CF e CF-Synp, é apresentado na Tabela 1. Todas as medidas foram repetidas em, pelo menos, triplicata e os resultados foram similares. Estes resultados demonstram que a MagI mantém a sua capacidade de fazer poros no eletrodo modificado pela CF. Como observado anteriormente, a ΔR_{CT} foi maior com a ação no MagI no eletrodo de ouro modificado com a CF (70,13%) do que no eletrodo de ouro modificado com CF-Synp (-17,38%) (Tabela 1). Assim, o Synp mostrou uma propriedade selante de membrana (Wu et al., 2004), evitando a ruptura da mesma.

Tabela 1. Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados e dos picos de corrente dos voltamogramas.

Eletrodo modificado	$R_{CT}(k\Omega)$	C_{dl} (F)	W ($\times 10^{-4}\Omega$)	$I_{pa}(\mu A)$	$I_{pc}(\mu A)$	ΔR_{CT} (%)	κ^o ($\times 10^{-10} m/s$)
Eletrodo de ouro	0.286 $\pm$ 0.011	1.015 $\times 10^{-8} \pm 0.013$	2.36 $\pm$ 0.011	0.404 $\pm$ 0.020	0.380 $\pm$ 0.013	-	2.67
CF	1.145 $\pm$ 0.010	6.075 $\times 10^{-8} \pm 0.096$	2.33 $\pm$ 0.086	0.249 $\pm$ 0.015	0.230 $\pm$ 0.021	-	0.66
CF-MagI	0.673 $\pm$ 0.021	6.662 $\times 10^{-8} \pm 0.116$	1.77 $\pm$ 0.109	0.327 $\pm$ 0.020	0.313 $\pm$ 0.030	70.13	1.13
CF-Synp	0.846 $\pm$ 0.012	8.844 $\times 10^{-7} \pm 0.067$	6.58 $\pm$ 0.073	0.308 $\pm$ 0.010	0.287 $\pm$ 0.017	-	0.90
CF-Synp-MagI	1.024 $\pm$ 0.014	7.617 $\times 10^{-7} \pm 0.079$	6.55 $\pm$ 0.124	0.314 $\pm$ 0.013	0.287 $\pm$ 0.011	-17.38	0.74

ΔR_{CT} - Variação de transferência de carga relativa a partir dos dados de impedância.

O mecanismo de interação entre a MagI e o eletrodo de ouro modificado pela CF era previsível. Inicialmente, a MagI liga-se provavelmente com a cabeça aniônica dos lipídios da CF através de interações eletrostáticas. Após a inserção na membrana, a MagI pode induzir a modificação dos fosfolipídios de tal modo a induzir uma curvatura positiva da interface, podendo impedir a passagem dos íons carregados negativamente da sonda redox através da membrana. Uma vez que a MagI é um peptídeo pequeno, presume-se que são necessárias várias moléculas associadas à membrana para formar um poro. Os resultados impedimétricos mostraram que a MagI rompeu a estrutura organizada de lipídios, resultando na remoção da mesma do eletrodo de ouro e, ao mesmo tempo, permitiu a passagem dos íons através dos poros na membrana, alcançando a superfície do metálica e exibindo uma resposta amperométrica.

A Fig. 5 mostra que o mecanismo de interação do peptídeo alterou as características elétricas da monocamada lipídica. O gráfico de Bode mostrou uma variação de impedância entre a situação inicial (com um revestimento lipídico intacto) e a situação final (onde a camada deve ter sido interrompida) e, apesar das alterações nas formas espectrais, foi aplicado o mesmo circuito equivalente. Na região de frequência média, uma relação linear pode ser observada entre o módulo de impedância *versus* logaritmo da frequência. Esta região de frequência corresponde ao comportamento capacitivo da interface eletrodo/eletrólito.

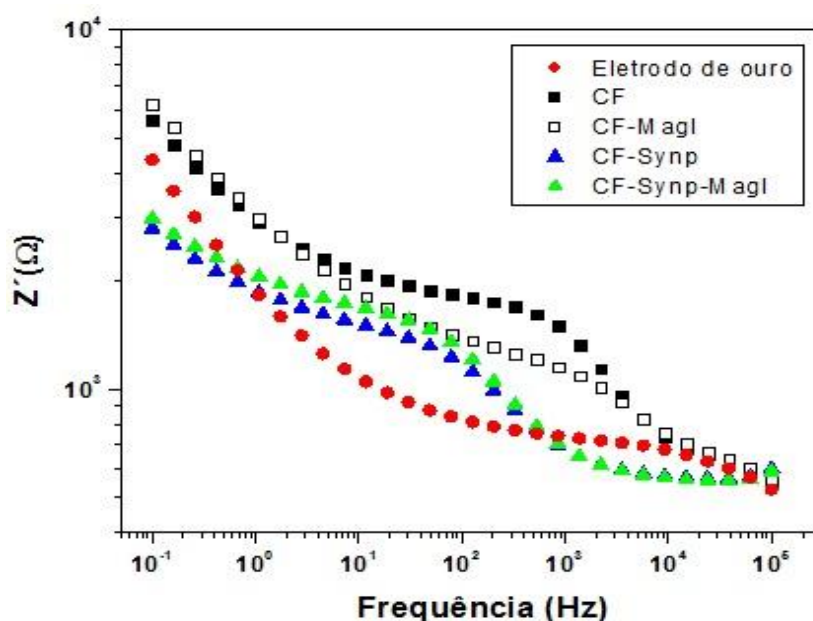


Figura 5. Gráfico de Bode do eletrodo em diferentes estágios de modificação.

Experimentos de R_{CT} *versus* tempo foram realizados a fim de aprimorar a compreensão do mecanismo de associação das membranas lipídicas (revestidas ou não pelo Synp) com a MagI. A Fig. 6 mostra a resposta da R_{CT} para os eletrodos modificados com CF e CF-Synp antes e depois da exposição à MagI. A MagI induz uma diminuição significativa na R_{CT} no primeiro minuto de exposição. No caso do sistema CF-Synp há um destacado aumento na R_{CT} após a exposição às moléculas de MagI. O valor final da R_{CT} para a CF na presença da MagI é 0,968 kΩ, enquanto que para CF-Synp-MagI é 2,703 kΩ. Os maiores valores de R_{CT} obtidos para CF-Synp-MagI indicam que a MagI é retida no sistema CF-Synp.

Na Fig. 6 é observada uma diminuição na resposta da R_{CT} para CF após interação com a MagI e, subsequentemente, um aumento da R_{CT} após alguns minutos. Esse comportamento impedimétrico resultante está de acordo com o modelo de EIS proposto por Chang et al. (2008b). Estes dados corroboram o modelo poro toroidal proposto para explicar os modos de ação de alguns PAMs. Nossos resultados mostraram que, por conseguinte, o biosistema proposto formado por membranas fosfolipídicas revestidos com Synp é adequado para o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas com uma resistência substancial à ação da MagI.

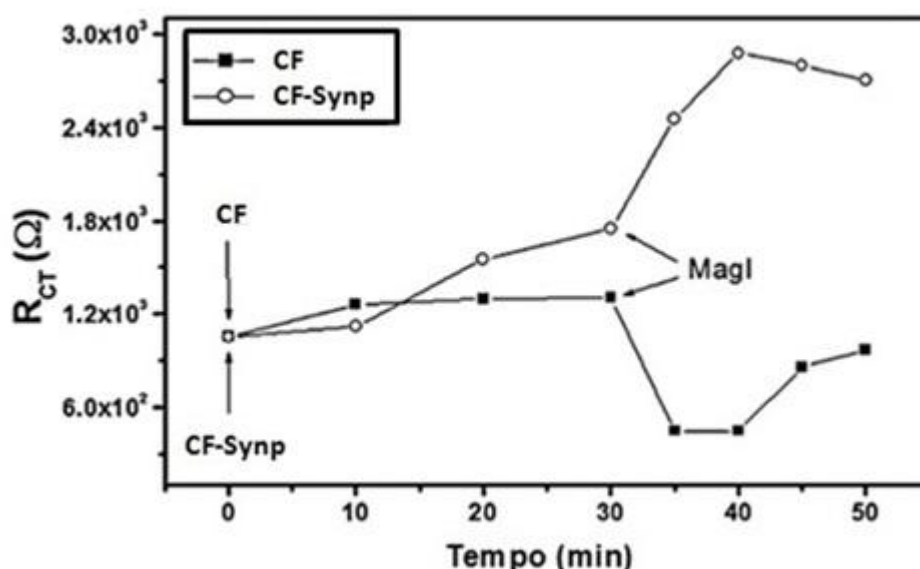


Figura 6. R_{CT} versus tempo para CF e CF-Synp exposta à MagI.

Análises por ressonância de plasmons de superfície de CF-MagI

Os sensorgramas de ligação entre a MagI e as camadas de CF e CF-Synp são mostrados na Fig. 7. Os resultados apresentados aqui mostram uma diferença notável na afinidade do peptídeo observada em CF-Synp em comparação com a CF pura, indicando a contribuição da camada de Synp para evitar a ruptura da membrana. As soluções de peptídeo foram passadas sobre as superfícies automontadas de MPTS e a taxa de associação detectada da MagI não variou consideravelmente quando a taxa de fluxo foi variada. Nossos resultados, portanto, indicam que a interação não foi de transporte de massa limitada.

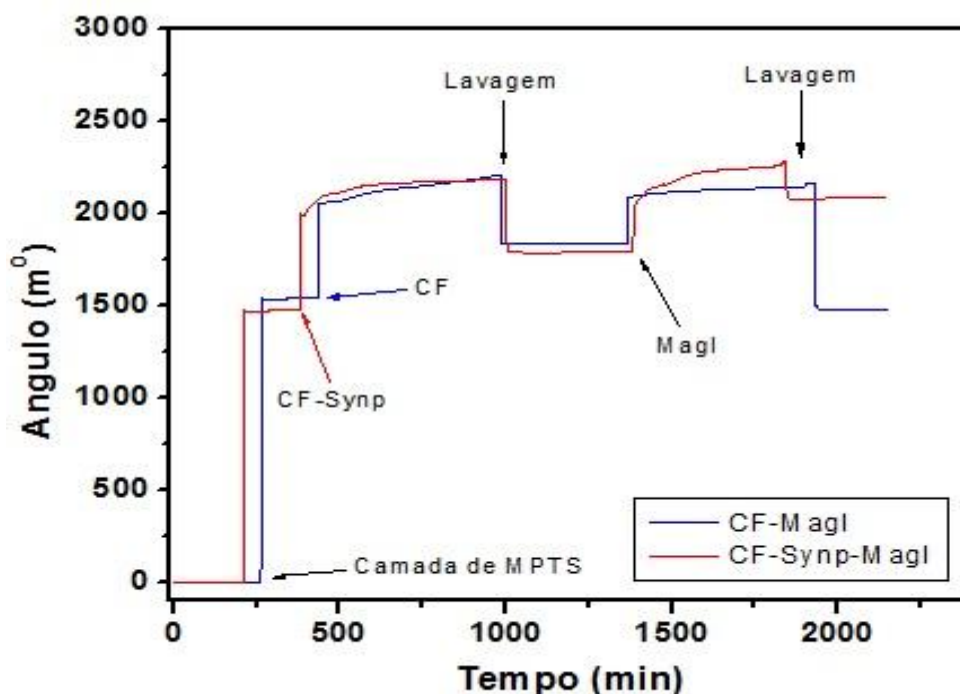


Figura 7. Resposta em tempo real da adsorção dos lipossomas (com ou sem Synp) sobre o eletrodo modificado na presença da MagI.

Adicionalmente, os sensorgramas indicam um comportamento bifásico relacionado à associação da MagI com as superfícies lipídicas. A associação inicial do sistema CF-MagI começa como um processo muito rápido e posteriormente desacelera em direção ao final da injeção de MagI. O mecanismo de associação entre a MagI e os fosfolipídios parece ser impulsionado por duas etapas e é conhecida como um modelo de reação de dois passos (Papo e Shai, 2003). Segundo esse modelo, a MagI se liga primeiro à cabeça do lipídio e, em seguida, penetra para o interior na região das caudas hidrocarbonadas da CF. Inicialmente, o primeiro passo é governado principalmente por interações eletrostáticas entre a MagI e a CF. As interações eletrostáticas não são importantes para a interação CF-MagI no segundo passo.

No entanto, devido à ligação covalente dos grupos tióis do MPTS à superfície do metal, a MagI pode não ser capaz de penetrar completamente na camada híbrida MPTS-CF. Mozsolits et al. (2001) propôs um modelo de reações paralelas (MRP) para explicar comportamento semelhante. O MRP propõe a ocorrência de duas interações bimoleculares simples, acontecendo em paralelo com diferentes constantes de velocidade, resultando numa interação bimolecular complexa.

Assim, quando analisamos nossos resultados, é possível assumir um mecanismo molecular que envolve a interação MagI-lipídio, quando a MagI inicialmente liga-se à CF e é subsequentemente inserida parcialmente na bicamada híbrida MPTS-CF, conduzindo ao rompimento limitado da CF adsorvida. Após a lavagem com o tampão de fluxo, uma grande quantidade de peptídeos livres ou fracamente ligados e a CF rompida foram removidos. No caso da CF-Synp-MagI, o sensorgrama não retornou ao zero, o que pode indicar que moléculas de MagI mantiveram-se ligadas à superfície ou inserida na CF-Synp. A contribuição da cabeça polar pode favorecer a retenção da MagI entre os grupos colinas e o Synp. Isto também foi relatado em estudos anteriores, nos quais foram observadas interações eletrostáticas entre os resíduos carregados positivamente do PAM e os grupos fosfato da cabeça do fosfolipídio (Kandasamy e Larson, 2004; Ramamoorthy, 2009). A análise do sensorgrama também revela que a MagI se liga mais rápido com a CF pura do que a CF-Synp.

Análise do espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta dos lipossomas revestidos e não revestidos com Synperonic

O potencial zeta e o diâmetro efetivo dos lipossomas (Lip), revestidos ou não revestidos com o Synp, em função da presença da MagI foi investigado. O tamanho médio de partícula e o potencial zeta, antes e após o revestimento, encontram-se ilustrados na Tabela 2. Em todas as amostras analisadas, alterações mínimas no tamanho de partícula (a partir de 191 a 201 nm) foram observadas, com um índice de polidispersão de aproximadamente 0.9. Os valores dos tamanhos mais reduzidos foram obtidos para Lip-Synp-MagI. As diferenças no tamanho entre o Lip, o Lip-Synp e o Lip-Synp-MagI são devida à ligação do PAM que induz a desordem na região da interface da bicamada fosfolipídica (Thennarasu et al., 2005; 2010). Bhattacharjya e Ramamoorthy (2009) estudaram as interações entre PAMs e biopolímeros, determinando uma notável organização estrutural dos peptídeos. Assim, é provável que os PAMs possam ter diferentes organizações estruturais, dependendo do tipo de ambiente em que se encontram situados (Bhattacharjya e Ramamoorthy, 2009; Bhunia et al., 2009).

Tabela 2. Potencial zeta e diâmetro de partículas com ou sem Synp em função da presença da MagI.

Amostra	Diâmetro (nm)	ζ -Potencial (mV)
Lip	200.0 $\pm$ 17.3	-6.7 $\pm$ 1.6
Lip-Synp	201.3 $\pm$ 32.3	11.0 $\pm$ 2.8
Lip-Synp-MagI	191.3 $\pm$ 28.0	17.3 $\pm$ 4.7

Adicionalmente, os lipossomas puros foram estáveis durante 5 dias. Por outro lado, as amostras de Lip-MagI foram completamente instáveis. Portanto, devido à instabilidade observada do sistema Lip-MagI, foi usada um agente estabilizante (Synp). As amostras de Lip-Synp e Lip-Synp-MagI apresentaram um claro comportamento de estabilidade por 15 dias. Nenhuma agregação visível foi observada para Lip-Synp ou Lip-Synp-MagI durante os experimentos. Vale ressaltar que os lipossomas puros são instáveis quando em contato com a MagI (um peptídeo formador de poros). O Synp melhora a estabilidade física do Lip e reduz a agregação.

Valores mais negativos para o ζ -potencial (-6,7 mV) dos lipossomas foram obtidos. Sabe-se que o valor do ζ -potencial de lipossomas depende fortemente do pH e da força iônica da solução. Dependendo da força iônica, o ζ -potencial dos lipossomas de fosfatidilcolina pode apresentar valor negativo (Kepczynski et al., 2006; Zhou e Raphael, 2007). Segundo Lewandowska et al. (2010), o ζ -potencial negativo pode vir de algumas impurezas ácidas como, por exemplo, o fosfatidilglicerol. Por outro lado, valores positivos de ζ -potencial (11.0-17.3 mV) foram obtidos após a adição do Synp, e este fato é uma clara demonstração de que os lipossomas revestidos com Synp impediram a ruptura da membrana pela ação da MagI.

Recentemente, vários autores (Thennarasu et al, 2010; Nguyen et al., 2009) têm demonstrado a existência de mais do que uma orientação distinta para os PAMs. Alguns destes são inseridos dentro da bicamada lipídica e os outros são orientados na superfície da bicamada lipídica. No entanto, o ζ -potencial resultante é ligeiramente mais positivo (Tabela 2) para Lip-Synp-MagI, indicando que algumas moléculas da MagI podem ser incorporadas na superfície do Synp e contribuem para uma superfície mais catiônica.

Análise elétrica da interação Pa-MAP/LL-37-membrana

Os espectros de impedância faradaica obtidos por EIE seguem um padrão de comportamento que inclui uma porção semicircular observadas em frequências mais elevadas, o que corresponde ao processo de transferência de elétrons na interface

solução/eletrodo, seguido por uma parte linear em frequência mais baixas, atribuída ao transporte de massa limitada pelo processo de difusão. A Fig. 8 mostra o diagrama de Nyquist, antes e após modificação do eletrodo com a camada de DPPC e após a adição dos peptídeos *Pa*-MAP e LL-37, nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e com diferentes potenciais.

A adição da camada fosfolipídica resultou em um aumento no diâmetro do semicírculo em relação à superfície do eletrodo, uma característica que pode ser associada com o aumento da transferência de resistência de carga (Fig. 8a). Com a adição de *Pa*-MAP, houve um decréscimo acentuado na resistência (de aproximadamente uma ordem de grandeza), devido à desestabilização da camada lipídica provocada pela presença do peptídeo. A diferença na resposta entre as duas concentrações nos diferentes potenciais de *Pa*-MAP mostra que a atividade de peptídeo pode estar correlacionada com a sua concentração, com a desestabilização máxima da membrana lipídica sendo observada quando 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de peptídeo está presente. A resposta dielétrica de *Pa*-MAP também foi influenciada pelo potencial aplicado, apesar da diferença não ser muito significativa, com uma resposta mais elevada para o potencial mais positivo (Fig. 8b).

LL-37 mostrou uma menor resposta em relação ao *Pa*-MAP para todas as concentrações analisadas. No entanto, a atividade de LL-37 apresentou uma maior correlação com a concentração, mostrando um decréscimo no semicírculo de cerca de uma ordem de grandeza para a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quanto ao potencial, LL-37 mostrou uma maior resposta para o potencial mais positivo, a qual foi mais aparente na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 8c).

Nas Fig. 8b e 8c é possível observar ainda que nas regiões de baixa frequência ocorre a polarização da interface eletrodo/solução, a qual é caracterizada pela parte linear do diagrama de Nyquist e está associada com o aumento da condutividade do meio devido à adição dos peptídeos na solução, sendo este efeito mais acentuado para o peptídeo *Pa*-MAP (Fig. 8b).

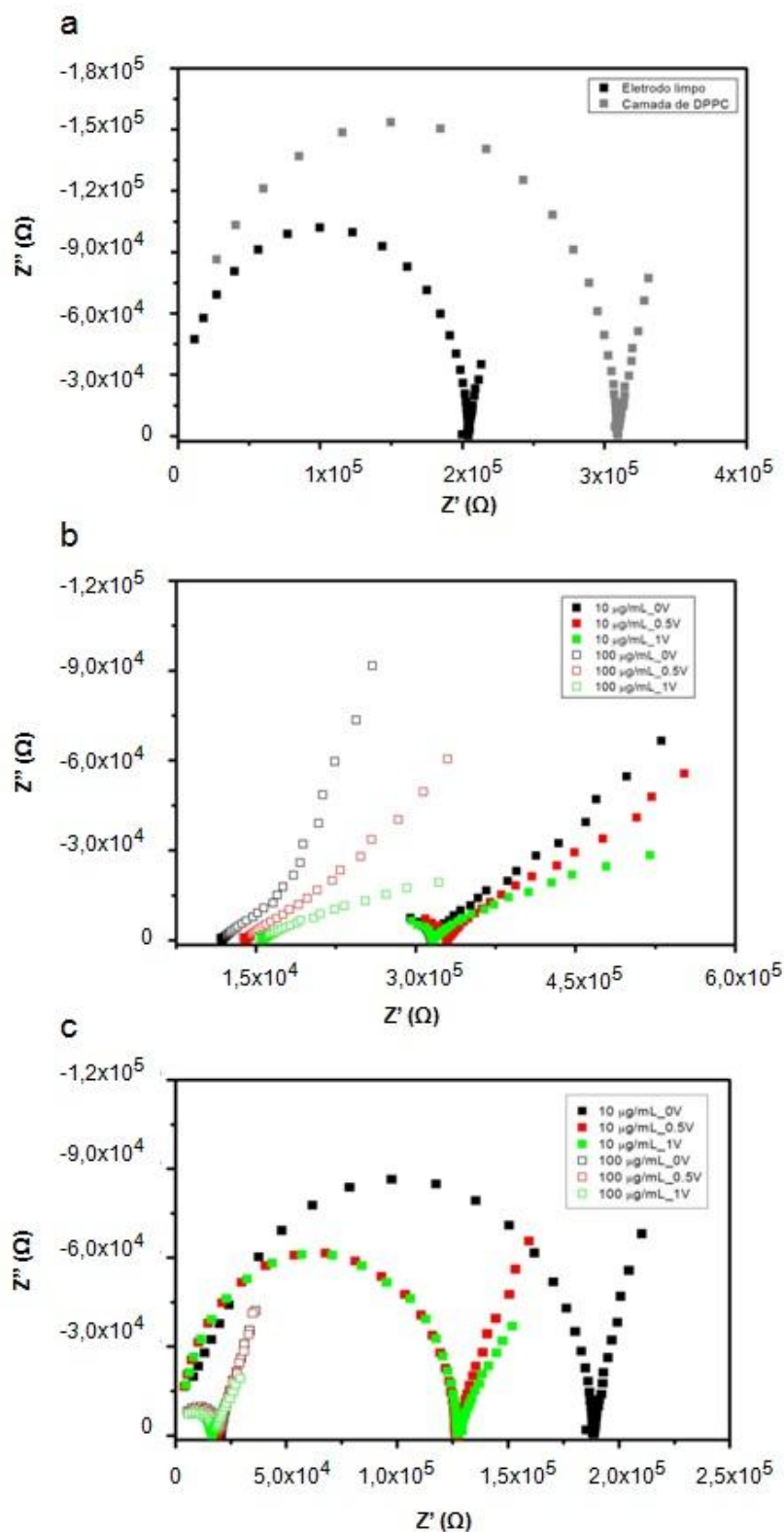


Figura 8. Diagramas de Nyquist após diferentes etapas de modificação: eletrodo limpo e após a deposição da membrana de DPPC (a), camada de lipídio após a adição dos peptídeos *Pa*-MAP (b) e LL-37 (c) em diferentes concentrações (os quadrados cheios representam a concentração de 10 μg/mL e os quadrados vazios 100 μg/mL) e potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0,5V e em verde, 1V).

Boubour e Lennox (2000) estudaram a permeabilidade iônica nas monocamadas automontadas usando espectroscopia de impedância sob potenciais diferentes na ausência de espécies redox ativas. Defeitos foram encontrados nas membranas lipídicas que foram afetadas pelos potenciais aplicados. Além disso, o movimento de íons a partir da interface da monocamada foi influenciado pelos potenciais externos. Durante os potenciais catódicos, a energia necessária para a migração de íons através das membranas diminui facilitando a transferência de elétrons (Boubour e Lennox, 2000). Portanto, esse tipo de comportamento pode explicar as respostas obtidas em potenciais mais positivos para os peptídeos investigados, uma vez que a membrana em potenciais positivos apresenta baixa resistência à transferência de carga.

Os resultados de impedância foram ajustados com o programa EquivCRT (Boukamp, 1986) utilizando o circuito apresentado na Fig. 9, o qual inclui a resistência da solução de (R_s), a resistência de transferência de carga da membrana (R_m) e do eletrodo (R_e), a capacitância da dupla camada elétrica da membrana (C_m) e do eletrodo (C_e), bem como um elemento de fase constante (CPE). Os três primeiros elementos estão relacionados a cinética das moléculas devido ao fluxo de íons e difusão de massa na interface enquanto que os três últimos estão relacionados a polarização molecular ou iônica ocorrida na interface. O CPE reflete a não homogeneidade da camada e é controlado pelo parâmetro n , onde o CPE pode ser considerado como uma capacitância pura quando n é próximo de 1 e uma resistência pura quando n é próximo de 0 (Kerner e Pajkossy, 1998). As modificações da R_m são mais elevadas comparando-se aos outros elementos da impedância, uma vez que esta depende da característica de resistência de isolamento na interface de eletrodo/solução. Assim, a R_m foi escolhida como o sinal mais relevante a partir do sensor. Este circuito foi o mais adequado ao sistema a partir dos dados obtidos por EIE.

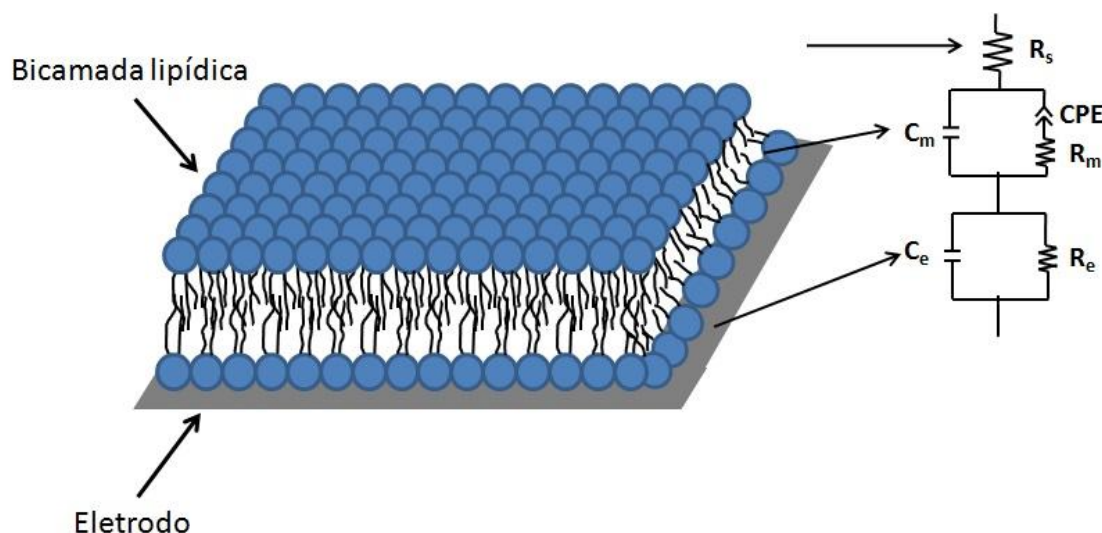


Figura 9. Representação esquemática do eletrodo modificado pela camada lipídica (esquerda) e o circuito equivalente correspondente (direita). Os elementos R_s e C_m corresponde a resistência da solução e a capacitância da dupla camada elétrica, respectivamente. Os elementos em série R_m e CPE corresponde à resistência da membrana e ao elemento de fase constante, e os elementos em paralelo C_e e R_e corresponde à capacitância da dupla camada elétrica e resistência do eletrodo.

A Fig. 10 mostra as mensurações em tempo real da curva da R_m versus o tempo de ação de *Pa*-MAP e LL-37. A adição de ambos os peptídeos em diferentes concentrações resultou numa diminuição drástica da resistência da membrana no primeiro minuto de exposição, mantendo-se constante até o fim do tempo de permanência (50 minutos). É importante notar que não é observada uma grande variação na resposta impedimétrica em relação à resistência da membrana sob diferentes potenciais aplicados. Entretanto, há uma maior resposta ao potencial mais positivo.

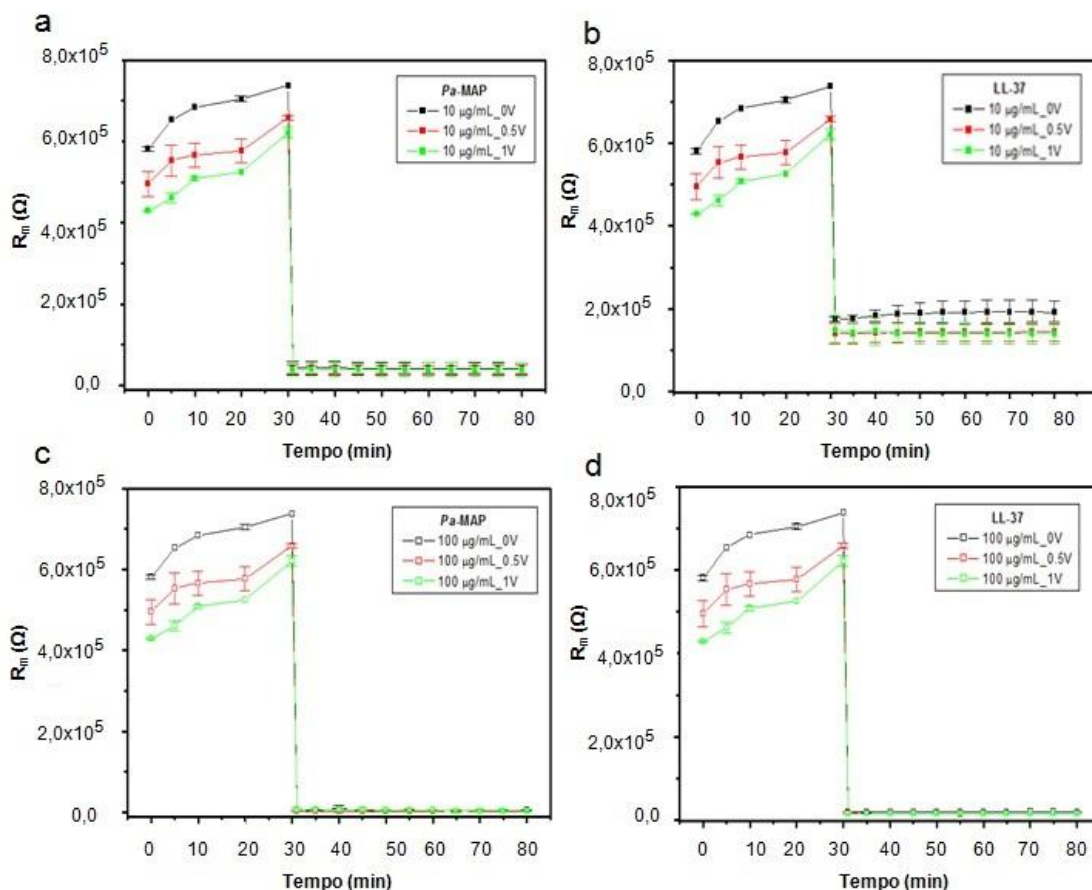


Figura 10. Resistência da membrana *versus* o tempo em diferentes potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0,5V e em verde, 1V). Em (a,b) a concentração usada foi de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (quadrados cheios) e em (c, d) de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (quadrados vazios). *Pa*-MAP e LL-37 foi adicionado no 30º minuto.

Um resumo dos resultados obtidos antes e após a exposição de *Pa*-MAP e LL-37 é apresentado na Tabela 3. Todas as medições foram repetidas pelo menos três vezes e os resultados foram similares a cada medida. Estes dados demonstram a eficácia de ambos os peptídeos na desestabilização de membrana. No potencial 0V, os valores de R_m na presença de *Pa*-MAP passou de $7,37 \times 10^5 \Omega$ para $4,14 \times 10^4 \Omega$ na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e para $4,40 \times 10^3 \Omega$, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por outro lado, na presença de LL-37 os valores diminuíram para $1,91 \times 10^5 \Omega$ na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e para $1,96 \times 10^4 \Omega$, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim, foi vista uma ação mais eficaz nas membranas pelo *Pa*-MAP, além da dependência da concentração utilizada para ambos os peptídeos.

A atividade dos PAMs é basicamente associada à carga e às propriedades de hidrofobicidade. Estas duas características físico-químicas, as quais estão relacionadas com a seletividade dos peptídeos sobre as membranas, facilitam a interação com as

cadeias acila dos lipídios (Lohner, 2001). A seletividade dos PAMs para as membranas microbianas e a aparente ausência de efeitos deletérios sobre as membranas dos mamíferos são importantes pontos a serem destacados para a utilização destes peptídeos na área farmacêutica. Em geral, os PAMs são catiônicos e têm uma elevada afinidade por lipídios carregados negativamente (um dos principais componentes das membranas bacterianas) (Oliveira et al., 2013).

O *Pa*-MAP, apesar da ausência de carga, apresentou maior atividade contra bactérias Gram-negativas em comparação com as bactérias Gram-positivas (Migliolo et al., 2012). Como discutido anteriormente, os resíduos catiônicos presentes nos PAMs desempenham, na maioria dos casos, um importante papel na primeira fase de interação devido à interação eletrostática entre os peptídios e as membranas microbianas. A importância dos resíduos catiônicos tem sido comprovada nos últimos anos. Mutações de resíduos de arginina e lisina podem modificar a atividade total dos PAMs, tais como a melitina (um peptídeo obtido da abelha *Apis mellifera*), o que resulta em um maior efeito sobre sua toxicidade para as células de mamíferos (Werkmeister et al., 1993). No entanto, esta característica não parece ser um fator determinante na afinidade do *Pa*-MAP pela membrana, uma vez que a taxa de hidrofobicidade correspondente parece desempenhar um papel essencial na segunda etapa, a de inserção na membrana (Johansson et al., 1998; Wang et al., 1998; Oren et al., 1999). A ausência destes resíduos catiônicos em *Pa*-MAP indica que a sua atividade é conduzido por interações hidrofóbicas e isto também explica a sua aparente ausência de atividade contra as células de mamíferos (Migliolo et al., 2012). Portanto, este comportamento pode contribuir para a resposta mais elevada obtida para o *Pa*-MAP neste trabalho, em comparação com LL-37, uma vez que este peptídeo tem uma proporção hidrofóbica superior (73%) (Migliolo et al., 2012).

Em relação à homogeneidade da membrana (n), as atividades do *Pa*-MAP e do LL-37 induzem uma diminuição nos valores de n (Tabela 3). No entanto, pode ser visto que, após esta redução, os valores de n permanecem constantes após a exposição ao *Pa*-MAP. Após a exposição ao LL-37, por sua vez, existe uma ligeira variação, indicando uma maior heterogeneidade a membrana quando exposta a este peptídeo (Tabela 3). A diminuição da homogeneidade deve ser atribuída às perturbações causadas pela presença de peptídeos. No entanto, a constância dos valores de n após ação do *Pa*-MAP indica que as membranas expostas a este peptídeo tendem a mostrar uma reorganização lipídica mais eficaz do que nas membranas expostas ao LL-37.

A análise da atividade do *Pa*-MAP e do LL-37 também foi avaliada através da variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}), a qual foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(m) - R_{CT}(pep)}{R_{CT}(m)}, \quad \text{Eq. 4}$$

onde o $R_{CT}(m)$ é o valor da resistência de transferência de carga do eletrodo modificado pela membrana e o $R_{CT}(pep)$ é o valor da resistência de transferência de carga do eletrodo modificado pela membrana após exposição aos peptídeos (*Pa*-MAP ou LL-37).

Como observado anteriormente para os valores de R_m , os valores ΔR_{CT} foram superiores para o *Pa*-MAP (em torno de 94% para a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 99% para 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), quando comparado com os valores observados para o LL-37 (cerca de 75% para a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 97% para 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados.

Amostra	Concentração do peptídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tempo de exposição (min)	R_{CT} (Ω)	Cdl (F)	n	ΔR_{CT} (%)
Eletrodo limpo	-		7.37×10^5	1.31×10^{-11}	-	-
<i>Pa</i> -MAP	10	1	4.27×10^4	1.32×10^{-11}	0.78	94.21
<i>Pa</i> -MAP	10	25	4.19×10^4	1.31×10^{-11}	0.78	94.31
<i>Pa</i> -MAP	10	50	4.14×10^4	1.27×10^{-11}	0.78	94.38
<i>Pa</i> -MAP	100	1	3.12×10^3	1.36×10^{-10}	0.81	99.58
<i>Pa</i> -MAP	100	25	3.49×10^3	1.06×10^{-10}	0.81	99.53
<i>Pa</i> -MAP	100	50	4.40×10^3	9.13×10^{-11}	0.81	99.40
LL-37	10	1	1.74×10^5	1.01×10^{-11}	0.79	76.39
LL-37	10	25	1.91×10^5	1.05×10^{-11}	0.78	74.08
LL-37	10	50	1.91×10^5	1.05×10^{-11}	0.76	74.08
LL-37	100	1	1.91×10^4	1.15×10^{-11}	0.77	97.41
LL-37	100	25	1.95×10^4	1.16×10^{-11}	0.78	97.35
LL-37	100	50	1.96×10^4	1.16×10^{-11}	0.78	97.39

A partir do diagrama de Bode é possível visualizar que a presença do *Pa*-MAP ou do LL-37 altera as características elétricas da membrana lipídica (Fig. 11). Estas diferenças são maiores para as concentrações mais elevadas, especialmente para o *Pa*-MAP. No entanto, a variação da intensidade do potencial aplicado não levou a diferenças significativas no comportamento. Na região de média frequência, uma relação linear pode ser observada entre o módulo de impedância e o logaritmo da

frequência (Fig. 11). Esta região corresponde à frequência do comportamento capacitivo da interface eletrodo/eletrólito. As atividades dos PAMs aqui avaliados podem afetar tanto a capacitância como a resistência das membranas. Para uma membrana ideal, nenhum íon pode ser transportado através da bicamada (que apresenta resistência infinita), enquanto que a membrana se comporta como um meio dielétrico com cargas acumuladas em ambos os lados. A resistência da membrana finita determina a taxa de difusão dos íons através da dupla camada (Chang et al., 2008b). Portanto, a instabilidade da membrana provocada pela interação com os peptídeos resulta em um aumento da C_m e uma diminuição da R_m , como pode ser visto na Tabela 3.

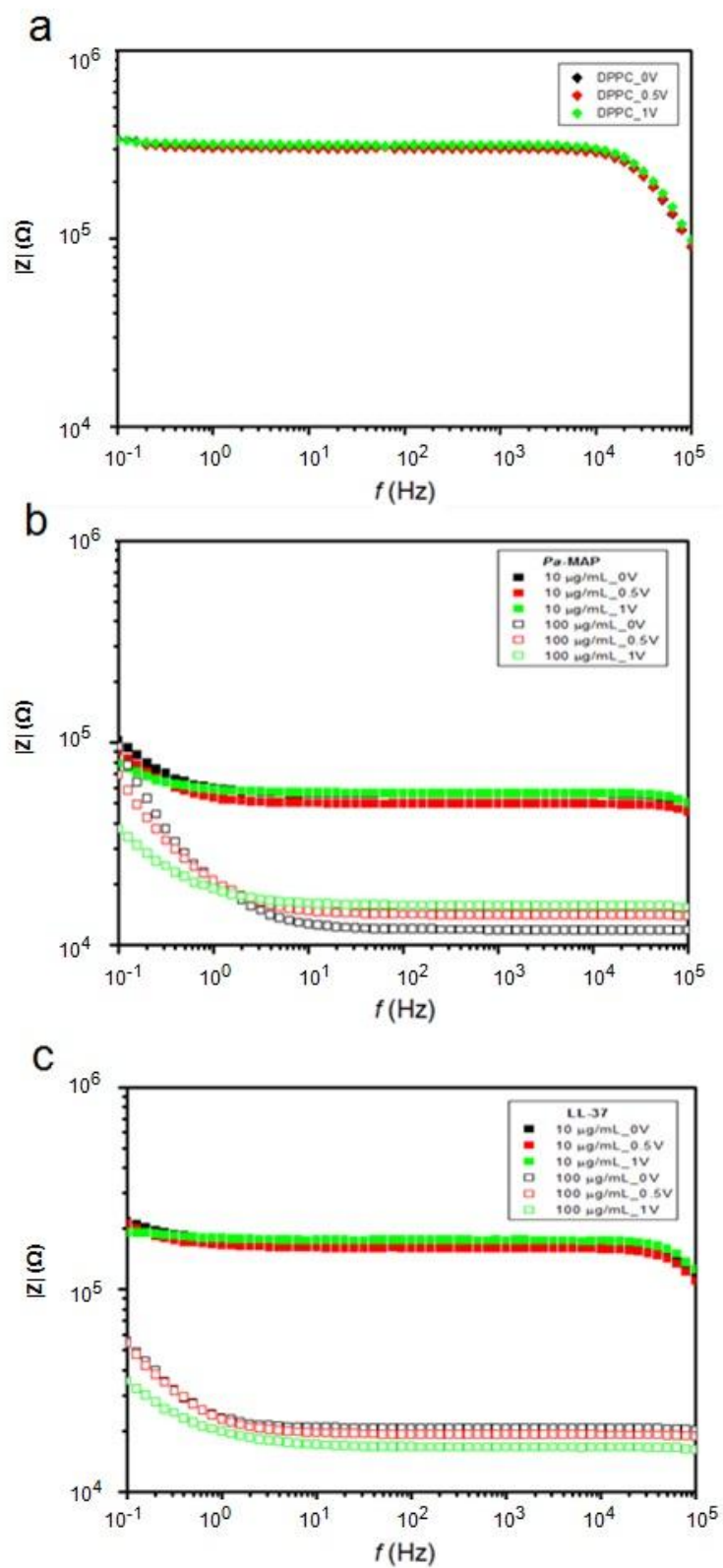


Figura 11. Gráfico de Bode do eletrodo modificado pela membrana lipídica antes (a) e após a adição do Pa-MAP (b) e do LL-37 (c) em diferentes concentrações (os quadrados cheios representam a concentração de 10 μg/mL e os quadrados vazios 100 μg/mL) e potenciais (em preto o potencial de 0V; em vermelho, 0,5V e em verde, 1V).

Chang et al. (2008) realizaram um estudo com dois PAMs, onde foi possível distinguir os modos de ação dos peptídeos baseado nas modificações de diferentes parâmetros (resistência, capacitância e homogeneidade da membrana) através de EIS. Se os peptídeos agem seguindo o modelo barril, a resistência da membrana diminui e a espessura e a homogeneidade da membrana permanecem inalteradas, tal como observado para a melitina (Chang et al., 2008b). Caso contrário, se os peptídeos atuarem de acordo com o modelo poro toroidal, a membrana também se torna permeável (R_m diminui) e a espessura da membrana nas regiões dos poros diminui, resultando numa ligeira diminuição da sua homogeneidade. De acordo com este modelo, os poros toroidais atuam como portas para a passagem de outras moléculas de peptídeos através da membrana. Assim, a formação de poros pode ser transitória, desintegrando-se com o tempo quando a concentração dos peptídeos de ambos os lados da membrana é equilibrado. Isto leva a um aumento na resistência da membrana, como observado para a magainina (Fig. 6) (Chang et al., 2008; Nascimento et al., 2012).

Para os peptídeos que agem através do modelo carpete, a homogeneidade da membrana diminui, enquanto que a resistência pode diminuir (no caso dos peptídeos que apresentam uma desordem dos lipídios) ou aumentar (se os peptídeos causarem uma ordenação dos lipídios). É interessante notar que os peptídeos que agem por este modelo podem induzir um efeito detergente. Estes peptídeos em concentrações elevadas podem afetar a membrana, o que resulta numa grande redução (ou mesmo o desaparecimento completo) da resistência da membrana. Contudo, a membrana pode ainda proporcionar uma barreira eletroquímica, onde as regiões afetadas são reparadas por redistribuição dos lipídios e/ou peptídeos por difusão lateral a partir das regiões intactas (Chang et al., 2008b). Este modelo é consistente com os dados observados para os peptídeos aqui descritos, sendo confirmado pelos trabalhos descritos anteriormente, os quais indicam o modelo carpete como o mecanismo de ação do LL-37 (Oren et al., 1999; Henzler-Wildman et al., 2004) e sugerem que este mesmo mecanismo é desempenhado pelo *Pa*-MAP. A presença de ambos os peptídeos causaram uma desestabilização da membrana durante o primeiro minuto de exposição e, subsequentemente, estas alterações são reparadas localmente, proporcionando uma resistência mensurável.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas após atuação do Pa-MAP e LL-37

A Fig. 12 mostra a superfície da membrana, antes e após a exposição ao *Pa*-MAP e ao LL-37, através de MEV. A camada de lipídios aparece como uma superfície homogênea e lisa (Fig. 12a). Após exposição ao *Pa*-MAP e ao LL-37, a membrana lipídica se tornou bastante heterogênea, formando um "tapete" com algumas falhas (Fig. 12b,c). As imagens obtidas por MEV corroboraram os resultados obtidos pelas análises eletroquímicas.

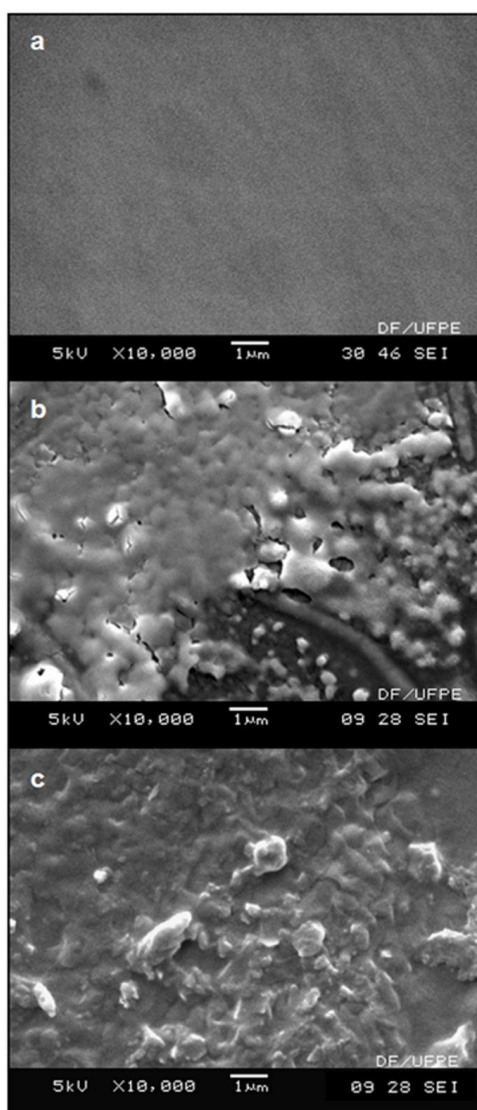


Figura 12. Imagens de MEV da camada de DPPC antes (a) e após a exposição de *Pa*-MAP (b) e LL-37 (c).

Avaliação da interação peptídeo-membrana in silico

Os dados obtidos pelos ensaios *in silico* corroboraram os resultados *in vitro* previamente apresentados (Migliolo et al., 2012). O valor médio da energia livre observada para *Pa*-MAP em contato com a membrana de DPPC foi de $-3,1 \pm 1,0$ kcal.mol⁻¹ (Fig. 13a). A energia livre observada em estudos semelhantes para dois peptídeos cíclicos denominados amp-1 e amp-2 em membranas Gram-negativas e Gram-positivas foi de -6,4 e -5,8 kcal.mol⁻¹ e -5,7 e -7,5 kcal.mol⁻¹, respectivamente (Mandal e Franco, 2012). Os dados *in silico* obtidos no nosso estudo sugerem que *Pa*-MAP apresenta menor afinidade pelo DPPC quando comparado com a energia livre observada para amp-1 e amp-2. Estes dados indicam que o *Pa*-MAP apresenta atividade antimicrobiana em maior concentração inibitória mínima (MIC = 30 mM), devido à ausência de resíduos de aminoácidos carregados quando comparado com os peptídeos antimicrobianos pleurocidina (MIC = 3,5 mM) e a pardaxina (MIC = 3,0 mM) (Primor e Tu, 1980; Mason et al., 2006), os quais são isolados de *Pleuronectes americanus* e *Pardachirus marmoratus*, respectivamente.

A análise de interação por *docking* – método pelo qual se prever a orientação preferencial com que uma molécula se liga a outra molécula, formando um complexo estável (Morris e Lim-Wilby, 2008) – mostrou que o *Pa*-MAP, o qual tem elevada hidrofobicidade (73%), parece estar envolvido na interação com os carbonos dos fosfolipídios que compõem a membrana de DPPC (Fig. 13b e 13c). A interação entre o peptídeo e a membrana envolve uma mistura de interação eletrostática e principalmente hidrofóbica guiada pela aminoácidos Leu¹² e Ala¹⁶. A His¹, Asn¹⁶ e a região C-terminal aminada são resíduos de aminoácidos do *Pa*-MAP possivelmente envolvidos com a fixação na membrana. A interação pode ser inicialmente guiada através de ligações de hidrogênio. A His¹ interage com o DPPC²⁶ através do O¹³ e O¹⁴, com distância de 3,38 e 2,87 Å (ver tabela inserida na Fig. 13c). Adicionalmente, foi possível detectar também duas interações hidrofóbicas entre o carbono da His¹ do anel imidazol (CD2 e CE1) ligado ao carbono do DPPC (C3), com distâncias de 3,21 e 3,40 Å, respectivamente. Importantes interações também foram observadas ocorrendo entre o carbono da Leu¹² (CD1) e o carbono do DPPC²⁴ (C14) a uma distância de 2,74 Å e uma ligação de hidrogênio entre o nitrogênio do aminoácido Asn¹⁴ (CD2) com o oxigênio do DPPC¹⁴ (O13) a uma distância de 3,40 Å. Além disso, uma ligação hidrofóbica envolvendo o carbono da Ala¹⁴ (CB) com o carbono do DPPC²⁴ (C14) foi também observada na

superfície da membrana formando um possível tapete estabilizado por interações hidrofóbicas, corroborando com os dados obtidos pelas análises dielétricas.

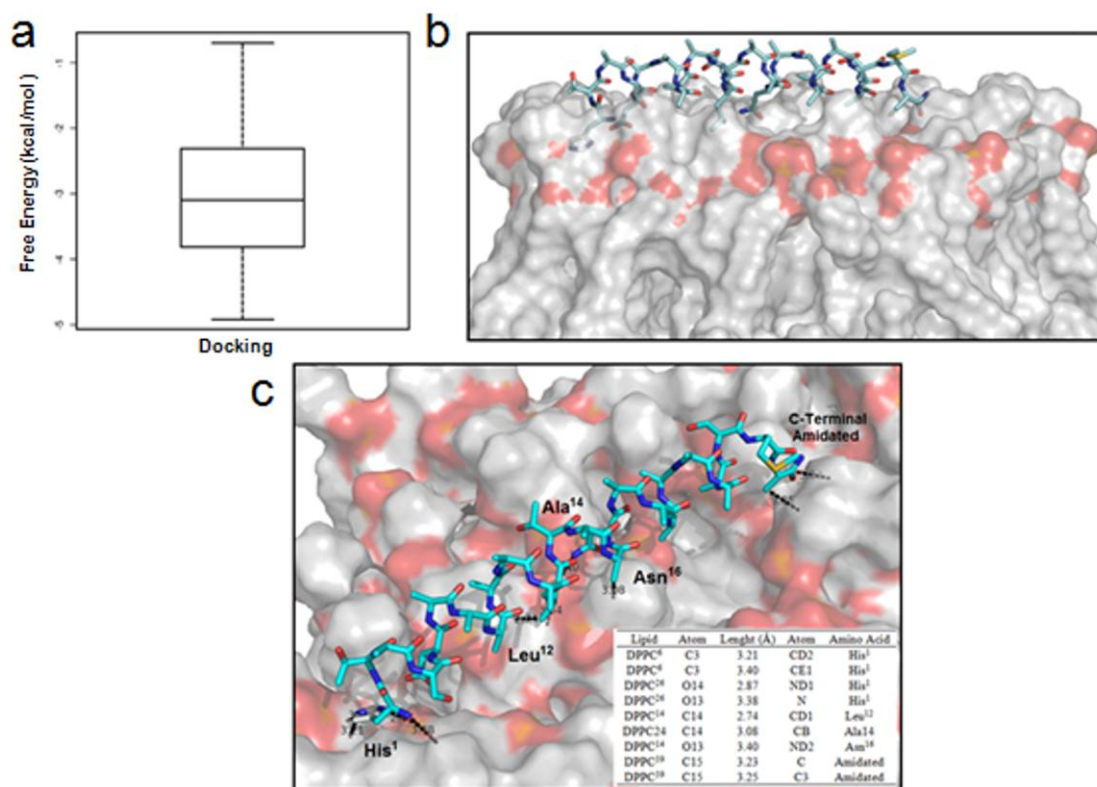


Figura 13. Análise de *docking in silico* do Pa-MAP com a membrana de DPPC. (A) Box plot de 335 modelos de interação classificados de acordo com a energia livre. (B) visualização de Pa-MAP frente a membrana de DPPC mostrando a inserção dos peptídeos e (C) visualização aumentada mostrando a interação do peptídeo com a membrana lipídica sendo visualizado detalhes da interação, na tabela é apresentado a posição dos lipídios e dos aminoácidos com os respectivos nomes de átomos e o comprimento da interação.

Avaliação da interação clavaninas-membrana através de espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta

Os peptídeos podem interagir com vesículas devido a efeitos eletrostáticos quando as mesmas são constituídas por lipídios eletricamente carregados (Tsogas et al., 2005; Volodkin et al., 2007; Domingues et al., 2008). A maioria dos peptídeos catiônicos induz a agregação de vesículas lipídicas com carga elétrica negativa, pelo menos em altas concentrações de peptídeos. Adicionalmente, muitos peptídeos hidrofóbicos são capazes de interagir com lipídios neutros induzindo a sua agregação

(Matos et al., 2004; Abrunhosa et al., 2005, Wadhwani et al., 2012). Esta agregação de vesículas lipídicas, bem como a estabilidade, na presença de peptídeos pode ser mensurada pelo tamanho e carga efetiva dos agregados.

No presente estudo foi analisada a interação de LUVs neutras formadas por (POPC) e carregados negativamente (POPC:POPG, 8:2). O diâmetro das vesículas lipídicas foi determinada por EDL antes e após a adição dos peptídeos ClavA e ClavX, ambos na concentração de 10 μ M. As LUVs antes da adição dos peptídeos apresentaram cerca de 100nm de diâmetro. Após a adição dos PAMs, foi observada a formação de estruturas com grandes raios hidrodinâmicos, indicando a interação dos peptídeos às vesículas. A ação da ClavA sobre as LUVs promoveu a formação de uma grande quantidade de agregados de tamanhos heterogêneos para ambas as vesículas, sendo esta tendência mais pronunciada na presença das vesículas de POPC (Fig. 14a). Para a ClavX foi observado a presença de grandes agregados com perfil bastante heterogêneo, apenas para as vesículas de POPC:POPG (Fig. 14b).

As clavaninas A e X são PAMs que apresentam um amplo espectro de ação antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (van Kan et al., 2003; Silva, 2011). A atividade da ClavA está intimamente dependente do pH. Em pH fisiológico, este peptídeo permeabiliza a membrana de maneira não específica levando a morte celular (van Kan et al., 2002). O mecanismo de ação proposto para a ClavA é através do moleado carpete, no qual os peptídeos são ancorados na interface da membrana através de interação eletrostática e depois é inserido dentro do core da membrana através de interações hidrofóbicas (Oren e Shai, 1999; Shai, 1999). Estudos com células microbianas demonstraram que a atividade antimicrobiana é melhorada quando o pH é reduzido (Lee et al., 1997a, 1997b; van Kan et al., 2002). Este aumento de atividade sugere que condições mais ácidas promovem uma maior afinidade da ClavA com a membrana bacteriana aniônica após a protonação dos seus resíduos de histidina (van Kan et al., 2002). No entanto, van Kan et al. (2001) demonstraram que a ClavA insere-se com eficiência tanto em monocamadas fosfolipídicas neutras como carregadas negativamente. Adicionalmente, foi visto que a inserção é essencialmente independente do pH, demonstrando que, tanto em pH ácido como em pH neutro, a ClavA interage com os lipídeos de membrana e que estas interações são promovidas principalmente por forças hidrofóbicas (van Kan et al., 2001).

A modificação da ClavA através da adição de cinco resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, dando origem a ClavX, foi acompanhada também pelo aumento da

atividade antimicrobiana do peptídeo (Silva, 2011). Este fato confirma a importância dos resíduos hidrofóbicos para atividade antimicrobiana destes peptídeos. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que ambos os peptídeos possuem a capacidade de interagir com as vesículas lipídicas, promovendo a agregação das mesmas, e que essa interação provavelmente é mediada principalmente por interações hidrofóbicas.

Em um estudo semelhante, Epand et al. (2001) analisaram a interação entre vesículas lipídicas e quatro análogos do PAM tricogina, um peptídeo antibiótico originado do fungo *Trichoderma longibrachiatum*. Um dos peptídeos, o BT, mostrou ter a capacidade de agregar vesículas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e DOPC:dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), induzindo ao aumento do seu diâmetro hidrodinâmico, tendo uma agregação mais rápida na presença de DOPE, enquanto outro peptídeo, o ST, não mostrou essa capacidade. A agregação das LUVs foi atribuída à natureza hidrofóbica do BT, ao contrário da estrutura anfifílica do ST (Epand et al., 2001), demonstrando mais uma vez a importância das interações hidrofóbicas para determinados peptídeos.

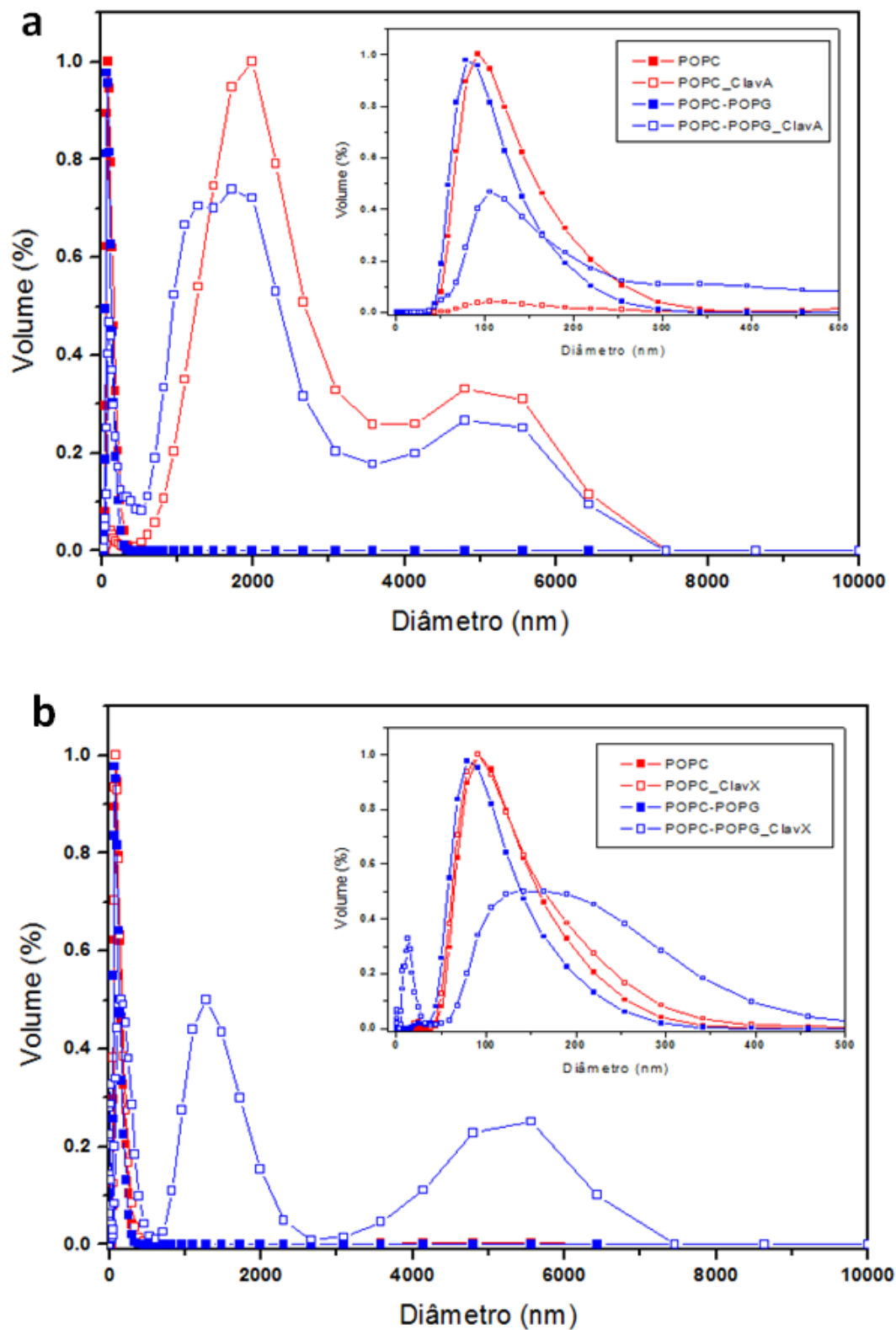


Figura 14. Distribuição de tamanho das vesículas de POPC e POPC:POPG antes e após a exposição dos peptídeos ClavA (a) e ClavX (b). O detalhe é o aumento da região que apresenta partículas de até 500nm de diâmetro.

A Tabela 4 apresenta os resultados do monitoramento da carga superficial das vesículas após a ação dos peptídeos. As LUVs de POPC e POPC:POPG apresentaram um potencial zeta de -1,53 mV e -19,8 mV, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os resultados disponíveis na literatura (Freire et al., 2011; Domingues et al., 2012). A adição de ambas as clavaninas promoveu um discreto aumento do potencial para -0,65 mV e -1,03 para as vesículas de POPC, após a ação da ClavA e ClavX, respectivamente, e enquanto que para as vesículas carregadas negativamente, o valor permaneceu praticamente constante mesmo após a atuação de ambos os peptídeos.

Apesar das mudanças na carga superficial não ter sido muito significativa, o fato de ter mudado a carga das vesículas neutras sugere mais uma vez que a interação desses peptídeos é guiada por interações hidrofóbicas. Uma vez que as MICs para a ClavA e ClavX variam bastante de acordo com a espécie bacteriana e as condições do meio, como por exemplo, o pH (van Kan et al, 2001; Silva, 2011), é possível que a ausência de mudanças na carga superficial das vesículas de POPC:POPG, bem como a ausência de agregados após a ação da ClavX sobre as vesículas de POPC, observadas através de EDL, tenham sido devido a baixa concentração de peptídeos utilizada, sugerindo que a ação dos peptídeos é dependente da concentração.

Tabela 4. Valores de potencial zeta (ζ) para as vesículas de POPC e POPC:POPG antes e após a exposição da ClavA e ClavX.

Amostra	ζ (mV)
POPC	-1,53±0,20
POPC_ClavA	-0,65±0,43
POPC_ClavX	-1,03±0,32
POPC:POPG	-19,80±0,56
POPC:POPG_ClavA	-19,40±1,76
POPC:POPG_ClavX	-19,90±0,07

Ensaio de permeabilidade de vesícula

Experimentos de vazamento de membrana induzida por peptídeos têm se tornado um experimento padrão para investigar a interação com membranas e o potencial de toxicidade de peptídeos. O vazamento pode ser investigado tanto em

células, por exemplo, hemólise, ou a partir de vesículas com moléculas fluorescentes retidas em seu lúmen (Epand e Epand, 2003; Ambroggio et al. 2005; Andersson et al., 2007; Mazzuca et al., 2010). Esses ensaios de vazamento de vesículas basicamente envolvem a detecção do aumento do sinal fluorescente devido à liberação do corante retido na vesícula após a ação do peptídeo (Torcato et al., 2012).

A liberação de solutos encapsulados induzida por PAMs pode ocorrer através de pequenos canais formados pela reorganização da membrana, devido à formação de poros ou pela desorganização total da bicamada, não podendo mais funcionar como uma barreira de permeabilidade (Caaveiro et al., 1998).

Na maioria dos casos, as curvas de liberação do cromóforo para diferentes peptídeos compartilham duas características peculiares: 1) são lentas, exigindo de minutos a horas para o vazamento completo e 2) exibem um comportamento não exponencial, com um vazamento inicial rápido que diminui progressivamente (Pokorny e Almeida, 2004; Rathinakumar e Wimley, 2008; Gregory et al., 2009; Mazzuca et al., 2010).

No presente estudo, os ensaios de vazamento de vesículas foram realizados para avaliar os efeitos de desestabilização da ClavA e ClavX sobre as vesículas carregadas (POPC) e não carregadas (POPC:POPG) utilizando diferentes concentrações de peptídeos (1, 5 e 10 μ M). Como observado na Tabela 5, ambos os peptídeos apresentaram a capacidade de realizar o vazamento da 5(6)-CF. A ClavA apresentou maior capacidade em desestabilizar as membranas das vesículas em comparação com a ClavX, estando de acordo com os resultados obtidos para o EDL. Isto pode ser observado mesmo em concentrações bastante baixas. A ClavX, por sua vez, apresentou menor capacidade em promover o vazamento das vesículas, tendo um comportamento de atuação do peptídeo mais dependente da concentração. O aumento da intensidade de fluorescência devido à liberação da 5(6)-CF induzida pelas duas clavaninas foi medida durante 15 minutos, tendo ocorrido de forma rápida no início do ensaio e diminuindo ao decorrer dos 15 minutos. Depois deste tempo, foi adicionado o Triton X-100 a 1% para detecção da fluorescência total. A liberação do fluoróforo ocorreu mais rapidamente para a ClavA, quando comparada com a ClavX, e a intensidade de fluorescência para este peptídeo atingiu quase o máximo antes mesmo da adição do Triton. A capacidade de promover a permeabilização de vesículas da ClavA e ClavX deve-se provavelmente a grande quantidade de resíduos hidrofóbicos nas suas estruturas, os quais permitem a

interação dos peptídeos com membranas independente da carga de superfície da mesma, estando de acordo com os resultados obtidos por EDL e potencial zeta.

Tabela 5. Valores percentuais dos ensaios de permeabilização de vesículas após a atuação dos peptídeos antimicrobianos.

Peptídeo	Concentração	POPC	POPC:POPG
ClavA	1µM	98,30%	92,30%
ClavA	5µM	98,77%	98,71%
ClavA	10µM	99,44%	103,04%
ClavX	1µM	4,59%	2,30%
ClavX	5µM	50,44%	10,69%
ClavX	10µM	68,80%	16,79%

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A interação da MagI com os sistemas CF e CF-Synp foi investigada utilizando o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ como marcador eletroquímico. A atração eletrostática entre a MagI e as membranas lipídicas e a auto-agregação da MagI na presença das membranas provocou a formação de poros e resultou no cruzamento dos íons através da camada lipídica, atingindo a superfície do eletrodo de ouro. Nossos resultados demonstram que o biosistema formado pelas membranas de fosfolípido revestidas pelo Synp é mais resistente à ação da MagI. No entanto, um modelo de reação paralela é proposto para a interação da MagI e a camada híbrida MPTS-CF, resultando numa interação biomolecular complexa. A importância do copolímero tribloco Synp na estabilização dos lipossomas para a liberação controlada da MagI foi demonstrada pela primeira vez neste trabalho, uma vez que os lipossomas convencionais (sem revestimento) não podem ser aplicados para a liberação controlada de PAMs, devido à sua desestabilização através da formação de poros.

Os resultados obtidos neste trabalho também demonstraram que o peptídeo *Pa*-MAP tem um enorme potencial para desestabilizar as membranas, uma observação que pode explicar sua atividade antimicrobiana observada *in vitro*. As respostas obtidas através de EIE para LL-37 revelou que este peptídeo segue o mecanismo de ação do tipo carpete, confirmando o que foi descrito anteriormente. Para o *Pa*-MAP, os dados sugerem que o mecanismo de ação deste peptídeo segue também o modelo carpete, apresentando um efeito detergente nas concentrações utilizadas neste estudo. Este mecanismo foi descrito pela primeira vez para o PAC *Pa*-MAP. Adicionalmente, a desestabilização ocorreu no primeiro minuto de exposição para ambos os peptídeos, enquanto a destruição da membrana ocorreu localmente e pode ser reparada por redistribuição dos lipídios/peptídeos ou pela difusão lateral dos lipídios a partir das regiões intactas. A atividade do *Pa*-MAP, independente do potencial, sugere que o peptídeo pode atuar sobre uma ampla variedade de microrganismos patogênicos (compostos por membranas com moléculas aniônicas, catiônicas e zwitteriônicas), estando de acordo com os resultados obtidos anteriormente *in vitro* por Migliolo e colaboradores.

Finalmente, os resultados obtidos pelas técnicas de EDL, potencial zeta e pelos ensaios de vazamento de vesículas demonstraram que as clavaninas A e X apresentam um elevado potencial em desestabilizar membranas neutras ou carregadas

negativamente, sendo esta desestabilização devida à presença de aminoácidos hidrofóbicos em suas respectivas estruturas, resultando no favorecimento das interações hidrofóbicas entre o peptídeo e as caudas hidrocarbonadas dos lipídios constituintes da membrana.

Os resultados obtidos neste trabalho para a ClavX foram os primeiros dados descritos para tentar entender o mecanismo de ação deste peptídeo sobre membranas lipídicas. Desta forma, como perspectivas futuras podemos destacar:

- Analisar a interação peptídeo-membrana utilizando uma maior faixa de concentração da ClavX;
- Testar a ação da ClavX sobre membranas de diferentes composições lipídicas;
- Elucidar o mecanismo de ação da ClavX através de parâmetros eletroquímicos e
- Redigir um artigo científico descrevendo o mecanismo de ação ClavX-membrana.

CAPÍTULO 7

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulhalim I., Zourob M., Lakhtakia A. (2008) Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini-Review. *Electromagnetics* 28: 214-242.
- Abramoff M.D., Magalhaes P.J., Ram S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophot. Internat.* 11(4):36–42.
- Abrunhosa F., Faria S., Gomes P., Tomaz I., Pessoa J.C., Andreu D., Bastos M. (2005) Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *J. Phys. Chem. B* 109:17311–17319.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York.
- Alves V.A., Brett C.M.A. (2002) Characterisation of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS. *Electrochim. Acta* 47: 2081-2091.
- Ambroggio E.E., Separovic F., Bowie J.H., Fidelio G.D., Bagatolli L.A. (2005) Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophys. J.* 89(3):1874–1881.
- Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Summerbell R.C., Rex J.H., Monson T.P., Spencer T., Kasai M., Francesconi A., Walsh T.J. (2002) Pathogenic *Aspergillus* Species Recovered from a Hospital Water System: A 3-Year Prospective Study. *Clin. Infect. Dis.* 34:780-789.
- Andersen O.S., Koeppe R.E. (2007) Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:107–30.
- Andersson, A., Danielsson J., Graslund A., Maler L. (2007) Kinetic models for peptide-induced leakage from vesicles and cells. *Eur. Biophys. J.* 36:621–635.
- Andrade C.A.S., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B., Nascimento S.C., Santos-Magalhaes N.S. (2004) Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Internat. J. Pharm.* 278 (2), 435–445.
- Andrade C.A.S., Oliveira M.D.L., Faulin T.E.S., Hering V.R., Abdalla D.S.P. (2011) Biosensors for detection of Low-Density Lipoprotein and its modified forms, in: P.A. Serra (Ed.), *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. Biosensors for Health, Environment and Biosecurity, InTech, Croatia.
- Araújo E.A., Andrade N.J., Carvalho A.F., Ramos A.M., Silva C.A.S. (2010) Aspectos coloidais da adesão de microrganismos. *Quim. Nova* 33(9):1940-1948.
- Archilha N.L. (2008) Interação de um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolipídeos. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Atvars T.D.Z., Martelli C. (2002) Espectroscopia de luminescência. Disponível em <<http://chemkeys.com/br/2002/02/18/espectroscopia-de-luminescencia/>>. Acesso em 15 de março de 2014 às 19:30h.
- Bard J., Faulkner L.R. (2001) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, United States of America.
- Barenholz Y. (2001) Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6:66-77.
- Barros M.R., Andreatti Filho R.L., Oliveira D.E., Lima E.T., Crocer A.J. (2009) Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(2): 319-325.

- Barsoukov E., Macdonald J.R. (2005) Impedance spectroscopy. Theory, experiment, and applications. 2^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Baszkin A., Boissonnade M.M., Santos-Magalhaes N.S., Carvalho Jr L.B., Correia M.T.S., Coelho L.C.B.B. (2000) *Cratylia Mollis* Lectin at the Air-Aqueous Solution Interface: Adsorption and Lectin-Lipid Interactions. Coll. Surf. B: Biointerf. 17:191-201.
- Bauer R.; Dicks L.M.T. (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Internat. J. Food Microbiol. 101(2):201-216.
- Bechinger B., Lohner K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. Biochim. Biophys. Acta: Biomemb. 1758(9):1529-1539.
- Berne B.J., Pecora R. (1990) Dynamic Light Scattering – With Application to Chemistry, Biology and Physics, Robert E (ed.). Krieger Publishing Company: Melbourne, FL: 4–23.
- Besenicar M., Macek P., Lakey J.H., Anderluh G. (2006) Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. Chem. Phys. Lipids 141:169-178.
- Bhattacharjya S., Ramamoorthy A. (2009) Multifunctional host defense peptides: functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. FEBS J. 276:6465–6473.
- Bhunia A., Ramamoorthy A., Bhattacharjya S. (2009) Helical hairpin structure of a potent antimicrobial peptide MSI-594 in lipopolysaccharide micelles by NMR spectroscopy. Chem. Eur. J. 15:2036–2040.
- Bibliomed, Health Latin America. Artigo: Infecção Hospitalar Atinge 15,5% dos Pacientes Internados no Brasil (2010) Disponível em: <http://corporativo.bibliomed.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=189&ReturnCatID=24>.
- Blondelle S.E.; Pérez-Payá H. (1996) Synthetic combinatorial libraries: Novel discovery strategy for identification of antimicrobial agents. Antimic. Agents Chemother. 40:1067-1071.
- Boesze-Battaglia K., Schimmel R.J. (1997) Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. J. Exp. Biol. 200: 2927–2936.
- Boman H.G., Nilsson I., Rasmuson B. (1972) Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. Nature 237:232-235.
- Boubour E., Lennox R.B. (2000) Potential-Induced Defects in n-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers Monitored by Impedance Spectroscopy. J. Phys. Chem. B 104:9004-9010.
- Boukamp B.A. (1986) A package for impedance/admittance data analysis. Sol. Stat. Ion. 18:136-140.
- Brett A.M.O., Brett, C.M.A. (1996) Electrochemistry - Principles, Methods and Applications. Oxford University Press, 5, 236p.
- Brett C.M.A., Brett A.M.O. (1993) Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications, Oxford University Press, New York, United States of America.
- Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microb. 3(3):238-250.
- Bromberg L., Alakhov V.Y., Hatton T.A. (2006) Self-assembling Pluronic®-modified polycations in gene delivery. Cur. Opin. Coll. Interf. Sci. 11(4):217–223.
- Brown W. (1996) Light scattering: principles and development. Clarendon Press: Oxford.

- Caaveiro J.M.M., Molina A., Palenzuela P.R., Coni F.M., Gonzalez-Maras J.M. (1998) Interaction of wheat a-thionin with large unilamellar vesicles. *Protein Science* 7: 2567-2577.
- Cardoso A.O. (2001) Espalhamento de luz dinâmico aplicado no estudo de sistemas micelares. Disponível em: <<http://chipre.iqm.unicamp.br/~wloh/offline/qp433/>>
- Carvalho R.M., Rath S., Kubota L.T. (2003) SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. *Quím. Nova* 26:97-104.
- Chan W.C., White P.D. (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Hames BD, editor.
- Chang L.C., Chang Y.Y., Gau C.S. (2008a) Interfacial properties of Pluronics and the interactions between Pluronics and cholesterol/DPPC mixed monolayers. *J. Coll. Interf. Sci.* 322:263–273.
- Chang W.K., Wimley W.C., Searson P.C., Hristova K., Merzlyakov M. (2008b) Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Bioch. Bioph. Acta: Biomemb.* 1778(10):2430-2436.
- Chen, R.F., Knutson J.R. (1988) Mechanism of Florescence Concentration Quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to Nonfluorescent Dimers. *Analyt. Bioch.* 172(1):61-77.
- Chinaglia D.L., Gozzi G., Alfaro R.A.M., Hessel R. (2008) Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. *Ver. Brasil. Ens. Fís.* 30(4):1-9.
- Chonn A., Cullis P.R. (1998) Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 30:73-83.
- Cleveland J.; Montville T.J.; Nes I.F.; Chikindas M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Internat. J. Food Microbiol.* 71(1):1-20.
- Coelho A.L. (2004) Desenvolvimento de procedimento de erivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetônido) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L., King L.G., Osman P.D., Raguse B., Wieczorek L., Pace R.J. (1997) A biosensor that uses ionchannel switches. *Nature* 387:580-583.
- Daghestani H.N., Day B.W. (2010) Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors* 10:9630-9646.
- Damos F. S., Mendes R. K., Kubora L.T. (2004) Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (Bio)sensors. *Quim. Nova* 27(6):970-979.
- DeLano W. (2002) The PyMOL molecular graphics system.
- DeLano W.L. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.3r1, Schrodinger, LLC, New York.
- Domingues M.M., Inácio R.G., Raimundo J.M., Martins M., Castanho M.A.R.B., Santos N.C. (2012) Biophysical Characterization of Polymyxin B Interaction with LPS Aggregates and Membrane Model Systems. *Peptide Scien.* 98(4):338-344.
- Domingues M.M., Santiago P.S., Castanho M.A.R.B., Santos N.C. (2008) What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *J. Pept. Sci.* 14(4):394.
- Duo T. (2009) Infecção hospitalar: ameaça e segurança do paciente. Disponível em: <http://www.saudebusinessweb.com.br/noticias/index.asp?cod=56495>. Acesso em 08 de maio de 2011 às 12:35 h.

- Engelman D.M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578-580.
- Epand R.F., Epand R.M., Formaggio F., Crisma M., Wu H., Lehrer R.I., Toniolo C. (2001) Analogs of the antimicrobial peptide trichogin having opposite membrane properties. *Eur. J. Biochem.* 268:703–712.
- Epand R.M., Epand R.F. (2003) Liposomes as models for antimicrobial peptides. *Methods Enzymol.* 372:124–133.
- Eswar, N. (2007) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 2.
- Feigenson G.W. (2007) Phase Boundaries and Biological Membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:63–77.
- Fernandes F.C., Rigden D.J., Franco O.L. (2012) Prediction of antimicrobial peptides based on the adaptive neuro-fuzzy inference system application. *Pept. Sci.* 98:280-287.
- Fernandez D.I., Gehman J.D., Separovic F. (2009) Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:1630-1638.
- Franco O.L. (2011) Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. *FEBS Lett.* 585:995–1000.
- Freire J.M., Domingues M.M., Matos J., Melo M.N., Veiga A.S., Santos N.C., Castanho M.A.R.B. (2011) Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 40:481–487.
- Fusco S., Borzacchiello A., Netti P.A. (2006) Perspectives on: PEO–PPO–PEO triblock copolymers and their biomedical applications. *J. Bioact. Compat. Pol.* 21:149–164.
- Ganz T., Lehrer R. I. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10:41–44.
- Garbati M.A., Godhair A.I. (2013) The growing resistance of *klebsiella pneumonia*, the need to expand our Antibigram: case report and review of the literature. *Afr. J. Infect. Dis.* 7(1): 8 – 10.
- Gong Z., Ewart K.V., Hu Z., Fletcher G. L., Hew C.L. (1996) Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. *J. Biol. Chem.* 271:4106-4112.
- Green R.J., Frazier R.A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. (2000) Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* 21:1823-1835.
- Gregory S.M., Pokorny A., Almeida P.F.F. (2009) Magainin 2 revisited: a test of the quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 96:116–131.
- Hall K., Mozsolits H., Aguilar M.I. (2003) Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide-membrane interactions: affinity & mechanism of action. *Lett. Pept. Sci.* 10:475-485.
- Hancock R.E.W. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418–422.
- Henzler-Wildman K.A., Martinez G.V., Brown M.F., Ramamoorthy A. (2004) Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43:8459-8469.
- Hew C.L., Joshi S., Wang N.C., Kao M.H., Ananthanarayanan V.S. (1985) Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 151:167-172.

- Hincha D.K., DeVries A.L., Schmitt J.M. (1993) Cryotoxicity of antifreeze proteins and glycoproteins to spinach thylakoid membranes—comparison with cryotoxic sugar acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1146:258–264.
- Huang Y., Huang J., Chen Y. (2010) Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell* 1:143–152.
- Huber W., Mueller F. (2006) Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology. *Curr. Pharm. Design.* 12, 3999–4021.
- Humblot V, et al. (2009) The antibacterial activity of magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* 30:3503–3512.
- Hwang P.M., Vogel H.J. (1998) Structure–function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76:235–246.
- Jafurulla M., Tiwari S., Chattopadhyay A (2011) Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404: 569–573.
- Jelinek R., Kolusheva S. (2005) Membrane interactions of hostdefense peptides studied in model systems. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 6:103–114.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3):491–511.
- Jiang J., Kucernak A. (2002) Nanostructured platinum as an electrocatalyst for the electrooxidation of formic acid. *Electroanal. Chem.*, 520(1-2):64–70.
- Jitonnorn J., Lomthaisong K., Lee V.S. (2012) Computational design of peptide inhibitor based on modifications of proregion from *Plutella xylostella* midgut trypsin. *Chem. Biol. Drug Des.* 79:583–593.
- Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., Berndt K.D., Agerberth B. (1998) Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273:3718–3724.
- Kabanov D.S., Prokhorenko I.R. (2010) Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry-Moscow*, 75:383–404.
- Kandasamy S.K., Larson R.G. (2004) Binding and insertion of alpha-helical antimicrobial peptides in POPC bilayers studied by molecular dynamics simulations. *Chem. Phys. Lip.* 132:113–132.
- Kaszuba M., Corbett J., Watson F.M., Jones A. (2010) High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 368(1927):4439–4451.
- Katz E., Willner L. (2003) Probing biomolecules interactions of conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: rantes to impedimetric immunosensors, DNA – sensors, and enzyme biosensors. *Eletroanalysis* 15(11):913–947.
- Kepczynski M., Nawalany K., Jachimska B., Romek M., Nowakowska M. (2006) Pegylated tetraarylporphyrin entrapped in liposomal membranes – a possible novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 49(1):22–30.
- Kerner Z., Pajkossy T. (1998) Impedance of rough capacitive electrodes - the role of surface disorder. *J. Electroanal. Chem.* 448:139–142.
- Khandelia H., Ipsen J.H., Mouritsen O.G. (2008) The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.* 1778:1528–1536.
- Kostarelos K., Luckham P.F., Tadros T.F. (1998) Steric stabilization of phospholipid vesicles by block copolymers – vesicle flocculation and osmotic swelling caused by monovalent and divalent cations. *J. Chem. Soc.: Faraday Trans.* 94(15):2159–2168.

- Kuiper M.J., Fecondo J.V., Wong M.G. (2002) Rational design of alpha-helical antifreeze peptides. *J. Pept. Res.* 59:1-8.
- Kun H., Minnes R., Mastai Y. (2008) Effects antifreeze peptides on the thermotropic properties of a model membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40:389–396.
- Ladokhin A.S., White S.H. (2001) ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* 1514:253-260.
- Lakowicz J.R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA: Springer.
- Lasic D.D. (1989) Liposomes, *Recherche* 20(212):904-913.
- Lasic D.D. (1998) Novel applications of liposomes, *Trends in Biotech.* 16(7):307-321.
- Lee I.H., Cho Y., Lehrer R.I. (1997a) Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun.* 65:2898–2903.
- Lee I.H., Zhao C., Cho Y., Harwig S.S., Cooper E.L., Lehrer R.I. (1997b) Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.* 400:158–162.
- Lewandowska J., Kepczynski M., Bednar J., Rząd E., Moravcikova V., Jachimska B., Nowakowska M. (2010) Silicone-stabilized liposomes. *Coll. Polymer. Sci.* 288(1):37–45.
- Lima S.V. (2010) Transições de fase em colóides: física básica e aplicações em liberação de fármacos. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Programa de Pós-graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, Bahia.
- Lin J., Motylinski J., Krauson A.J., Wimley W.C., Searson P.C., Hristova K. (2012) Interactions of Membrane Active Peptides with Planar Supported Bilayers: An Impedance Spectroscopy Study. *Langmuir* 28:6088–6096.
- Lohner K. (2001) The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies* (Lohner, K., ed.), Horizon Scientific Press, pp. 149–165.
- Lohner K., Sevcsik E., Pabst G. (2008) Liposome-based biomembrane mimetic systems: Implications for lipid-peptide interactions, in: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Leitmannova-Liu A, Editor. Elsevier, Amsterdam.
- Lojou E., Bianco P. (2006) Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceramics.* 16(1):79-91.
- Lopes J.L.S. (2010) Plantaricina 149 e análogos: atividade antimicrobiana, estudos estruturais e mecanismos de ação. Tese (Doutorado em Física) – Programa de Pós-graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
- Lugtenberg E.J.J., Peters R. (1976) Distribution of lipids in ytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* 441(1):38-47.
- Luiz F.C.L. (2009) Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MacDonald J.R. (1987) *Impedance spectroscopy: emphasizing solid materials and systems*, John Wiley and Sons, Inc., New York, United States of America.
- MacDonald J.R. (1992) Impedance Spectroscopy. *Annals Biomed. Engin.* 20(3):289-305.
- Mandal S.M., Dey S., Mandal M., Sarkar S., Maria-Neto S., Franco O.L. (2009) Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides* 30(4):633–637.

- Mandal S.M., Franco O.L. (2012) The use of MALDI-TOF-MS and in silico studies for determination of antimicrobial peptides' affinity to bacterial cells. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 23:1939-1948.
- Mangoni M.L., Shai Y. (2009) Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:1610–1619
- Maria-Neto S., Cândido E.D., Rodrigues D.R., Souza D.A., Silva E.M., de Moraes, L.M., Otero-Gonzales A.D., Magalhães B.S., Dias S.C., Franco O.L. (2012) Deciphering the magainin-resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (4):1714–1724.
- Marrink S.J., Berger O., Tieleman D.P., Jaehnig, F. (1998) Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 74:931-943.
- Maskarinec S.A., Wu G., Lee K.Y.C. (2005) Membrane Sealing by Polymers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066:310–320.
- Mason A.J., Chotimah I.N., Bertani P., Bechinger B. (2006) A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide pleurocidin. *Mol. Membr. Biol.* 23:185-194.
- Matos C., de Castro B., Gameiro P., Lima J.L., Reis S. (2004) Zeta-potential measurements as a tool to quantify the effect of charged drugs on the surface potential of egg phosphatidylcholine liposomes. *Langmuir* 20:369–377.
- Matsuzaki K., Harada M., Handa T., Funakoshi S., Fujii N., Yajima H., Miyajima K. (1989) Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively charged lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 981(1):130–134.
- Matsuzaki K., Sugishita K., Miyajima K. (1999) Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 449: 221-224.
- Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 858(1):161–168.
- Mazzuca C., Orioni B., Coletta M, Formaggio F., Toniolo C., Maulucci G., De Spirito M., Pispisa B., Venanzi M., Stella L. (2010) Fluctuations and the rate-limiting step of peptide-induced membrane leakage. *Biophys J.* 99(6):1791–1800.
- Melo M.N., Ferre R., Castanho M.A.R.B. (2009) Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* 245-250.
- Migliolo L., Silva O.N., Silva P.A., Costa M.P., Costa C.R., Nolasco D.O., Barbosa J.A.R.G., Silva M.R.R., Bemquerer M.P., Lima L.M.P., Romanos M.T.V., Freitas S.M., Magalhães B.S., Franco O.L. (2012) Structural and Functional Characterization of a Multifunctional Alanine-Rich Peptide Analogue from *Pleuronectes americanus*. *Plos one* 7(10): e47047.
- Mihajlovic M., Lazaridis T. (2010) Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim. Biophys. Acta* 1798(8):1494-502.
- Morris G.M. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chem.* 16:2785-2791.
- Morris G.M.; Lim-Wilby M. (2008) Molecular docking. *Methods Mol. Biol.* 443:365-382.
- Mozsolits H., Wirth H.J., Werkmeister J., Aguilar M.I. (2001) Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta: Biomemb.* 1512(1):64–76.

- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2006) *Microbiologia Médica*. 5 ed. Ed. Mosby, 992p.
- Myers D. (1999) *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., p493.
- Nascimento J.M., Franco O.L., Oliveira M.D.L., Andrade C.A.S. (2012) Evaluation of magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem. Phys. Lipids* 165:537-544.
- Nascimento, V.F.S., Araújo, M.F.F. (2013) Ocorrência de bactérias patogênicas oportunistas em um reservatório do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ver. Cien. Ambientais* 7(1): 91-104.
- Neckel I.T. (2009) Crescimento e morfologia de ligas de CoXFe100-X eletrodepositadas sobre Si(111) tipo-n. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Pós Graduação em Engenharia. Área de Concentração: Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Nguyen K.T., Le Clair S.V., Ye S., Chen Z. (2009) Orientation determination of protein helical secondary structures using linear and nonlinear vibrational spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 113:12169–12180.
- Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotech.* 29:464-472.
- Nicolas P. (2009) Multifunctional host defense peptides: intracellular targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 276:6483–6496
- Nobeli I., Favia A.D., Thornton J.M. (2009) Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol* 27: 157–167.
- O'Donnell A.G., Nahaie M.R., Goodfellow M., Minnikin D.E., Hajek V. (1985) Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.* 131(8):2023-2033.
- Oliveira M.D.L., Abdalla D.S.P., Guilherme D.F., Faulin T.E.S., Andrade C.A.S. (2011) Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL(-)) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal)-gold nanoparticles matrix. *Sens. Actua. B: Chem.* 155(2):775–781.
- Oliveira M.D.L., Franco O.L., Nascimento J.M., de Melo C.P., Andrade C.A.S. (2013) Mechanistic aspects of peptide-membrane interactions determined by optical, dielectric and piezoelectric techniques: an overview. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, In Press.
- Orazem M. E., Tribollet B. (2008) *Eletrochemical impedance spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai, Y. (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell selective activity. *Biochem. J.* 341, 501-513.
- Oren Z., Shai Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Oren Z., Shai Y. (1999) Mode of action of linear amphipathic a-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47:451– 463.
- Pacheco W.F., Semaan F.S., Almeida V.G.K., Ritta A.G.S.L., Aucélio R.Q. (2013) Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Rev. Virtual Quim.* 5(4):516-537.

- Papo N., Shai Y. (2003) Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: Differentiation between pore formation *versus* membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry* 42, 458-466.
- Parton R.G., Hancock J.F. (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14(3):141-147.
- Paterson D.L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control* 34(5):20-28.
- Paulson J.C. (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* 14(7):272-276.
- Perelman Y., Ginosar R. (2008) The Neuroprocessor: An integrated interface to biological Neural Networks. Haifa: Springer science.
- Peschel A., Sahl H.G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:529-536.
- Philo J.S. (2006) Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS J.* 8:E564-E571.
- Pietzsch J. (2004) Mind the membrane. Nature Publishing Group. Disponível em: http://www.nature.com/horizon/livingfrontier/background/figs/membrane_f2.html. Acesso em 09 de maio de 2014 às 21:01h.
- Piwonski I., Grobelny J., Cichomski M., Celichowski G., Rogowski J. (2005) Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(1 1 1) surface. *Appl. Surf. Sci.* 242(1-2):147-153.
- Pokorny A., Almeida P.F.F. (2004) Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by d-lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. *Biochemistry.* 43:8846-8857.
- Primor N., Tu A.T. (1980) Conformation of pardaxin, the toxin of the flatfish *Pardachirus marmoratus*. *Biochim. Biophys. Acta* 626:299-306.
- Ramamoorthy A. (2009) Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 35:201-207.
- Ramanathan B., Davis E.G., Ross C.R., Blecha F. (2002) Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 4(3):361-72.
- Rathinakumar R., Wimley W.C. (2008) Biomolecular engineering by combinatorial design and high-throughput screening: small, soluble peptides that permeabilize membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 130:9849-9858.
- Ratledge E., Wilkinson G. (1988) Microbial lipids Volume 1. Academic Press, London.
- Resende J.M., Moraes C.M., Prates M.V., Cesar A., Almeida F.C., Mundim N.C., Valente A.P., Bemquerer M.P., Pilo-Veloso D., Bechinger B. (2008) Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides* 29:1633-1644.
- Rosa C.M.; Franco B.D.G.M. (2002) Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Conscien. Saúde* 1:9-15.
- Sanderson J.M. (2005) Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Org. Biomol. Chem.* 3(2):201-212.
- Santos N.C., Sousa A.M.A, Betbeder D., Prieto M., Castanho M.A.R.B. (1997) Structural characterization of organized systems of polysaccharides and phospholipids by light scattering spectroscopy and electron microscopy. *Carbohydr. Res.* 300:31-40.

- Schaffazick S.R., Guterres S.S. (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* 26(5):726-737.
- Scott G.K., Hew C.L., Davies P.L. (1985) Antifreeze protein genes are tandemly linked and clustered in the genome of the winter flounder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2613–2617.
- Seelig J. (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1666: 40-50.
- Sejdárková M., Rehák M., Otto M. (1997) Stability of bilayer lipid membranes on different metallic supports *Biosensors & Bioelectronics* 12(2):145-153.
- seminarios/textodeapoio-atilio.pdf>. Acesso em 31 de janeiro de 2014 às 13:25h.
- Sevcsik E., Pabst G., Jilek A., Lohner K. (2007) How lipids influence the mode of action of membrane-active peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:2586-2595.
- Shai Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462(1-2): 55-70.
- Shaw D.J. (1992) Introduction to Colloid and Surface Chemistry, 4th edition, Elsevier Science Ltd., p306.
- Silva O.N. (2011) Avaliação do potencial terapêutico e estudo da atividade imunomodulatória e antimicrobiana *in vitro e in vivo* de diferentes formas de clavaninas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.
- Simon S.A., McIntosh T.J. (2002) Peptide-lipid interactions. Academic Press, San Diego.
- Simons K., Vaz W.L.C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:269–95.
- Singer S.J., Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Sluyters-Rehbach, M., Sluyters J.H. (1970) On the impedance of galvanic cells: XXIX. The potential dependence of the faradaic parameters for electrode processes with coupled homogeneous chemical reactions. *Electroanal. Chem.* 26(2-3):237-257.
- Sotomayor M.D.P.T.; Dias I.L.T.; Lanza M.R.V.; Moreira A.B.; Kubota L.T. (2008) Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova* 31(7):1755-1774.
- Stenberg E.; Persson B.; Roos H.; Urbaniczky C. (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Coll. Interf. Sci.* 143:513-526.
- Sugihara K., Delaia M., Szendro I., Guillaume-Gentil O., Vörös J., Zambelli, T. (2012) Simultaneous OWLS and EIS monitoring of supported lipid bilayers with the pore forming peptide melittin. *Sens. Act. B* 161:600-606.
- Tan M.L., Choong P.F.M., Dass C.R. (2010) Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides* 31: 184–193.
- Teixeira L.D., Silva O.N., Migliolo L., Fensterseifer I.C.M, Franco O.L. (2013) In vivo antimicrobial evaluation of an alanine-rich peptide derived from *Pleuronectes americanus*. *Peptides* 42:144–148.
- Thennarasu S., Huang R., Lee D.K., Yang P., Maloy L., Chen Z., Ramamoorthy A. (2010) Limiting an antimicrobial peptide to the lipid–water interface enhances its

- bacterial membrane selectivity: a case study of MSI-367. *Biochemistry* 49:10595–10605.
- Thennarasu S., Lee D.K., Tan A., Kari U.P., Ramamoorthy A. (2005) Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochim. Biophys. Acta* 1711:49–58.
- Tomczak M.M., Hinch D.K., Estrada S.D., Wolkers W.F., Crowe L.M., Feeney R.E., Tablin F., Crowe J. H. (2002) A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys. J.* 82:874-881.
- Torcatto I.M., Castanho M.A.R.B., Henriques S.T. (2012) The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. *Spect. Intern. J.* 27(5-6):541–549.
- Torrent M., Pulido D., Nogués M.V., Boix E. (2012) Exploring New Biological Functions of Amyloids: Bacteria Cell Agglutination Mediated by Host Protein Aggregation. *PLoS Pathog.* 8:e1003005.
- Tortora G.J.; Funke B.R.; Case CL. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Trabulsi L.R., Alterthum F. (2008) *Microbiologia*. 5ª ed. Ed. Atheneu, 780p.
- Tsogas I., Tsiourvas D., Nounesis G., Paleos C.M. (2005) Interaction of poly-L-arginine with dihexadecyl phosphate/phosphatidylcholine liposomes. *Langmuir* 21:5997–6001.
- Unwin N. (1984) The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250(2):78-94.
- Valeur B. (2001) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- van Kan E.J., Demel R.A., Breukink E., van der Bent A., de Kruijff B. (2002) Clavanin permeabilizes target membranes via two distinctly different pH-dependent mechanisms. *Biochemistry* 41(24):7529-39.
- van Kan E.J., Demel R.A., van der Bent A., de Kruijff B. (2003) The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. *Biochim Biophys Acta*. 1615:84–92.
- van Kan E.J., van der Bent A., Demel R.A., de Kruijff B. (2001) Membrane activity of the peptide antibiotic clavanin and the importance of its glycine residues. *Biochemistry* 40(21):6398-405.
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(2):112–124.
- Vasir J.K., Labhasetwar V. (2007) Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* 59:718-728.
- Vockenroth I.K., Fine D., Dodabalapur A., Jenkins A.T.A., Koper I. (2008) Tethered bilayer lipid membranes with giga-ohm resistances. *Electrochem. Commun.* 10:323-328.
- Volodkin D., Ball V., Schaaf P., Voegel J.C., Mohwald H. (2007) Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:280–290.
- Wadhwani P., Reichert J., Bürck J., Ulrich A.S. (2012) Antimicrobial and cell-penetrating peptides induce lipid vesicle fusion by folding and aggregation. *Eur. Biophys. J.* 41:177–187.
- Wang W., Smith D.K., Moulding K., Chen H.M. (1998) The Dependence of Membrane Permeability by the Antibacterial Peptide Cecropin B and Its Analogs, CB-1 and CB-3, on Liposomes of Different Composition. *J. Biol. Chem.* 273:27438-27448.
- Wang Z., Wang G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucl. Acids Res.* 32:D590-592.

- Werkmeister J.A., Kirkpatrick A., McKenzie J.A., Rivett D.E. (1993) The effect of sequence variations and structure on the cytolytic activity of melittin peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1157:50-54.
- Wiederstein M., Sippl M.J. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35:W407-W410.
- Wieprecht T., Apostolov O., Seelig J. (2000) Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. *Biophys. Chem.* 85:187-198.
- Winnik F.M., Regismong S.T.A. (1996) Fluorescence Methods in the study of the Interactions of surfactants with polymers. *Colloids Surf. A* 118:1-39.
- World Health Organization (2009) Core components for infection prevention and control programmes. Report of the Second Meeting Informal Network on Infection Prevention and Control in Health Care.
- Wu G., Majewski J., Ege C., Kjaer K., Weygand M.J., Lee K.Y. (2004) Lipid corralling and poloxamer squeeze-out in membranes. *Phys. Rev. Lett.* 93(2):028101.
- Zasloff M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceed. Natio. Acad. Sci. USA* 84(15):5449-5453.
- Zhang L.J., Rozek A., Hancock R.E.W. (2001) Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* 276(38):35714-35722.
- Zhou Y., Raphael R.M. (2007) Solution pH alters mechanical and electrical properties of phosphatidylcholine membranes: relation between interfacial electrostatics, intramembrane potential, and bending elasticity. *Biophys. J.* 92(7):2451-2462.
- Zimmerberg J., Kozlov M.M. (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Reviews* 7: 9-19.
- Zoltowski, P. (1994) A new approach to measurement modelling in electrochemical impedance spectroscopy *J. Electroanal. Chem.*, 375(1-2), 45-57.

CAPÍTULO 8

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

Artigo publicado na revista *Chemistry and Physics of Lipids*

**Evaluation of Magainin I interactions with lipid membranes: An
optical and electrochemical study**



Evaluation of Magainin I interactions with lipid membranes: An optical and electrochemical study

Jéssica M. Nascimento^a, Octávio L. Franco^b, Maria D.L. Oliveira^c, César A.S. Andrade^{a, c, *}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, 70990-160, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2012

Received in revised form 12 May 2012

Accepted 15 May 2012

Available online 24 May 2012

Keywords:

Magainin

Phospholipid

Liposomes

Electrochemical impedance spectroscopy

Surface plasmon resonance

ABSTRACT

Most antimicrobial peptides (AMPs) have shown clear activity related to the disruption of lipid bilayers. In order to improve knowledge of this subject, the interaction of Magainin I (MagI) with phospholipid layers (PLs), uncoated or coated with synperonic (Synp), was studied using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and surface plasmon resonance (SPR) techniques. MagI peptide was immobilized on gold electrode via a self-assembling monolayer obtained from liposomes and liposomes covered by Synp. MagI induces pores in the supported lipid membranes, which are reflected in an increased amperometric-response and also a decreased electron-transfer resistance (R_{CT}). In addition, MagI showed a significant interaction with the PL-Synp-modified gold electrode, but MagI showed a reliable contact with the PL-modified gold electrode, leading to a decrease in the relative resistance charge transfer value of -17.38% . Our results demonstrated that Synp acts as a membrane sealant after exposure of the lipid membrane to MagI. A parallel reaction model was proposed for the interaction of MagI and a hybrid layer that result in a complex bimolecular interaction. In short, the importance of triblock copolymer to stabilize liposomes for future applications as drug delivery systems for MagI was demonstrated.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, a large number of proteinaceous compounds, known as antimicrobial peptides (AMPs), with deleterious effects on microorganisms have been isolated from numerous sources such as bacteria, plants, insects, amphibians and mammals (Strandberg et al., 2009). These peptides are essential components of innate immunity, being considered an ancient defense mechanism commonly found in different organism (Yount et al., 2006; Tavares et al., 2008; Carvalho and Gomes, 2009). AMPs are promising candidates for novel, anti-infectious drugs since they are effective against antibiotic-resistant bacteria. The indiscriminate use of antimicrobials is an important risk factor for the emergence and spread of drug-resistant microorganisms, requiring intense searches for new classes of antimicrobial agents (Mandal et al., 2009; Vaara, 2009).

The potential use of AMPs as promising therapeutic agents to control infections by microorganisms has focused much attention on numerous studies aiming to decipher their modes of action (Jelinek and Kolusheva, 2005). Among these, the study of phospholipid membrane models has provided important contributions

to clarify how the interaction of these peptides with biological membranes and the type of cellular damage is induced by peptides (Chang et al., 2008b; Brogden, 2005).

In general, peptides have some amphiphilic characteristics and the hydrophobic effect acts to allocate the peptide in the hydrophilic–hydrophobic interfacial layer of the membrane (Khandelia et al., 2008). AMPs act specifically by bacterial cell membrane permeabilisation and novel studies have shown alternative mechanisms similar to disinfectants, as opposed to traditional antibiotic therapies (Zhang et al., 2001). Permeability through the membrane by these peptides can occur in different forms, such as the attraction between the AMP and the microbial membrane, followed by the penetration of the membrane, forming pores and leading the microorganism to death (Hall et al., 2003; Zhang et al., 2001).

Magainin I (MagI) is a 23-amino acid cationic AMP obtained from the African frog *Xenopus laevis*. This peptide has an α -helical structure and is characterized by being a cationic and amphipathic molecule (Matsuzaki, 1998). MagI reveals multiple functions related to membrane interactions, being active toward multiple pathogens (Zaslhoff, 1987; Maria-Neto et al., 2012; Matsuzaki et al., 1989). This peptide also carries a positive net charge at a neutral pH level and has hydrophobic residues (Hicks et al., 2003; Bechinger et al., 1992) that are essential for antimicrobial activity (Khandelia et al., 2008). The modes of action proposed for MagI are

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8540; fax: +55 81 2126 8576.

E-mail address: csrandrade@gmail.com (C.A.S. Andrade).

related to cellular membrane disruption and include the insertion of hydrophobic peptide regions into the lipid bilayer alignment, removal of membrane sections and pore formation (Huang et al., 2010; Imura et al., 2008). Furthermore, MagI seems to be able to affect the bacterial cell in different ways and further modifies the pathogen's metabolism, suggesting the presence of unusual and undiscovered targets (Maria-Neto et al., 2012; Li and Salditt, 2006; Hicks et al., 2003).

In short, in spite of the enormous similarity between them, MagI peptide was chosen, due to the small number of reports previously published reports, in contrast to the large number of studies with Magainin II (MagII). Magainin I and II showed only two differences at positions 10 and 22 (Matsuzaki, 1998). Moreover this data could also be correlated with the bacterial resistance effect previously observed in *Escherichia coli* cells (Maria-Neto et al., 2012), leading us to create a novel hypothesis and enhance our understanding of the mechanism of action of MagI.

A wide variety of studies have assessed the activity of magainins through peptide-vesicle/membrane interaction formed by a single type or different mixed lipids, providing data on the attraction, attachment, insertion and orientation of AMPs, as well as on the thickness and integrity of lipid bilayers following the action of the peptide (Brogden, 2005). In addition, several studies have dealt with the steric stabilization of phospholipid vesicles by adsorption of glycolipids and water-soluble polymers (including triblock copolymers) onto the outer liposome surface (Kostarelos et al., 1998). Synperonic F68 (Synp), also known as pluronic or poloxamer, is a strongly hydrophilic triblock copolymer of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) (PEO–PPO–PEO) applied in drug delivery systems and in gene delivery, as biological adjuvants (Fusco et al., 2006; Bromberg et al., 2006). In addition, PEO–PPO–PEO have also been applied as dispersants and stabilizers in antibiotics, vitamin dispersions and in cell culture to protect microorganisms and animal and plant cells against mechanical damage (Kostarelos et al., 1998). As previously reported (Maskarinec et al., 2005), PEO–PPO–PEO are able to interact with lipid bilayers in order to restore their integrity and can therefore be a useful stabilizer for liposomes (Lip).

As a result, since real difficulties of AMP encapsulation into Lip have been observed due to pore-forming mechanisms, novel approaches are required to stabilize the Lip–MagI interaction for further understanding of drug delivery systems for controlled AMP release. In addition, Lip mimicking the outer-leaflet plasma membrane of bacteria have also been used. In this connection, the present study evaluated the interactions of MagI (H_2N –GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS–COOH) with phospholipid layers (PLs) (uncoated or coated with Synp) in order to understand the association mechanism with model membranes using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and surface plasmon resonance (SPR). Since MagI causes cellular membrane disruption PEO–PPO–PEO were applied as a membrane sealant (Wu et al., 2004) for the development of stable drug delivery systems. To the best of our knowledge, the present report is the first to show the possibility of obtaining a useful drug delivery system for AMPs based on Synp-modified liposomes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (Epikuron 200, 98% PC) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany). Cholesterol and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Synperonic F68 was purchased from SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany). Potassium

ferri- and ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). Synthetic Magainin I (Sigma Chemical) with a 95% degree of purity was employed in all experiments. All chemicals and solvents were of analytical grade and were used as received, without further purification. The water used was obtained from a Milli-Q plus (Billerica, USA) purification system.

2.2. Formulation of the uncoated and coated liposomes

Liposomes (Lip) were obtained by a lipid film formed by evaporation of the solvent from a phospholipid organic solution (Andrade et al., 2004). For the formulation, Epikuron 200 (EP) and cholesterol (CHOL) in a molar ratio of 7:1 were used. The EP and CHOL were separately dissolved in an organic solvent containing chloroform/methanol (9:1, v/v) using magnetic stirring at room temperature and were then mixed together and stirred for 10 min. Subsequently, the formulation was subjected to low pressure (100 mmHg^{-1}) and agitation (100 rpm, 37°C) for solvent evaporation and obtaining lipid films. Shortly afterwards, the films were hydrated with 10^{-3} M citrate–phosphate buffer (pH 7.4) to obtain multilamellar vesicles (MLV). The solution was subjected to magnetic stirring at room temperature for 45 min. Next, the MLV suspensions were subjected to sonication for 120 s using a probe-type sonicator (Unique DES500), and large and small unilamellar vesicles (LUV and SUV) were formed. Synp-coated Lip were obtained according to Kostarelos et al. (1998). 0.5% of Synp was added to an equal volume of liposome solution under magnetic stirring at room temperature for two hours. Finally, all formulations were stored at 4°C .

2.3. Dynamic light scattering and zeta potential measurements

The measurements of size and zeta (ζ) potential were performed using a Zetasizer Nano ZS90 instrument (Malvern, UK). The hydrodynamic mean diameter was determined by dynamic light scattering detected at an angle of 90° with a laser He–Ne operating at $\lambda = 633 \text{ nm}$ as the light source. ζ -Potential was measured by the electrophoretic technique by means of the Smoluchowski approximation, $U = \varepsilon\zeta/\eta$, where U is the mobility, η is the viscosity and ε is the dielectric constant for pure water. All measurements were carried out at 25°C and the results reported correspond to the average of three independent measurements.

2.4. Self-assembled layers

In order to evaluate the PL–MagI interaction a MPTS-modified gold electrode was used in order to obtain a self-assembled PL. Measurements were performed using a gold substrate coated with a self-assembly MPTS monolayer. For coating, a solution was prepared by diluting the MPTS in ethanol at a final concentration of approximately $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. The substrate was immersed in this solution for 30 min and then washed with distilled water and ethanol. The substrate was then taken to an incubator at 60°C for 1 h (Piwonski et al., 2005). Fig. 1 schematically shows the proposed stepwise formation of the supported PL on the MPTS-modified gold surface. The figure clearly illustrates that the unilamellar vesicles adsorb spontaneously on the hydrophobic MPTS surface to form a supported PL, providing a model membrane surface.

2.5. Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were carried out on a PGSTAT 302N potentiostat (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) interfaced with an analyzer controlled by a computer. A three-electrode setup with an Ag/AgCl (saturated KCl) reference electrode was employed throughout the investigation. All potentials were

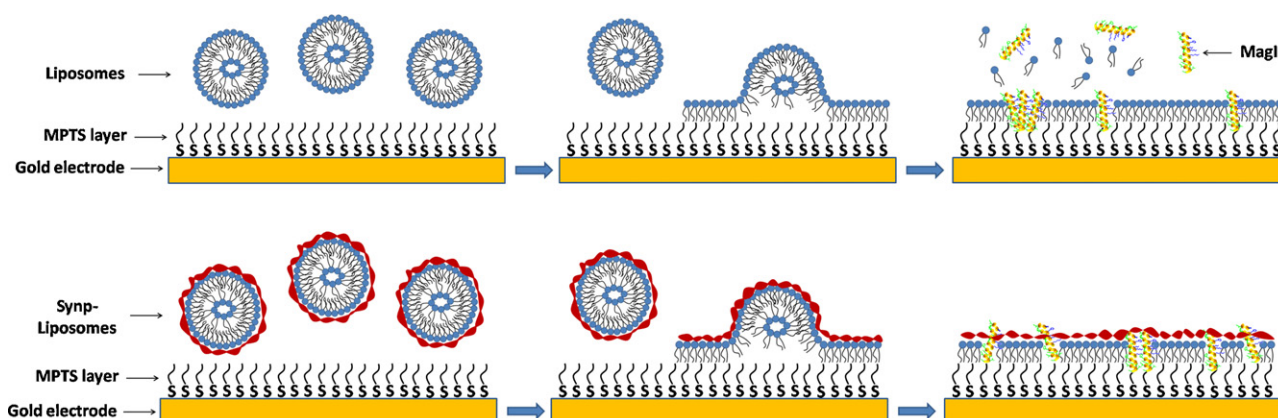


Fig. 1. Schematic representation of liposome adsorption (with or without Synp) on MPTS-modified gold electrode and MagI action.

referred to this electrode. A platinum wire and a modified gold disc ($d = 2$ mm) were used as auxiliary and working electrodes, respectively. The impedance spectra were recorded in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz. The amplitude of the applied sine wave potential was 10 mV, while the direct current (dc) potential was limited at the open circuit potential measured just before the application of the sine wave potential. Cyclic voltammetry (CV) was performed with the potential sweeping between +0.7 and -0.2 V at a scan rate of 50 mV s^{-1} . CV and EIS measurements, performed in the presence of a $10 \text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) solution used as a redox probe in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4), were carried out at different stages of the preparation of the modified electrode. The bare gold electrode was mechanically polished with $0.05 \mu\text{m } \alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ powder and washed ultrasonically in distilled water prior to each experiment. All electrochemical measurements were performed at room temperature inside a Faraday cage.

2.6. SPR instrumentation and measurements

SPR measurements were made using an Esprit double channel SPR instrument (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) setup in the Kretschmann configuration (Oliveira et al., 2011b). Gold-plated sensor surfaces (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) were used for the SPR measurements, and the corresponding signal was recorded as a function of time. The SPR signal was first recorded using a running solution to stabilize the electrode and allow the establishment of the baseline. During each run, the first 200 s represent the baseline, after which the sample was added and allowed to interact with the electrode. The response of the SPR sensor was automatically monitored in a PC by a digital converter.

2.7. Scanning electron microscopy measurements

The scanning electron microscopy images were obtained from a JSM 5900 (JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV and a working distance of $5 \mu\text{m}$ (Oliveira et al., 2011a). The 3D images were obtained using ImageJ software (Abramoff et al., 2004).

3. Results and discussion

3.1. Morphological analyses

Scanning electron microscopy was used to study the morphology of the PL-modified surface with or without Synp and compared with the pure PL, as shown in Fig. 2. The PL appears as a flat and

smooth surface (Fig. 2a and b) in contrast with the PL-MagI system, which has a relatively heterogeneous surface in SEM images (Fig. 2c and d). In particular, the PL-MagI system shows pores on the PL surface (Fig. 2c). In addition, the pore-forming MagI action over PL is clarified in Fig. 2d and some irregularly-shaped particles were also identified. The morphology of the PL-Synp film was a plain and smooth surface (Fig. 2e and f). This typical surface appearance suggests that Synp is completely dispersed on the PL film matrix. No significant structural difference can be observed by increasing the MagI content in the PL-Synp systems (Fig. 2g and h). Thus the results obtained for MagI interacting with PL-Synp system indicate that triblock copolymers can help to seal structurally damaged PL membranes. Maskarinec et al. (2005) demonstrated that the insertion of PEO-PPO-PEO into a lipid film leads to a tighter packing of the lipid molecules by physically occupying part of the damaged lipid film. Subsequently, triblock copolymer is expelled when the membrane integrity is restored (Chang et al., 2008a; Maskarinec et al., 2005; Wu et al., 2004).

3.2. Electrochemical behavior of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ at the modified electrode surface

Cyclic voltammograms were obtained using a stepwise modification process for differently modified electrodes in the presence of a fairly reversible redox couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ at the scan rate of 50 mV s^{-1} to monitor electrode modification (Fig. 3a). The cyclic voltammogram of the bare gold electrode showed a pair of well-defined redox peaks, demonstrating the reverse process of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in the solution phase. The self-assembled PL on the electrode surface decreased the anodic and cathodic peak current of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. This could be easily interpreted as a relatively compact PL formed on the gold electrode that prevents the diffusion of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ toward the electrode surface. The solid-supported lipid membrane has the advantage of ease of preparation, reproducibility, stability and the possibility of using an electrically conductive support.

After interaction of MagI on the PL surface an increase of anodic and cathodic peaks occurred, which could suggest a possible pore formation. These results demonstrate that MagI retain their biological action after exposure on the electrode surface. However, no increase in the amperometric response of the PL-MagI system in the presence of Synp was observed, suggesting that membrane disruption is probably not occurring. Our results confirmed that MagI displayed a subtle interaction with the PL-Synp system with no significant modifications in the voltammetric response.

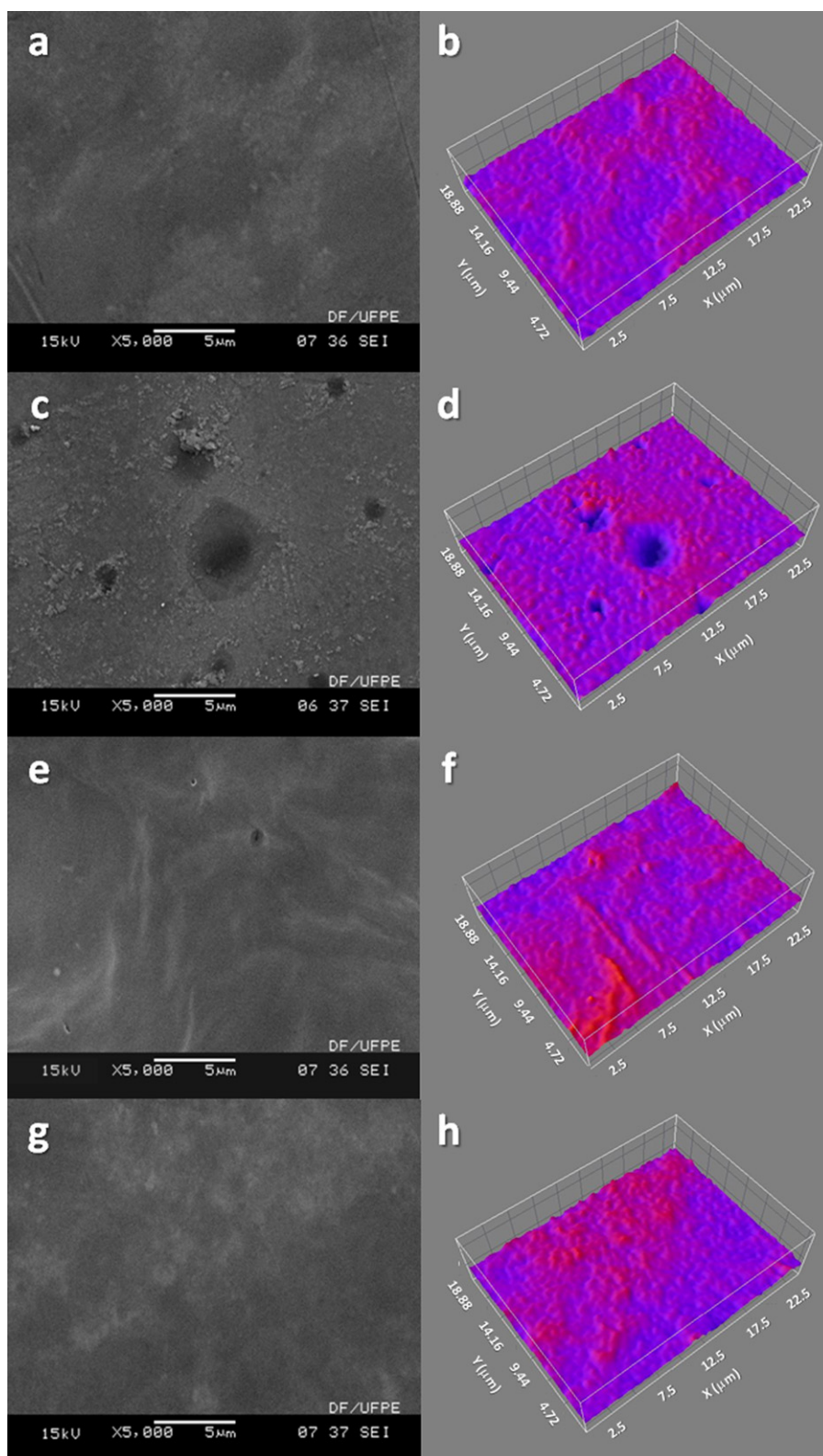


Fig. 2. Representative SEM images of PL (a), PL-MagI (c), PL-Synp (e) and PL-Synp-MagI (g) and their corresponding 3D images: PL (b), PL-MagI (d), PL-Synp (f) and PL-Synp-MagI (h). Lighter color represents greater height.

3.3. Electrochemical impedance spectroscopy

Fig. 3b shows the Faradaic impedance spectra observed during the stepwise modification process. The bare gold electrode reveals a very small semicircle, signifying a very low

charge-transfer resistance (R_{CT}) of the redox probe, thereby confirming the CV results. The R_{CT} was increased after the electrode modification with PL due to the deposition of lipids on the electrode surface, which act as an electrostatic barrier that hinders the ability of the redox probe to access the layer and retards the

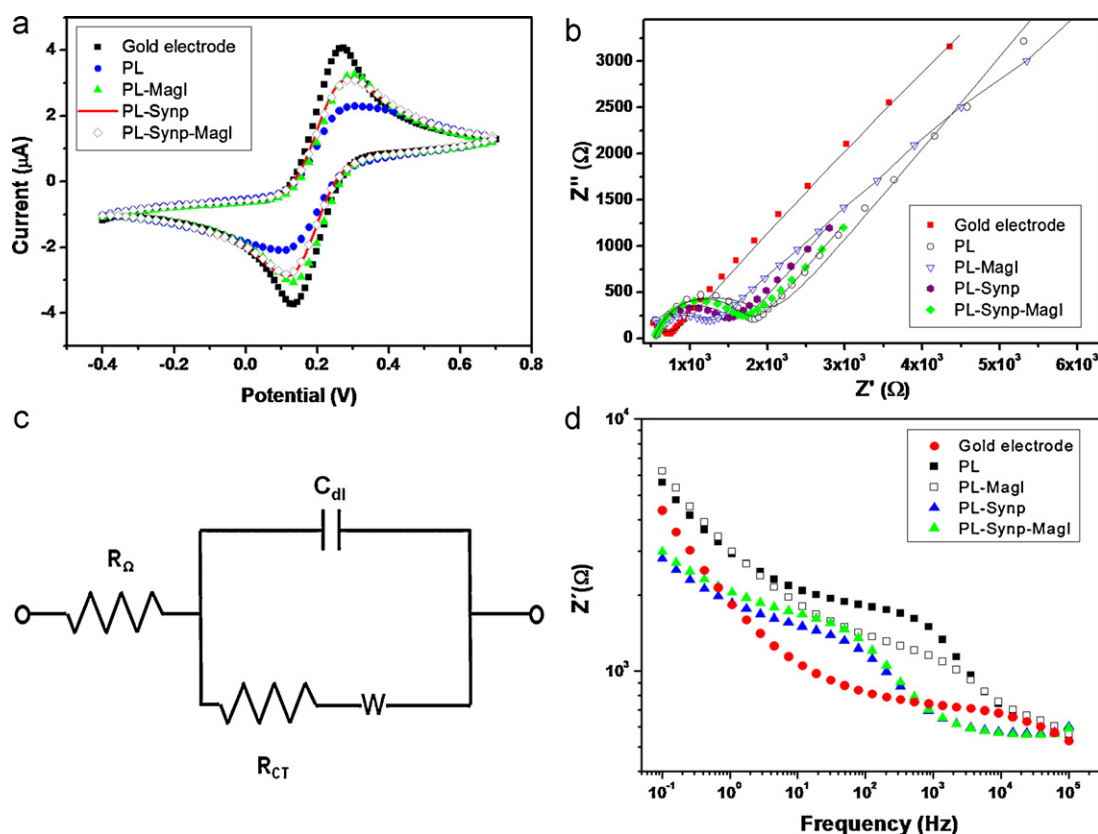


Fig. 3. Cyclic voltammograms (a), Nyquist plots (b), equivalent circuit applied to fit impedance measurements (c) and Bode plots (d) of the electrode of the electrode at different stages. Supporting electrolyte 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM pH 7.4 solution; scan rate of 50 mV s⁻¹. R_Ω , the ohmic resistance of the electrolyte solution; C_{dl} , the double layer capacitance; Z_W , the Warburg impedance; R_{CT} , the charge-transfer resistance.

electron transfer kinetics between the redox probe and the electrode.

The impedance spectra follow the theoretical shapes and include a semicircular portion observed at higher frequencies, which corresponds to the electron transfer-limited process, followed by a linear part characteristic of the lower frequency attributable to a diffusional limited electron transfer (Fig. 3b). The impedance data were fitted with a Boukamp non-linear least-square fitting program (Oliveira et al., 2011a), using the Randles equivalent circuit (Fig. 3c), which includes the solution resistance (R_Ω), the charge-transfer resistance (R_{CT}), the double layer capacitance (C_{dl}) and the Warburg impedance element (Z_W). Ideally, Z_W and R_Ω represented the bulk properties of the electrolyte solution and diffusion features of the redox probe in solution and are thus not affected by modifications in the electrode surface. The R_{CT} depend on the insulating feature at the electrode/electrolyte interface. The changes in R_{CT} were much larger than those in the other impedance components. Thus, R_{CT} was a suitable signal for sensing the interfacial properties of the biosystem prepared during all these assembly procedures.

The C_{dl} changes show a direct and sensitive relationship with the electron-transfer rate and with the responses of the interaction between MagI and the lipid membrane. Thus, the R_{CT} was used as the sensor signal. At high frequencies the semicircle demonstrates heterogeneous charge transfer kinetics, according to the equations below:

$$R_{CT} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (1)$$

$$i_0 = nFA\kappa^0 C \quad (2)$$

where R is the gas constant, T is the temperature, n is the electron-transferring constant of the redox couple ($n = 1$ as for $Fe(CN)_6^{3-/4-}$), F is the Faraday constant, i_0 is the exchange current between the gold electrode and the redox couple, A is the area of gold electrode, κ^0 is the charge transfer rate constant and C is the concentration of the redox couple. The charge transfer rate constant was obtained from the above equations.

The curve simulated by the equivalent circuit is preferably close to the experimental impedance plots, which indicates that the equivalent circuit is accurate. The PL-MagI complex causes the disruption of the lipid layer on the electrode surface, which decreases the diameter of the semicircle resulting in a low R_{CT} . The diameter becomes smaller and the charge-transferring rate constant κ^0 increases from 0.66×10^{-10} m/s to 1.13×10^{-10} m/s in the following order: PL-modified electrode, PL-Synp-MagI complex and PL-MagI modified electrode.

Table 1 lists the parameters of the fitted impedance results. Table 1 shows the value of R_{CT} , C_{dl} and κ^0 for each modification process. The R_{CT} of a bare gold electrode is 0.286 kΩ, a very small response compared to the values of R_{CT} of the other analyzed systems, except for the PL-MagI system. The increase observed for κ^0 is in agreement with the fact that the interaction of MagI with PL results in a significant decrease in R_{CT} (0.673 kΩ), owing to the generation of faults in the lipid membrane. After the interaction of MagI with the PL-Synp modified electrode, a significant increase in R_{CT} from 0.846 kΩ to 1.024 kΩ (Table 1) was observed. This data reflects the peptide immobilization/adsorption and leads to a very significant increase in mass on the electrode surface. The sequence of measurements for the pure PL, PL-Synp and PL-Synp-MagI modified electrodes are consistent with the occurrence of a progressive blockage of the interface, confirming that the amount of

Table 1
Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results and current peaks of voltammograms.

Modified electrode	R_{CT} (k Ω)	C_{dl} (F)	W ($\times 10^{-4}$ Ω)	I_{pa} (μ A)	I_{pc} (μ A)	ΔR_{CT} (%)	κ^0 ($\times 10^{-10}$ m/s)
Gold electrode	0.286 ± 0.011	$1.015 \times 10^{-8} \pm 0.013$	2.36 ± 0.011	0.404 ± 0.020	0.380 ± 0.013	–	2.67
PL	1.145 ± 0.010	$6.075 \times 10^{-8} \pm 0.096$	2.33 ± 0.086	0.249 ± 0.015	0.230 ± 0.021	–	0.66
PL-MagI	0.673 ± 0.021	$6.662 \times 10^{-8} \pm 0.116$	1.77 ± 0.109	0.327 ± 0.020	0.313 ± 0.030	70.13	1.13
PL-Synp	0.846 ± 0.012	$8.844 \times 10^{-7} \pm 0.067$	6.58 ± 0.073	0.308 ± 0.010	0.287 ± 0.017	–	0.90
PL-Synp-MagI	1.024 ± 0.014	$7.617 \times 10^{-7} \pm 0.079$	6.55 ± 0.124	0.314 ± 0.013	0.287 ± 0.011	–17.38	0.74

ΔR_{CT} – Relative charge transfer variation from impedance data.

material immobilized and/or adsorbed on the electrode surface directly correlates with the impedance response.

In addition, Synp coating retained the MagI in the PL and preserved the membrane structure, with no apparent modifications in the EIE response. The results presented in Fig. 3b clearly show that MagI was able to disrupt the PL, as can be seen by the decrease in the charge transfer, R_{CT} .

The performance of the modified electrode for analysis of MagI action was evaluated through the relative variation of this parameter (ΔR_{CT}). This variation can be calculated according to the following equation:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(PL) - R_{CT}(MagI)}{R_{CT}(MagI)} \quad (3)$$

Here, $R_{CT}(PL)$ is the value of the charge-transfer resistance of the PL or PL-Synp modified electrode. $R_{CT}(MagI)$ is the value of the charge-transfer resistance of the PL-modified electrodes after exposing them to the solution containing MagI.

A summary of the results of MagI action in each system analyzed, such as PL and PL-Synp, is given in Table 1. All the measurements were repeated at least three times and the results were nearly the same each time (Table 1). These results demonstrate that the MagI retains its capability to make pores in PL-modified electrodes. As previously observed, ΔR_{CT} was higher with the MagI action in the PL-modified gold electrode (70.13%) than in the PL-Synp-gold electrode (–17.38%). Thus, Synp showed a membrane sealant property (Wu et al., 2004) and avoided membrane disruption.

The mechanism of interaction between the MagI- and PL-modified gold electrodes was predictable. Initially, MagI probably binds with the anionic head group of PL via electrostatic interactions. Upon insertion into the membrane, MagI might induce the modification of phospholipids in such a way that it induces a positive interface curvature. The negatively-charged marker ions could not cross the membrane. Since MagI is a small peptide that can span the membrane only once, it was assumed that several molecules associated with the membrane are able to form a pore. The impedimetric results showed that MagI had broken the structure of the underlying lipid membrane by removing the lipid membrane from the gold electrode and that, at the same time, the marker ions had crossed the membrane through the water-filled pores to reach the surface of the gold electrode and exhibited an amperometric response.

Fig. 3d shows that the mechanism interaction of the peptide changed the electrical characteristics of the lipid membrane. A Bode plot showed an impedance variation between the initial situation (with an intact lipid coating) and the final situation (where the layer should be disrupted), and, despite the changes in the spectra shapes, we applied the same equivalent circuit. In the medium-frequency region, a linear relationship can be observed between the impedance modulus and log frequency. This frequency region corresponds to the capacitive behavior of the electrode/electrolyte interface.

R_{CT} versus time experiments were performed in order to better understand the association mechanism of lipid membranes (coated or uncoated Synp) with MagI. Fig. 4 shows the R_{CT} response for PL- and PL-Synp-modified electrodes before and after exposure to the

MagI. MagI induces a significant decrease in the R_{CT} within the first minute. In the case of the PL-Synp system there is a major increase in the R_{CT} after exposure to MagI molecules. The final value of R_{CT} for PL in the presence of MagI is 0.968 k Ω , while for PL-Synp-MagI it is 2.703 k Ω . The higher values of R_{CT} obtained for PL-Synp-MagI indicate that MagI is retained in the PL-Synp system.

In Fig. 4a decrease in the R_{CT} response for PL after MagI interaction and, subsequently, an increase in R_{CT} after a few minutes were observed. Thus, the resulting impedimetric behavior is in accordance with the EIS model proposed by Chang et al. (2008b). This data substantiate the toroidal pore model proposition for the AMP mode of action. In addition, the charge cluster mechanism can also be proposed for amphipathic helical cationic AMPs (Epand et al., 2010), but is not applicable to some peptides, such as Mag. Our results therefore showed that the proposed biosystem formed by Synp-coated phospholipid membranes is appropriate for the development of drug delivery systems with substantial resistance to the action of MagI.

3.4. Surface plasmon resonance analyses

Binding sensorgrams between MagI with layers of PL and PL-Synp are shown in Fig. 5. The results reported here show that a notable difference in the peptide affinity was observed in PL-Synp as compared to pure PL, indicating the contribution of the Synp layer in avoiding the membrane disruption. The peptide solutions were passed over the self-assembled surfaces and the detected association rate of the MagI did not vary considerably when the flow rate was varied. Our results therefore indicate that the interaction was not mass-transport limited.

In addition, the sensorgrams indicate a biphasic behavior related to the association of MagI with the lipid surfaces. The initial association of the PL-MagI system starts as a very rapid process and subsequently slows down toward the end of the MagI injection and does not reach equilibrium (Mozsolits et al., 2001). The mechanism of association between MagI and phospholipids seems to be driven by two steps (Papo and Shai, 2003) and is known as a two-state reaction model. According to this model, the MagI first bind to the lipid head group and then penetrate further into the hydrocarbon region

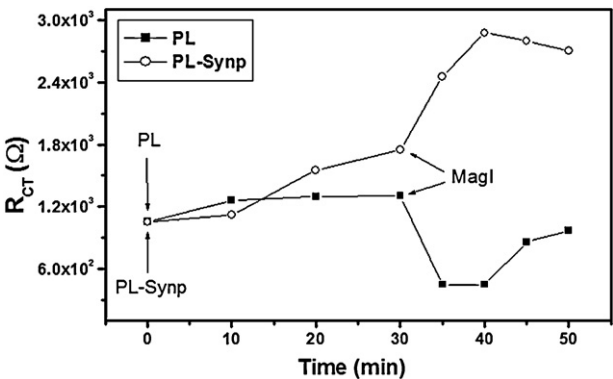


Fig. 4. R_{CT} versus time for PL and PL-Synp exposed to MagI.

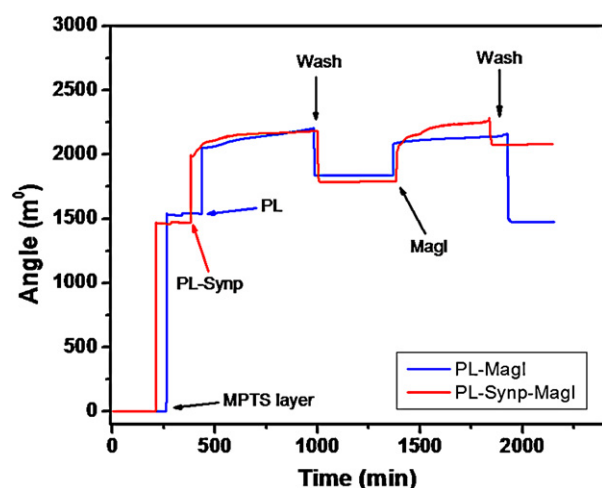


Fig. 5. A real-time response of liposome adsorption (with or without Synp) on MPTS-modified gold electrode at MagI presence.

of the PL. Initially, the first step is mainly governed by electrostatic interactions between the MagI and PL. Moreover, the electrostatic interactions are not important for the PL-MagI interaction in the second step.

However, due to the covalent attachment of MPTS thiol groups to the metal surface, the MagI may not be able to completely penetrate the MPTS-PL hybrid layer. Mozsolits et al. (2001) have proposed a parallel reactions model (PRM) to explain similar behavior. PRM assumes two simple bimolecular interactions running parallel with different rate constants, resulting in a complex bimolecular interaction.

Thus, when analyzing our PRM results, it is possible to assume a molecular mechanism involving a MagI-lipid interaction, when the MagI initially binds to the PL and is subsequently partially inserted into the MPTS-PL hybrid bilayer, leading to the limited disruption of the adsorbed PL. After the buffer flow had been washed, a large amount of free or weakly-bound peptide and disrupted PL was removed. In the case of PL-Synp-MagI, the sensorgrams did not return to zero, which may indicate that molecules of the MagI remained bound to the surface or inserted into the PL-Synp. The contribution of the polar head group may favor MagI retention between the choline groups and Synp. The electrostatic interactions between the positively-charged residues of the AMP and the phosphate group of the phospholipid head group have been studied (Kandasamy and Larson, 2004; Ramamoorthy, 2009). The sensorgram characteristics also reveal that the MagI bound faster to the pure PL than the PL-Synp.

3.5. Dynamic light scattering and zeta potential analyses

The ζ -potential and effective diameter of the liposomes with or without Synp as a function of the presence of MagI were investigated. The mean particle size and ζ -potential, before and after coating, are illustrated in Table 2. In addition, for all analyzed samples, minimal changes in the particle size (from 191 to 201 nm) were observed with a polydispersity index of ~ 0.9 .

Table 2
 ζ -Potential and size particles of the liposomes with or without Synp as a function of the presence of MagI.

Sample	Size (nm)	ζ -Potential (mV)
Liposome	200.0 $\pm$ 17.3	−6.7 $\pm$ 1.6
Liposome-Synp	201.3 $\pm$ 32.3	11.0 $\pm$ 2.8
Liposome-Synp-MagI	191.3 $\pm$ 28.0	17.3 $\pm$ 4.7

Lower size values were obtained for Lip-Synp-MagI. The differences in size for Lip, Lip-Synp and Lip-Synp-MagI are due to the AMP binding that induces disorder in the phospholipid bilayer interface region (Thennarasu et al., 2005, 2010). Recently, Bhattacharjya and Ramamoorthy (2009) have studied the interactions between AMP and biopolymers, determining a notably different structural organization of the peptides. Thus, it is likely that AMPs could have different structural organizations, depending on the type of environment in which they are situated (Bhattacharjya and Ramamoorthy, 2009; Bhunia et al., 2009).

In addition, the pure liposomes were stable for 5 days. On the other hand, the Lip-MagI samples were completely unstable. Therefore, due to the observed instability of Lip-MagI, we used a stabilizing agent (Synp). The Lip-Synp and Lip-Synp-MagI samples presented a clear stability behavior for 15 days. No visible aggregation was observed for Lip-Synp or Lip-Synp-MagI during the experiments. It is worth stressing that pure liposomes, when in contact with pore-forming MagI, are unstable. Synp improves the physical stability of Lip and reduces aggregation.

Low values for the ζ -potential (−6.7 mV) of liposomes were obtained. It is known that the value of ζ -potential of liposomes strongly depends on the pH and ionic strength of the solution. Depending on the ionic strength, the ζ -potential of the liposomes from L- α -phosphatidylcholine is in the negative range (Kepczynski et al., 2006; Zhou and Raphael, 2007). According to Lewandowska et al. (2010), the negative ζ -potential may come from some acidic impurities, e.g., phosphatidylglycerol. On the other hand, ζ -potential positive values (11.0–17.3 mV) were obtained after adding the Synp, and are a clear demonstration that Synp-coated liposomes prevented membrane disruption by MagI action.

Recently, a number of authors (Thennarasu et al., 2010; Nguyen et al., 2009) have shown the existence of more than one distinct orientation of AMPs. Some of these are inserted into the lipid bilayer and others are oriented on the lipid bilayer surface. However, the resulting ζ -potential is slightly more positive (Table 2) for Lip-Synp-MagI, indicating that some MagI molecules might be embedded on the Synp surface and contribute to a more cationic surface.

4. Conclusions

The interaction of MagI with PL and PL-Synp systems was investigated using $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ couples as electrochemical marker ions. The electrostatic attraction between MagI and lipid membranes and the self-aggregation of MagI in the presence of membranes caused pore formation and resulted in marker ions crossing the supported lipid membrane layer and reaching the surface of the gold electrode. In addition, our results demonstrate that the biosystem formed by Synp-coated phospholipid membranes is more resistant to action from MagI. However, a parallel reaction model is proposed for the interaction of MagI and the MPTS-PL hybrid layer, resulting in a complex bimolecular interaction. The importance of triblock copolymers in stabilizing liposomes for the controlled release of MagI was demonstrated here, since conventional liposomes cannot be applied to control the release of AMPs, owing to their destabilization by pore formation.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support of the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES and INCT-IF. J.M. Nascimento would like to thank CAPES for a PhD scholarship.

References

Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11 (4), 36–42.

Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 278 (2), 435–445.

Bechinger, B., Zasloff, M., Opella, S.J., 1992. Structure and interactions of magainin antibiotic peptides in lipid bilayers – a solid-state nuclear-magnetic-resonance investigation. *Biophysical Journal* 62 (1), 12–14.

Bhattacharjya, S., Ramamoorthy, A., 2009. Multifunctional host defense peptides: functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. *FEBS Journal* 276, 6465–6473.

Bhunia, A., Ramamoorthy, A., Bhattacharjya, S., 2009. Helical hairpin structure of a potent antimicrobial peptide MSI-594 in lipopolysaccharide micelles by NMR spectroscopy. *Chemistry – A European Journal* 15, 2036–2040.

Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3 (3), 238–250.

Bromberg, L., Alakhov, V.Y., Hatton, T.A., 2006. Self-assembling Pluronic®-modified polycations in gene delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11 (4), 217–223.

Carvalho, A.D., Gomes, V.M., 2009. Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30 (5), 1007–1020.

Chang, L.-C., Chang, Y.-Y., Gau, C.-S., 2008a. Interfacial properties of Pluronics and the interactions between Pluronics and cholesterol/DPPE mixed monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* 322, 263–273.

Chang, W.K., Wimley, W.C., Searson, P.C., Hristova, K., Merzlyakov, M., 2008b. Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* 1778 (10), 2430–2436.

Epand, R.F., Maloy, W.L., Ramamoorthy, A., Epand, R.M., 2010. Probing the charge cluster mechanism in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry* 49, 4076–4084.

Fusco, S., Borzacchiello, A., Netti, P.A., 2006. Perspectives on: PEO–PPO–PEO triblock copolymers and their biomedical applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 21, 149–164.

Hall, K., Mozsolits, H., Aguilar, M.I., 2003. Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide–membrane interactions: affinity & mechanism of action. *Letters in Peptide Science* 10 (5–6), 475–485.

Hicks, R.P., Mones, E., Kim, H., Koser, B.W., Nichols, D.A., Bhattacharjee, A.K., 2003. Comparison of the conformation and electrostatic surface properties of magainin peptides bound to sodium dodecyl sulfate and dodecylphosphocholine micelles. *Biopolymers* 68 (4), 459–470.

Huang, Y., Huang, J., Chen, Y., 2010. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell* 1, 143–152.

Imura, Y., Choda, N., Matsuzaki, K., 2008. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. *Biophysical Journal* 95, 5757–5765.

Jelinek, R., Kolusheva, S., 2005. Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Current Protein and Peptide Science* 6 (1), 103–114.

Kandasamy, S.K., Larson, R.G., 2004. Binding and insertion of alpha-helical antimicrobial peptides in POPC bilayers studied by molecular dynamics simulations. *Chemistry and Physics of Lipids* 132, 113–132.

Kepczynski, M., Nawalany, K., Jachimska, B., Romek, M., Nowakowska, M., 2006. Pegylated tetraarylporphyrin entrapped in liposomal membranes – a possible novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49 (1), 22–30.

Khandelia, H., Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G., 2008. The impact of peptides on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* 1778 (7–8), 1528–1536.

Kostarelos, K., Luckham, P.F., Tadros, T.F., 1998. Steric stabilization of phospholipid vesicles by block copolymers – vesicle flocculation and osmotic swelling caused by monovalent and divalent cations. *Journal of the Chemical Society: Faraday Transactions* 94 (15), 2159–2168.

Lewandowska, J., Kepczynski, M., Bednar, J., Rząd, E., Moravcikova, V., Jachimska, B., Nowakowska, M., 2010. Silicone-stabilized liposomes. *Colloid and Polymer Science* 288 (1), 37–45.

Li, C., Salditt, T., 2006. Structure of magainin and alamethicin in model membranes studied by X-ray reflectivity. *Biophysical Journal* 91 (9), 3285–3300.

Mandal, S.M., Dey, S., Mandal, M., Sarkar, S., Maria-Neto, S., Franco, O.L., 2009. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides* 30 (4), 633–637.

Maria-Neto, S., Cândido, E.D., Rodrigues, D.R., Souza, D.A., Silva, E.M., de Moraes, L.M., Otero-Gonzales, A.D., Magalhães, B.S., Dias, S.C., Franco, O.L., 2012. Deciphering the magainin-resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (4), 1714–1724.

Maskarinec, S.A., Wu, G., Lee, K.Y.C., 2005. Membrane Sealing by Polymers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066, 310–320.

Matsuzaki, K., 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore-forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376, 391–400.

Matsuzaki, K., Harada, M., Handa, T., Funakoshi, S., Fujii, N., Yajima, H., Miyajima, K., 1989. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 981 (1), 130–134.

Mozsolits, H., Wirth, H.J., Werkmeister, J., Aguilar, M.I., 2001. Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* 1512 (1), 64–76.

Nguyen, K.T., Le Clair, S.V., Ye, S., Chen, Z., 2009. Orientation determination of protein helical secondary structures using linear and nonlinear vibrational spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 113, 12169–12180.

Oliveira, M.D.L., Abdalla, D.S.P., Guilherme, D.F., Faulin, T.E.S., Andrade, C.A.S., 2011a. Impedimetric immunosensor for electronegative low density lipoprotein (LDL(–)) based on monoclonal antibody adsorbed on (polyvinyl formal)–gold nanoparticles matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical* 155 (2), 775–781.

Oliveira, M.D.L., de Melo, C.P., Oliva, G., Andrade, C.A.S., 2011b. Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82 (2), 365–370.

Papo, N., Shai, Y., 2003. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry* 42 (2), 458–466.

Piwonski, I., Grobelny, J., Cichomski, M., Celichowski, G., Rogowski, J., 2005. Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surface. *Applied Surface Science* 242 (1–2), 147–153.

Ramamoorthy, A., 2009. Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 35, 201–207.

Strandberg, E., Tremouilhac, P., Wadhwani, P., Ulrich, A.S., 2009. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* 1788 (8), 1667–1679.

Tavares, L.S., Santos, M.D., Viccini, L.F., Moreira, J.S., Miller, R.N.G., Franco, O.L., 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29 (10), 1842–1851.

Thennarasu, S., Huang, R., Lee, D.-K., Yang, P., Maloy, L., Chen, Z., Ramamoorthy, A., 2010. Limiting an antimicrobial peptide to the lipid–water interface enhances its bacterial membrane selectivity: a case study of MSI-367. *Biochemistry* 49, 10595–10605.

Thennarasu, S., Lee, D.-K., Tan, A., Kari, U.P., Ramamoorthy, A., 2005. Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711, 49–58.

Vaara, M., 2009. New approaches in peptide antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology* 9 (5), 571–576.

Wu, G., Majewski, J., Ege, C., Kjaer, K., Weygand, M.J., Lee, K.Y., 2004. Lipid corralling and poloxamer squeeze-out in membranes. *Physical Review Letters* 93 (2), 028101.

Yount, N.Y., Bayer, A.S., Xiong, Y.Q., Yeaman, M.R., 2006. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers* 84 (5), 435–458.

Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (15), 5449–5453.

Zhang, L.J., Rozek, A., Hancock, R.E.W., 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *Journal of Biological Chemistry* 276 (38), 35714–35722.

Zhou, Y., Raphael, R.M., 2007. Solution pH alters mechanical and electrical properties of phosphatidylcholine membranes: relation between interfacial electrostatics, intramembrane potential, and bending elasticity. *Biophysical Journal* 92 (7), 2451–2462.

8.2. Anexo 2

Artigo publicado na revista *Current Protein and Peptide Science*

Mechanistic Aspects of Peptide-Membrane Interactions Determined by Optical, Dielectric and Piezoelectric Techniques: An Overview

Mechanistic Aspects of Peptide-Membrane Interactions Determined by Optical, Dielectric and Piezoelectric Techniques: An Overview

Maria D.L. Oliveira¹, Octavio L. Franco², Jessica M. Nascimento³, Celso P. de Melo⁴ and Cesar A.S. Andrade^{1,3,*}

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil; ²Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, 70990-160, Brasília, DF, Brazil; ³Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil; ⁴Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Abstract: Antimicrobial peptides (AMPs) have been isolated from a wide variety of organisms that include microorganisms, plants, insects, frogs and mammals. As part of the innate immune system expressed in many tissues, AMPs are able to provide protection against invasion of foreign microorganisms and exhibit a broad spectrum of activity against bacteria, fungi and/or virus. Non-AMPs cell-penetrating peptides have been used as carriers for overcoming the membrane barrier and helping in the delivery of various molecules into the cell. Physicochemical peptide-lipid interactions studies can provide us with reliable molecular information about microbe defense response, including the elucidation of the prevailing mechanisms of its action, such as the barrel-stave, toroidal pore, carpet and detergent-like models. In this paper, we present an overview of the peptide-lipid mechanisms of interaction as well as discuss alternative techniques that could help to elucidate the peptides functionality. Quartz crystal microbalance (QCM), surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) are useful techniques to investigate in details of the peptide-membrane interaction. The techniques here discussed could also offer specific and low-cost methods that can shed some light over the different modes of action of AMPs, contributing to the development of drugs against infectious diseases.

Keywords: Antimicrobial peptides; phospholipids; electrochemical impedance spectroscopy; surface plasmon resonance spectroscopy; quartz crystal microbalance; peptide-lipid association.

NATURAL AND SYNTHETIC PEPTIDES

Antimicrobial peptides (AMPs) have been isolated from numerous sources such as bacteria, plants, insects, amphibians and mammals [1-5]. AMPs are an important part of the innate immune system providing protection against microorganism invasion and exhibiting a broad activity spectrum against bacteria, fungi and/or virus [1, 6]. Antibiotic resistance develops very fast as soon as novel agents are introduced, only ten growth rounds are necessary for increased resistance development [7]. Therefore, attempts to develop new antimicrobial compounds with unusual mechanisms of action may lead to an improved control of bacteria with high resistance to commercial antibiotics [8]. As effective agents against antibiotic-resistant bacteria [9], AMPs are promising candidates for novel anti-infectious drugs. One of the most studied AMPs consists in magainin I (MagI), a natural 23-amino acid residues long cationic and amphipathic helical AMP (Fig. 1) obtained from the African frog *Xenopus laevis* [10]. The specific peptide sequence of MagI is shown in Table 1.

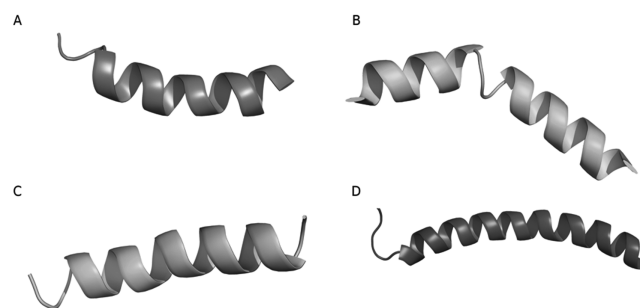


Fig. (1). Three dimensional structures of helical antibacterial peptides. (A) Phylloseptin from *Phyllomedusa hypochondrialis* (PDB code 2jq0; [101]). (B) Mellitin from *Apis mellifera* (PDB code 2mlt; [102]). (C) Magainin from *Xenopus laevis* (PDB code 2mag; [103]). (D) Cathelicidin LL-37 from *Homo sapiens* (PDB code 2k6o; [104]).

AMPs are generally composed of amphipathic and cationic structure regions that can act as effective cell permeabilizers that leads to pathogen death. Peptides have amphiphilic properties and the hydrophobic effect allows the peptides to become localized in the membrane layer [11, 12]. In addition, the hydrophobicity, amphipathicity, peptide

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil; Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-2126.8576; E-mail: cstrandrade@gmail.com

Table 1. Some Peptides and their Respective Sequence and Action Mechanism Obtained Using Alternative Techniques.

Type of mechanism	Peptide designation	Sequence	Technique	Ref.
pore-toroidal	Magainin	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-COOH	SPR and EIS	[24]
pore-toroidal	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	SPR	[24]
peptide carriers	Pep-1	acetyl-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cysteamine	SPR	[16]
carpet	Aurein 1.2	GLFDIHKIAESF-NH ₂	QCM	[37]
pore-forming	Caerin 1.1	GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL-NH ₂	QCM	[37]
unclear	Gly15Gly19-caerin 1.1	GLLSVLGSAKHVLGHVVGIVIAEHL-NH ₂	QCM with dissipation monitoring (QCM-D)	[49]
unclear	Ala15Ala19-caerin 1.1	GLLSVLGSAKHVLAHVVAIVIAEHL-NH ₂	QCM-D	[49]
unclear	Oncocin (peptide 10)	VDKPPYLPRPRPRRIYNR-NH ₂	QCM-D	[49]
carpet	Tat (44–57)	Ac-GISYGRKKRRQRRR-NH ₂	QCM-D	[47]
carpet	Tat (49–57)	Ac-RKKRRQRRR-NH ₂	QCM-D	[47]
pore-forming	CNY21	CNYITELRRQHARASHLGLAR	EIS	[92]
pore-forming	Nisin	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK	QCM	[44]
toroidal pore	Fallaxidin4.1a	GLLSFLPKVIGVIGHLIHPPS-NH ₂	QCM	[43]
carpet or detergent	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	EIS	[95]
pore-forming	HPA3	AKKVFKRLEKLFSKIWNWK	SPR	[79]
pore-forming	HPA3P	AKKVFKRLPKLFSKIWNWK	SPR	[79]
carpet mechanism	Novicidin	KNLRRRIIRKGIHIIKKYF	QCM-D	[58]

charge and degree of secondary structure angle have also been shown to play important roles in the cell-lytic peptides properties [13-15]. The study of peptide-membrane interactions is also extremely important in the case of non-AMPs, such as cell-penetrating peptides (CPPs).

CPPs have been used as carriers for overcoming the membrane barrier, with a substantial improvement in the cellular uptake of hydrophilic macromolecules with pharmacological interest [16, 17]. Some cationic peptides are able to transverse the cell membrane and to help in the delivering of various molecules into the cell [18]. Basic peptidic sequences have the ability to pass through the membrane in a nontoxic and non-immunogenic manner [19]. Pep-1, a synthetic peptide carrier that belongs to the family of primary amphipathic peptides, is an example of CPPs. This peptide shows exceptional properties as a vector and is able to efficiently deliver molecules producing the desired biochemical effect in the expected cellular localizations [20, 21]. Pep-1, that was developed to deliver cargo proteins into several cell lines without the need for covalent coupling, contains three segments: a hydrophobic tryptophan rich motif (KETWWETWWTEW), a spacer domain, and a hydrophilic lysine-rich domain (KKKRKV) [21-23].

PEPTIDE-MEMBRANE INTERACTIONS AND DOCKING MECHANISMS OF ACTION

Currently, a large number of studies have been directed to evaluate the interactions between bioactive peptides and lipid membranes, since they play a key role in many cellular processes [24]. Thermodynamics of peptide-lipid interactions seems to be governed by distinct forces that depend both on the peptide properties and on the membrane composition. The peptide-membrane interaction can occur in different forms, such as the attraction between the AMPs and lipid membrane, followed by membrane penetration, which leads to pore formation and subsequent microorganism death [25, 26]. In summary, the main forces involved can be grouped into electrostatic forces, hydrogen bonds and hydrophobic interactions [27]. The interactions between peptides and lipid membranes result in several modes of action [28], which could be classified, as follows: barrel-stave, toroidal pore, carpet and a detergent-like mechanism (Fig. 2). However, these modes of action are not necessarily exclusive of each other. In classical models of lipid bilayer disruption, once the peptides bound on the membrane surface reach a threshold concentration and they insert themselves across the bilayer to form either peptide-lined pores (in the barrel-stave model), solubilizing the membrane into micellar structures (in the carpet model), or forming peptide-and-lipid lined

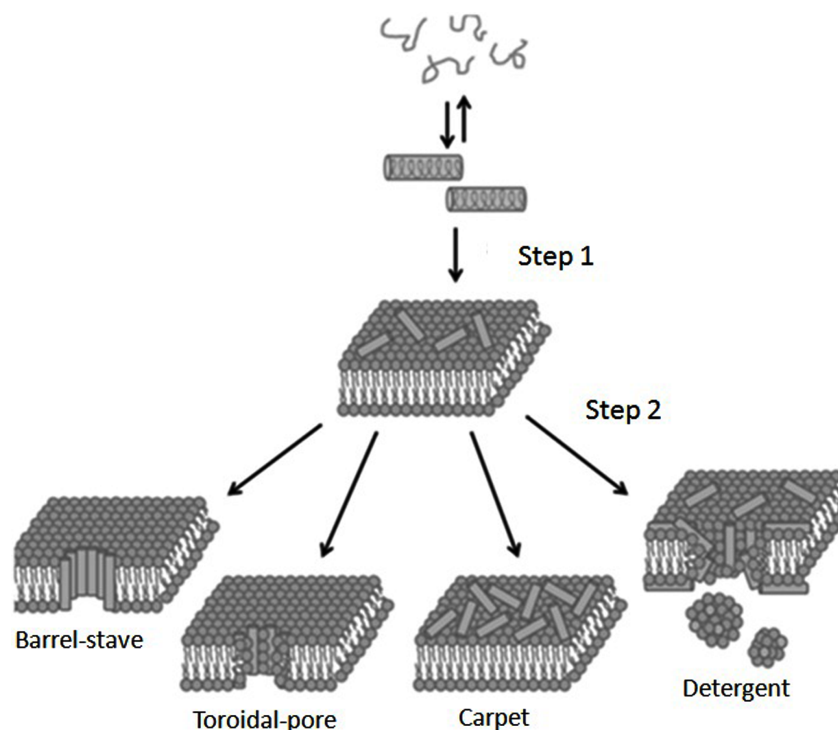


Fig. (2). Schematic diagram of the different mechanisms of membrane-peptide association. The peptides in aqueous adapt the structure in the α -helix. In the first stage, the peptides bind to the membrane by electrostatic interactions. Subsequently, in the second step, the peptides in the lipid bilayer reorganize themselves, inducing the formation of pores (barrel-stave and toroidal-pore models) or destabilization of the membrane (carpeting and detergent models) (Figure adapted from [24]).

pores (in a toroidal pore model) [29]. In the reviewed disordered toroidal pore model, pore formation is more stochastic and involves only low peptide quantity. The bilayer thickness may be affected by the peptides presence and the membrane could be remodeled to form anionic lipids rich domains in the peptides surfaces [28]. In other specific cases, non-bilayer intermediates may be induced. Non-bilayer phospholipid arrangements are three-dimensional structures that can be formed when anionic phospholipids with an intermediate form of the tubular hexagonal phase, such as phosphatidic acid, phosphatidylserine or cardiolipin, are present in lipids bilayer [30]. It is worthy to note that the peptide adsorption to the membrane can be enhanced by targeting them to oxidized phospholipids [28]. Additionally AMPs may pair with anions across the membranes, resulting in ion efflux. Another mechanism that could be observed for AMPs may lead to charge modification in the membrane surface. In this specific case the membrane potential can be dissipated or increased without any clear damage [28].

The ability of a particular AMP to permeate model membranes does not always correlate with cognate biological function, since the peptide needs to transverse the bacterial cell wall (composed of lipoteichoic acid and peptidoglycan in Gram-positive and lipopolysaccharides in Gram-negative bacteria) before reaching the target membrane [24]. In fact, the ability of AMPs to permeate phospholipid membranes is an essential property for their antibiotic function; also AMPs cationicity promote interactions with negatively charged moieties on other biomolecules, such as outer membrane lipids, nucleic acids and phosphorylated proteins that can be found at intracellular medium [28].

BIOPHYSICAL TECHNIQUES TO STUDY PEPTIDE-LIPID ASSOCIATION

Diverse techniques have been extensively utilized to determine the mode of action of different peptides. However, in spite of the fact that new techniques have been applied to study the mechanistic of AMPs action, only few studies applying these new techniques can be currently found in the literature. For these reasons, this report focuses on description of specific techniques, such as quartz crystal microbalance (QCM), surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), as new tools to evaluate the AMPs mode of action (Table 1).

Quartz Crystal Microbalance

QCM is an ultra-sensitive weighing device that utilizes the mechanical resonance of piezoelectric single-crystalline quartz [31] (Fig. 3). In addition, from the QCM it is also possible to analyze the phase shifts of the oscillation and its higher harmonics. Then, it is possible to use mathematical models to calculate the thickness and viscoelasticity of the attached mass, and hence gathering essential information about the structure of surface coatings [32, 33].

It is worthy to note that the resonant frequency modification depends on the total oscillating mass [34]. Thus, a mass adsorbed on the surface can be detected as a frequency decrease. In addition, the linear relation between frequency change and adsorbed mass corresponds to the Saurbrey equation [35], as follows,

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

Eq. 1

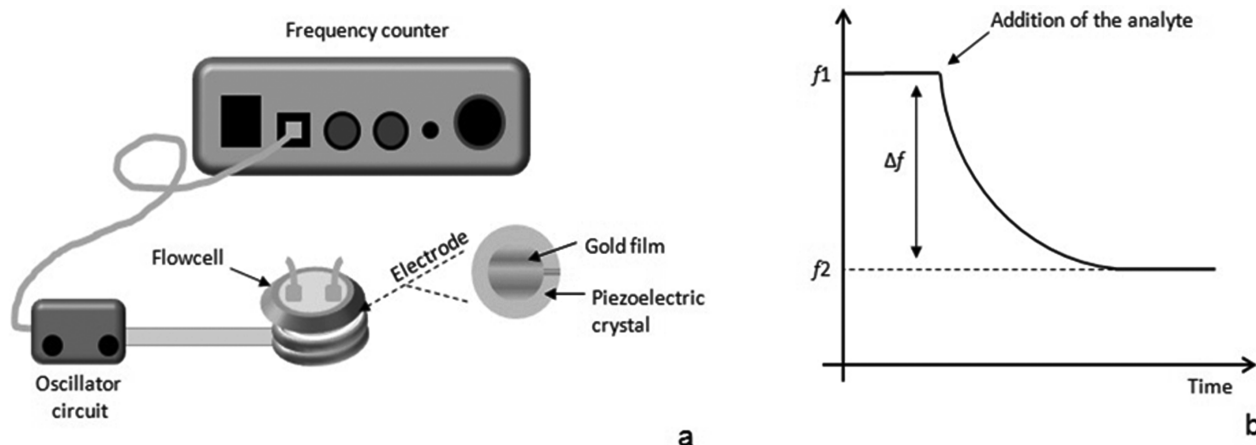


Fig. (3). A typical setup of QCM (a) and conventional plot of frequency vs. time (b).

where f_0 is the resonant frequency (Hz), Δf is the frequency change (Hz), Δm is the mass change (g), A is the piezoelectrically active crystal area (area between electrodes in cm^2), ρ_q is the density of quartz ($\rho_q = 2.648 \text{ g/cm}^3$) and μ_q is the shear modulus of quartz for AT-cut crystal ($\mu_q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm.s}^2$).

The QCM technique provides a precise quantitative and dynamic characterization of molecular interactions on solid-liquid interfaces in chemical reactions and biological assays [36]. Therefore, QCM can be used to investigate the mass and structural changes caused by the insertion of peptides as well by the removal of lipids [37]. Variations in the material structure and density of phospholipid bilayers as a function of distance from the sensor surface due to the applied peptide have allowed discrimination between the two proposed modes of action [37].

However, it must be noted that there are some limitations associated to the QCM technique. One of the limitations is for the generation of thermodynamic data set relative to peptide-surface interactions [38]. QCM or SPR techniques require nanoscale-thick surfaces to be coated on a sensor chip (e.g., coatings on a SPR gold sensor chip or on a QCM quartz sensor chip) limiting the materials that could be studied [39, 40]. In addition, artifacts can arise in QCM measurements due to the evaporation of water [41]. For higher frequency QCM the mass loading effect arises when the adsorbed molecules do not continue to move in unison with the crystal oscillator. The adsorbed molecules fail to follow the crystal movement if the binding between the receptor and the target is weak and their contribution to the additional mass in the resonator system becomes only partial [42].

Mechler *et al.* [37] applied the QCM technique to study the interactions between membranes and the natural peptides aurein1.2, maculatin1.1 and caerin1.1 obtained from skin secretions of Australian frogs with previously determined antimicrobial activity. The QCM results suggested that caerin1.1 was inserted into the lipid bilayer in a transmembrane manner, regardless of concentration and phospholipid composition, which is consistent with a pore-forming mechanism. In contrast, maculatin1.1 and aurein 1.2 interacted with membranes in a concentration-dependent manner. At low concentrations ($<5 \mu\text{M}$), maculatin1.1 exhibits transmembrane incorporation, whereas aurein1.2 is limited

to surface association. Upon reaching a threshold value of concentration, both peptides lysed the membrane. In the case of maculatin1.1, the lysis progress occurs in a slow and concentration-dependent manner, forming mixed micelles [37].

Kannisto *et al.* [33] studied the natural membrane-perturbing peptide melittin with a phospholipid bilayer supported on a SiO_2 surface by means of QCM. Melittin is the principal active component of apitoxin (*Apis mellifera* venom) and is a powerful stimulator of phospholipase A2. Melittin sequence can be visualized in Table 1. From the QCM results, it was observed that the melittin adsorption to the solid supported POPC/POPG (POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, and POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) bilayer was very fast and strongly disrupted its structure, a process that was followed by a slower desorption in an indication of a two-step interaction mechanisms. Melittin forms transmembrane pores in a zwitterionic phospholipid membrane and adsorbs predominantly with electrostatic interactions to negatively charged membranes without transmembrane pore formation [24].

Moreover, Sherman *et al.* [43] performed experiments using real time QCM in order to evaluate the interaction between fallaxidin 4.1a and DMPC (1,2-dimyristoyl-3-sn-phosphatidylcholine) and DMPC/DMPG (DMPG: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt) supported lipid bilayers. Fallaxidin 4.1a is a C-terminal amidated analogue of fallaxidin 4.1, a natural cationic antimicrobial peptide isolated from the amphibian *Litoria fallax*. Together with the NMR results, the QCM results indicated transmembrane pore formation in DMPC/DMPG membranes and peptide insertion, followed by disruption at a threshold concentration in DMPC membranes. QCM results obtained [43] are consistent with a two-stage mechanism: insertion followed by a threshold-disruption. In addition, the interaction of fallaxidin 4.1a with bacterial-like (DMPC/DMPG) membranes, with an increase in mass across the bilayer, is consistent with transmembrane peptide insertion, clearly suggesting pore formation.

Chen *et al.* [34] developed a vascular mimetic membrane system in order: a) to investigate the effect of the cholesterol (Chol) content in lipid bilayer on the dynamics of the melittin-membrane penetration reaction, which was monitored in real-time by a piezoelectric sensor, and b) to assess the mor-

phology by use of atomic force microscopy. The authors suggest that the high Chol content in phospholipid membrane inhibits both the binding and the insertion of melittin. Thus, the molecular configuration and the insertion kinetics depend on the membrane state, which was determined by the intrinsic components and the environmental conditions. However, a kinetic analysis reveals that the different mechanisms could be Chol dependent, particularly for the insertion step.

Additionally, Christ *et al.* [44] investigated the nisin activity with respect to membrane binding and pore formation in real time QCM. Nisin, a natural peptide antibiotic, efficiently kills bacteria through a unique mechanism that includes cell wall biosynthesis inhibition and pore formation in cytoplasmic membranes. Both mechanisms are based on interaction with the cell wall precursor lipid II that is simultaneously used as target and pore constituent. In addition, nisin is produced by *Streptococcus lactis* strains belonging to serological group N [45]. They observed that the presence of 0.1 mol% lipid II strongly increased nisin binding affinity to 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (k_D 2.68×10^{-7} M vs. 1.03×10^{-6} M) by a higher association rate.

Christ *et al.* [44] also correlated the variation in the damping D for changing frequency f to the viscoelastic properties of the sensor bound analytes. Since, D/f slopes represent time-independent absolute data and reflect the viscoelasticity on the membrane surface. The presence of lipid II changes the D/f slopes, confirming that lipid II has an impact on the membrane surface and affects peptide attachment. This indicates a highly viscous surface structure that is typically induced by molecular associations. According to the same authors, when contacting negatively charged membranes cationic peptides are able to extract lipids out of the membrane assembly, yielding micellar or vesicular associates. This effect is described as carpet mechanism by Shai [46].

Moreover, QCM could also be associated to dissipation monitoring (QCM-D), consisting in a piezoelectric technique that has been extensively employed to investigate the AMPs mode of action [47, 48]. McCubbin *et al.* [49] studied five AMPs of different charges, lengths and activities (caerin 1.1 wild-type, two caerin 1.1 mutants (Gly15Gly19-caerin 1.1 and Ala15Ala19-caerin 1.1), aurein 1.2 and oncocin) that are used as case studies. Caerin 1.1 is a natural wide-spectrum antibiotic from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*, that presents a higher activity against Gram-positive than towards Gram-negative bacteria [50], and also additional antiviral and anticancer properties [51]. In Gly15Gly19-caerin 1.1 and Ala15Ala19-caerin 1.1, the two proline residues were replaced with two glycines and two alanines, respectively. Aurein 1.2 is a natural short AMP secreted by the southern bell frog, *Litoria raniformis*, that shows both antibiotic and anticancer activity [52]. Oncocin (peptide 10) is a novel AMP based on the native *Oncopeltus* antibacterial peptide isolated from *Oncopeltus fasciatus* [53]. The interaction between the AMPs and a DMPC membrane was analyzed using frequency-dissipation (Δf - ΔD) plots to ascertain the AMP mechanism of action, when the authors [49] showed that the Δf - ΔD plot can be used to provide an AMP-membrane interaction fingerprint.

Some authors [54] have demonstrated a parallel QCM-D and EIS monitoring with a SiO₂ QCM crystal, and studied a bilayer formation and its interaction with an natural antibiotic produced by the soil bacterium *Bacillus brevis* named as gramicidin D, a linear pentadecapeptide. Gramicidin D is used to treat infections caused by certain Gram-positive bacteria and is a heterogeneous mixture of antibiotic compounds, gramicidins A, B and C [55, 56]. The aminoacid sequence of gramicidin D is HCO-L-Val-D-Ala-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH₂CH₂OH [57]. Briand *et al.* [54] showed that the membrane properties were altered depending on the toxin concentration. At higher concentrations, the QCM-D data showed dramatic changes in the membrane viscoelastic properties. In addition, QCM-D studies on the interaction of AMPs with lipid membranes emphasize the importance of including the dissipation factor in data analysis, revealing a highly hydrated film formation [58]. QCM-D has also been used to investigate the Tat (44-57) and Tat (49-57) mechanisms of action over bacterial-mimetic DMPC/DMPG membranes [47]. Tat is a natural multifarious peptide derived from the HIV-1 virus that exhibits antimicrobial activity. Piantavigna *et al.* [47] showed that the results reveal that both peptides could disrupt DMPC/DMPG membranes via a surface-active (carpet-like) mechanism. The disruption magnitude could be dependent on both membrane and peptide properties: less disruption was observed not only on enhanced negatively charged membranes, but also for the longer and slightly more hydrophobic Tat (44-57) peptide [47].

Nielsen and Otzen [58] studied the impact of an 18-residue cationic antimicrobial peptide novicidin on the structure and integrity of partially anionic lipid membranes using QCM-D. Novicidin is a synthetic antimicrobial peptide derived from ovipirin, a cationic peptide originated from the ovine cathelicidin SMAP-29 [59]. Novicidin belongs to a large group of linear cationic α -helical peptides, which also includes well-studied AMPs, such as cecropins, mellitin, magainin and LL37, among its members. This study provides information about a carpet mechanism of membrane disruption in which peptide binding first induces leakage at a critical surface concentration, probably through formation of transient pores or transient membrane integrity disruption, followed by more extensive membrane disintegration at higher P/L ratios.

Surface Plasmon Resonance Spectroscopy

The surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy is a powerful technique for characterization of (bio)materials, which allows real-time analysis of interactions without the use of specific bio-markers [60]. SPR is a quantum electromagnetic phenomenon arising from the interaction of light with free electrons at a metal-dielectric interface, which results in a charge-density oscillation propagating wave along the interface of two media with dielectric constants of opposite signs [61, 62] (Fig. 4).

SPR can also be used to study surface phenomena by monitoring the extent of the refractive index modifications due to changes in a metal surface [63]. The metal should display a free electron behavior and although the most suit-

able metals are silver, gold, copper and aluminum, the first two are the most commonly used elements [64].

SPR is a surface-sensitive technique where the ligand is immobilized onto a solid support and the solute is in solution. In this view, the binding event can be readily detected and analyzed [61]. The SPR phenomenon causes a modification in the reflected light intensity and these changes can be detected. The alterations in optical properties depend on several factors, such as metal layer thickness, light wavelength and, most importantly, the mass adsorbed on the surface of the sensor chip [25]. Most current SPR instruments operate using the Kretschmann configuration, which is based on the attenuated total reflection phenomenon [61]. This system relies on the condition of total internal reflection, which is based on the scattering of a fraction of the incident wave at the interface, resulting in an evanescent electromagnetic field (Fig. 4a). In addition, changes in the vicinity of the interface metal/environment promote a modification in the resonance conditions system that results in a shift in the SPR angle (Fig. 4b).

The relationship between the wave vector of the evanescent field (K_{ev}) and the angle of incidence of the light is given by

$$K_{ev} = w_0/c \cdot \eta_g \sin \theta \quad \text{Eq. 2}$$

where w_0 is the frequency of incident light, η_g the refractive index of the dense medium (glass), θ the angle of incidence of the light and c the speed of light in vacuum [63, 65]. The wave vector of a surface plasmon (K_{sp}) can be approximated as

$$K_{sp} = w_0/c \cdot (\epsilon_m \eta_s^2 / \epsilon_m + \eta_s^2)^{1/2} \quad \text{Eq. 3}$$

where ϵ_m is the dielectric constant of the metal film and η_s is the refractive index of the dielectric medium [63, 65].

At the instant that the wave vectors of the parallel component of the incident photon of light and of the propagation plasmons are equivalent, i.e., $K_{ev} = K_{sp}$ (Eqns. 2 and 3), there is a reduction in the reflectance due to the formation of the evanescent wave that propagates through the metal surface and interacts with the external environment [65]. These changes in resonance angle, which can be detected by a two-dimensional array of photodiodes or charge coupled detectors, make it possible to apply the phenomenon of SPR to monitor temporal changes in the sensor surface by tracking the resonance at an angle along the time [66]. At a critical angle of incidence, the surface plasmons are generated at the surface of the metal and the optical response changes are proportional to the amount of molecules bound to the surface [67, 68]. Small changes in the refractive index at the membrane interface can be detected for peptides as small as 500 Da [67, 68].

In spite of SPR system advantages for development of biosensors based on biomolecules, some problems seem to be associated to this technique. A SPR limitation is due to the rate of ligand density in the delivery of the analyte to the surface (mass transport). In this case, mass transport becomes the rate-limiting step and the measured association rate constant can be slower than the dissociation rate constant. In this situation, even though the surface density, the lateral distribution and mobility in the plane of the surface

greatly influence the effects of multivalent attachment and mass transport, their precise replication is not possible [69].

SPR has been extensively used to evaluate the mechanisms of membrane-peptide association towards different membrane systems though observation of the rate and amount of peptide adsorbing on and desorbing from immobilized lipid bilayers [12, 70]. SPR combine the ability to monitor the amount of adsorbed molecules continuously with high sensitivity, thus yielding valuable information of the peptide-lipid interaction kinetics and thermodynamics [71]. SPR has been also combined with EIS to study protein-lipid interaction by an incorporation of α -hemolysin into a lipid bilayer [72].

The binding process (BP) for peptide-membrane can be considered as a simple binding of peptides (P) to lipids (L) and the further insertion into the membranes with no additional interactions involved [13], as follows



Mozsolits and collaborators [13] proposed that the corresponding differential rate equation for this reaction model is

$$dR/dt = k_a \times [C_p] \times R_{max} - (k_a \times [C_p] + k_d) \times R \quad \text{Eq. 5}$$

where k_a and k_d are the association and dissociation rate constants, respectively, R_{max} is the maximum signal (proportional to the initial concentration of L), $[C_p]$ is the peptide concentration and R is the optical signal that is proportional to the amount of PL . Although it is also possible to consider the two-state reaction model (where the first step is the binding and the second step is the insertion of the peptide into the membrane) [13, 24] that corresponds to



In the second step, PL is changed to PL^* that cannot dissociate directly to $P + L$ and may correspond to a partial insertion of the peptide into the lipid membrane [13]. The initial binding may be governed mainly by electrostatic attractions of the ionic peptide to the polar lipid headgroup. Nevertheless, some exceptions could be observed as the derivative peptide Pa-MAP1, designed from original peptides from the Antarctic fish *Pleuronectes americanus* [4]. In this specific report, the initial binding is governed by hydrophobic interactions. In this view, the peptide insertion depends on the conformation of hydrocarbon chain structure and could be ruled by the hydrophobic/hydrophilic balance of the peptide-membrane association [27]. In addition, the corresponding differential rate equations for this reaction model are

$$dRU_1/dt = k_{a1} \times C_p \times (RU_{max} - RU_1 - RU_2) - k_{d1} \times RU_1 - k_{a2} \times RU_1 + k_{d2} \times RU_2 \quad \text{Eq. 7}$$

$$dRU_2/dt = k_{a2} \times RU_1 - k_{d2} \times RU_2 \quad \text{Eq. 8}$$

Here, RU_1 and RU_2 are the response units for the first and second steps, respectively, RU_{max} being the maximal response unit (i.e. the equilibrium binding response), and k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , and k_{d2} the association and dissociation rate constants for the first and second steps, respectively [24].

As reported for other amphipathic peptides [27, 73, 74], Pep-1 interacts with membranes in a fast process that can be

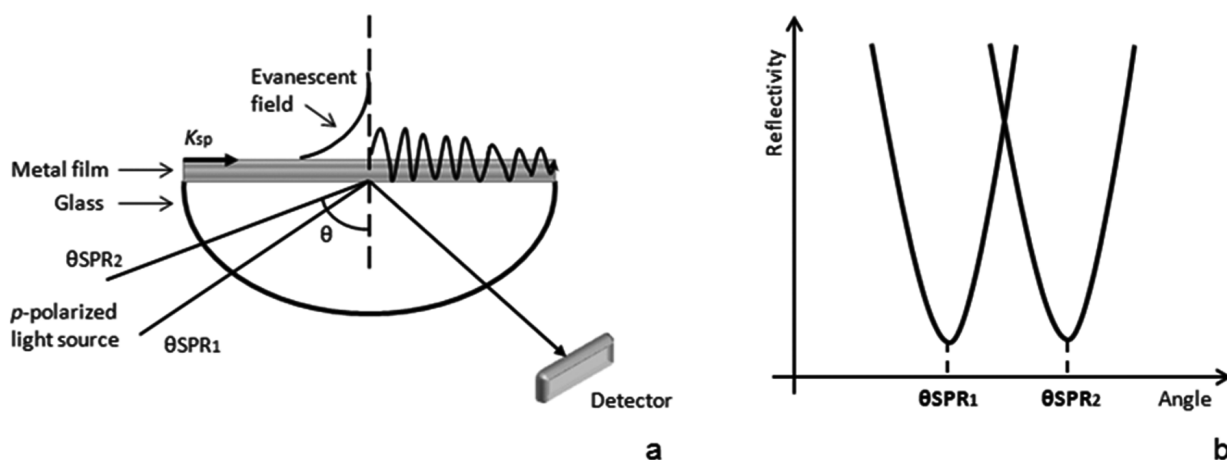


Fig. (4). SPR schematic representation. Formation of evanescent wave (a) and resonance angle shift (b) (Figure adapted from [65]).

described by a multistep model initiated by peptide adsorption, which is initially governed by electrostatic attractions and subsequently by peptide insertion in the hydrophobic membrane core [16]. Henriques and collaborators [16] proposed that the asymmetric properties of the cell membrane could promote the translocation and the cellular uptake of Pep-1. Low ionic strength and a more fluid phase facilitate the peptide insertion into the lipid bilayer. In addition, the dissociation from the membrane increased with the increment of temperature [16].

SPR has been also used to study the binding properties of a new class of immunomodulating peptides derived from the transmembrane region of the T cell antigen receptor on model membranes [75]. Also, they observed that the position of the charged amino acids in the sequence, the number of hydrophobic amino acids between the charged residues, and substitution of one or both basic amino acids by neutral ones may affect the binding process [75].

Mozsolits *et al.* [13] using SPR technique demonstrated that MagI preferentially interacted with negatively charged DMPG, while melittin interacted with both zwitterionic DMPC and anionic DMPG. Circular dichroism indicates that the helical content of both peptides was considerably higher in the presence of DMPG liposomes. This higher helical content is directly correlated with a higher lipid binding affinity, a fact that demonstrates that the formation of an α -helical structure seems to be an important requirement in the binding process, presumably due to the amphipathic nature of each peptide helix. Rex and Schwarz [76] using fluorescence spectroscopy analysis demonstrated that melittin forms pores in POPC vesicles. Otherwise, melittin causes a detergent-like release from POPG vesicles [77]. Circular dichroism experiments with melittin in oriented lipid multibilayers showed that melittin can adopt a transmembrane configuration in POPC multilayers [78].

Two complementary optical biosensors have been used to study quantitatively the interaction of two helical synthetic antimicrobial peptides (HPA3 and HPA3P) with planar supported lipid membranes [79]. Both peptides are analogues of Hp(2-20) derived from the N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 (RpL1). SPR analysis showed that the proline substitution in HPA3P decreased the affinity for both zwitterionic and anionic membranes. The binding of

HPA3 to each membrane was associated with a higher level of bond peptide, an enhanced membrane lipid disordering and a faster and higher degree of peptide insertion into the membrane. The higher value of RU_{max} of HPA3 obtained for both DMPC and DMPC/DMPG could be correlated with a clear hydrophobic surface exposure. At sufficiently high concentration, the peptides change their orientation by inserting vertically (or at an oblique angle) into the lipid bilayer, forming pores of either barrel stave or toroidal type [79].

Electrochemical Impedance Spectroscopy

The technique that allows measure the impedance as a function of the applied frequency is called electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The average potential of the working electrode is basically the equilibrium potential determined by the ratio of oxidized and reduced forms of the redox couple [80, 81]. The electrochemical measurements could be performed in three-electrode electrochemical cell, containing a work electrode (WE), a reference electrode (RE) and a counter electrode (CE) (Fig. 5). The faradaic impedance method, including EIS, affords high precision measurements and is frequently used for the evaluation of heterogeneous charge-transfer parameters and for studies of double-layer structure.

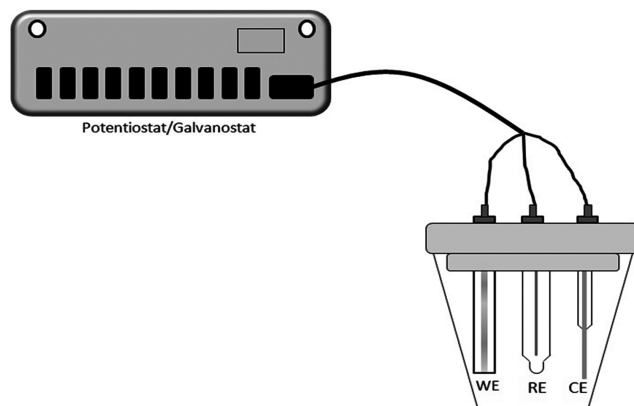


Fig. (5). A potentiostat/galvanostat (left) and a three-electrode electrochemical cell (right). WE = work electrode; RE = reference electrode; and, CE = counter electrode.

During the EIS measurements to analyze the peptide-lipid interaction, some artifacts can normally arise at high frequency. From EIS measurements, the high-frequency limit is related to the electrolyte resistance. According to Scully *et al.* [82], the major contribution to artifacts is often attributed to additional time constants associated with the reference electrode, limitations of the potentiostat, electrical leads and others. Artifacts can be also found at low-conductivity electrolytes to parasitic conduction paths within the electrochemical cell and measurement system [82].

EIS measurements virtually involve excitation signals, such as potential of sinusoidal component (E_{ac}) of very low amplitude depends essentially on the fact that current-overpotential relations are virtually linear at low overpotentials. For linear systems excitations at frequency (ω) provides a current (i) also of frequency ω . However, a nonlinear i - E relation gives a distorted response that is not purely sinusoidal [80].

For impedimetric experiments a small-amplitude perturbation in the form of a sinusoidal voltage is applied to the system of interest. Thus, the sinusoidally modulated voltage can be represented in the form

$$V = V_m \sin \omega t \quad \text{Eq. 9}$$

where ω is the frequency in radians s^{-1} ($\omega = 2\pi f$, where f is the frequency in Hz), V_m is the maximum (peak-to-peak) voltage, and V the voltage at any given instant. If this voltage appears across the terminals of the passive circuit, device, or system, the current flowing in the circuit may be related to the applied voltage, both by its magnitude and its phase angle (θ) (Fig. 6), in the form [83, 84]

$$i = i_m \sin(\omega t + \theta) \quad \text{Eq. 10}$$

The frequency and sinusoidal nature of the waveform are unchanged by interaction with the system, where the characteristics of the system are reflected in the ratio V_m/i_m and the value of θ .

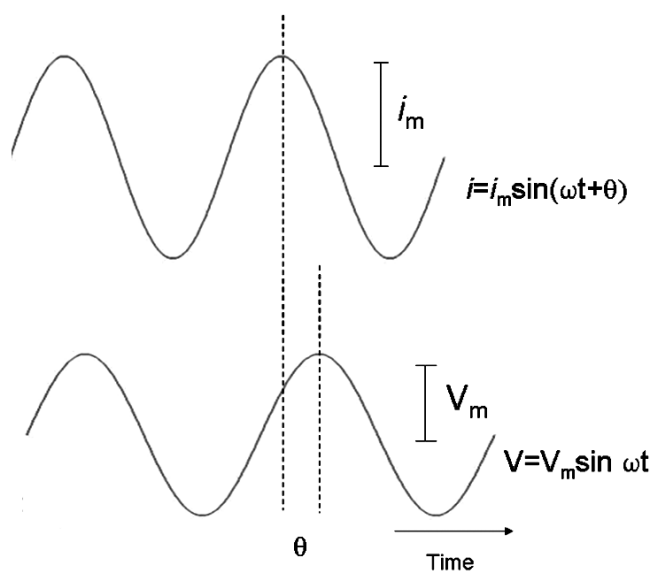


Fig. (6). The phase of the current differs from that of the voltage by an amount θ (Figure adapted from [105]).

In general two types of impedance measurements can be commonly observed, involving faradaic and non-faradaic processes. The charge transfer leads to both faradaic and nonfaradaic components. The faradaic component arises from the electron transfer via a reaction (a) across the interface, by overcoming an appropriate activation barrier – namely the polarization resistance of the electrode (R_{pe}) – along with the uncompensated solution resistance (R_s), i.e.,



The electric current is governed by the rates of processes among them, mass transfer (oxidized species from the bulk solution to the electrode surface), electron transfer at the electrode surface, chemical reactions preceding or following the electron transfer and other surface reactions, such as adsorption, desorption, or electrodeposition [83] (Fig. 7).

The nonfaradaic current results from charging the double-layer capacitor (C_{dl}). When the charge transfer takes place at the interface, the mass transports of the reactant and product take on roles in determining the rate of electron transfer, which depends on the consumption of the oxidized species and the production of the reduced species near the electrode surface [81].

It is worth to note that EIS is an useful technique that can be applied to monitor the integrity of lipid membranes in a stationary and real time mode, being very sensitive to small changes in membrane properties such as membrane thickness, membrane heterogeneity and ion permeation [12]. In addition, the characteristics of pore-forming peptides and proteins interacting with membranes can be assessed by EIS, since the resistance of lipid bilayers is known to be extremely sensitive to pore formation [85-87].

Chang and collaborators [88] demonstrated that electrical parameters (Fig. 8) can be used to describe the membrane impedimetric behavior, by adopting: (i) the values of the membrane resistance (R_m) as a measure of membrane leakiness, i.e. the degree of lipid order and the presence of ion channels or membrane defects, (ii) the exponent n as a measure of membrane homogeneity, and (iii) the membrane capacitance (C_m) as a measure of membrane thickness.

Some authors [88] applied electrochemical impedance spectroscopy as a new experimental approach to study surface-supported bilayer membranes for the monitoring changes in membrane properties, such as thickness, ion permeability, and homogeneity, after AMPs exposure. They showed that two cationic peptides very similar in sequence but different in activity, induce dramatically different changes in membrane properties, as probed by EIS. These two 26 residues long cationic peptides, sequentially identical except for five combinatorially variable sites at positions 4, 5, 7, 20 and 23, which were chosen from a library [89]. The first one was denominated as the potent pore-former (its sequence is RRGFSLKLALAKDGWALMLRLGYGRR, original library designation FSKRGY), and the second sequence was denominated as poor pore-former (RRGAGLGLALAKDGWALMLKLGFGR, original library designation AGGKGF) [89]. Chang *et al.* [88] showed that the addition of either FSKRGY or AGGKGF induces a significant decrease in R_m within 1 min of exposure to the bilayer. The final value for the R_m in the presence of

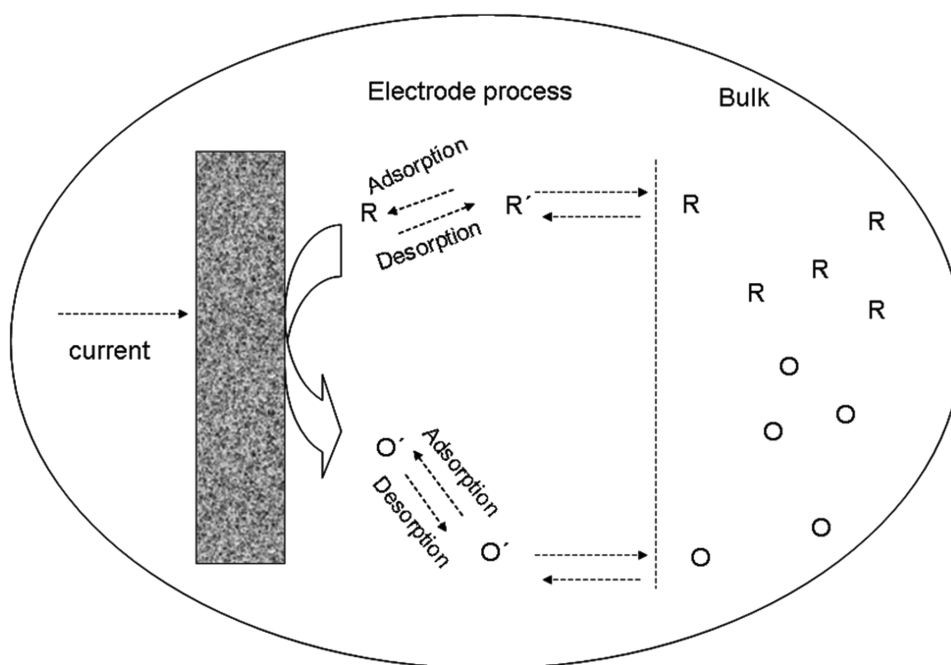


Fig. (7). Electrochemical process at the interface electrode-solution. R corresponds to the reduced species and O the oxidized species (Figure adapted from [80]).

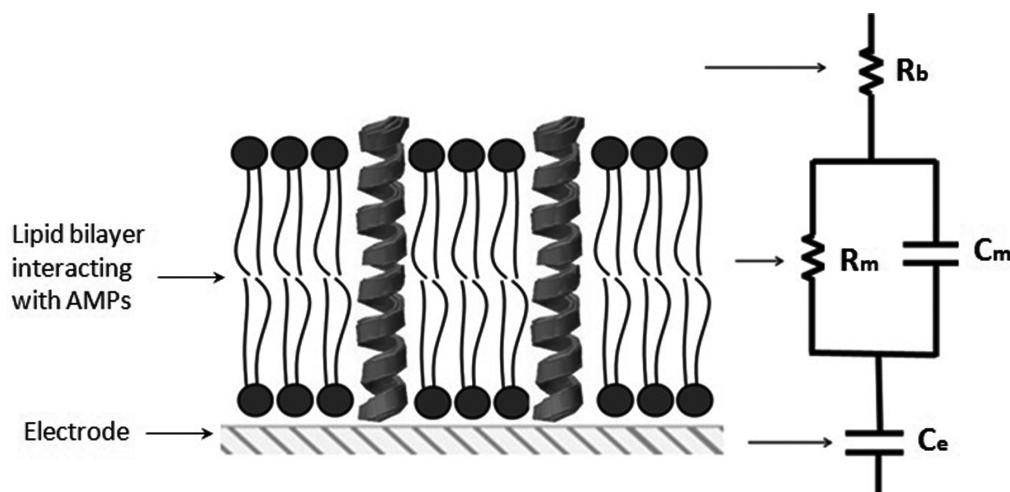


Fig. (8). A schematic representation of AMP-lipid interaction (left) and equivalent circuit (right) of the modified electrode. The element C_e corresponds to the capacitance of electrode-buffer interface, the elements in parallel correspond to resistance (R_m) and capacitance (C_m) of the membrane and the element in series corresponds to resistance (R_b) of the aqueous solution (buffer) (Figure adapted from [88]).

FSKRGY is $\sim 1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ and $R_m \sim 5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ in the presence of AGGKGF.

Recently, Sugihara *et al.* [87] simultaneously applied optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) and EIS measurements for the investigation of a supported lipid bilayer and its interactions with melittin, a pore-forming peptide. OWLS is a technique based on effective refractive index measurements of a thin layer above the waveguide [90]. Thus, OWLS is a highly sensitive technique that is capable of real-time monitoring of these (bio)interactions [91]. They observed that the increase of the electrical sensitivity occurred only after the optimization of the ITO coating on the waveguide. The combined system enabled the monitoring of melittin pore activities in a wider range of melittin concentrations than that of either technique alone ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

$1 < C_{\text{melittin}} < 200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Furthermore, it provided unique information that could not be obtained by the individual methods, such as a better identification of the melittin-pore formation and an insight about the correlation between the total pore areas vs. adsorbed melittin amount.

Furthermore, hanging mercury drop electrode (HMDE), an electrochemical method, is also a powerful tool for investigating interactions between AMPs and lipid monolayer [92]. Several studies have been performed to evaluate the interaction between AMPs such as gramicidin, a channel-forming peptide, and phospholipid monolayers [93, 94]. Ringstad *et al.* [92] have used mercury drop electrode to study the interaction between variants of the complement-derived antimicrobial peptide CNY21 (CNYITELRRQH ARASHLGLAR) and DOPC monolayers. The synthetic

AMPs used in that investigation were CNY21 (CNY-ITELRRQHARASHLGLAR), CNY21L (CNY-ITELRRQLARASLLGLAR), and CNY21K (CNY-ITELRRQKARASKLGLAR). They observed that increasing the peptide hydrophobicity by substituting the two histidine residues with leucine resulted in a deeper peptide penetration into the hydrophobic region of the DOPC monolayer, which was indicated by an increase in the dielectric constant (ϵ) of the lipid monolayer ($\Delta\epsilon = 2.0$). Otherwise, an increasing in the peptide net charge from +3 to +5 by replacing the histidines by lysines arrested the peptide in the lipid headgroup region.

Neville *et al.* [95] investigated the interaction of LL-37a cathelicidin peptide with phospholipid and lipid A monolayers on a MDE. LL-37 is a synthetic α -helical antimicrobial peptide of human origin containing 37 residues. Lipid A is a major lipopolysaccharides component isolated from the bacterial outer cell membrane [95]. The capacity-potential curves of the coated electrode in the presence and absence of LL-37 were measured using out-of-phase *ac* voltammetry. LL-37 shows a significant interaction with a lipid A monolayer, thereby decreasing the zero frequency capacitance by 30%. In other work [96], lipid monolayers were utilized at the air-aqueous interface to mimic bacterial or eukaryotic membranes and found that LL-37 readily inserts into phosphatidylglycerol (PG) and lipid A monolayers, significantly disrupting their structure. Conversely, EIS showed that the LL-37 rich PC monolayer remains an ideal capacitor, while LL-37 enriched lipid A capacitance decreases significantly, suggesting an increase in layer thickness as a result from peptide-lipid binding. Therefore, the EIS results imply that the phosphatidylcholine headgroup of the lipid does not interact with LL-37, whereas there is a clear interaction between LL-37 and lipid A.

Classes of membrane active peptides include membrane translocating peptides that can pass through membranes without destabilizing them and membrane permeabilizing peptides with antimicrobial activity, which include some of the best studied membrane active peptides [46, 97, 98]. Lin *et al.* [99] used EIS on polymer-cushioned supported lipid bilayers constructed on single crystal silicon to study two pairs of closely related membrane active peptides selected from rationally designed combinatorial libraries to have different activities in lipid bilayers: translocation, permeabilization, or no activity. They observed that binding of a membrane translocating peptide to the lipid bilayer resulted in a small decrease in membrane resistance, which was followed by a recovery back to the original value. The recovery may be directly attributable to peptide translocation. A nontranslocating peptide did not decrease the resistance. The other pair, composed by two membrane permeabilizing peptides, caused an exponential decrease of membrane resistance in a concentration-dependent manner. This permeabilization of the supported bilayer occurs even at peptide to lipid ratios 1000-fold lower than that needed to observe effects in vesicle leakage assays.

Recently, Nascimento *et al.* [12] immobilized MagI peptide on gold electrode via a self-assembling monolayer obtained from liposomes and liposomes covered by Synperonic (Synp). Synp is a strongly hydrophilic triblock copolymer of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene

oxide) (PEO-PPO-PEO) applied in drug delivery systems and in gene delivery [100]. In addition, Nascimento *et al.* [12] associated cyclic voltammetry (CV), EIS and SPR techniques to study the interaction of MagI with phospholipid layers (PLs). They showed that the electrostatic attraction between MagI and lipid membranes and the self-aggregation of MagI in the presence of membranes caused pore formation and resulted in marker ions crossing the supported lipid membrane layer and reaching the surface of the gold electrode. However, a parallel reaction model was proposed for the interaction of MagI and a hybrid silane-PL layer, resulting in a complex bimolecular interaction. Nascimento *et al.* [12] confirmed the toroidal pore model proposition for the AMP mode of action by using EIS.

CONCLUSIONS

SPR, QCM and EIS can be used as an useful tool to study peptide-membrane interaction since all of them can reveal important new details about AMP activity that are not accessible to other experimental techniques, thus advancing the research in the field of AMPs. In addition, those techniques can be used to distinguish the modes of action of peptides and to assess their potency in membrane destabilization. Thus, the information obtained by those techniques is particularly important for the continued detailed investigation of interactions at model membrane surfaces. These techniques can offer specific and low-cost methods capable to discriminate between the different modes of action of AMPs.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the support from the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES and INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica). J.M. Nascimento would like to thank CAPES for a PhD scholarship. Moreover, authors are also gratefully for CNPq (grant 310305/2012-8 and 310361/2012-5) and FACEPE financial support.

LIST OF ABBREVIATIONS

AMPs	=	Antimicrobial peptides
BP	=	Binding process
C_{dl}	=	Double-layer capacitor
CE	=	Counter electrode
Chol	=	Cholesterol
C_m	=	Membrane capacitance
[CP]	=	Peptide concentration
CPPs	=	Cell-penetrating peptides
CV	=	Cyclic voltammetry
DMPC	=	1,2-dimyristoyl-3-sn-phosphatidylcholine
DMPG	=	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt

DOPC	=	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
EIS	=	Electrochemical impedance spectroscopy
HMDE	=	Mercury drop electrode
L	=	Lipids
MagI	=	Magainin I
P/L	=	Peptide/lipid ratios
P	=	Peptides
PG	=	Phosphatidylglycerol
PLs	=	Phospholipid layers
POPC	=	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	=	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
QCM	=	Quartz crystal microbalance
QCM-D	=	QCM with dissipation monitoring
RE	=	Reference electrode
Rm	=	Membrane resistance
Rpe	=	Polarization resistance of the electrode
Rs	=	Solution resistance
SPR	=	Surface plasmon resonance
Synp	=	Synperonic
WE	=	Work electrode

REFERENCES

- Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolym.*, **1998**, *47*, 415-433.
- Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J.M.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Plant defense peptides. *Biopolym.*, **1998**, *47*, 479-491.
- Strandberg, E.; Tremouilhac, P.; Wadhwani, P.; Ulrich, A. S. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.*, **2009**, *1788*, 1667-1679.
- Migliolo, L.; Silva, O. N.; Silva, P. A.; Costa, M. P.; Costa, C. R.; Nolasco, D. O.; Barbosa, J. A.; Silva, M. R.; Bemquerer, M. P.; Lima, L. M.; Romanos, M. T.; Freitas, S. M.; Magalhaes, B. S.; Franco, O. L. Structural and Functional Characterization of a Multifunctional Alanine-Rich Peptide Analogue from *Pleuronectes americanus*. *PLoS One*, **2012**, *7* (e47047), 1-13.
- Silva, O. N.; Mulder, K. C.; Barbosa, A. E.; Otero-Gonzalez, A. J.; Lopez-Abarrategui, C.; Rezende, T. M.; Dias, S. C.; Franco, O. L. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front. Microbiol.*, **2011**, *2*, 232.
- Hallock, K. J.; Lee, D. -K.; Ramamoorthy, A. MSI-78, an Analogue of the Magainin Antimicrobial Peptides, Disrupts Lipid Bilayer Structure via Positive Curvature Strain. *Biophys. J.*, **2003**, *84*, 3052-3060.
- Maria-Neto, S.; Candido, E. D. S.; Rodrigues, D. R.; de Sousa, D. A.; da Silva, E. M.; de Moraes, L. M. P.; Otero-Gonzalez, A. D. J.; Magalhaes, B. S.; Dias, S.C.; Franco, O. L. Deciphering the magainin resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2012**, *56*, 1714-1724.
- Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolym.*, **1998**, *47*, 451-463.
- Mandal, S. M.; Dey, S.; Mandal, M.; Sarkar, S.; Maria-Neto, S.; Franco, O. L. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides*, **2009**, *30*, 633-637.
- Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore-forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1376*, 391-400.
- Khandelia, H.; Ipsen, J. H.; Mouritsen, O. G. The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.*, **2008**, *1778*, 1528-1536.
- Nascimento, J. M.; Franco, O. L.; Oliveira, M. D. L.; Andrade, C.A.S. Evaluation of magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem. Physics Lipids*, **2012**, *165*, 537-544.
- Mozsolits, H.; Wirth, H. J.; Werkmeister, J.; Aguilar, M. I. Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **2001**, *1512*, 64-76.
- Fernandes, F. C.; Rigden, D. J.; Franco, O. L. Prediction of antimicrobial peptides based on the adaptive neuro-fuzzy inference system application. *Peptide Sci.*, **2012**, *98*, 280-287.
- Torrent, M.; Pulido, D.; Nogués, M. V.; Boix, E. Exploring New Biological Functions of Amyloids: Bacteria Cell Agglutination Mediated by Host Protein Aggregation. *PLoS Pathog.*, **2012**, *8*, e1003005.
- Henriques, S. T.; Castanho, M. A. R. B.; Pattenden, L. K.; Aguilar, M. I. Fast Membrane Association Is a Crucial Factor in the Peptide Pep-1 Translocation Mechanism: A Kinetic Study Followed by Surface Plasmon Resonance. *Biopolym.*, **2010**, *94*, 314-322.
- Lindgren, M.; Hallbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, *21*, 99-103.
- Ziegler, A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 580-597.
- Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostinibazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**, *88*, 1864-1868.
- Loudet, A.; Han, J.Y.; Barhoumi, R.; Pellois, J.P.; Burghardt, R.C.; Burgess, K. Non-covalent delivery of proteins into mammalian cells. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 4516-4522.
- Morris, M.C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnol.*, **2001**, *19*, 1173-1176.
- Sharonov, A.; Hochstrasser, R.M. Single-molecule imaging of the association of the cell-penetrating peptide Pep-1 to model membranes. *Biochem.*, **2007**, *46*, 7963-7972.
- Ding, B.; Chen, Z. Molecular Interactions between Cell Penetrating Peptide Pep-1 and Model Cell Membranes. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 2545-2552.
- Papo, N.; Shai, Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: Differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochem.*, **2003**, *42*, 458-466.
- Hall, K.; Mozsolits, H.; Aguilar, M.I. Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide-membrane interactions: affinity & mechanism of action. *Lett. Peptide Sci.*, **2003**, *10*, 475-485.
- Zhang, L.J.; Rozek, A.; Hancock, R.E.W. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 35714-35722.
- Seelig, J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1666*, 40-50.
- Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, **2011**, *29*, 464-472.
- Rapaport, D.; Shai, Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 23769-23775.
- Wong-Baeza, C.; Hernandez-Pando, R.; Resendiz, A.; Tesucano, A.; Bustos, I.; Ibanez, M.; Wong, C.; Baeza, I. Molecular organization of the non-bilayer phospholipid arrangements that induce an autoimmune disease resembling human lupus in mice. *Mol. Membr. Biol.*, **2012**, *29*, 52-67.
- Höök, F.; Rudh, M. Quartz Crystal Microbalances (QCM) in biomacromolecular recognition. *Biotech. Inter.*, **2005**, *2*, 1-5.
- Bandey, H. L.; Martin, S. J.; Cernosek, R. W.; Hillman, A. R. Modeling the responses of thickness-shear mode resonators under various loading conditions. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 2205-2214.

- [33] Kannisto, K.; Murtomaki, L.; Viitala, T. An impedance QCM study on the partitioning of bioactive compounds in supported phospholipid bilayers. *Coll. Surf. B-Biointerf.*, **2011**, *86*, 298-304.
- [34] Chen, L. Y.; Cheng, C. W.; Lin, J. J.; Chen, W. Y. Exploring the effect of cholesterol in lipid bilayer membrane on the melittin penetration mechanism. *Anal. Biochem.*, **2007**, *367*, 49-55.
- [35] Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, **1959**, *155*, 206-222.
- [36] Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surface: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.*, **2003**, *85*, 3035-3047.
- [37] Mechler, A.; Praporski, S.; Atmuri, K.; Boland, M.; Separovic, F.; Martin, L. L. Specific and Selective Peptide-Membrane Interactions Revealed Using Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J.*, **2007**, *93*, 3907-3916.
- [38] Thyparambil, A. A.; Wei, Y.; Latour, R. A. Determination of peptide-surface adsorption free energy for material surfaces not conducive to SPR or QCM using AFM. *Langmuir*, **2012**, *28*, 5687-5694.
- [39] Ansorena, P.; Zuzuarregui, A.; Perez-Lorenzo, E.; Mujika, M.; Arana, S. Comparative analysis of QCM and SPR techniques for the optimization of immobilization sequences. *Sens. Actuators, B: Chem.*, **2011**, *155*, 667-672.
- [40] Kößlinger, C.; Uttenthaler, E.; Drost, S.; Aberl, F.; Wolf, H.; Brink, G.; Stanglmaier, A.; Sackmann, E. Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. *Sens. Actuators, B: Chem.*, **1995**, *24*, 107-112.
- [41] Zhou, T.; Marx, K. A.; Warren, M.; Schulze, H.; Braunhut, S. J. The Quartz Crystal Microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, *16*, 268-277.
- [42] Ogi, H.; Naga, H.; Fukunishi, Y.; Hirao, M.; Nishiyama, M. 170-MHz Electroless Quartz Crystal Microbalance biosensor: capability and limitation of higher frequency measurement. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 8068-8073.
- [43] Sherman, P. J.; Jackway, R. J.; Gehman, J. D.; Praporski, S.; McCubbin, G. A.; Mechler, A.; Martin, L. L.; Separovic, F.; Bowie, J. H. Solution structure and membrane interactions of the antimicrobial peptide fallaxidin4.1a: an NMR and QCM study. *Biochem.*, **2009**, *48*, 11892-11901.
- [44] Christ, K.; Wiedemann, I.; Bakowsky, U.; Sahl, H. G.; Bendas, G. The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **2007**, *1768*, 694-704.
- [45] Kaletta, C.; Entian, K.-D. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and post translational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, **1989**, *171*, 1597-1601.
- [46] Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **2002**, *66*, 236-248.
- [47] Piantavigna, S.; McCubbin, G. A.; Boehnke, S.; Graham, B.; Spiccia, L.; Martin, L. L. A mechanistic investigation of cell-penetrating Tat peptides with supported lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.*, **2011**, *1808*, 1811-1817.
- [48] Keller, C. A.; Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.*, **1998**, *75*, 1397-1402.
- [49] McCubbin, G. A.; Praporski, S.; Piantavigna, S.; Knappe, D.; Hoffmann, R.; Bowie, J. H.; Separovic, F.; Martin, L. L. QCM-D fingerprinting of membrane-active peptides. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, **2011**, *40*, 437-446.
- [50] Wong, H.; Bowie, J. H.; Carver, J. A. The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *247*, 545-557.
- [51] VanCompernelle, S. E.; Taylor, R. J.; Oswald-Richter, K.; Jiang, J.; Youree, B. E.; Bowie, J. H.; Tyler, M. J.; Conlon, J. M.; Wade, D.; Aiken, C.; Dermody, T. S.; Kewal Ramani, V. N.; Rollins-Smith, L. A.; Unutmaz, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *J. Virol.*, **2005**, *79*, 11598-11606.
- [52] Rozek, T.; Wegener, K. L.; Bowie, J. H.; Olver, I. N.; Carver, J. A.; Wallace, J. C.; Tyler, M. J. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 5330-5341.
- [53] Knappe, D.; Piantavigna, S.; Hansen, A.; Mechler, A.; Binas, A.; Nolte, O.; Martin, L. L.; Hoffmann, R. Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRRRIYNH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 5240-5247.
- [54] Briand, E.; Zäch, M.; Svedhem, S.; Kasemo, B.; Petronis, S. Combined QCM-D and EIS study of supported lipid bilayer formation and interaction with pore-forming peptides. *The Analyst*, **2009**, *135*, 343-350.
- [55] Bourinbaier, A. S.; Coleman, C. F. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 *in vitro*. *Arch. Virol.*, **1997**, *142*, 2225-2235.
- [56] Okoro, L. N. Effect of Gramicidin D on the compressibility and volume fluctuations of DPPC - peptide bilayers: a densitometry and sound velocimetry study. *Inter. J. Chem.*, **2011**, *3*, 166-175.
- [57] Chattopadhyay, A.; Rawat, S. S. Wavelength-selective fluorescence in ion channels formed by gramicidin A in membranes. *J. Chem. Sci.*, **2007**, *119*, 135-140.
- [58] Nielsen, S. B.; Otzen, D. E. Impact of the antimicrobial peptide Novicidin on membrane structure and integrity. *J. Coll. Interf. Sci.*, **2010**, *345*, 248-256.
- [59] Dorosz, J.; Gofman, Y.; Kolusheva, S.; Otzen, D.; Ben-Tal, N.; Nielsen, N. C.; Jelinek, R. Membrane interactions of Novicidin, a novel antimicrobial peptide: phosphatidylglycerol promotes bilayer insertion. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 11053-11060.
- [60] Oliveira, M. D. L.; de Melo, C. P.; Oliva, G.; Andrade, C. A. S. Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **2011**, *82*, 365-370.
- [61] Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; Faulin, T. E. S.; Hering, V. R.; Abdalla, D. S. P. Biosensors for detection of Low-Density Lipoprotein and its modified forms, in: P. A. Serra (Ed.), *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*. Biosensors for Health, Environment and Biosecurity, InTech, Croatia, **2011**.
- [62] Abdulhalim, I.; Zourob, M.; Lakhtakia, A. Surface Plasmon Resonance for Biosensing: A Mini-Review. *Electromagnetics*, **2008**, *28*, 214-242.
- [63] Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, **2000**, *21*, 1823-1835.
- [64] Carvalho, R. M.; Rath, S.; Kubota, L. T. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. *Química Nova*, **2006**, *26*, 97-104.
- [65] Damos, F. S.; Mendes, R. K.; Kubota, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. *Química Nova*, **2004**, *27*, 970-979.
- [66] Daghestani, H. N.; Day, B. W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors*, **2010**, *10*, 9630-9646.
- [67] Besenicar, M.; Macek, P.; Lakey, J. H.; Anderluh, G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids*, **2006**, *141*, 169-178.
- [68] Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Coll. Interf. Sci.*, **1991**, *143*, 513-526.
- [69] Schuck, P. Protein interactions: biophysical approaches for the study of complex reversible system, Springer, **2007**.
- [70] Fernandez, D. I.; Gehman, J. D.; Separovic, F. Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian frogs. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1788*, 1630-1638.
- [71] Huber, W.; Mueller, F. Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology. *Curr. Pharm. Design*, **2006**, *12*, 3999-4021.
- [72] Vockenroth, I. K.; Atanasova, P. P.; Jenkins, A. T.; Köper, I. Incorporation of alpha-hemolysin in different tethered bilayer lipid membrane architectures. *Langmuir*, **2007**, *24*, 496-502.
- [73] Lee, M. T.; Chen, F. Y.; Huang, H. W. Energetics of pore formation induced by antimicrobial peptides. *Biochem.*, **2004**, *43*, 3590-3599.
- [74] McParland, V. J.; Kad, N. M.; Kalverda, A. P.; Brown, A.; Kirwin-Jones, P.; Hunter, M. G.; Sunde, M.; Radford, S. E. Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation *in vitro*. *Biochem.*, **2000**, *39*, 8735-8746.

- [75] Bender, V.; Ali, M.; Amon, M.; Diefenbach, E.; Manolios, N. T. Cell Antigen Receptor Peptide-Lipid Membrane Interactions Using Surface Plasmon Resonance. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 54002-54007.
- [76] Rex, S.; Schwarz, G. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochem.*, **1998**, 37, 2336-2345.
- [77] Ladokhin, A. S.; White, S. H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1514, 253-260.
- [78] Vogel, H. Comparison of the conformations and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes. *Biochem.*, **1987**, 26, 4562-4572.
- [79] Lee, T. H.; Hall, K. N.; Swann, M. J.; Popplewell, J. F.; Unabia, S.; Park, Y.; Hahn, K. S.; Aguilar, M. I. The membrane insertion of helical antimicrobial peptides from the N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1798, 544-557.
- [80] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 2nd ed., Wiley, **2001**.
- [81] Macdonald, J. R. *Impedance Spectroscopy Emphasizing Solid Materials and Systems*, John Wiley and Sons, New York, **1987**.
- [82] Stewart, K. C.; Kolman, D. G.; Taylor, S. R. The effect of parasitic conduction pathways on EIS measurements in low conductivity media, in: Scully, J.R., Silverman, D.C. M.W. Kendig (Eds.), *Electrochemical impedance: analysis and interpretation*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, **1993**.
- [83] Barsoukov, E.; Macdonald, J. R. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*, John Wiley & Sons, **2005**.
- [84] Macdonald, J.R. Impedance spectroscopy. *Ann. Biomed. Engineer.*, **1992**, 20, 289-305.
- [85] Cornell, B. A.; Braach-Maksvytis, V. L.; King, L. G.; Osman, P. D.; Raguse, B.; Wiczorek, L.; Pace, R. J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, **1997**, 387, 580-583.
- [86] Vockenroth, I. K.; Fine, D.; Dodabalapur, A.; Jenkins, A. T. A.; Koper, I. Tethered bilayer lipid membranes with giga-ohm resistances. *Electrochem. Commun.*, **2008**, 10, 323-328.
- [87] Sugihara, K.; Delaia, M.; Szendro, I.; Guillaume-Gentil O.; Vörös, J.; Zambelli, T. Simultaneous OWLS and EIS monitoring of supported lipid bilayers with the pore forming peptide melittin. *Sens. Act. B*, **2012**, 161, 600-606.
- [88] Chang, W. K.; Wimley, W. C.; Searson, P. C.; Hristova, K.; Merzlyakov, M. Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.*, **2008**, 1778, 2430-2436.
- [89] Rausch, J. M.; Marks, J. R.; Wimley, W. C. Rational combinatorial design of pore-forming beta-sheet peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102, 10511-10515.
- [90] Hug, T. S.; Prenosil, J. E.; Morbidelli, M. Optical waveguide lightmode spectroscopy as a new method to study adhesion of anchorage-dependent cells as an indicator of metabolic state. *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 865-874.
- [91] Vörös, J.; Ramsden, J. J.; Csúcs, G.; Szendro, I.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D. Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials*, **2002**, 23, 3699-3710.
- [92] Ringstad, L.; Protopapa, E.; Lindholm-Sethson, B.; Schmidtchen, A.; Nelson, A.; Malmsten, M. An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono- and bilayers. *Langmuir*, **2008**, 24, 208-216.
- [93] Lindholm-Sethson, B.; Nystrom, J.; Geladi, P.; Nelson, A. Gramicidin A interaction at a dioleoylphosphatidylcholine monolayer on a mercury drop electrode. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375, 350-355.
- [94] Whitehouse, C.; Gidalevitz, D.; Cahuzac, M.; Koeppe, R. E.; Nelson, A. Interaction of gramicidin derivatives with phospholipid monolayers. *Langmuir*, **2004**, 20, 9291-9298.
- [95] Neville, F.; Gidalevitz, D.; Kale, G.; Nelson, A. Electrochemical screening of anti-microbial peptide LL-37 interaction with phospholipids. *Bioelectrochem.*, **2007**, 70, 205-213.
- [96] Neville, F.; Cahuzac, M.; Nelson, A.; Gidalevitz, D. The interaction of antimicrobial peptide LL-37 with artificial biomembranes: epifluorescence and impedance spectroscopy approach. *J. Phys.-Cond. Matter*, **2004**, 16, S2413-S2420.
- [97] Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **2002**, 415, 389-395.
- [98] Shai, Y. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Des.*, **2002**, 8, 715-725.
- [99] Lin, J.; Motylinski, J.; Krauson, A. J.; Wimley, W. C.; Searson, P. C.; Hristova, K. Interactions of membrane active peptides with planar supported bilayers: an impedance spectroscopy study. *Langmuir*, **2012**, 28, 6088-6096.
- [100] Fusco, S.; Borzacchiello, A.; Netti, P. A. Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications. *J. Bioactive Compat. Polym.*, **2006**, 21, 149-164.
- [101] Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Prates, M. V.; Cesar, A.; Almeida, F. C.; Mundim, N. C.; Valente, A. P.; Bemquerer, M. P.; Pilo-Veloso, D.; Bechinger, B. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides*, **2008**, 29, 1633-1644.
- [102] Terwilliger, T.C.; Eisenberg, D. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 6010.
- [103] Gesell, J.; Zasloff, M.; Opella, S. J. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J. Biomol. NMR*, **1997**, 9, 127-135.
- [104] Wang, G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 32637-32643.
- [105] Kell, D. B. The principles and potential of electrical admittance spectroscopy: an introduction, in: Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. (Eds.), *Biosensors: fundamentals and applications*, Oxford University Press, New York, **1987**.

8.3. Anexo 3

Artigo submetido à revista *Langmuir*

**Elucidation of mechanisms of interaction of a multifunctional peptide *Pa-map* with
lipid membranes**

**ELUCIDATION OF MECHANISMS OF INTERACTION OF A MULTIFUNCTIONAL
PEPTIDE *Pa*-MAP WITH LIPID MEMBRANES**

Jéssica M. Nascimento¹, Maria, D. L. Oliveira², Octávio L. Franco³,
Ludovico Migliolo³, Celso P. de Melo⁴, César A. S. Andrade^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE,
Brazil

³Centro de Análise Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Universidade Católica de Brasília,
Brasília-DF, Brazil

⁴Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

*Corresponding author: Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8576, e-mail:
csrandrade@gmail.com

Abstract

This work aims to investigate the possible mechanism of action of the homologue peptide *Pa*-MAP based on the Antarctic fish *Pleuronectes americanus*, through the study of models of phospholipid membranes by Electrical Impedance Spectroscopy (EIS). We also conducted a study evaluating the human peptide LL-37, which presents the mechanism of action described in the literature and similar to *Pa*-MAP, for comparison and validation of the data obtained by EIS. The results obtained indicate that *Pa*-MAP has enormous potential as a membrane-disrupting peptide and also suggest that the mechanism of action occurs by carpet model followed by detergent-like effect. The addition of either one of these peptides at different concentrations resulted in a drastic decrease in the membrane resistance after just 1 min of exposure. Additionally, it was seen that the peptides *Pa*-MAP and LL-37 may act in membranes with different charges, in an indication of a possible broad spectrum of antimicrobial activity. These interactions with different membrane compositions have been attributed to the peptides' structure, mainly due to the presence of many hydrophobic amino acid residues as observed by *in silico* studies. Here the *Pa*-MAP mechanism of action was described for the first time. Furthermore, data here reported demonstrate that EIS is a very sensitive technique that can be used for studies of peptide-membranes interaction and that can detect small changes on the surface of the electrode.

Keywords: *Pleuronectes americanus*, multifunctional peptides, antimicrobial, membranes, electrical impedance spectroscopy

1. Introduction

The indiscriminate use of antibiotics has been an important risk factor for emergence of resistance in microorganisms, and as a result intensive research is required for the development of novel antimicrobial agents ^{1,2}. In recent years, a large number of protein compounds – known as antimicrobial peptides – (AMPs) – has been isolated from numerous sources, such as bacteria, plants, insects, amphibians and mammals ³. In fact, since their discovery in the 1980s, AMPs have been heralded as a promising alternative to today's antibiotics ⁴. Most antibiotics have specific targets, including proteins and other macromolecules; AMPs have a different mechanism of action and usually attack microbial membranes, due to their hydrophobicity and, in some cases, cationic amphipathic structure, which allows the electrostatic attraction towards anionic lipids in the microorganisms' membranes to prevail, an initial step that is followed by pore formation in the membrane and leads to cell death ^{5,6}.

In spite of the fact that the discovery of new AMPs began with the identification of active peptides from natural sources, nowadays most research pursues the rational design of synthetic peptide analogues through structure-function studies ⁷. In general, the main physical features common to the AMPs are a cationic charge, which promotes selectivity for negatively charged microbial cytoplasmic membranes over zwitterionic mammalian membranes, and a significant proportion of hydrophobic residues that facilitate interactions with the fatty acyl chains ⁸. Additionally, the understanding of peptide-membrane interaction may contribute to discovery and rational design of new biopharmaceuticals with high efficiency in controlling pathogenic microorganisms.

Another class of peptides that has been studied, but with less intensity, is the antifreeze peptides (AFPs). These are found in organisms living in frozen environments, such as Arctic and Antarctic fishes, and inhibit ice crystal growth in their fluids ^{9,10}.

The family of type I AFPs has commonly been characterized from winter flounder (*Pleuronectes americanus*) via two peptides, which have low molecular masses named HPLC-6 (4000 Da) and HPLC-8 (3300 Da) ⁹. The *Pa*-MAP was designed and constructed from HPLC-8 ⁹. The theoretical *Pa*-MAP three-dimensional structure consists of an alanine-rich α -helix composed of 11 amino acids with two imperfect motif repetitions ($X_{10}T$, where X is any amino acid residue and T is threonine) ¹¹. Previous studies show that *Pa*-MAP was able to control multiple pathogens, including viruses, fungi and bacteria, but was incapable of causing any mammalian cell disruption ¹² showing a clear connection between the functional features of AMP and AFP.

Despite numerous studies on AMPs, there are still many questions to be answered about their mechanisms of action. Part of this lack of understanding occurs due to intrinsic limitations in experimental techniques used to decipher their molecular mechanisms ¹³. The most traditional technique used for the study of AMP membrane disorders consists of vesicle leakage assays,

which use fluorescent probes ¹⁴ to examine the escape of polar compounds through the vesicle lipid membranes, as a result of AMP action. However, this technique suffers from several limitations, as both the ability to detect disturbances in the membrane and the small size of the substances to be analyzed usually require the use of higher AMP concentrations. Thus, these trials in AMP action mechanisms commonly report only the decrease in the analyte concentration gradient and just state the cumulative AMP effects on the membrane structure, and do not account for fundamental membrane-molecular peptides interactions ¹³.

Another technique that has been extensively used to evaluate AMP mechanisms is solid-state Nuclear Magnetic Resonance (NMR), since it can provide biologically-relevant high-resolution insights into the peptide-induced modifications in the lipid membrane, such as peptide structure, dynamics, membrane orientation and insertion ^{15, 16}. However, solid-state NMR also has some limitations, since the experiments usually: a) demand a large quantity of samples; b) require freezing of the lipid bilayers containing AMPs, and this procedure may not only compromise the dynamic but also is not appropriate for addressing important biological questions; and, c) do not allow dynamic approaches at the atomic level over time ^{17, 18}. Thus, for the analyses of the minimum required concentrations of AMPs and to allow peptide dynamics measurements at various time scales at room temperature it is necessary to use high-sensitivity techniques based on new approaches.

As a manner to avoid some of the previously described limitations, electrical impedance spectroscopy could be used in the investigation of membrane-AMP interactions, since it is a very sensitive technique that allows the monitoring of even small changes on the surface of biological molecules, in real time ^{19, 20}. Impedance spectroscopy has been used to unravel AMPs' mechanisms of action, since it is a robust technique that allows not only the study of a wide variety of AMPs but also the analysis of other membrane-associated molecules (such as toxins, amyloid proteins, polymeric compounds) even when present in small quantities ^{13, 21}. These characteristics provide satisfactory results in real time monitoring of the effects of active peptides on lipid membranes, and generate direct measurements of bilayer resistance and capacitance ^{13, 21, 22}.

In summary, the present work helps to decipher the possible mechanism of action of *Pa*-MAP, a peptide analog derived from the Antarctic fish *Pleuronectes americanus*, by studying models of phospholipid membranes through Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) associated with molecular modeling, dynamics and docking studies, clearly providing important contributions to the understanding of the peptide/biological membrane interactions. Moreover, the types of cellular damage induced by *Pa*-MAP were also focused. All these data were further compared to those resulting from the use of human peptide cathelicidin LL-37, which has a broad antimicrobial activity and whose action mode is already known ²³⁻²⁵.

2. Experimental

2.1. Materials

The phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Solid-phase cathelicidin LL-37 with 95% purity, synthesized by the Fmoc technique, was purchased from China Peptides (Hong Kong, China). All chemicals and solvents were of analytical grade and they have been used as received, without further purification. All purified water used was obtained from a Milli-Q plus (Billerica, USA) system. Amino acid derivatives and other reagents for the solid-phase peptide synthesis were from Merck-Nova Biochem (Whitehouse Station, NJ), Peptides International (Louisville, KY) or Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 Solid-phase Peptide Synthesis

Pa-MAP was synthesized by the stepwise solid-phase method using the N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy with a Rink amide resin (0.52 mmol.g^{-1}). Side chain protecting groups were t-butyl for threonine and (triphenyl)methyl for histidine. Couplings were performed with 1,3-diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (DIC/HOBt) in N,N-dimethylformamide (DMF) for 60 to 120 min. Fmoc deprotections (15 min, twice) were performed with 4-methylpiperidine:DMF solution (1:4; by volume). Cleavage from the resin and deprotection of side chains were performed with trifluoroacetic acid (TFA): water:1,2-ethanedithiol (EDT): triisopropylsilane (TIS), 94.0:2.5:2.5:1.0, by volume, at 24 °C for 90 min. After this, the crude product was precipitated with cold diisopropyl ether, collected by filtration and solubilized in 200 mL aqueous acetonitrile at 50 % (by volume). The extracted peptide was twice freeze-dried for purification.

2.3 Peptide Purification

Pa-MAP was solubilized in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) aqueous solution and filtered with a Millex filter 0.22 mm 25 mm (Millipore-Merck, Billerica, MA). The crude extract was submitted to semi-preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), C18 NST, 5 mm, 250 mm and 610 mm, using the following mobile phase conditions: H₂O:ACN:TFA (95:05:0.1, v:v:v) for 5 min, then a linear gradient to H₂O:ACN:TFA (05:95:0.1, v:v:v) for 60 min at a flow rate of 2.5 mL.min^{-1} ²⁶. The experiments were conducted at room temperature and monitored at 216 nm. Fractions were manually collected and lyophilized. The synthetic peptide concentrations for all experiments reported here were determined by using the measurement of absorbance at 205, 215 and 225 nm, as described by Murphy and Kies²⁷.

2.4 Mass Spectrometry Analyses

Pa-MAP and LL-37 molecular masses and purity degree were determined by using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis on an UltraFlex III MALDI-ToF MS/MS (Bruker Daltonics, Billerica, USA). Purified peptide was dissolved in a minimum volume of water that was mixed with an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid saturated matrix solution (1:3, v:v), spotted onto a MALDI target plate and dried at room temperature for 5 min. The α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution was prepared at 50 mM in H₂O:ACN:TFA (50:50:0.3, v:v:v). Peptide monoisotopic mass was obtained in the reflector mode with external calibration, using the Peptide Calibration Standard II for mass spectrometry (up to 4,000 Da mass range, Bruker Daltonics, Billerica, MA).

2.5. Modification of Electrode

The phospholipid membranes were obtained by self-assembly on a stainless steel electrode using the dip-coating method (Tien and Ottova-Leitmannova, 2003). First, the electrode was immersed in a chloroform solution of DPPC (1 mg.mL⁻¹) and the measurements were performed at intervals of 5 min. After reaching the maximum time of deposition (30 min), the electrode containing the lipid membrane was immersed in a beaker containing 5 mL of *Pa*-MAP and LL-37 at two standard concentrations (10 and 100 μ g.mL⁻¹), and the electrical measurements were carried out also for each interval of 5 min. Before each lipid membrane deposition, an EIS measurement on a clean (unmodified) electrode was performed in deionized water, as a comparison reference to evaluate each subsequent modification step.

2.4. Electrical Measurements

Electrical impedance measurements were performed on a SI 1260 impedance analyzer (Solartron, UK), varying the frequency of 1Hz-1MHz. The dielectric measurements were performed under different potentials (0V, 0.5V and 1V) and amplitude of 100 mV. For determining the real (Z') and imaginary (Z'') parts of the impedance a system composed of two parallel stainless steel plates with dimensions of 64 $\times$ 21 mm at a distance of 10 mm was utilized. Electrode cleaning was performed in chloroform and subsequently immersed in deionized water in an ultrasonic bath. All experimental steps were performed at room temperature and repeated at least three times.

2.5. Scanning Electron Microscopy Measurements

The scanning electron microscopy (SEM) images were obtained using a JSM 5900 (JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV and a working distance of 5 μ m. Samples were prepared on glass slides and these were placed atop a SEM stub. After drying at

room temperature, a thin gold layer was deposited on top of it using a SCD 050 sputter coater (Bal-Tec, USA)²⁸.

2.6. Molecular Modeling of *Pa*-MAP

The three-dimensional model for *Pa*-MAP was constructed according to Migliolo and coworkers²⁹, by using the PDB structure 1jb5 as template. The theoretical three-dimensional peptide structure was constructed by Modeller v.9.8³⁰ using the template. The final model was chosen as the best one after evaluation using both PROSA II³¹ to analyze packing and solvent exposure characteristics and PROCHECK for additional analysis of the stereochemical quality. In addition, RMSD was calculated by overlap of C α traces and backbones onto the template structure with the program 3DSS³². The peptide structures were visualized and analyzed on Delano Scientific's PYMOL <http://pymol.sourceforge.net/>³³. The grand average of hydropathicity, known as GRAVY, was calculated using ProtParam software^{34,35}.

2.7. In Silico *Pa*-MAP Versus DPPC Membrane Interaction

All docking calculations were performed using AUTODOCK 4.2 program³⁶. Docking simulation of *Pa*-MAP was performed toward DPPC (64 lipids) membrane and 3864 water molecules³⁷. All water molecules were removed and hydrogen atoms were added using the Auto Dock Tool. Grid maps were calculated with 35 x 35 x 20 and 1.0 Å spacing centered on the membrane surface and allowing interaction with all head group exposes. A Lamarckian genetic algorithm was used as the search method to find the best peptide-membrane complex. Fifty docking runs were implemented totalizing 335 possible models for *Pa*-MAP versus DPPC membranes, where the maximum of freedom to the side chains was unlocked. The 335 generated structures were organized in a Box Plot to identify the greatest amount of interactions with lowest free energy, and the analysis showed tolerance of 4 Å, as recommended for blind docking³⁸. The program PyMol³⁹ <http://pymol.sourceforge.net/> was used to characterize peptide-membrane interactions. The statistical analyses were done through the R package for statistical computing (<http://www.r-project.org>).

3. Results

Electrochemical analysis of lipid-peptide interaction. Nyquist diagrams before and after modification with the electrode layer of DPPC and addition of peptides *Pa*-MAP and LL-37 at concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and at different potentials can be seen in Fig. 1. The phospholipid layer addition resulted in an increase in the semicircle diameter with respect to the electrode surface (Fig. 1a). With the addition of *Pa*-MAP, there was a sharp decrease in resistance, of approximately one order of magnitude due to the lipid layer destabilization caused

by the presence of the peptide. The difference in response between the two concentrations at diverse potentials of *Pa*-MAP shows that the peptide activity could be correlated to its concentration, with the maximum destabilization of the lipid membrane being observed when $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of peptide is present. The *Pa*-MAP dielectric response was also influenced by the applied potential, although it was not very significant, with a higher response to the more positive potential (Fig. 1b). LL-37 showed a lower response compared to *Pa*-MAP for all analyzed concentrations. However, the LL-37 activity had a clear correlation with the higher concentration, showing a decrease in the semicircle by about one order of magnitude for the concentration of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Regarding potential, LL-37 showed the highest response to more positive potentials, which is most apparent at a concentration of $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 1c).

The impedance data were fitted with the program EquivCRT⁴⁶, using the circuit shown in Fig. 2 – which includes the solution resistance (R_s), the membrane charge transfer resistance (R_m) and electrode (R_e), the double layer capacitance membrane (C_m) and electrode (C_e), as well the constant phase element (CPE). R_m modifications are much higher than in other parts of impedance, since this depends on the characteristic resistance of insulation at the interface electrode/solution. Thus, the R_m was chosen as the relevant signal from the sensor.

Fig. 3 shows the real-time measurements of the curve R_m versus time of action of *Pa*-MAP and LL-37. The addition of both peptides at different concentrations resulted in a drastic decrease in membrane resistance in the first minute of exposure, remaining constant until the end of time of permanency (50 min). It is noteworthy that a large variation in impedimetric response is not observed in relation to membrane resistance under different applied potentials. However, there is a greater response to more positive potential.

A summary of the results obtained before and after exposure of *Pa*-MAP and LL-37 is given in Table 1. All measurements were repeated at least three times and the results were the same nearly every time. These data demonstrate the efficiency of both peptides in membrane destabilization. At 0V potential, the values of R_m in the presence of *Pa*-MAP dropped from $7.37 \times 10^5 \Omega$ to $4.14 \times 10^4 \Omega$, at a concentration of $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and to $4.40 \times 10^3 \Omega$, at a concentration of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Otherwise, in the presence of LL-37 the values decreased to $1.91 \times 10^5 \Omega$, at a concentration of $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and $1.96 \times 10^4 \Omega$, at a concentration of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Thus, a more efficient action in disrupting membranes was observed for *Pa*-MAP, besides a dependence of action as a function of the concentration adopted for both peptides.

In relation to membrane homogeneity of the (n), the *Pa*-MAP and LL-37 activities induce a decrease in the n values (Table 1). However, it can be seen that after this reduction the n values remain constant after exposure to *Pa*-MAP. After exposure to the LL-37, in turn, there is a slight variation, indicating greater membrane heterogeneity in behavior when exposed to this peptide (Table 1).

The analysis of *Pa*-MAP and LL-37 activities was also evaluated by varying the relative R_{CT} (ΔR_{CT}), which was calculated from the following equation:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(m) - R_{CT}(pep)}{R_{CT}(m)} \times 100 \quad , \quad (1)$$

where $R_{CT}(m)$ is the resistance value of the charge transfer electrode modified by the membrane and $R_{CT}(pep)$ is the resistance value of the charge transfer electrode modified by the membrane after exposure to peptides (*Pa*-MAP or LL-37).

As previously noted, the ΔR_{CT} values were higher for *Pa*-MAP (around 94% for concentration $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 99% for $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) than those observed for LL-37 (approximately 75% concentration for $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 97% for $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Table 1).

In the Bode plot is possible to visualize that the presence of either *Pa*-MAP or LL-37 alters the electrical lipid membrane characteristics (Fig. 4). These differences are greater at higher concentrations, especially for *Pa*-MAP. However, varying the intensity of the applied potential did not lead to significant differences in behavior. In the medium-frequency region, a linear relationship can be observed between the impedance modulus and the logarithm of the frequency (Fig. 4). This frequency region corresponds to the capacitive behavior of the electrode/electrolyte interface.

Scanning electron microscopy (SEM). Fig. 5 shows the membrane surface before and after exposure to *Pa*-MAP and LL-37 by SEM. The layer of lipids appears as a homogeneous and flat smooth surface (Fig. 5a). After exposure to *Pa*-MAP and LL-37, the lipid membrane became quite heterogeneous, forming a "carpet" with some flaws (Fig. 5b and 5c).

Evaluation *in silico* of lipid-peptide interaction. The peptide was left close to the DPPC membrane, allowing random contact with all surfaces since *Pa*-MAP demonstrated affinity for the DPPC membrane by *in vitro* assays, as previously reported [Migliolo et al 2012]. These data were also corroborated by *in silico* studies comparing the output energy encountered in the well-defined cluster generated after data mining observed in DPPC membrane. The average value of the free energy observed for *Pa*-MAP toward the DPPC membrane was of (-3.1 ± 1.0) Kcal.mol⁻¹ as demonstrated in a Box plot (Fig. 6a).

The docking interaction analysis showed that *Pa*-MAP, which has high hydrophobicity (73%), appeared to be involved in interaction with the phospholipid carbons that compose the DPPC membrane (Fig. 6b and 6c). His¹ interacts with DPPC²⁶ through of O13 and O14 (oxygen head group) with distance of 3.38 and 2.87 Å (table inside Fig. 6C). In addition, it was also possible to detect two hydrophobic interactions between His¹ carbon of the imidazole ring (CD2 and CE1) attacking DPPC carbon (C3) with distances of 3.21 and 3.40 Å, respectively. Important interactions were also observed to occur between Leu¹² side chain carbon (CD1) and DPPC²⁴ carbon (C14) at a distance of 2.74 Å and a hydrogen bond between amino acid Asn¹⁴ nitrogen (ND2) with DPPC¹⁴ oxygen head group (O13) at a distance of 3.40 Å. Furthermore, a

hydrophobic link involving Ala¹⁴ carbon (CB) with DPPC²⁴ carbon (C14) was also observed on the membrane surface.

4. Discussion

Currently, several studies have been conducted in order to understand how the interaction of antimicrobial peptides with biomembranes takes place and to decipher their possible modes of action^{21, 22}. Several different mechanisms have been proposed to describe the AMPs' modes of action. Among these, four classical models are noteworthy: barrel-stave, toroidal-pore, carpet and detergent⁸. However, some authors consider the carpet model as an extension of the detergent model, i.e., at high peptide concentrations, surface-oriented peptides are thought to disrupt the bilayer in a detergent-like manner, eventually leading to the formation of micelles^{14, 40, 41}.

In practice, it does not seem possible to distinguish between these models, although all the mechanisms mentioned above have two common steps. The first is the electrostatic interaction between the cationic peptides and the anionic lipids present in microbial membranes, and this is followed by a second step that consists of peptide reorganization over the phospholipid bilayer that leads to pore formation and, consequently, to permeability increase, which suggests the occurrence of membrane destruction^{42, 43}.

EIS has been used in studies of peptide/membrane interaction, since this technique monitors the lipid membrane integrity in real time and is extremely sensitive to membrane property modifications, such as thickness, uniformity and ion permeability, and it has been successfully used in different studies to understand the AMPs' mechanisms of action^{13, 21}.

Faradaic impedance spectra obtained by EIS follow a behavior pattern that includes a semicircular portion observed at higher frequencies, corresponding to the transferring electrons process in the electrode-solution interface, followed by a linear lower frequency part assigned to mass transport limited by diffusion⁴⁴. The increased resistance observed in the Nyquist diagram after adding the phospholipid layer is a characteristic that can be associated with resistance load transfer, since addition of phospholipids on the electrode hinders the passage of electrons, increasing the resistance of the system. Already the sudden fall of resistance after addition of the Pa-MAP and LL-37 may be explained by the destabilization of the membrane caused by the peptides, thus allowing the passage of electrons on the electrode surface. Regarding the influence of applied potential on the response of the peptides, as was observed in this study, other studies have shown that the movement of ions from the interface of the monolayer can be influenced by external potentials. Boubour and Lennox⁴⁵ studied the ionic permeability in the self-assembled monolayers using impedance spectroscopy under different potentials in the absence of redox active species. Defects have been found in the lipid membranes that were caused by the applied potentials. During cathodic potentials, the energy required for migration

of ions through the membrane decreases, facilitating the transfer of electrons ⁴⁵. Therefore, such previous behavior can explain the responses obtained at more positive potentials for the peptides investigated, since the membrane at positive potentials shows low resistance to charge transfer.

The activity of AMPs is basically associated with charge and hydrophobicity properties. These two physicochemical characteristics, which are related to the selectivity of the peptides to membranes, facilitate the interaction with fatty acyl chains ⁸. The AMPs selectivity for microbial membranes and the absence of deleterious effects on membranes of mammals are important points to be highlighted in the use of these peptides in the pharmaceutical area. In general, AMPs are cationic and have high affinity for negatively charged lipids (a major component of bacterial membranes) ²⁰.

The results obtained from adjustments using the program EquivCRT demonstrate the efficient large of the *Pa*-MAP and LL-37 in destabilize membranes. For both peptides, the *R_m* fell sharply in the first minute of exposure. LL-37 is a 37-amino acid peptide, 16 of which are charged at physiological pH, 11 positive and 5 negative, resulting in a net charge of +6 [Sevcsik et al. 2007]. This peptide was shown to bind to and permeate effectively both zwitterionic and negatively charged phospholipid, a feature that distinguishes LL-37 from most other antimicrobial peptides, which act selectively on bacterial cells. This affinity for zwitterionic membranes suggests the occurrence of hydrophobic interactions between the peptide and the membranes [Johansson et al. 1999, Oren et al. 1999].

It is worth noting that, despite being neutrally charged, *Pa*-MAP showed higher activity against Gram-negative bacteria, as compared to Gram-positive bacteria ²⁹. As previously discussed, cationic residues may in most cases play an important role in the first step, due to electrostatic interaction. The importance of cationic residues has been proven in the last few years. Mutations of arginine and lysine residues can modify the total activity of AMPs, such as mellitin (a peptide from *Apis mellifera*), resulting in a greater effect on their toxicity to mammalian cells ⁴⁷. However, this feature seems not to be a determinant in the affinity of the *Pa*-MAP by membrane, since the corresponding hydrophobicity ratio seems to plays an essential role in the second step, pore forming ^{23, 48, 49}. The absence of these cationic residues in *Pa*-MAP shows that its activity is driven by hydrophobic interactions and this also explains their lack of toxicity to mammalian cells ²⁹. Therefore, this behavior may contribute to the higher response obtained for *Pa*-MAP as compared to LL-37, since this peptide has a higher hydrophobic ratio (73%) ²⁹.

The activity of the peptides on the membranes also appears to influence the membrane homogeneity (*n*). The fall in homogeneity should be attributed to disruptions caused by the presence of peptides. However, the constancy of *n* values after *Pa*-MAP action indicates that membranes exposed to this peptide tend to show more effective lipid reorganization than membranes exposed to LL-37.

The AMP activities here evaluated may affect both the capacitance and the resistance of the membranes. For an ideal membrane, no ion is transported across the bilayer (which presents infinite resistance) while the membrane behaves like a dielectric medium with charges accumulating on both sides. A finite membrane resistance determines the ion diffusion rate through the bilayer²¹. The capacitance of the membrane is given by

$$C_m = \frac{\varepsilon}{d} \quad (2)$$

where ε is the permittivity and d the membrane thickness. Therefore, the membrane instability caused by the interaction with the peptides results in an increased C_m and a decrease in R_m , as can be seen in Table 1.

Chang et al.²¹ conducted a study with two AMPs, where it was possible to distinguish the modifications in the peptides' modes of action-based parameters (resistance, capacitance and homogeneity of membrane) as perceived by EIS. If the peptides act by following a barrel-stave model, the resistance of the membrane drops and the thickness and homogeneity of the membrane are unaltered, as observed for melittin²¹. Otherwise, if the peptides act as prescribed by the toroidal pore model, the membrane also becomes permeable (R_m decreases) and the membrane thickness in the pore regions decreases, resulting in a slight decrease in its homogeneity. According to this model, the toroidal pores act as gates for the peptides' passage across the membrane. Thus, the pore formation may be transient, disintegrating over time as the concentration of the peptides on both sides of the membrane is balanced. This leads to an increase in membrane resistance as observed for magainin²¹.

For peptides that act by the carpet model, the membrane homogeneity decreases, while the resistance can decrease (in the case of peptides that introduce a disorder in lipids) or increased (if the peptides cause an ordering of lipids). It is worth noting that peptides that act by this model can induce a detergent effect. These peptides in high concentrations can disrupt the membrane, resulting in a huge reduction (or even complete disappearance) of membrane resistance. However, the membrane can still provide an electrochemical barrier, where affected regions are repaired by redistributing lipids and/or peptides by lateral diffusion from the intact regions. Thus, the uniformity decreases due to the existence of intact and repaired disrupted regions²¹. This model is consistent with the observed data for the peptides here described, confirming the work described above, which indicated the carpet model as a mechanism of action for LL-37^{23, 50} and suggesting this same mechanism for *Pa*-MAP. The presence of both peptides caused a destabilization of the membrane in the first minutes of exposure, and subsequently these changes are locally repaired, providing a measurable resistance.

The evaluation of *in silico* interaction *Pa*-MAP-DPPC allowed complement the results obtained for electrochemical analysis, in addition to improving the understanding of the possible mechanism of action of *Pa*-MAP. The output energy observed in previous similar studies for

two cyclic peptides, named amp-1 and amp-2, toward Gram-negative and –positive membranes were reported with -6.4 and -5.8 Kcal.mol⁻¹ and -5.7 and -7.5 Kcal.mol⁻¹, respectively⁵¹. The *in silico* data here obtained (-3.1 Kcal.mol⁻¹) suggested that *Pa*-MAP presents a lower affinity for DPPC when compared with the free energy observed for amp-1 and amp-2. The *in silico* data corroborated the *in vitro* data [Migliolo et al. 2012], indicating that *Pa*-MAP has activity (MIC 30 µM) in higher concentration due to the absence of charged amino acid residues when compared, for example, with the pleurocidin from *Pleuronectes americanus* and pardaxin isolated from *Pardachirus marmoratus*^{52, 53}, which presented MIC values of 3.5 and 3.0 µM, respectively.

The docking interaction analysis allowed observing that the interaction between *Pa*-MAP and membrane involved a mix of electrostatic and mainly hydrophobic interaction guided by Leu¹² and Ala¹⁶ amino acid residues. His¹, Asn¹⁶ and amidated C-termini are *Pa*-MAP amino acid residues that may be involved with anchorage in membrane. The interaction might first be guided through hydrogen bonds. After that, the presence of *Pa*-MAP at higher concentrations could lead to pore formation due to the presence of hydrophobic amino acid residues that could bind to membrane by van der Waals forces. These data corroborate impedance data obtained (Fig. 3 and 4), in which some time is necessary to cause membrane, besides explaining the formation of a "carpet" as observed in Fig. 5.

4. Conclusions

Our results demonstrated that the peptide *Pa*-MAP has enormous potential to destabilize membranes, an observation that may explain its observed *in vitro* antimicrobial activity²⁹. The responses obtained through EIS for LL-37 showed that this peptide followed a carpet model mode of action, confirming what has been previously described^{23, 50}. For *Pa*-MAP, the data suggest that the mechanism of action of *Pa*-MAP is also that of a patterned carpet, with a detergent effect arising at the concentrations range used in this study. Additionally, the destabilization occurred in the first minute of exposure for both peptides, while the destruction of the membrane occurs locally and can be repaired by redistributing lipids/peptides or by the lateral diffusion of the lipids from the intact regions. Finally, the potential-independent activity of *Pa*-MAP suggests that the peptide can act on a wide range of pathogenic microorganisms (membranes with anionic, cationic and zwitterionic molecules), in agreement with previous *in vitro* results²⁹.

Acknowledgements

The authors are grateful for support from the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES and INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica). J.M.

Nascimento would like to thank CAPES for a PhD scholarship. Moreover, authors are also grateful for financial support from CNPq (grant 310305/2012-8 and 310361/2012-5), CAPES, FAPDF and FACEPE.

Figure captions

Figure 1. Nyquist diagrams after different modification steps: clean electrode and after deposition of the membrane of DPPC (a), lipid layer after the addition of peptides *Pa*-MAP (b) and LL-37 (c) at different concentrations (the filled squares represent the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ and the open squares 100 $\mu\text{g/mL}$) and potentials (in black 0V potential, in red, 0.5 V and in green, 1V).

Figure 2. A schematic representation of electrode modified by lipid layer (left) and its equivalent circuit (right). The elements R_s and C_m correspond to the solution resistance and double layer capacitance membrane, respectively. The elements in series R_m and CPE correspond to the membrane resistance and the constant phase element, and the elements in parallel C_e and R_e correspond to electrode double layer capacitance and resistance.

Figure 3. Membrane resistance *versus* time at different potentials (in black 0V potential, in red, 0.5 V and in green, 1V). In (a, b) the concentration used was 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (filled squares) and (c, d), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (open squares). *Pa*-MAP and LL-37 were added in the 30th minute.

Figure 4. Bode plot of the lipid membrane-modified electrode before (a) and after addition of *Pa*-MAP (b) and LL-37 (c) at different concentrations (the filled squares represent the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ and the open squares 100 $\mu\text{g/mL}$) and potentials (in black 0V potential, in red, 0.5 V and in green, 1V).

Figure 5. SEM images layer DPPC before (a) and after exposure of *Pa*-MAP (b) and LL-37 (c).

Figure 6. *Pa*-MAP *in silico* docking analysis with DPPC membrane (A) Box plot of 335 interaction models ranked according to free energy. (B) Side visualization of *Pa*-MAP forward DPPC membrane showing the peptide insertion and (C) zoom visualization showing peptide interaction, with detailed interaction being showed in the inner table with lipid and amino acid position and their respective atom names and interaction length.

Table 1. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Sample	Peptide concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exposure Time (min)	R_{CT} (Ω)	Cdl (F)	n	ΔR_{CT} (%)
Clean electrode	-		5.81×10^5	1.31×10^{-11}	-	-
<i>Pa-MAP</i>	10	1	4.27×10^4	1.32×10^{-11}	0.78	94.21
<i>Pa-MAP</i>	10	25	4.19×10^4	1.31×10^{-11}	0.78	94.31
<i>Pa-MAP</i>	10	50	4.14×10^4	1.27×10^{-11}	0.78	94.38
<i>Pa-MAP</i>	100	1	3.12×10^3	1.36×10^{-10}	0.81	99.58
<i>Pa-MAP</i>	100	25	3.49×10^3	1.06×10^{-10}	0.81	99.53
<i>Pa-MAP</i>	100	50	4.40×10^3	9.13×10^{-11}	0.81	99.40
LL-37	10	1	1.74×10^5	1.01×10^{-11}	0.79	76.39
LL-37	10	25	1.91×10^5	1.05×10^{-11}	0.78	74.08
LL-37	10	50	1.91×10^5	1.05×10^{-11}	0.76	74.08
LL-37	100	1	1.91×10^4	1.15×10^{-11}	0.77	97.41
LL-37	100	25	1.95×10^4	1.16×10^{-11}	0.78	97.35
LL-37	100	50	1.96×10^4	1.16×10^{-11}	0.78	97.39

References

1. Mandal, S.M. et al. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides* **30**, 633-637 (2009).
2. Vaara, M. New approaches in peptide antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 571-576 (2009).
3. Strandberg, E., Tremouilhac, P., Wadhwani, P. & Ulrich, A.S. Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 1667-1679 (2009).
4. Hancock, R.E. & Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551-1557 (2006).
5. Hall, K., Mozsolits, H. & Aguilar, M.I. Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide-membrane interactions: affinity & mechanism of action. *Lett. Pept. Sci.* **10**, 475-485 (2003).
6. Zhang, L.J., Rozek, A. & Hancock, R.E.W. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 35714-35722 (2001).
7. Nguyen, L.T., Haney, E.F. & Vogel, H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464-472 (2011).
8. Lohner, K. in *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies*. (ed. K. Lohner) 149-165 (Horizon Scientific Press, 2001).
9. Gong, Z., Ewart, K.V., Hu, Z., Fletcher, G.L. & Hew, C.L. Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. *J. Biol. Chem.* **271**, 4106-4112 (1996).
10. Kuiper, M.J., Fecondo, J.V. & Wong, M.G. Rational design of alpha-helical antifreeze peptides. *J. Pept. Res.* **59**, 1-8 (2002).
11. Hew, C.L., Joshi, S., Wang, N.C., Kao, M.H. & Ananthanarayanan, V.S. Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **151**, 167-172 (1985).
12. Tomczak, M.M. et al. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys. J.* **82**, 874-881 (2002).
13. Lin, J. et al. Interactions of Membrane Active Peptides with Planar Supported Bilayers: An Impedance Spectroscopy Study. *Langmuir* **28**, 6088-6096 (2012).
14. Ladokhin, A.S. & White, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**, 253-260 (2001).
15. Wildman, K.A.H., Lee, D.K. & Ramamoorthy, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **42**, 6545-6558 (2003).
16. Porcelli, F. et al. NMR Structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry* **47**, 5565-5572 (2008).
17. Fujiwara, T. & Ramamoorthy, A. How far can the sensitivity of NMR be increased? *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **58**, 155-175 (2006).
18. Ramamoorthy, A. Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: Dynamical images at atomic resolution and functional insights. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **35**, 201-207 (2009).
19. da Silva, G.J.L., Andrade, C.A.S., Oliveira, I.S., de Melo, C.P. & Oliveira, M.D.L. Impedimetric sensor for toxigenic *penicillium sclerotigenum* detection in yam based on Fe₃O₄-Poly(allylamine hydrochloride) composite. *J. Colloid Interface Sci.* **396**, 258-263 (2013).
20. Oliveira, M.D.L., Franco, O.L., Nascimento, J.M., de Melo, C.P. & Andrade, C.A.S. Mechanistic aspects of peptide-membrane interactions determined by optical, dielectric and piezoelectric techniques: an overview. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2013).
21. Chang, W.K., Wimley, W.C., Searson, P.C., Hristova, K. & Merzlyakov, M. Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 2430-2436 (2008).

22. Nascimento, J.M., Franco, O.L., Oliveira, M.D.L. & Andrade, C.A.S. Evaluation of magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 537-544 (2012).
23. Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B. & Shai, Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell selective activity. *Biochem. J.* **341**, 501-513 (1999).
24. Neville, F. et al. Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys. J.* **90**, 1275-1287 (2006).
25. Sevcsik, E., Pabst, G., Jilek, A. & Lohner, K. How lipids influence the mode of action of membrane-active peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** 2586-2595 (2007).
26. Borenfreund, E. & Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119-124 (1985).
27. Murphy, J. & Kies, M. Note on the spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 382-384 (1960).
28. de Oliveira, H.P., Andrade, C.A.S. & de Melo, C.P. Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant-magnetite-polypyrrole particles. *J. Coll. Interf. Sci.* **319**, 441-449 (2008).
29. Migliolo, L. et al. Structural and Functional Characterization of a Multifunctional Alanine-Rich Peptide Analogue from *Pleuronectes americanus*. *Plos one* **7**, e47047 (2012).
30. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **2** (2007).
31. Wiederstein, M. & Sippl, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, W407-W410 (2007).
32. Sumathi, K., Ananthalakshmi, P., Roshan, M.N. & Sekar, K. 3dSS: 3D structural superposition. *Nucleic Acids Res.* **34**, W128-W132 (2006).
33. DeLano, W. The PyMOL molecular graphics system. (2002).
34. Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. & Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32** (2004).
35. Wilkins, M.R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **112**, 531-552 (1999).
36. Morris, G.M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chem.* **16**, 2785-2791 (2009).
37. Marrink, S.J., Berger, O., Tieleman, D.P. & Jaehnig, F. Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **74**, 931-943 (1998).
38. Jitonnorn, J., Lomthaisong, K. & Lee, V.S. Computational design of peptide inhibitor based on modifications of proregion from *Plutella xylostella* midgut trypsin. *Chem. Biol. Drug Des.* **79**, 583-593 (2012).
39. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. *Version 1.3r1*, Schrodinger, LLC, New York. (2010).
40. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 55-70 (1999).
41. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238-250 (2005).
42. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236-248 (2002).
43. Sato, H. & Feix, J.B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1245-1256 (2006).
44. Macdonald, J.R. Impedance Spectroscopy. *Ann. Biomed. Engineer.* **20**, 289-305 (1992).

45. Boubour, E. & Lennox, R.B. Potential-Induced Defects in n-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers Monitored by Impedance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **104**, 9004-9010 (2000).
46. Boukamp, B.A. A package for impedance/admittance data analysis. *Solid State Ionics* **18**, 136-140 (1986).
47. Werkmeister, J.A., Kirkpatrick, A., McKenzie, J.A. & Rivett, D.E. The effect of sequence variations and structure on the cytolytic activity of melittin peptides *Biochim. Biophys. Acta* **1157**, 50-54 (1993).
48. Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D. & Agerberth, B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* **273**, 3718-3724 (1998).
49. Wang, W., Smith, D.K., Moulding, K. & Chen, H.M. The Dependence of Membrane Permeability by the Antibacterial Peptide Cecropin B and Its Analogs, CB-1 and CB-3, on Liposomes of Different Composition. *J. Biol. Chem.* **273**, 27438-27448 (1998).
50. Henzler-Wildman, K.A., Martinez, G.V., Brown, M.F. & Ramamoorthy, A. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* **43**, 8459-8469 (2004).
51. Mandal, S.M., L., M. & Franco, O.L. The use of MALDI-TOF-MS and in silico studies for determination of antimicrobial peptides' affinity to bacterial cells. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **23**, 1939-1948 (2012).
52. Primor, N. & Tu, A.T. Conformation of pardaxin, the toxin of the flatfish *Pardachirus marmoratus*. *Biochim. Biophys. Acta* **626**, 299-306 (1980).
53. Mason, A.J., Chotimah, I.N., Bertani, P. & Bechinger, B. A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide pleurocidin. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 185-194 (2006).

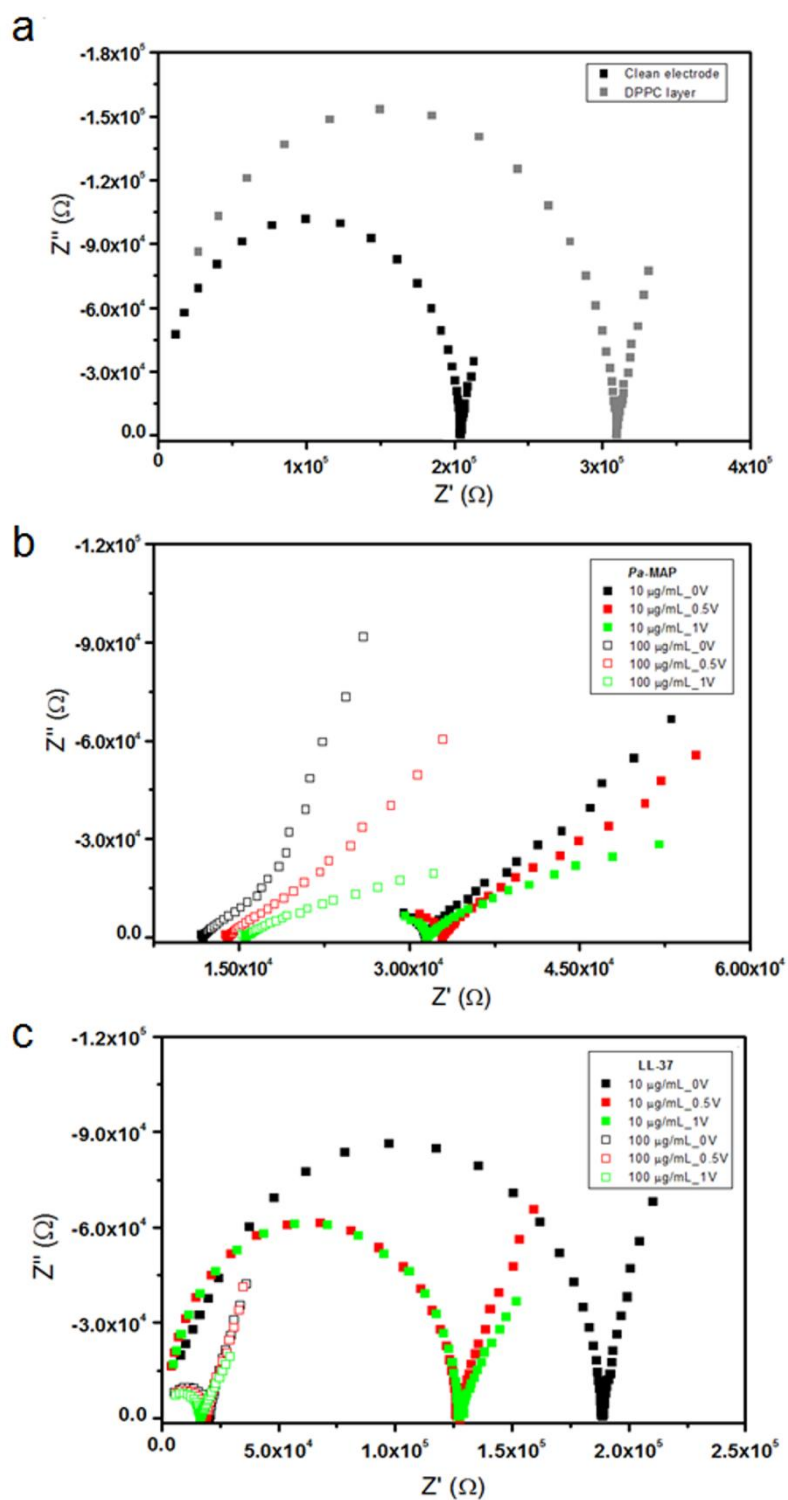
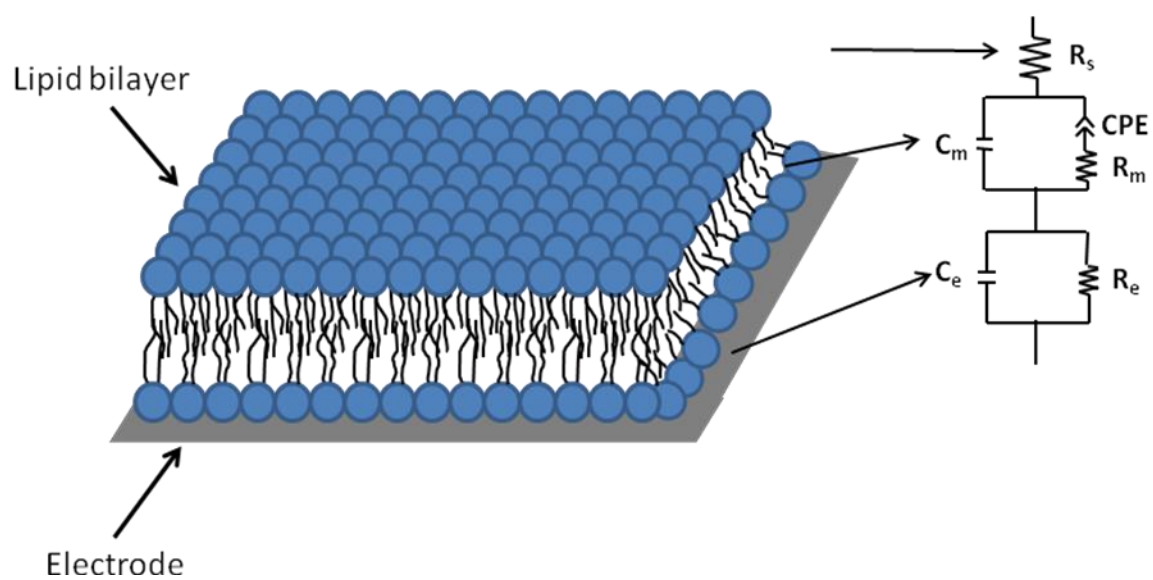


Figure 1

**Figure 2**

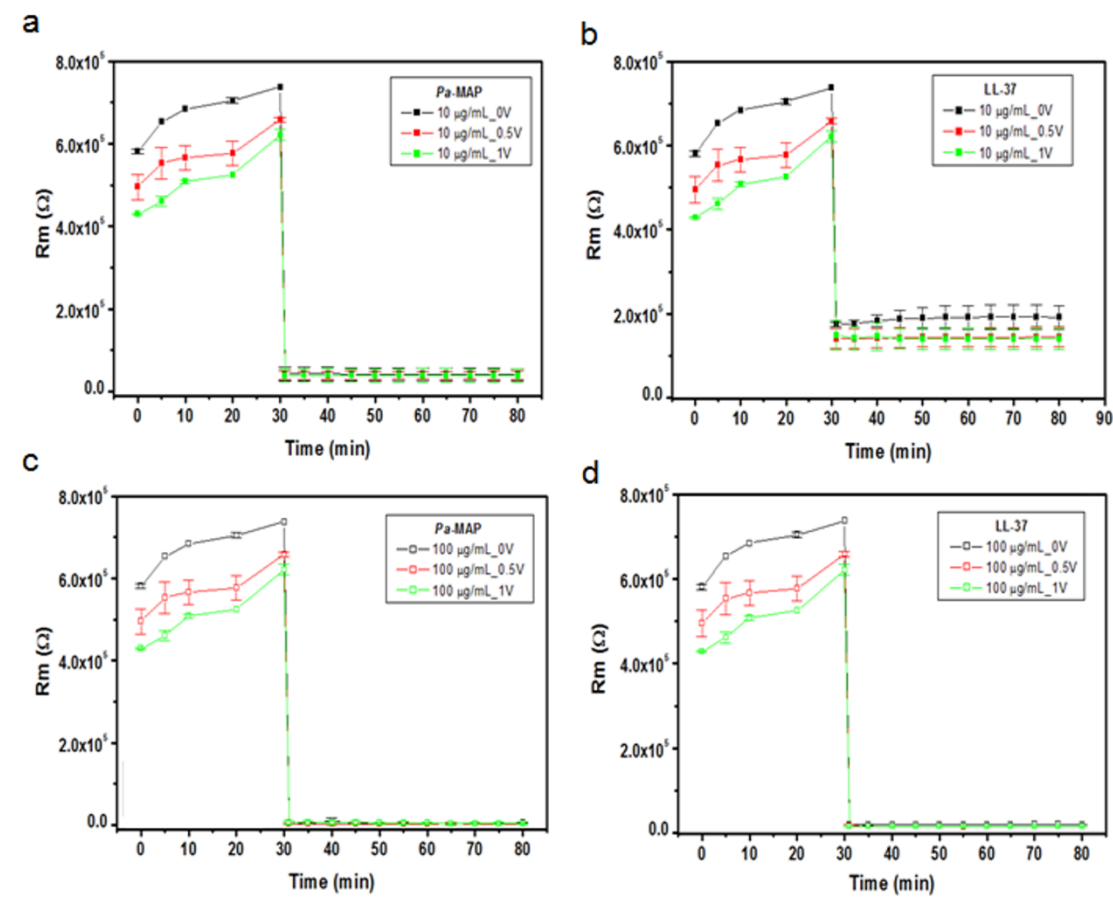


Figure 3

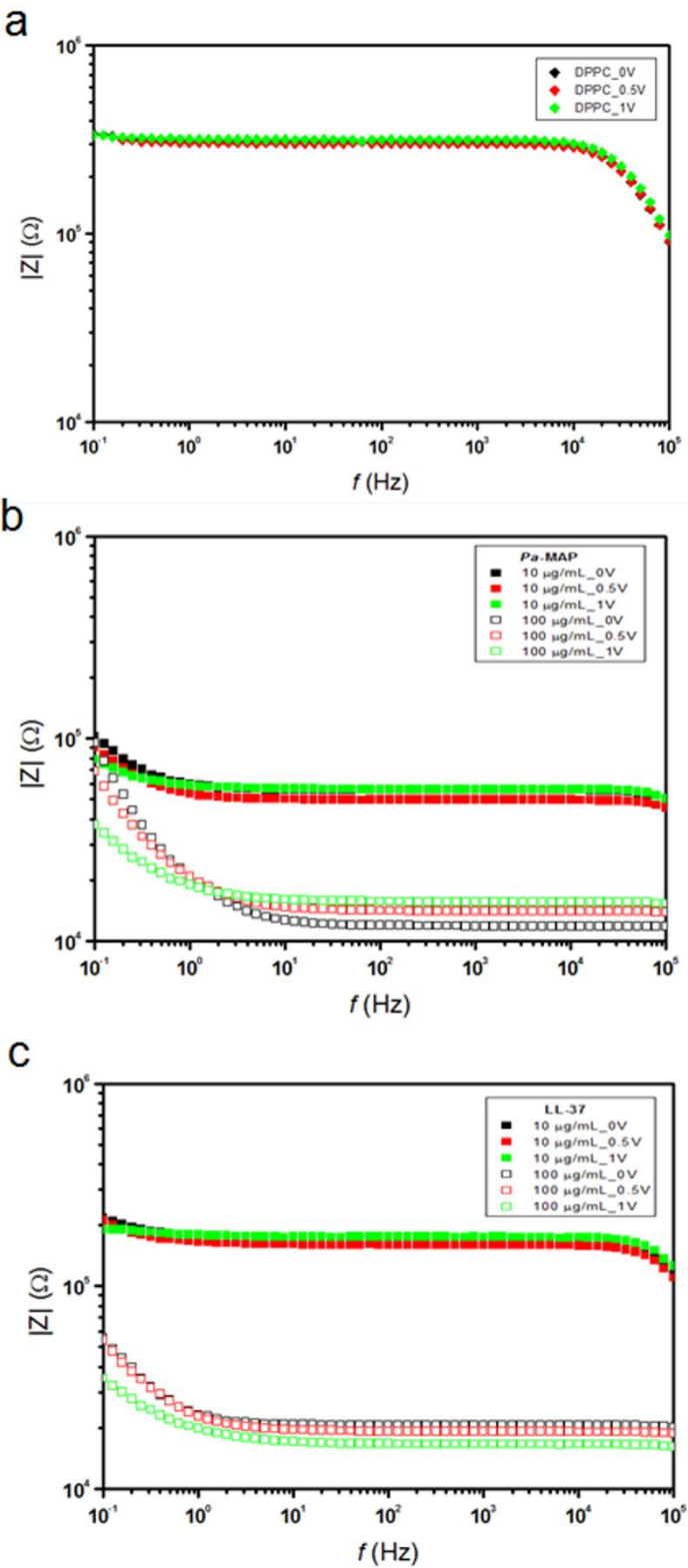
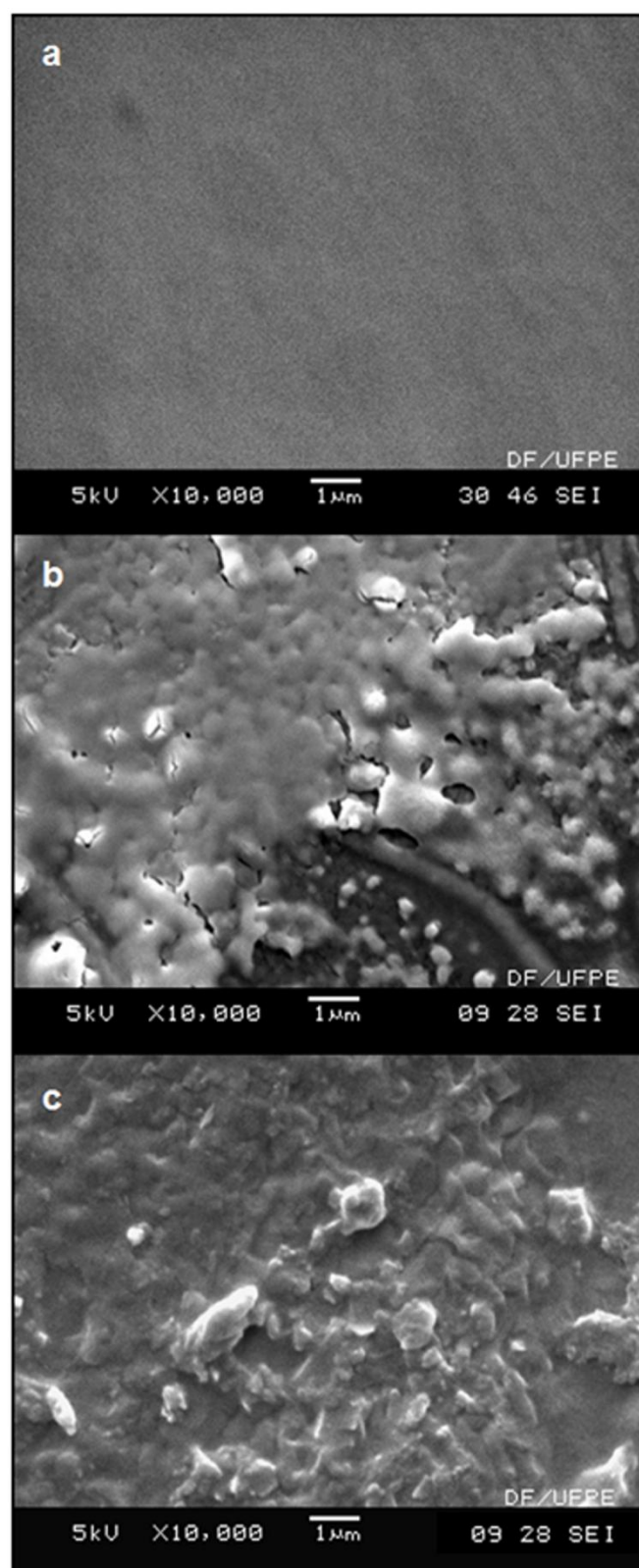


Figure 4

**Figure 5**

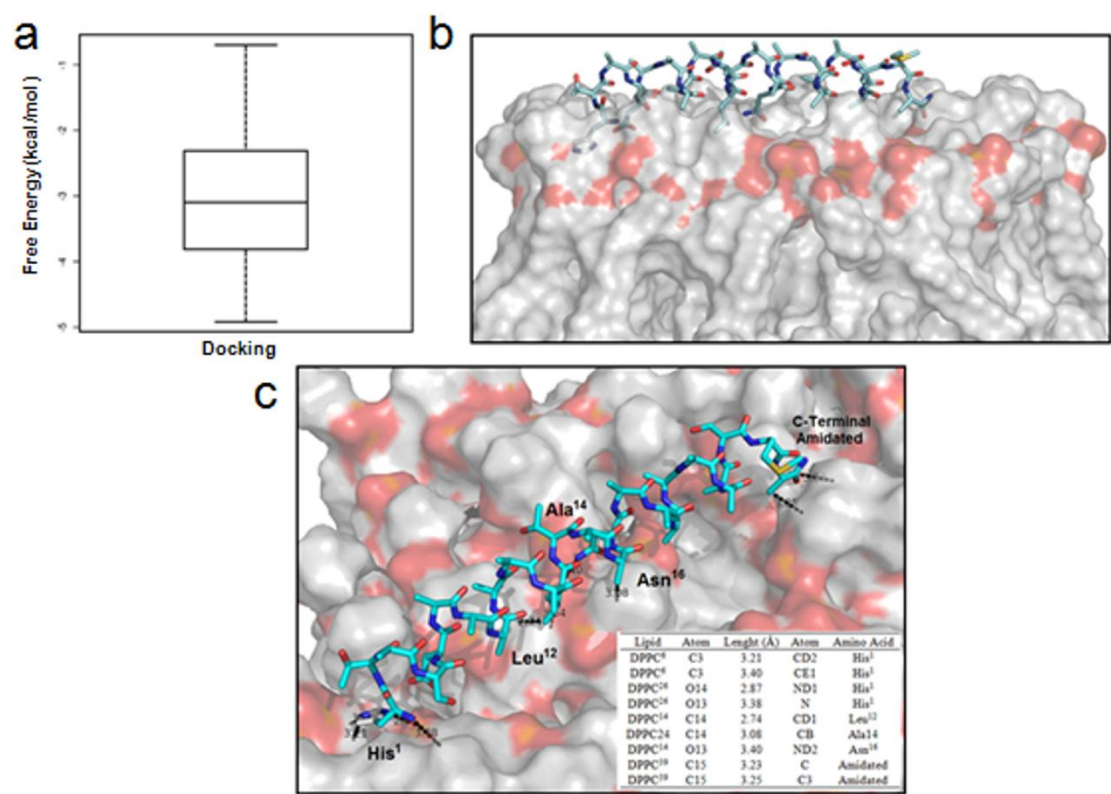


Figure 6