

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Aumento do espectro de acção de péptidos antimicrobianos**

**Actividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas**

**Inês Mota Torcato**

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização: Bioquímica Médica

2011



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Aumento do espectro de acção de péptidos antimicrobianos**

**Actividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas**

**Inês Mota Torcato**

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização: Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:

Prof. Doutor Miguel Castanho e Doutor Carlos Cordeiro

2011



## Prefácio

O presente trabalho, desenvolvido na Unidade de Bioquímica Física, no Instituto de Medicina Molecular, tem como objectivo o desenvolvimento de péptidos antimicrobianos com um maior espectro de acção e com uma actividade antimicrobiana superior. Pretende-se ainda estudar o mecanismo de acção destes péptidos, com vista a perceber de que forma estes péptidos interagem com a membrana celular e, conseqüentemente, como causam a morte celular bacteriana. Este conhecimento será importante para a optimização destes péptidos como agentes antimicrobianos com aplicação em humanos. A motivação deste trabalho baseia-se num dos problemas de saúde mais graves do momento: o tratamento de infecções causadas por bactérias com várias resistências aos antibióticos comuns.

Neste trabalho foram realizados ensaios biológicos com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, ensaios de hemólise e foram utilizadas as técnicas de microscopia de força atómica, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular de forma a atingir os objectivos propostos. Esta dissertação está dividida de forma a que o leitor siga de uma forma lógica o trabalho realizado. Deste modo, em primeiro lugar encontram-se os resumos que têm como função familiarizar o leitor com o trabalho realizado, metodologias empregues e principais resultados obtidos. De seguida, encontra-se um capítulo introdutório em que o leitor é familiarizado com as bases teóricas necessárias para acompanhar o presente trabalho, nomeadamente informação sobre péptidos antimicrobianos e a sua interacção com membranas e as principais características das bactérias empregues neste estudo. Após este capítulo introdutório, são descritas as metodologias utilizadas, sendo estas seguidas do capítulo onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Por fim, são reunidas as principais conclusões e apresentadas as perspectivas futuras para o presente trabalho, nomeadamente, o trabalho necessário para completar o estudo do mecanismo de acção destes péptidos e para a sua optimização.

Durante a realização deste trabalho tive a oportunidade de frequentar um nanocurso de transferência de tecnologia denominado *Improving technology transfer from academia in translational medicine*, que decorreu nos dias 24 e 25 de Março no Instituto de Medicina Molecular e de assistir ao XVII Congresso Nacional de Bioquímica, na cidade do Porto. Tive ainda a oportunidade de apresentar o presente trabalho na *14<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecule* que decorreu entre 29 de Agosto e 3 de Setembro, na cidade de Coimbra. Este trabalho foi apresentado sob a forma de uma apresentação oral curta

com o título *Novel Antimicrobial Peptides with Activity Against Gram-negative and Gram-positive Bacteria*.

## Agradecimentos

Ao Professor Miguel Castanho por me ter recebido de braços abertos no seu grupo e pela confiança que sempre me transmitiu. Obrigada por toda a disponibilidade, orientação, incentivo e boa-disposição.

À Doutora Sónia Henriques que durante este ano me guiou e aconselhou, iniciando-me no meu percurso científico. Obrigada por todo o tempo dedicado ao presente trabalho e acima de tudo pela amizade, apoio, paciência, incentivo e confiança com que preencheu os meus dias.

Ao Doutor Carlos Cordeiro por toda a disponibilidade, simpatia e interesse com que acompanhou o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus colegas da unidade de Bioquímica Física por toda a amizade e por todos os bons momentos que me proporcionaram dentro e fora do laboratório, em especial ao Henri que foi o meu tutor no AFM, à Diana pela ajuda nos ensaios de CD e à Marta por rever os meus textos e por me ensinar o funcionamento do instituto. A todos um muito obrigada.

À Unidade de Biomembranas por toda a ajuda e sugestões que me foram dando ao longo do ano. Um obrigada especial ao Marco e à Margarida por toda a amizade e ajuda.

A Catarina Pronto por me ensinar as regras básicas do trabalho com bactérias e por me ter ensinado a preparar e a suplementar os meios de cultura.

A Carla Alves pela ajuda com os protocolos de microbiologia e constante disponibilidade para responder às minhas dúvidas.

A Yen-Hua Huang do Instituto de Biociência Molecular, da Universidade de Queensland pela síntese de todos os péptidos utilizados nesta dissertação.

À Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção do Instituto de Medicina Molecular pela cedência das estirpes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e dos antibióticos utilizados neste estudo. Um obrigada especial à Margarida que por mais de uma vez me ajudou.

À Doutora Mónica Oleastro do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge por me ter cedido a estirpe de *Helicobacter pylori* utilizada neste trabalho e ao Dr. João Benoliel por me ter deixado acompanhar o seu trabalho durante uma manhã bem-disposta.

Aos meus amigos e colegas da FCUL, nomeadamente, Ricardo, Bruno, Ângelo, Andreia Raimundo, Andreia Fernandes, Ana Brazão, Joana Dias e Zé João por tornarem especial este percurso. À Tatiana pela lufada de ar fresco que trouxe e ao André Faustino por ser um grande amigo, mesmo quando se vê grego para achar o  $\theta$ . A Catarina Santos não há palavras para agradecer todo o apoio e amizade destes últimos cinco anos.

Aos meus amigos de sempre, Sara, Emanuel, Ana, André, João, Diogo, Ismael e ao pessoal da Rabisco e Asterisco pela amizade incondicional.

Ao meu namorado João por ser o meu melhor amigo, confidente, motivador e apoio ao longo de todos estes anos. Obrigada por toda a amizade, carinho e amor com que preenche a minha vida.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, às minhas irmãs, ao meu cunhado Etienne, aos meus sobrinhos e ao meu namorado João, por serem os meus pilares. Um obrigado especial à Carina e Etienne por me ajudarem a encontrar o equilíbrio, ao meu pai por nunca duvidar das minhas capacidades e à minha mãe por ser o meu porto seguro.



## Resumo

O aumento das resistências bacterianas aos antibióticos correntes, torna necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Os péptidos antimicrobianos (AMPs) ao fazerem parte do sistema imunitário inato de humanos e ao possuírem um extenso espectro de acção contra bactérias e vírus, são uma alternativa promissora. Para além disso, por substituição de resíduos de aminoácidos a sua actividade, especificidade e citotoxicidade podem ser optimizadas.

O BP100 é um AMP híbrido de cecropina A e melitina com actividade comprovada contra bactérias Gram-negativas, mas não contra bactérias Gram-positivas. Com o intuito de aumentar a actividade antimicrobiana deste tipo de péptidos foram desenvolvidos e sintetizados dois derivados, PepRYL e PepRWL, por introdução de resíduos de arginina e triptofano. Para comparar a actividade destes derivados com a de AMPs já estudados, todos os ensaios foram também estudados os péptidos BP100 e Sub3, sendo o Sub3 um AMP activo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Por determinação da concentração mínima inibitória (MIC) observou-se actividade antimicrobiana destes derivados a concentrações na ordem do micromolar contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, à semelhança do que foi também observado em ensaios de microscopia de força atómica, onde a baixas concentrações destes péptido era observável a perturbação das membranas bacterianas. Por realização de estudos de espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular observou-se que ambos os derivados apresentam preferência para vesículas aniónicas, sendo observada uma alteração estrutural por interacção péptido-vesículas aniónicas. Em todos os ensaios de caracterização da interacção do péptido com a membrana foi possível inferir a existência de um mecanismo de acção diferente para o Sub3.

De uma forma geral, PepRYL e PepRWL possuem uma maior actividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas que o BP100. Para além disso, PepRWL e PepRYL possuem actividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas enquanto que o BP100 é inactivo.

**Palavras-chave:** péptidos antimicrobianos, membranas, resistência bacteriana, antibióticos, substituição de resíduos de aminoácidos.

## Abstract

The increasing resistance of bacteria to conventional antibiotics has led to the need for alternative therapies. Being part of the human innate defense system, antimicrobial peptides (AMPs) are a very promising alternative, presenting a broad spectrum of activity against bacteria and viruses. Designing superior AMPs through amino acid residues substitution is a powerful strategy to enhance their activity and specificity but also to decrease their cytotoxicity.

BP100 is a cecropin A–melittin hybrid peptide that has proved bactericidal activity against Gram-negative bacteria but not against Gram-positive. Knowing that arginine and tryptophan amino acid residues enhance antimicrobial activity, we designed and synthesized BP100 analogues, PepRYL and PepRWL, that include these residues, in an attempt to improve antimicrobial activity. The activity of the novel peptides was compared with the activity of BP100 and Sub3, an AMP with activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

PepRYL and PepRWL have bactericidal activity at low micromolar range against Gram-negative and Gram-positive bacteria as revealed with minimal inhibitory concentration (MIC) assays. Antimicrobial activity of PepRYL and PepRWL was further confirmed by atomic force microscopy imaging in which bacterial membrane perturbation is shown. To clarify the peptides' mechanism of action and structure in aqueous and lipid environments, fluorescence spectroscopy and circular dichroism measurements were employed. A preference of both BP100 derivatives towards anionic vesicles over neutral vesicles was observed. Accordingly, a conformational change was observed in both PepRYL and PepRWL peptides structure upon interaction with negatively-charged lipidic vesicles. Peptide-membrane studies suggested that Sub3 has a mechanism of action distinct from BP100 and its analogues.

Overall, BP100 derivatives have a higher antimicrobial activity against Gram-negative bacteria than BP100 and show high activity towards Gram-positive bacteria, unlike other cecropin A–melittin derivatives. Moreover, PepRWL is more efficient than Sub3 against Gram-positive bacteria.

**Keywords:** antimicrobial peptides, membranes, bacteria resistance, antibiotics, amino acid residues substitution.

# Índice

Prefácio.....	i
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vi
Índice.....	vii
Índice de figuras .....	xi
Índice de tabelas .....	xix
Lista de abreviaturas e siglas.....	xxi
Lista de símbolos.....	xxiv
1.Introdução .....	1
1.1. Resistência bacteriana ao tratamento com antibióticos .....	1
1.2. Péptidos antimicrobianos e as membranas lipídicas .....	1
1.3. BP100 e novos péptidos.....	5
1.4. Escherichia coli.....	6
1.5. Staphylococcus aureus .....	8
1.6. Helicobacter pylori.....	9
1.7. Objectivos .....	11
2.Materiais e métodos .....	12
2.1. Síntese de péptidos.....	12
2.2. Ensaio biológico .....	13
2.2.1. Optimização do crescimento .....	13
2.2.2. Crescimento bacteriano .....	14

2.2.3.	Determinação das concentrações mínimas inibitórias.....	15
2.2.4.	Tratamento dos resultados .....	17
2.3.	Microscopia de força atômica (AFM).....	18
2.3.1.	Preparação das amostras .....	19
2.3.2.	Obtenção e tratamento das imagens .....	20
2.3.3.	Tratamento dos dados de rugosidade e inchaço .....	20
2.1.	Ensaio hemolítico.....	21
2.2.	Espectroscopia de fluorescência .....	22
2.2.1.	Efeito da concentração e caracterização espectral.....	23
2.2.2.	Determinação do rendimento quântico.....	24
2.2.3.	<i>Quenching</i> pela acrilamida .....	25
2.2.4.	Efeito da presença de ureia e de alteração de pH .....	26
2.2.5.	Efeito de <i>red edge</i> ( <i>red edge Excitation Shift</i> , REES).....	27
2.2.6.	Interação dos péptidos com modelos membranares .....	27
2.2.6.1.	Preparação das LUVs .....	28
2.2.6.2.	Estudos de partição .....	28
2.2.6.3.	Agregação de vesículas .....	30
2.2.6.4.	<i>Quenching</i> em profundidade e com acrilamida.....	30
2.2.6.5.	<i>Leakage</i> .....	31
2.3.	Dicroísmo circular .....	33
3.	Apresentação e discussão dos resultados .....	35
3.1.	Determinação das concentrações mínimas inibitórias .....	35
3.1.1.	<i>Helicobacter pylori</i> .....	42
3.2.	Estudos de microscopia de força atômica .....	44
3.3.	Previsão teórica da afinidade dos péptidos para membranas.....	56
3.4.	Determinação da citotoxicidade dos péptidos.....	58

3.5. Ensaio biofísicos.....	62
3.5.1. Caracterização espectral .....	63
3.5.2. Efeito da concentração.....	66
3.5.3. Determinação do rendimento quântico.....	67
3.5.4. <i>Quenching</i> pela acrilamida .....	68
3.5.5. Efeito da presença de ureia e alteração do pH.....	70
3.5.6. Efeito de <i>red edge</i> .....	71
3.5.7. Estudos de partição.....	72
3.5.8. Agregação de vesículas .....	77
3.5.9. <i>Quenching</i> em profundidade e com a acrilamida .....	79
3.5.10. Estudos de <i>Leakage</i> .....	88
3.6. Dicroísmo circular .....	91
3.7. Representação tridimensional dos péptidos .....	93
Conclusão .....	97
Perspectivas futuras.....	101
Referências bibliográficas .....	102
Anexo A – Optimização do crescimento microbiano .....	109
Anexo B – Composição e modo de preparação dos meios de cultura .....	111
B1. Meio Mueller Hinton Broth.....	111
B2. Meio Mueller Hinton Ágar .....	111
B3. Meio Brucella Broth .....	112
B4. Meio Brucella Ágar .....	112
B5. Meio selectivo para <i>Helicobacter pylori</i> .....	113
Anexo C – Fundamentos teóricos suplementares .....	114

C1. Método de esgotamento do inóculo.....	114
C2. <i>Quenching</i> de fluorescência.....	114

## Índice de figuras

- Figura 1 – Estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A parede celular de bactérias Gram-positivas, representada à esquerda, é constituída maioritariamente por uma espessa camada de peptidoglicano ao qual se ligam ácidos teicóicos (contendo resíduos de glicerol fosfato ou ribitol fosfato). A parede celular de bactérias Gram-negativas, representada à direita, possui uma camada de peptidoglicano menos espessa que as bactérias Gram-positivas. Sobre esta camada encontra-se uma nova bicamada fosfolipídica que possui polissacáridos ligados covalentemente a lípidos, formando lipopolissacáridos (LPS). Esta segunda membrana é denominada membrana externa ou simplesmente LPS. Adaptada de [20]. ..... 4
- Figura 2 – Projecção da *Edmunson wheel*. Ao desenvolver novos péptidos alterando apenas os resíduos 1 e 10 e o grupo R, originam-se novos derivados com uma estrutura de hélice perfeita, já que ao fazer o *fold*, uma face da hélice terá carácter hidrófilo (resíduos de aminoácidos com fundo negro) e a outra carácter hidrófobo (resíduos de aminoácidos com fundo branco). Retirada de [12]. ..... 5
- Figura 3 – Patogénese da infecção do tracto urinário causada por *E. coli* uropatogénica. Retirada de [23]. ..... 7
- Figura 4 – Fotografias de crescimento bacteriano de *E. coli* (esquerda), *S. aureus* (centro) e *H. pylori* (direita) em meio sólido. .... 15
- Figura 5 – Esquema representativo do conteúdo das placas de 96 poços utilizadas para a determinação das concentrações mínimas inibitórias. A cinzento escuro encontram-se representados os poços em que não ocorre qualquer adição, pois são os que apresentam uma maior variabilidade aquando da leitura no leitor de microplacas. A cinzento claro encontra-se representado o conteúdo para um dos péptidos e a branco o conteúdo para o outro péptido, a ser testado na placa. As concentrações de péptidos apresentadas encontram-se em  $\mu\text{M}$ . AB, antibiótico. .... 17
- Figura 6 – Esquema do modo de funcionamento da microscopia de força atómica. Um raio laser incide sobre a ponta do *cantilever*. Uma vez que o *cantilever* irá oscilar, com a oscilação da *tip* sobre a amostra, ocorrerá a deflecção deste raio laser. O conjunto de fotomultiplicadores irá detectar a magnitude desta deflecção, dando as informações necessárias para a construção da imagem pelo computador. Imagem adaptada de [51]. ..... 19

Figura 7 – Espectros de dicroísmo circular característicos dos elementos de estrutura secundária mais comuns. Espectro da poli-L-lisina a pH 11,1 com conformação de hélice  $\alpha$  (preto), de folha antiparalela  $\beta$  (vermelho) e a pH 5,7 de *random coil* (verde). Imagem adaptada de [70]. ..... 33

Figura 8 – Representação gráfica da percentagem de sobrevivência de *E.coli* nos meios de cultura líquidos MHB e BB em função do logaritmo da concentração de péptido. A percentagem de sobrevivência resulta da média dos três replicados, tendo sido realizada uma regressão não linear aos resultados de forma a obter o valor de MIC<sub>50</sub>. São apresentadas as barras representativas do erro padrão da média. (●) Meio líquido Mueller Hinton Broth, (■) meio líquido Brucella Broth, (A) BP100, (B) PepRYL, (C) PepRWL e (C) Sub3..... 36

Figura 9 - Representação gráfica da percentagem de sobrevivência de *S.aureus* nos meios de cultura líquidos MHB e BB em função do logaritmo da concentração de péptido. A percentagem de sobrevivência resulta da média dos três replicados, tendo sido realizada uma regressão não linear aos resultados de forma a obter o valor de MIC<sub>50</sub>. São apresentadas as barras representativas do erro padrão da média. (●) Meio líquido Mueller Hinton Broth, (■) meio líquido Brucella Broth, (A) BP100, (B) PepRYL, (C) PepRWL e (C) Sub3..... 37

Figura 10 - Percentagem de sobrevivência da bactéria *Helicobacter pylori* após tratamento com 100  $\mu$ M dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3. Os péptidos estiveram incubados com a suspensão bacteriana durante 30 horas..... 43

Figura 11 - Percentagem de sobrevivência da bactéria *Helicobacter pylori* após tratamento com 100, 50, 10 e 1  $\mu$ g/mL de tetraciclina. As diferentes concentrações de antibiótico foram incubadas com a suspensão bacteriana durante 30 horas. .... 44

Figura 12 - Efeito dependente da concentração de BP100 contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de BP100 (A, E) e na presença de BP100 1  $\mu$ M (B, F), 10  $\mu$ M (C, G) e 100  $\mu$ M (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ . ..... 45

Figura 13 - Efeito dependente da concentração de PepRYL contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de PepRYL



(A, E) e na presença de PepRYL 1  $\mu\text{M}$  (B, F), 10  $\mu\text{M}$  (C, G) e 100  $\mu\text{M}$  (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ ..... 45

Figura 14 - Efeito dependente da concentração de PepRWL contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de PepRWL (A,E) e na presença de PepRYL 1  $\mu\text{M}$  (B,F), 10  $\mu\text{M}$  (C,G) e 100  $\mu\text{M}$  (D,H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ ..... 46

Figura 15 - Efeito dependente da concentração de Sub3 contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de Sub3 (A, E) e na presença de PepRWL 1  $\mu\text{M}$  (B, F), 10  $\mu\text{M}$  (C, G) e 100  $\mu\text{M}$  (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ ..... 46

Figura 16 – Imagens de *E. coli* e *S. aureus* sem tratamento. Imagens de altura de *E. coli* (A) e *S. aureus* (C) com as secções realizadas de forma a originar os gráficos altura vs largura para *E. coli* (B) e altura vs comprimento para a *S. aureus* (D). ..... 47

Figura 17 – Análise da rugosidade superficial aplicada às imagens de AFM. À imagem de altura obtida inicialmente (A) foi aplicado um filtro de valores médios para estimar a forma geral das bactérias (B). A imagem obtida é subtraída à imagem inicial de altura, originando uma imagem achatada (C) que foi analisada por medição da média quadrática dos valores de altura da superfície bacteriana em áreas com dimensões de  $125 \times 125 \text{ nm}^2$  (D). Nesta figura o processo de análise foi exemplificado para uma célula de *E. coli*. ..... 48

Figura 18 – Análise de rugosidade das bactérias *E. coli*. Valores de rugosidade superficial obtidos para as células bacterianas de *E. coli* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1  $\mu\text{M}$  (padrão axadrezado), 10  $\mu\text{M}$  (preto) e 100  $\mu\text{M}$  (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas..... 49

Figura 19 - Análise de inchaço das bactérias *E. coli*. Valores de inchaço obtidos para as células bacterianas de *E. coli* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1  $\mu\text{M}$  (padrão

axadrezado), 10  $\mu\text{M}$  (preto) e 100  $\mu\text{M}$  (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas..... 51

Figura 20 - Análise de rugosidade das bactérias *S. aureus*. Valores de rugosidade superficial obtidos para as células bacterianas de *S. aureus* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1  $\mu\text{M}$  (padrão axadrezado), 10  $\mu\text{M}$  (preto) e 100  $\mu\text{M}$  (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas..... 53

Figura 21 - Análise de inchaço das bactérias *S. aureus*. Valores de inchaço obtidos para as células bacterianas de *S. aureus* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1  $\mu\text{M}$  (padrão axadrezado), 10  $\mu\text{M}$  (preto) e 100  $\mu\text{M}$  (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas..... 55

Figura 22 - Previsão da afinidade dos péptidos em estudo para membranas. Afinidade dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) para membranas, por representação das energias livres de transferência dos resíduos da água para interfaces membranares constituídas por POPC ( $\Delta G_{\text{água-membrana}}$ ). Resíduos com  $\Delta G_{\text{água-membrana}} < 0$  têm maior afinidade para região de interface da membrana. Valores de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$  retirados de [73]. ..... 57

Figura 23 – Resultados obtidos para o ensaio hemolítico. (A) Representação dos valores de percentagem de hemólise versus concentração de péptido. (B) Representação dos valores de percentagem de hemólise versus logaritmo da concentração de péptido. A estes valores foi realizada uma regressão não linear. ( $\Delta$ ) PepRWL, ( $\square$ ) PepRYL, (O) BP100 e ( $\diamond$ ) Sub3. .... 59

Figura 24 – Caracterização espectral dos péptidos em estudo. Espectros de absorção (—), emissão (.....) e excitação (– –) dos péptidos BP100 (A) e PepRYL (B) a 50 $\mu$ M e de PepRWL (C) e Sub3 (D) a 15 $\mu$ M em tampão HEPES, normalizados para o valor máximo.....	64
Figura 25 – Simetria dos espectros de emissão (.....) e absorção (—) dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D).....	65
Figura 26 – Efeito da concentração de péptido na intensidade de fluorescência medida. Representações da intensidade de fluorescência medida em função da concentração de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) até uma concentração máxima de 100 $\mu$ M. ....	66
Figura 27 – <i>Quenching</i> pela acrilamida. Representações gráficas de $I_0/I$ vs concentração de acrilamida para (A) BP100, (B) PepRYL e (C) PepRWL e Sub3 na presença dos controlos tirosina e triptofano. (●) BP100, (o) tyr, (■) PepRYL, (□) tyr, (▲) PepRWL, (◆) Sub3 e (●) trp. ....	69
Figura 28 - Efeito da diminuição do pH. Foi seguida a intensidade de fluorescência durante a titulação de uma solução dos péptidos BP100 (●), PepRYL (■), PepRWL (▲) e Sub3 (◆) com ácido clorídrico. Os valores apresentados encontram-se normalizados ao padrão utilizado: tirosina para BP100 e PepRYL (A) e triptofano para PepRWL e Sub3 (B). ....	70
Figura 29 - Efeito do aumento da concentração de ureia. Foi seguida a intensidade de fluorescência durante a titulação de uma solução dos péptidos BP100 (●), PepRYL (■), PepRWL (▲) e Sub3 (◆) com ureia. Os valores apresentados encontram-se normalizados ao padrão utilizado: tirosina para BP100 e PepRYL (A) e triptofano para PepRWL e Sub3 (B). ....	71
Figura 30 – Representação gráfica da variação do $\lambda_{em}$ (nm) em função do $\lambda_{exc}$ (nm). (▲) PepRWL, (◆) Sub3 e (○)Triptofano. ....	72
Figura 31 – Representação da intensidade de fluorescência vs $\lambda_{em}$ dos péptidos PepRWL (A), Sub3 (B) e do resíduo de triptofano (C) por interacção com concentrações crescentes de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. ....	74
Figura 32 - Representação da intensidade de fluorescência vs $\lambda_{em}$ dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B) e do resíduo de tirosina (C) por interacção com concentrações crescentes de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. ....	74

Figura 33 – Curvas de partição. Ajuste da regressão não-linear aos valores experimentais obtidos para BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) em modelos membranares constituídos por POPC (●), POPC/POPG 4:1 (■) ou POPC/POPG 1:1 (▲). ..... 75

Figura 34 – Agregação de vesículas induzida pelos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). Aos 6 minutos foram adicionados 50  $\mu$ M de péptido a 500  $\mu$ M de LUVs constituídas por POPC (—), POPC/POPG 4:1 (- - -) e 1:1 (- · -). ..... 78

Figura 35 – *Quenching* diferencial do péptido BP100. *Quenching* por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou (B) POPC. (C) *Quenching* pela acrilamida (■) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto). ..... 80

Figura 36 - *Quenching* diferencial do péptido PepRYL. *Quenching* por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou por (B) POPC. (C) *Quenching* do péptido PepRYL pela acrilamida (■) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou POPC/POPG 1:1 (preto). (D) *Quenching* da solução do resíduo de tirosina livre pela acrilamida (○) em LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).81

Figura 37 – *Quenching* diferencial do péptido PepRWL. *Quenching* por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou (B) POPC. (C) *Quenching* pela acrilamida (■) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto). ..... 82

Figura 38 - *Quenching* diferencial do péptido Sub3. *Quenching* por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou por (B) POPC. (C) *Quenching* do péptido Sub3 pela acrilamida (■) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou POPC/POPG 1:1 (preto). (D) *Quenching* da solução do resíduo de tirosina livre pela acrilamida (○) em LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).83

Figura 39 - Representações gráficas da percentagem de *leakage* vs concentração de péptido (A) ou logaritmo da concentração de péptido (B) em LUVs constituídas por POPC. Aos dados da figura B foi ajustada uma regressão não-linear de forma a obter os valores de concentração de péptido necessária para induzir 50% de *leakage*. (○) BP100, (□) PepRYL, (△) PepRWL e (◇) Sub3. .... 88

Figura 40 - Representações gráficas da percentagem de *leakage* vs concentração de péptido (A) ou logaritmo da concentração de péptido (B) em LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1.

Aos dados da figura B foi ajustada uma regressão não-linear de forma a obter os valores de concentração de péptido necessária para induzir 50% de *leakage*. (○) BP100, (□) PepRYL, (△) PepRWL e (◇) Sub3. .... 89

Figura 41 – Cinéticas de *leakage* dos péptidos em estudo em vesículas constituídas por POPC (A) ou por POPC/POPG 1:1 (B). (—) BP100, (.....) PepRYL, (- · -) PepRWL e (- -) Sub3.. 91

Figura 42 – Espectros de dicroísmo circular para os péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). Foram realizados os espectros de uma solução de 50 µM de péptido com 500 µM de POPC/POPG 1:1 (-), numa solução de pH 2 (-), na presença de 5 mM de ureia (-) ou apenas em tampão (-)..... 92

Figura 43 – Representações tridimensionais do péptido BP100. (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de lisina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre os resíduos de lisina e leucina situados nas extremidades de BP100. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de BP100. Resíduos polares coloridos de amarelo e resíduos apolares coloridos de cor-de-laranja..... 95

Figura 44 - Representações tridimensionais do péptido PepRYL. (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre os resíduos de arginina e leucina situados nas extremidades de PepRYL. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de PepRYL. Resíduos polares coloridos de vermelho e resíduos apolares coloridos de cor-de-laranja. .... 95

Figura 45 - Representações tridimensionais do péptido PepRWL. (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre os resíduos de arginina e leucina situados nas extremidades de PepRWL. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de PepRWL. Resíduos polares coloridos de azul-escuro e resíduos apolares coloridos de azul-claro. .... 96

Figura 46 - Representações tridimensionais do péptido Sub3. (A) Representação do péptido Sub3 e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre os

resíduos de arginina situados nas extremidades de Sub3. Resíduos polares coloridos de cor-de-rosa e resíduos apolares coloridos de violeta. .... 96

Figura 47 – Representação das principais conclusões retiradas. Os resultados de MIC<sub>100</sub> apresentados foram obtidos para o meio BB; os valores apresentados para o perfil hemolítico e *leakage* foram obtidos para a concentração mais elevada de péptido utilizada (50 µM no ensaio de hemólise e 100 µM no ensaio de *leakage*) nos ensaios com LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. .... 100

Figura A1 – Curvas de crescimento de *S.aureus* em meio MHB (A) e BB (B). O ajuste foi realizado apenas para os valores de crescimento exponencial (preto), não sendo consideradas as restantes fases de crescimento (cinzento). .... 109

Figura C1 - Sementeira de uma placa de meio de cultura sólido segundo o método do esgotamento do inóculo. .... 114

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Sequência peptídica dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 e respectivos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ).....	12
Tabela 2 – Valores de MIC <sub>50</sub> , MIC <sub>90</sub> e MIC <sub>100</sub> determinados para <i>E. coli</i> em meio MHB ou BB.....	38
Tabela 3 - Valores de MIC <sub>50</sub> , MIC <sub>90</sub> e MIC <sub>100</sub> determinados para <i>S. aureus</i> em meio MHB ou BB.....	40
Tabela 4 – Valores médios de rugosidade superficial para as células de <i>E. coli</i> tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média. ....	50
Tabela 5 - Valores médios de inchaço para as células de <i>E. coli</i> tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média. ....	52
Tabela 6 - Valores médios de rugosidade para as células de <i>S. aureus</i> tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média. ....	54
Tabela 7 - Valores médios de inchaço para as células de <i>S. aureus</i> tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média. ....	56
Tabela 8 – Valores de percentagem de hemólise obtidos para as diferentes concentrações dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3.....	59
Tabela 9 – Valores de concentração dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 necessárias para atingir uma percentagem de 50% de hemólise celular. ....	60
Tabela 10 – Valores de índice terapêutico obtidos para os diferentes péptidos.....	61
Tabela 11 – Principais características dos péptidos em estudo. Os valores de coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ), massa molar (M) e de ponto isoelétrico (pI) são os valores teóricos obtidos por recurso à ferramenta ProtParam. ....	63
Tabela 12 – Valores de rendimento quântico obtidos para os diferentes péptidos em estudo. Estes valores foram obtidos utilizando o comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) e de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) apresentados a 21,4 °C para o péptido BP100, 21,7 °C para PepRYL e a 21°C para PepRWL e Sub3. ....	67

Tabela 13 – Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtidos para o quenching pela acrilamida dos péptidos em estudo e dos controlos tirosina e triptofano.....	69
Tabela 14 – Valores de $K_p$ , da razão $I_I/I_W$ e de $X_L$ determinados para as diferentes misturas lipídicas utilizadas para cada um dos péptidos em estudo. ....	76
Tabela 15 – Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtidos para o <i>quenching</i> diferencial dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 com 5 e 16-NS e acrilamida. ....	84
Tabela 16 – Valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida a partir da população de fluoróforos particionados no lípido ( $f_L$ ) e dos valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida a partir da população de fluoróforos acessíveis aos quenchers 5-NS ( $f_{B, 5-NS}$ ) e 16-NS ( $f_{B, 16-NS}$ ). ....	85
Tabela 17 – Valores de percentagem de <i>leakage</i> obtidos para os péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3. ....	89
Tabela 18 – Valores da concentração dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 necessária para induzir 50% de <i>leakage</i> em modelos membranares constituídos por POPC ou por POPC/POPG 1:1. ....	90



## Lista de abreviaturas e siglas

16-NS	Ácido 16-doxilo esteárico
5-NS	Ácido 5-doxilo esteárico
AB	Antibiótico
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>atomic force microscopy</i> )
AMP	Péptidos antimicrobianos (do inglês <i>antimicrobial peptides</i> )
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	Brucella Ágar
BB	Brucella Broth
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>circular dichroism</i> )
Cfu	Unidades formadoras de colónias (do inglês <i>colony forming units</i> )
CL	Cardiolipina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes (do inglês <i>giant unilamellar vesicles</i> )

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)1-piperazinil]-etanosulfónico
HIV	Vírus de imunodeficiência humana (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> )
LPS	Lipopolissacárido
LUVs	Vesículas unilamelares grandes (do inglês <i>large unilamellar vesicles</i> )
MHA	Mueller Hinton Ágar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i> )
MLVs	Vesículas multilamelares (do inglês <i>multilamellar vesicles</i> )
MNEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> associada à meningite
MRSA	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (do inglês <i>methicillin resistant staphylococcus aureus</i> )
NaCl	Cloreto de sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OD	Densidade óptica (do inglês <i>optical density</i> )
PBS	Tampão salino de fosfatos (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
pI	Ponto isoelétrico

POPC	1-palmitoíl-2-oleoíl- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPG	1-palmitoíl-2-oleoíl- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
REES	Efeito de <i>red edge</i> (do inglês <i>red edge excitation shift</i> )
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SM	Esfingomielina
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês <i>small unilamellar vesicles</i> )
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UPEC	Estirpe de <i>Escherichia coli</i> uropatogénica
VacA	Citotoxina vacuolizante

## Lista de símbolos

A	Absorvância
$A_{\text{amostra}}$	Absorvância da amostra
$A_f$	Absorvância do fluoróforo
$A_{\text{PBS}}$	Absorvância na presença do tampão PBS
$A_s$	Absorvância da referência
$A_t$	Absorvância total da solução
$A_{\text{Triton}}$	Absorvância na presença de Triton X-100
$A_x$	Absorvância da amostra
C	Número médio de colônias contadas
D	Valor da diluição de base 10
$EC_{50}$	Concentração de composto necessária para induzir a morte de 50% de uma população
S	Porcentagem de sobrevivência
$F_s$	Área do espectro de emissão da referência
$F_x$	Área do espectro de emissão da referência
H	Declive de Hill (do inglês <i>Hillslope</i> )
I	Intensidade de fluorescência
$I_0$	Intensidade de fluorescência inicial na ausência de péptido ou <i>quencher</i>
$I_c$	Intensidade de fluorescência corrigida
$I_L$	Valor máximo de intensidade de fluorescência para uma determinada concentração de lípido

$I_{\text{Triton}}$	Intensidade de fluorescência na presença de Triton X-100
$I_W$	Intensidade de fluorescência na ausência de lípido
$K_p$	Constante de partição
$K_{pQ}$	Coefficiente de partição do quencher
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
$L$	Lípido
$M$	Massa molar
$N$	Número total de imagens consideradas ou unidades formadoras de colónias por mililitro
$N_A$	Constante de Avogadro
$n_s$	Índice de refração do padrão
$n_x$	Índice de refração da amostra
$Q$	<i>Quencher</i>
$R_{\text{rms}}$	Média quadrática (do inglês <i>root mean square</i> )
$S_0$	Estado fundamental de energia
$S_1$	Primeiro estado excitado singuleto
$S_2$	Segundo estado excitado singuleto
$V$	Volume da esfera activa
$V_i$	Volume do inóculo
$X_L$	Concentração de péptido particionado na membrana
$z_i$	Altura do ponto $i$
$z_m$	Média da altura

$\gamma_L$	Volume molar de lípido
$\Delta G_{\text{água-membrana}}$	Energia livre de transferência do resíduo de aminoácido da água para interfaces membranares constituídas por POPC
$\varepsilon$	Coefficiente de extinção molar
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{exc}$	Comprimento de onda de excitação
$\Phi_F$	Rendimento quântico de fluorescência

## 1. Introdução

### 1.1. Resistência bacteriana ao tratamento com antibióticos

A penicilina, descoberta por Alexandre Flemming em 1928, foi a primeira molécula com propriedades bactericidas a ser identificada. A sua utilização como agente terapêutico só foi possível 11 anos mais tarde após Howard Foley e colaboradores terem extraído, purificado e identificado a substância com actividade bactericida [1]. A administração de penicilina durante a segunda Guerra Mundial salvou milhares de vidas [2] e foi um importante marco para o tratamento de infecções bacterianas, que até então eram letais. Depois da classe das penicilinas, muitas outras classes de antibióticos foram desenvolvidas, passando as infecções bacterianas a serem consideradas patologias comuns de fácil tratamento. Contudo, o recorrente e abusivo recurso a estes fármacos provocou o aparecimento de resistências aos mesmos. Estas têm vindo a aumentar, sendo colocada a hipótese de este ser o começo de uma era pós-antibióticos em que as infecções bacterianas voltam a ser letais [3]. Um exemplo recente são as superbactérias que têm vindo a surgir em ambiente hospitalar, ou o surto de *Escherichia coli* verificado este ano que já conduziu a várias mortes. Actualmente, na União Europeia, 25 000 pessoas morrem devido a infecções bacterianas resistentes, sendo que a sua maioria é adquirida em hospitais. Este facto não escapou à Organização Mundial de Saúde que dedicou o dia Mundial da Saúde de 2011 a este fenómeno [4]. Para combater eficazmente estas infecções é, então, necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

### 1.2. Péptidos antimicrobianos e as membranas lipídicas

Uma alternativa promissora ao tratamento das infecções bacterianas com recurso às classes convencionais de antibióticos como as penicilinas, macrólidos e sulfonamidas são os péptidos antimicrobianos (AMPs) [5, 6]. Estes péptidos são considerados uma boa opção pois, para além de possuírem um vasto espectro de acção sobre bactérias, fungos, vírus e alguns sobre células cancerígenas, existem naturalmente em todas as classes de organismos, sem que os seus alvos tenham conseguido estabelecer mecanismos de resistência que impeçam a sua acção [7-9]. Para além destas características, alguns AMPs possuem a capacidade de actuar sinergisticamente com antibióticos convencionais [8, 10]. Foram já descobertos péptidos com uma elevada variabilidade sequencial, o que os torna ainda mais interessantes [9]. De forma a agrupar esta grande variedade de péptidos foram propostos quatro grupos estruturais: hélice

$\alpha$ , folha  $\beta$ , cíclicos e *random coil* [11]. Contudo, os AMPs naturais têm normalmente sequências de aminoácidos longas possuindo susceptibilidade à degradação por acção de proteases e uma baixa biodisponibilidade. Estas desvantagens têm levado ao desenvolvimento de péptidos sintéticos, com sequências de resíduos de aminoácidos menores e com pequenas substituições destes resíduos, de forma a criar novas e eficazes moléculas terapêuticas com maior estabilidade, maior actividade antimicrobiana e uma inferior citotoxicidade [12].

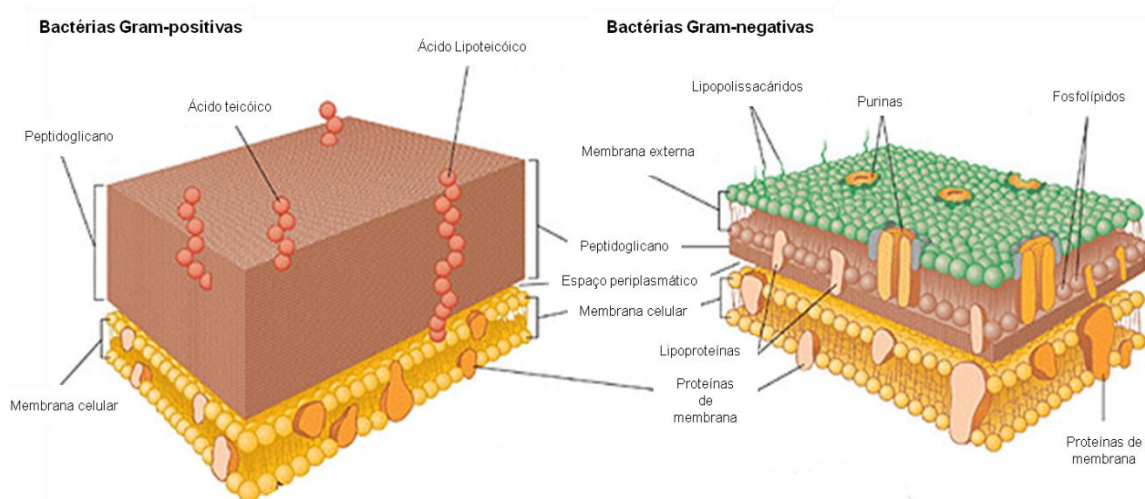
Os AMPs podem ser catiónicos ou aniónicos, mas uma vez que os péptidos catiónicos são os mais activos, estes são também os mais estudados [13]. Para além da carga positiva, os AMPs são na sua maioria péptidos curtos (10-30 resíduos de aminoácidos) e possuem carácter anfipático [8, 11]. Um mecanismo de acção que explique a actividade dos diferentes elementos desta classe de péptido tão diversa é irrealista, e vários mecanismos têm sido propostos na literatura. Algumas hipóteses de mecanismos sugerem que os AMPs atacam directamente e inespecificamente a membrana bacteriana permeabilizando-a. Esta permeabilização pode ocorrer ou por acumulação de péptidos à sua superfície (“*carpet mechanism*”), ou por formação de poros (“*barrel-stave*” e “*toroidal pore mechanism*”). Alternativamente, alguns péptidos parecem translocar através da membrana e actuar sobre alvos intracelulares [13, 14]. Independentemente de possuírem um alvo membranar ou intracelular, a membrana bacteriana é uma barreira com a qual os AMPs têm de interagir para exercerem a sua actividade anti-bacteriana [14]. Uma actividade dependente de interacções péptido-membrana é a razão mais provável para a incapacidade dos microrganismos de desenvolverem resistência a estes péptidos, já que isso implicaria uma reestruturação da sua membrana, (i. e. alterar a composição ou a organização dos seus constituintes) [9, 11].

As membranas têm como função compartimentalizar a célula (membrana plasmática) ou organelos (apenas no caso das células eucariotas), sendo constituídas essencialmente por fosfolípidos e proteínas [15, 16]. Os fosfolípidos apresentam uma zona polar (cabeça hidrófila) e uma zona hidrófoba (duas cadeias acilo). Por contacto com a água estes formam uma bicamada lipídica, adquirindo uma conformação anfipática, em que as cabeças polares ficam viradas para o meio aquoso exterior e as cadeias acilo para o interior, devido ao efeito hidrófobo [16, 17]. É esta conformação que lhe permite actuar como barreira selectiva, controlando, por exemplo, os gradientes iónico e químico, essenciais à vida. Dependendo da temperatura, pressão, hidratação e constituição fosfolipídica (p.e. existência de lípidos saturados ou insaturados), a “compactação” dos fosfolípidos da membrana pode possuir



propriedades físicas distintas que são designados por: fase gel ( $s_o$ ), fase líquida desordenada ( $L_d$ ) ou fase líquida ordenada ( $L_o$ ). A fase líquida desordenada (ou fase fluida) é a mais relevante em termos fisiológicos, já que na célula a bicamada lipídica apresenta, na sua maioria, propriedades de fase fluida [18]. Cada um dos dois folhetos constituintes da membrana, possui uma composição específica de proteínas e lípidos, fenómeno denominado por assimetria de membrana [16].

As membranas apresentam características que variam conforme o organismo onde se inserem. As membranas de mamíferos e de bactérias apresentam várias diferenças. As membranas de mamíferos são constituídas essencialmente por glicerofosfolípidos neutros em que a cabeça polar é constituída por fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidiletanolamina (PE), por esfingolípido como a esfingomielina (SM) e esteróis como o colesterol [16]. Já as membranas bacterianas são constituídas essencialmente por glicerofosfolípidos aniónicos como o fosfatidilglicerol (PG) e a cardiolipina (CL) sem a presença de esteróis, o que lhes confere uma superfície com carga negativa [14]. Para além da constituição lipídica, o potencial transmembranar existente nas bactérias é mais electronegativo que nas células de mamíferos, sendo de -130 a -150 mV e de -90 a -110 mV, respectivamente [14]. A existência de uma parede celular em células bacterianas, ausente nas células eucariotas também contribui para a carga negativa existente à superfície das células bacterianas. Na parede celular de bactérias Gram-positivas existem ácidos teicóicos carregados negativamente ligados ao peptidoglicano, enquanto que na parede celular de bactérias Gram-negativas existe uma membrana externa para além da camada de peptidoglicano composta por lipopolissacárido (LPS) que também possui carga negativa. O LPS para além de conferir a carga negativa e ter uma função de suporte pode ainda actuar como endotoxina [19]. Na figura 1 encontram-se representadas paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



**Figura 1 – Estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.** A parede celular de bactérias Gram-positivas, representada à esquerda, é constituída maioritariamente por uma espessa camada de peptidoglicano ao qual se ligam ácidos teicóicos (contendo resíduos de glicerol fosfato ou ribitol fosfato). A parede celular de bactérias Gram-negativas, representada à direita, possui uma camada de peptidoglicano menos espessa que as bactérias Gram-positivas. Sobre esta camada encontra-se uma nova bicamada fosfolípida que possui polissacáridos ligados covalentemente a lípidos, formando lipopolissacáridos (LPS). Esta segunda membrana é denominada membrana externa ou simplesmente LPS. Adaptada de [20].

Os AMPs ao serem catiónicos serão mais atraídos para as membranas bacterianas, carregadas negativamente, que para as membranas de mamíferos de carga neutra o que lhes conferirá diferentes níveis de selectividade [14, 21]. Devido ao seu carácter anfipático ocorrerão primeiro interacções electrostáticas entre os resíduos básicos dos AMPs e as cabeças polares dos lípidos de membrana, podendo depois ocorrer a inserção da parte hidrófoba do péptido no interior da membrana [22]. Grande parte dos péptidos com estrutura de hélice  $\alpha$  apenas assume esta conformação após contacto com as membranas, encontrando-se numa conformação *random coil* em solução [13, 22]. Já que o primeiro passo da interacção péptido-membrana passa pela existência de interacções electrostáticas, a força iónica é um factor que diminui a acção dos AMPs uma vez que enfraquece este tipo de interacção [9].

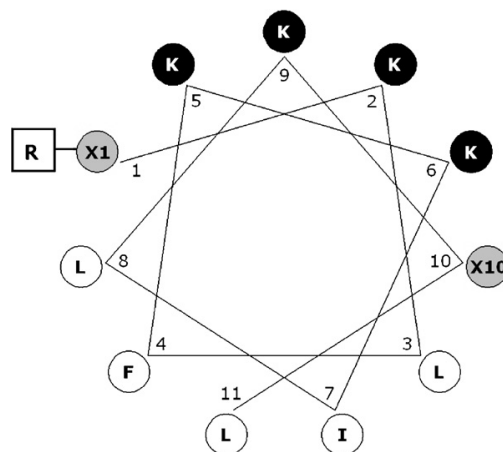
Não obstante, os AMPs têm ainda a vantagem de poderem ser aperfeiçoados por substituição de resíduos de aminoácidos [13] permitindo otimizar selectividade, toxicidade ou actividade antimicrobiana dos AMPs contra um alvo específico [10, 12]. Estudos demonstram que, por exemplo, a inserção de vários resíduos hidrófobos na sequência de

AMPs conduz a uma perda de especificidade e a um aumento de toxicidade para células de mamíferos, uma vez que facilitam a inserção do péptido na zona hidrófoba da membrana [14].

### 1.3. BP100 e novos péptidos

O BP100 (KKLFFKKILKYL-NH<sub>2</sub>) é um péptido híbrido de cecropina A e melitina com actividade comprovada contra bactérias Gram-negativas, possuindo baixa citotoxicidade e pouca susceptibilidade à degradação por proteases testadas [6]. Este péptido foi desenvolvido tendo como objectivo a obtenção de uma estrutura de hélice  $\alpha$  anfipática, isto é, com os resíduos de aminoácidos hidrófobos num dos lados da hélice e os resíduos de aminoácidos hidrófilos no outro. A representação de *Edmunson wheel* correspondente encontra-se na figura 2 [12].

Porém, este péptido não apresenta actividade contra bactérias Gram-positivas [5]. Com o intuito de desenvolver péptidos com um espectro de acção mais alargado e com uma actividade mais elevada, foram desenhados dois novos péptidos: PepRYL (RRLFRRILRYL-NH<sub>2</sub>) e PepRWL (RRLFRRILRWL-NH<sub>2</sub>). O seu desenho teve por base os resultados obtidos para o BP100, assim como, a observação de que substituições de resíduos de aminoácidos de lisina (K) por arginina (R) e de tirosina (Y) por triptofano (W) levariam a um aumento da actividade dos péptidos [5, 10]. Para comprovar o aumento do espectro de acção destes péptidos foram realizados ensaios biológicos com três bactérias cuidadosamente escolhidas.



**Figura 2 – Projeção da Edmunson wheel.** Ao desenvolver novos péptidos alterando apenas os resíduos 1 e 10 e o grupo R, originam-se novos derivados com uma estrutura de hélice perfeita, já que ao fazer o *fold*, uma face da hélice terá carácter hidrófilo (resíduos de aminoácidos com fundo negro) e a outra carácter hidrófobo (resíduos de aminoácidos com fundo branco). Retirada de [12].

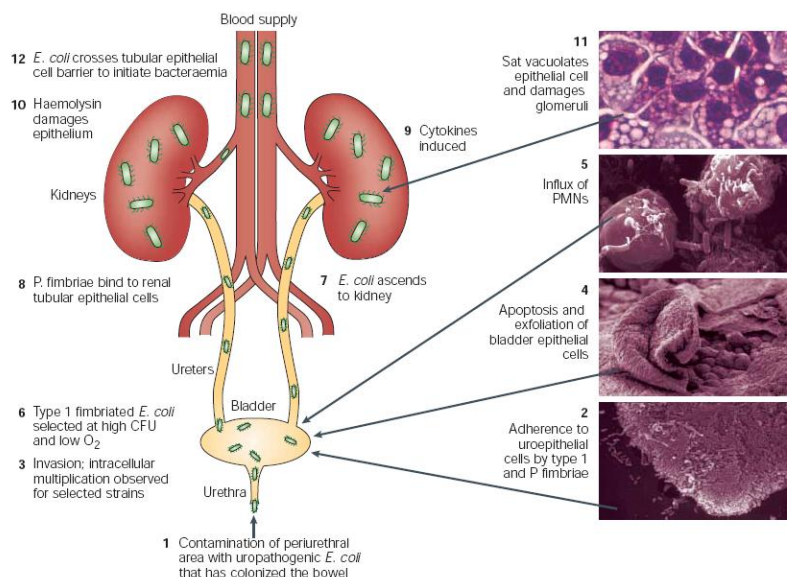
#### 1.4. *Escherichia coli*

A primeira bactéria escolhida para testar a acção dos novos péptidos desenvolvidos, foi a *Escherichia coli* (*E. coli*), pois é uma bactéria Gram-negativa, cujo crescimento é inibido pelo BP100 [5]. Deste modo, poderá testar-se a acção do BP100 em conjunto com a dos novos derivados, como forma de controlo. A sua escolha passou ainda pelo facto de, ao ser uma bactéria não fastidiosa, crescer rapidamente, sem precisar de suplementos ou condições especiais de incubação e pela sua plasticidade genética. Esta característica que torna a *E. coli* como a bactéria de eleição para protocolos de biologia molecular, torna também difícil a caracterização e distinção destas bactérias em patótipos bem definidos e, conseqüentemente, a sua erradicação [23].

A *E. coli* cresce a 37° C em condições de aerobiose, apesar de ser aeróbia facultativa [19]. Tem uma forma bacilar, flagelos que facilitam a sua movimentação e possui aproximadamente 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro [19, 24]. É o microorganismo predominante da flora intestinal, sendo proposto que a sua predominância possa ser devida à sua capacidade de utilizar o gluconato existente no cólon de uma forma mais eficiente que outras espécies aí residentes [23]. Usualmente, esta bactéria coloniza o tracto gastrointestinal de crianças poucas horas após o seu nascimento, mantendo com o hospedeiro uma relação simbiótica. Contudo, quando o indivíduo se encontra imunocomprometido ou possui as barreiras gastrointestinais normais afectadas, as estirpes de *E. coli* não patogénicas que habitam a camada mucosa do cólon podem causar infecção [25]. Para além destas estirpes, estirpes altamente evoluídas, com factores de virulência específicos são originadas por introdução de plasmídeos, fagos e transposões ou pela existência de pseudogenes. Ocorre uma adaptação das estirpes de *E. coli*, que passam a ter a capacidade de colonizar novos nichos e de provocar doenças em hospedeiros imunocompetentes. No entanto, apenas as combinações mais bem sucedidas de factores de virulência persistem, de modo a formar um patótipo específico [23]. Estes patótipos de *E. coli* são caracterizados por antígenos O (lipopolissacárido) e H (flagelos) que definem o seu serótipo [25].

Os três principais síndromes clínicos resultantes da infecção por *E. coli* são diarreia, infecções do tracto urinário e meningite [25]. A diarreia, tal como, colite e disenteria, é originada por estirpes de *E. coli* patogénicas do intestino, que colonizam o intestino humano. Já as infecções do tracto urinário e a meningite são provocadas por estirpes de *E. coli* patogénicas extraintestinais, que residem no intestino de forma assintomática, mas que

podem causar infecções severas ao atingirem os nichos extraintestinais como a corrente sanguínea ou o tracto urinário [23, 26]. Existem seis estirpes de *E. coli* patogénicas intestinais bem estudadas: enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC). Estas estirpes são normalmente responsáveis por diarreia com e sem a presença de sangue nas fezes, colite hemorrágica, síndrome hemolítico urémico (EHEC) e, ainda, colite inflamatória e disenteria (EIEC). Quanto às estirpes de *E. coli* patogénicas extraintestinais existem dois patótipos bem estudados: uropatogénica (UPEC) e associada à meningite (MNEC), responsáveis pelo aparecimento de infecções do tracto urinário e meningite, respectivamente [23, 26]. Nesta dissertação foi utilizada uma estirpe de *E. coli* com um serótipo O6 que corresponde a uma estirpe extraintestinal uropatogénica [27, 28], cujo mecanismo de acção se encontra descrito na figura 3. Os principais factores de virulência desta bactéria são factores de aderência e toxinas. Os primeiros são importantes para a colonização do hospedeiro e são, por exemplo, fímbrias específicas que consistem em filamentos proteicos mais pequenos e curtos que os flagelos. Já as toxinas são proteínas efectoras ou secretadas pelas bactérias, que afectam vários processos eucarióticos [23].



**Figura 3 – Patogênese da infecção do tracto urinário causada por *E. coli* uropatogénica.** Retirada de [23].

### 1.5. *Staphylococcus aureus*

A segunda bactéria escolhida para testar a acção dos novos derivados foi a *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), pois é uma bactéria Gram-positiva, sobre a qual o BP100 não é activo [5]. Esta, à semelhança da *E. coli*, é não fastidiosa, crescendo rapidamente sem que sejam necessárias condições especiais ou suplementação dos meios [19]. Para além disso é a principal causa de infecções hospitalares, sendo potencialmente letal [29].

A *S. aureus* possui aproximadamente 1 µm de diâmetro [30] e coloniza o tracto respiratório superior, axilas, cavidade oral, órgão reprodutor feminino e superfícies de pele lesionadas. Esta cresce a 37°C em condições de aerobiose mas à semelhança da *E. coli*, é aeróbia facultativa, [19]. As colónias de *S. aureus* possuem a forma de *coccus*, com uma pigmentação dourada. A infecção causada por estas bactérias é a principal responsável pelo aparecimento do Síndrome do Choque Tóxico, um síndrome potencialmente letal, que pode levar à falência de órgãos vitais. Pode também originar endocardite infecciosa (i.e. infecção do endocárdio) mas, de uma forma geral, provoca bacteriémia que consiste na presença de bactérias na corrente sanguínea. Contudo, quando a concentração bacteriana é muito elevada para que os glóbulos brancos sejam eficazes, esta condição pode evoluir para sépsis ou, em caso extremo, para choque séptico, uma situação potencialmente letal [29].

Os factores responsáveis pela virulência desta bactéria são o peptidoglicano, proteínas de superfície ou secretadas, enzimas e toxinas. O peptidoglicano, constituinte da parede celular, actua como endotoxina estimulando a libertação de citocinas pelos macrófagos, a activação do complemento e a agregação de plaquetas. A existência de uma expressão sequencial de genes permite a regulação da expressão de proteínas de superfície ou excretadas. Assim, as proteínas de superfície são sintetizadas durante a fase exponencial de crescimento, onde durante a fase inicial de infecção, contribuem para uma colonização eficaz do hospedeiro ao actuarem como adesinas (proteínas que reconhecem certas moléculas presentes na superfície das células às quais se ligam). Por outro lado, as proteínas secretadas são sintetizadas posteriormente, durante a fase estacionária, onde favorecem a expansão da infecção para os tecidos adjacentes. Para além destes factores, a *S.aureus* possui ainda enzimas como proteases, lipases e hialuronidasas que destroem tecidos do hospedeiro contribuindo para a expansão da infecção aos tecidos adjacentes. Porém, os principais factores de virulência desta proteína são as toxinas. Estas são responsáveis pelo aparecimento de

febres altas, choque e disfunção de vários órgãos devido à libertação de excessivas quantidades de citocinas [29].

Estima-se que 30-50% de adultos saudáveis estejam colonizados com *S. aureus* e que destes, 10-20% estejam persistentemente colonizados. O risco de infecção é maior para doentes com diabetes tipo-I, doentes infectados com HIV, assim como para doentes submetidos a hemodiálise ou intervenções cirúrgicas [29]. Ao longo das últimas décadas, o número de pessoas infectadas tem aumentado paralelamente com o aumento do uso de dispositivos intravasculares como cateteres [29, 31]. O principal modo de transmissão da bactéria é por contacto com profissionais de saúde que estejam infectados de forma transiente com a bactéria mas, também, e embora em menor escala, pelo contacto com fontes ambientais da bactéria ou com pessoas infectadas. A principal e mais problemática resistência a antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *S. aureus* é a resistência à meticilina que origina as denominadas estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) [31-33].

### 1.6. *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi a terceira bactéria escolhida devido ao seu impacto na saúde mundial. Estima-se que metade da população do planeta esteja infectada com *H. pylori*, sendo uma das infecções crónicas mais difundidas do mundo. Em Portugal, em 1993, estimava-se que uma taxa de 80% da população com idade superior a 15 anos estivesse infectada [34]. Todos os indivíduos colonizados desenvolvem inflamação crónica gástrica que é normalmente assintomática, mas em 10-20% dos casos a doença gastroduodenal desenvolve-se podendo originar úlceras gástricas ou duodenais e gastrite atrófica que é uma pré-condição para o aparecimento de cancro gástrico [35]. Em 1994, o grupo de trabalho da Organização Mundial de Saúde para avaliação de riscos carcinogénicos para o homem, declarou a infecção por *H. pylori* um carcinogénico humano [34]; no início de 2000, o cancro gástrico era a segunda forma de cancro mais comum em todo o mundo [36, 37].

A *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa, com uma forma helicoidal, com um diâmetro entre 0,5 e 1  $\mu\text{m}$  e com um comprimento entre 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ . Forma colónias translúcidas, não pigmentadas, crescendo a 37 °C em condições de microaerofilia [34, 38]. Como se trata de uma bactéria fastidiosa, os seus meios de cultura são normalmente suplementados com sangue (meios sólidos) ou soro (meios líquidos), de forma a enriquecer o seu nível de nutrientes [39-41]. Coloniza exclusivamente o epitélio gástrico humano,

localizando-se normalmente na mucosa antral do estômago sob a camada mucosa, à superfície das células epiteliais [34, 36]. Esta possui a capacidade de adquirir uma forma de *coccus* quando as condições do ambiente em que se encontra não são as mais favoráveis. Tem vindo a ser discutido ao longo da última década se esta transformação seria uma estratégia de sobrevivência, ou uma forma degradada da bactéria. Contudo, estudos recentes apontam para que a forma *coccus* de *H. pylori* se encontre num estado viável mas não-cultivável, denotando que esta transformação consiste numa manifestação da adaptação da bactéria a condições menos favoráveis [42]. A difícil erradicação desta bactéria deve-se ao grande número de organismos *H. pylori* no estômago, o que provoca um aumento da concentração mínima inibitória de fármaco necessária, assim como, à existência de um pH ácido no estômago que pode provocar a diminuição do efeito dos fármacos. Deve-se também à observação de que uma proporção destes organismos se encontra ligada às células da mucosa gástrica, formando um biofilme, e de que outras se encontram no interior das células, ficando inacessíveis a diversos antibióticos [43]. A principal via de transmissão da infecção por *H. pylori* é a via gastro-oral, devido ao uso de sondas gástricas infectadas ou ao contacto com secreções gástricas [34].

Ao contrário daquilo que seria de esperar, a *H. pylori in vitro* possui um pH óptimo de crescimento entre 6 e 7. Esta observação justifica-se pelo facto desta bactéria ser um microrganismo neutrófilo que se adapta ao ambiente ácido do estômago. Esta adaptação encontra-se dependente de vários mecanismos, sendo o principal a existência de um urease, responsável pela degradação da ureia em amoníaco e CO<sub>2</sub>, criando um microambiente neutro em torno da bactéria [34, 44]. Estes mecanismos de adaptação ao pH ácido do estômago são os seus principais factores de virulência já que lhe permitem colonizar a mucosa gástrica. No entanto, o facto de possuir 5-7 flagelos cujo centro se encontra envolto numa bainha (constituída por uma dupla camada fosfolipídica) que os protege da acidez gástrica e adesinas, que lhe permite aderir aos tecidos do hospedeiro são também factores de virulência importantes para a colonização do hospedeiro. Para além destes factores também outros enzimas, o LPS, a citotoxina vacuolizante (VacA) e a ilha de patogenicidade *cag* são importantes e indispensáveis factores de virulência. Assim, a *H. pylori* possui os enzimas superóxido dismutase, catalase e alquilhidroperóxido reductase responsáveis pela resistência da bactéria às espécies reactivas de oxigénio, para além do urease que, em adição ao seu papel na adaptação da bactéria ao pH, pode ainda ter uma acção tóxica directa ou indirecta sobre o epitélio gástrico. Já a fracção glicoproteica do LPS, constituinte da parede celular, possui



homologia estrutural com as cadeias oligossacáridas dos antígenos Lewis<sup>x</sup> e Lewis<sup>y</sup>, podendo induzir uma resposta auto-imune contra as células parietais humanas, responsáveis pela secreção de ácido gástrico no estômago. A VacA é responsável pela indução de vacuolização em células epiteliais gástricas e do processo de apoptose em mitocôndrios por activação da caspase-3. Por fim, a ilha de patogenicidade *cag* possui aproximadamente 30 genes que codificam uma série de proteínas implicadas na virulência de estirpes de *H. pylori*, sendo a mais estudada a CagA [34]. A presença da ilha de patogenicidade *cag* determina a virulência das estirpes, denominando-se por estirpes de tipo I (*cag*<sup>+</sup>,*VacA*<sup>+</sup>) as estirpes mais virulentas e por estirpes de tipo II (*cag*<sup>-</sup>,*VacA*<sup>-</sup>) as menos virulentas [34, 36].

### 1.7. Objectivos

Esta dissertação teve como objectivo o desenvolvimento de péptidos antimicrobianos melhorados, isto é, com um alargado espectro de acção e uma elevada actividade antibacteriana. Teve ainda como objectivo, o estudo do mecanismo de acção destes AMPs e a determinação da sua citotoxicidade.

De forma a verificar e quantificar a acção de PepRYL e PepRWL sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foram realizados ensaios de determinação da concentração mínima inibitória (MIC) sobre *E. coli*, *H. pylori* (bactérias Gram-negativas) e *S. aureus* (bactéria Gram-positiva). Após quantificação da sua actividade, foram realizados estudos de microscopia de força atómica com o intuito de comprovar visualmente os resultados obtidos com a determinação das MICs. Para estudar o mecanismo de acção destes péptidos foram usados modelos membranares artificiais, sendo a interacção péptido-membrana estudada por recurso a espectroscopia de fluorescência e dícroísmo circular. Com o intuito de determinar a citotoxicidade destes péptidos foi realizado um teste de hemólise utilizando eritrócitos humanos. Em paralelo foram sempre estudados os péptidos BP100 e Sub3 (RRWRIVVIRVRR-NH<sub>2</sub>) como controlo. A acção selectiva do BP100 sobre bactérias Gram-negativas encontra-se bem documentada e o Sub3 é um péptido com actividade comprovada contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, nomeadamente *E. coli* e *S. aureus*.

## 2. Materiais e métodos

Para todos os ensaios realizados nesta dissertação foi utilizado material corrente de laboratório como micropipetas eppendorf de 0.5-10  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,01 \mu\text{L}$ ), 2-20  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,02 \mu\text{L}$ ), 10-100  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,1 \mu\text{L}$ ), 20-200  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,2 \mu\text{L}$ ), e 100-1000  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,5 \mu\text{L}$ ), pipetas de vidro graduadas, pipetador automático (Pipetboy, Integra Biosciences), balões de fundo redondo, gobelés, espátulas, agitadores magnéticos, placas de aquecimento, vórtex e varetas.

### 2.1. Síntese de péptidos

Os péptidos utilizados neste estudo, BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3, foram sintetizados no *Institute for Molecular Bioscience – The University of Queensland*, de acordo com a colaboração existente, segundo o método descrito em [45]. De uma forma resumida, os péptidos foram sintetizados segundo o processo de síntese peptídica de fase sólida, em que os péptidos precursores se ligam a uma resina de polietileno glicol-poliestireno (PEG) através de um resíduo de lisina. Nesta síntese utilizou-se um sintetizador de péptidos automático (CEM microwave peptide synthesizer, Liberty). A pureza dos péptidos foi confirmada por HPLC analítico de fase reversa. Péptidos com uma pureza  $\geq 95\%$  foram utilizados nos ensaios *in vitro*. A concentração das soluções stocks foi determinada através da absorvência a 280 nm considerando como coeficiente de extinção molar os valores presentes na Tabela 1. O aparelho Nanodrop (ND-1000 Thermo Scientific) foi utilizado para a leitura das absorvências.

**Tabela 1 – Sequência peptídica dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 e respectivos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ).**

Péptido	Sequência	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
<b>BP100</b>	KKLFFKILKYL	1490
<b>PepRYL</b>	RRLFRRILRYL	1490
<b>PepRWL</b>	RRLFRRILRWL	5500
<b>Sub3</b>	RRWRIVVIRVRR	5500

## 2.2. Ensaio biológicos

Para determinar a acção dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 sobre as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *H. pylori* foram realizados ensaios de determinação da concentração mínima inibitória (MIC). Para este efeito, foi utilizada uma estirpe de *E. coli* da *American Type Culture Collection* (ATCC 25922) que corresponde a uma estirpe extraintestinal uropatogénica [27], uma estirpe de *S. aureus* ATCC 25923, sensível à meticilina [46] e uma estirpe de *H. pylori* de tipo I, isolada de uma paciente de 17 anos com úlcera duodenal. Esta estirpe apresenta multi-resistência aos antibióticos usualmente utilizados no tratamento da infecção por *H. pylori*. As estirpes de *E. coli* e *S. aureus* foram cedidas pela Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção do Instituto de Medicina Molecular e a estirpe de *H. pylori* foi cedido pela Doutora Mónica Oleastro do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

As medidas de absorvância realizadas para seguir a densidade óptica (OD) das culturas bacterianas, foram efectuadas nos espectrofotómetros Genesys 10 UV Thermo Spectronic ou Thermo Scientific, em *cuvettes* de plástico descartáveis (Brand). As suspensões bacterianas foram realizadas em tubos de vidro autoclaváveis ou em frascos *falcon* estéreis de 15 mL (Corning).

### 2.2.1. Optimização do crescimento

Para seguir o crescimento da bactéria *S. aureus* nos dois meios de cultura líquidos utilizados, Mueller Hinton Broth (MHB) e Brucella Broth (BB), a OD a 600 nm foi seguida aproximadamente durante 12 horas e o ponto médio do crescimento exponencial da bactéria *S. aureus* determinado. Para correlacionar OD com o número de unidades formadoras de colónias por mL (cfu/mL) plaquearam-se diferentes diluições da suspensão de *S. aureus* em placas de meio Mueller Hinton ágar (MHA) ou Brucella ágar (BA) e contaram-se as colónias. Deste modo, obteve-se como ponto médio do crescimento exponencial o valor de OD a 600 nm de 0,319 que corresponde aproximadamente a  $2,74 \times 10^8$  cfu/mL para a *S. aureus* em MHB (Oxoid) e de 0,563 que corresponde a aproximadamente  $3,2 \times 10^8$  cfu/mL em BB (Remel) (Ver Anexo A). Este procedimento foi realizado apenas para a *S. aureus* pois para a *E. coli* a relação OD (600nm) – cfu/mL de 0,1 para aproximadamente  $2 \times 10^8$  cfu/mL, tinha sido estimada anteriormente [5]. Como a *H. pylori* possui condições de crescimento muito rigorosas e um crescimento mais lento, a correlação OD-cfu/mL não foi estimada no nosso

laboratório. Deste modo, considerou-se que uma OD a 600 nm de 1 corresponde a aproximadamente  $5 \times 10^8$  cfu/mL, conforme publicado anteriormente [47].

### 2.2.2. Crescimento bacteriano

Para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* semearam-se placas de MHA (Oxoid) ou BA (Remel) a partir da solução *stock* de bactéria. Para realizar este procedimento, uma ança (Sarstedt) foi mergulhada na solução *stock*, sendo depois a suspensão espalhada sobre as placas de meio de cultura sólido pelo método de esgotamento do inóculo (Ver Anexo C). Estas placas foram posteriormente incubadas entre 18 a 24 horas, a 37°C, numa incubadora Incu-Line IL53. Após incubação, foram retiradas com uma ança, três a cinco colónias de *E. coli* ou *S. aureus* que foram, de seguida, ressuspendidas em 5 mL de meio líquido (MHB ou BB). Os tubos com estas suspensões foram então incubados até que estas atingissem a OD a 600 nm de 0,319 ou 0,563 para a *S. aureus* (aproximadamente 6 horas) e de 0,1 para a *E. coli* (aproximadamente 2 horas). Ao atingirem a OD pretendida, estas suspensões foram diluídas pelo método das diluições sucessivas até aproximadamente  $2 \times 10^5$  cfu/mL no caso da *E. coli* e de aproximadamente  $2 \times 10^6$  cfu/mL no caso da *S. aureus*. Foi necessária a utilização de uma concentração superior de *S. aureus* pois esta bactéria apresenta um crescimento menor e mais incerto que *E. coli*, sendo necessário este aumento para que as duas bactérias apresentem valores de OD semelhantes, na ausência de péptido.

Para a *H. pylori* este processo teve de ser ligeiramente alterado, pois esta necessita de condições de crescimento específicas. Assim, placas de meio selectivo para a *H. pylori* (Biogerm) foram semeadas a partir da solução *stock* guardada a -80°C como descrito acima para as restantes bactérias. Estas são colocadas dentro de uma caixa de anaerobiose (Genbox, Biomérieux), na presença de uma saqueta geradora de atmosfera de microaerofília (Genbox microaer, Biomérieux), que consiste numa atmosfera com 5% de O<sub>2</sub> e 10% de CO<sub>2</sub>. Estas são deixadas a incubar na estufa a 37°C durante 4 dias sendo depois as colónias recolhidas com uma ança e suspensas em meio líquido BB suplementado com 10% (v/v) de soro de cavalo (Oxoid). A suspensão obtida é então espalhada sobre novas placas de meio selectivo para a *H. pylori* e são colocadas a incubar sob as mesmas condições. Ao fim de 2 dias as colónias apresentam uma massa uniforme e brilhante que será recolhida com recurso a zaragatoas (VWR) e suspensa em meio BB suplementado com 10% de soro de cavalo, até que seja

obtida uma OD a 600 nm aproximadamente de 0,25 (que corresponde a aproximadamente a  $1,25 \times 10^8$  cfu/mL).

Os meios de cultura (líquidos ou sólidos) foram preparados no laboratório, recorrendo a placas de petri estéreis (Normax) e água destilada, com excepção do meio de cultura sólido para a *H. pylori* que foi adquirido da empresa Biogerm. A constituição dos meios de cultura, assim como o seu modo de preparação, encontram-se descritos no Anexo B.



**Figura 4 – Fotografias de crescimento bacteriano de *E. coli* (esquerda), *S. aureus* (centro) e *H. pylori* (direita) em meio sólido.**

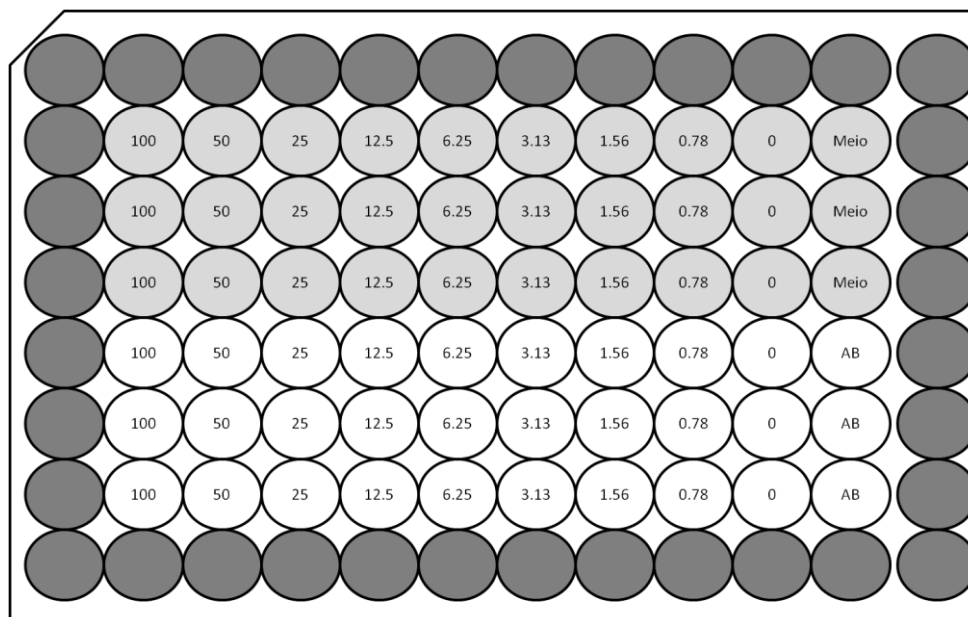
### 2.2.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias

A determinação da MIC consiste na determinação da concentração mínima de péptido necessária para inibir o crescimento das bactérias em estudo [48]. Deste modo, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foi utilizado o método de microdiluição em meio. Neste método, são adicionadas concentrações decrescentes de péptido através de uma diluição seriada de base 2 a uma suspensão de bactérias com um número determinado de cfu/mL. Assim, numa placa de 96 poços de polipropileno (Costar 3879), 15  $\mu$ L de péptido com as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8  $\mu$ M foram adicionados a 135  $\mu$ L de suspensão bacteriana com  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^6$  cfu/mL para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, de forma a obter as concentrações finais de péptido de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78  $\mu$ M. Como branco utilizou-se 15  $\mu$ L de água millipore autoclavada e como controlo positivo 15  $\mu$ L de um antibiótico, previamente filtrado à chama (filtros VWR, com membrana de poliétersulfona com um poro de 0,22  $\mu$ m e seringas estéreis de 5 mL BD Discardit™ II). Tetraciclina (Sigma-Aldrich) foi o antibiótico utilizado contra a *E. coli* e a kanamicina

(Sigma-Aldrich) foi utilizada como controlo positivo contra a *S. aureus*. A concentração de antibiótico final utilizada foi de 10 µg/mL (22,5 µM no caso da tetraciclina e 18,9 µM no caso da kanamicina). Em cada placa estava também presente um poço com meio de cultura (135 µL de meio com 15 µL de água millipore autoclavada), sendo o valor obtido depois descontado aos valores obtidos para os poços com suspensão bacteriana na presença ou ausência de péptido. Em cada placa, os testes realizados com diferentes concentrações de péptidos e controlos foram realizados em triplicado, como esquematizado na figura 5.

Os valores de OD a 600 nm foram obtidos por leitura das placas num leitor de microplacas Infinite M200 da Tecan. Uma vez que este leitor não possui as pré-definições necessárias para a leitura do conteúdo presente em placas de polipropileno, o conteúdo de todas as placas foi transferido para placas de 96 poços de poliestireno (TPP 92096), antes da leitura. A incubação da suspensão bacteriana com as diferentes concentrações de péptidos decorreu em placas de polipropileno, pois não ocorre a adsorção dos péptidos à superfície da placa. Pelo contrário, em placas de poliestireno, a carga positiva dos péptidos em estudo levaria à sua adsorção na superfície das placas devido à carga negativa característica deste tipo de plástico. Cada ensaio foi realizado três vezes de forma independente, isto é, em diferentes dias.

No caso da *H. pylori*, numa placa de 6 poços (Nunc, Nunclon™), a 4,5 mL de suspensão bacteriana com aproximadamente  $1,25 \times 10^8$  cfu/mL foram adicionados 500 µL de péptido a 100 µM ou de diferentes concentrações de tetraciclina (1, 10, 50 e 100 µg/mL). A tetraciclina foi o antibiótico escolhido pois as resistências a este antibiótico são raras [49, 50]. Cada um dos poços foi preparado em triplicado, não tendo estes ensaios sido ainda repetidos devido à necessidade de otimizar as condições experimentais dos mesmos. A leitura das amostras foi realizada em *cuvettes* de plástico descartáveis nos espectrofotómetros mencionados acima. Nestes ensaios foram utilizadas placas de 6 poços, ao invés de placas de 96 poços, pois foi necessário um volume superior de suspensão bacteriana, para que ocorresse o crescimento significativo de *H. pylori*.



**Figura 5 – Esquema representativo do conteúdo das placas de 96 poços utilizadas para a determinação das concentrações mínimas inibitórias.** A cinzento escuro encontram-se representados os poços em que não ocorre qualquer adição, pois são os que apresentam uma maior variabilidade aquando da leitura no leitor de microplacas. A cinzento claro encontra-se representado o conteúdo para um dos péptidos e a branco o conteúdo para o outro péptido, a ser testado na placa. As concentrações de péptidos apresentadas encontram-se em  $\mu\text{M}$ . AB, antibiótico.

#### 2.2.4. Tratamento dos resultados

Os resultados de OD a 600 nm foram convertidos em percentagem de sobrevivência e as três médias dos triplicados de cada placa foram ajustados no programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, pela equação *Sigmoidal dose-response (variable slope)* (equação 1), com a constrição de mínimo (*Bottom*) igual a 0% e máximo (*Top*) igual a 100%, de forma a retirar o valor de  $\text{MIC}_{50}$  (50% de sobrevivência):

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot H}} \quad \text{Equação 1}$$

em que  $H$  é o declive de Hill e  $EC_{50}$  representa o valor de concentração de péptido necessária para que haja apenas 50% de sobrevivência. Para calcular o valor da  $\text{MIC}_{90}$  (10% de sobrevivência) foi utilizada a equação 2:

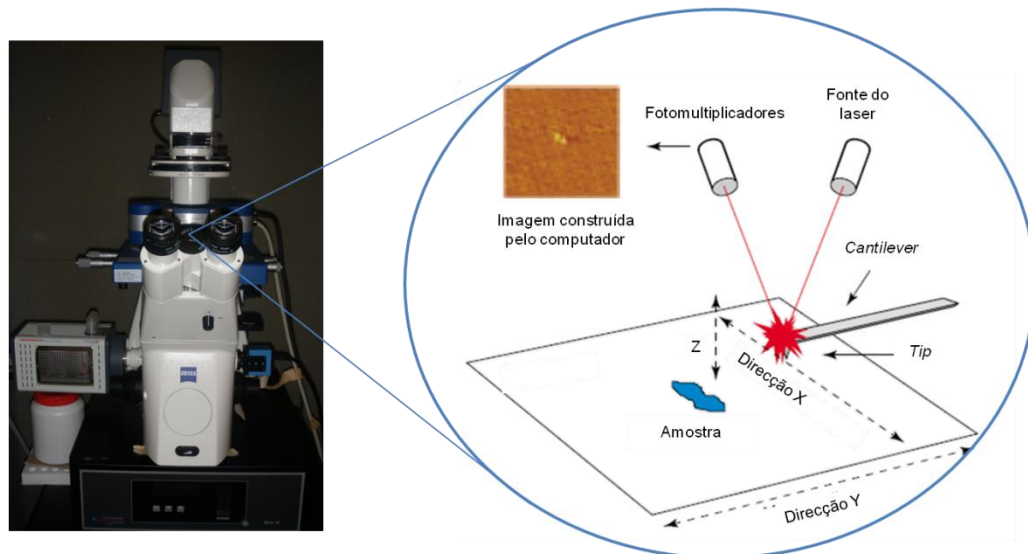
$$EC_S = \left( \frac{S}{100 - S} \right)^{1/H} \times EC_{50} \quad \text{Equação 2}$$

em que  $S$  é igual à percentagem de sobrevivência pretendida. Os valores de  $H$  e  $EC_{50}$  utilizados foram obtidos a partir do ajuste realizado para calcular o valor da  $MIC_{50}$ . Os valores de  $MIC_{100}$  foram obtidos por observação directa dos valores de percentagem de sobrevivência.

### 2.3. Microscopia de força atómica (AFM)

A microscopia de força atómica foi desenvolvida com o objectivo de medir forças interactivas entre moléculas à escala do átomo [51]. Este objectivo foi atingido e, hoje em dia, é uma potente ferramenta com elevada relevância nas ciências biológicas, permitindo o estudo da carga e hidrofobicidade superficiais, assim como, de propriedades mecânicas de moléculas através da utilização de espectroscopia de força. Esta técnica permite ainda a obtenção de imagens tridimensionais da superfície de moléculas com uma resolução a nível molecular, em tempo real, sob condições aproximadamente fisiológicas [52]. De forma a obter estas imagens tridimensionais uma *tip* que se encontra na ponta de um *cantilever* percorre a superfície da amostra em estudo. À medida que esta *tip* é repelida ou atraída pela superfície da amostra, o mesmo ocorre com o *cantilever*. Uma vez que um raio laser se encontra reflectido na ponta do *cantilever*, ocorrerá deflecção. A magnitude desta deflecção será registada pela mudança de direcção do raio e detectada por um conjunto de fotomultiplicadores, podendo então construir-se a imagem (figura 6). De forma a obter estas imagens poder-se-iam utilizar dois métodos: o método de contacto, em que a *tip* se encontra em contacto com a amostra, ou o método de contacto intermitente, em que a *tip* oscila rapidamente por cima da amostra. As imagens tridimensionais da superfície das bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram obtidas utilizando o método de contacto intermitente, já que este método exerce menos força lateral sobre a amostra, não danificando as células bacterianas [51, 53].





**Figura 6 – Esquema do modo de funcionamento da microscopia de força atômica.** Um raio laser incide sobre a ponta do *cantilever*. Uma vez que o *cantilever* irá oscilar, com a oscilação da *tip* sobre a amostra, ocorrerá a deflexão deste raio laser. O conjunto de fotomultiplicadores irá detectar a magnitude desta deflexão, dando as informações necessárias para a construção da imagem pelo computador. Imagem adaptada de [51].

### 2.3.1. Preparação das amostras

As suspensões de *E. coli* e *S. aureus* foram obtidas seguindo o mesmo protocolo descrito na secção *Crescimento bacteriano* (pág.14), sendo MHA o meio sólido e MHB o meio líquido utilizados. Após atingirem a OD pretendida, 1 mL de suspensão bacteriana foi centrifugado três vezes (Eppendorf mini spin), sendo de cada uma das vezes substituído com tampão PBS 1× (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) filtrado à chama (filtros VWR, com membrana de polietersulfona com um poro de 0,22 µm e seringas estéreis de 5 mL BD Discardit™ II). As centrifugações decorreram durante 8 minutos para a *E. coli* e 30 minutos para a *S. aureus* a 13 000 rpm. Após ressuspender o último precipitado em tampão foram preparados tubos eppendorf com 15 µL de péptido, ou água no caso do controlo, e com 135 µL da suspensão bacteriana com aproximadamente  $2 \times 10^7$  cfu/mL. As concentrações de BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 utilizadas foram de 1, 10 e 100 µM.

As amostras incubaram durante duas horas na estufa (Incline IL53) e, posteriormente, 100 µL de cada amostra foram depositados sobre slides de vidro revestidos com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Este revestimento confere uma carga positiva ao slide, permitindo a fixação das células bacterianas que possuem carga superficial negativa. Deixou-

se sedimentar durante 20 minutos a 25°C, lavando-se, de seguida, por 10 vezes a amostra com água millipore. Deixou-se secar ao ar.

### 2.3.2. Obtenção e tratamento das imagens

As imagens foram obtidas utilizando um aparelho JPK Nano Wizard II, montado sobre um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200, utilizando *cantilevers* de silicone, não revestidos ACL (Applied NanoStructure). Estes *cantilevers* possuem uma frequência entre 145 e 230 kHz e uma constante de oscilação de 45 N/m. O modo de obtenção de imagens utilizado foi o modo de contacto intermitente e foram guardadas as imagens de altura, erro e de mudança de fase. Em média, foram obtidas cinco imagens provenientes de duas zonas diferentes de cada amostra, com uma área total de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ . As imagens de altura foram tratadas no programa JPK data processing, sendo posteriormente realizadas projecções ortogonais das mesmas no programa Gwyddion (versão 2.24). Informações sobre altura e tamanho foram também obtidas por recurso ao programa JPK data processing.

### 2.3.3. Tratamento dos dados de rugosidade e inchaço

Para tratar os dados de rugosidade foram utilizadas as imagens de altura. Deste modo, no programa Gwyddion foi empregue um filtro de valores médios para estimar a forma da bactéria. Este filtro permite estimar a forma geral da bactéria pois assume como valor, o valor da média dos valores vizinhos, isto é, para cada ponto avaliado este será substituído pelo valor da média dos pontos vizinhos, dando origem à forma geral da bactéria. Por subtracção da imagem obtida à imagem de altura original, obteve-se uma imagem achatada em que as únicas elevações são as rugosidades existentes na bactéria. A rugosidade de uma parte da imagem, neste caso de toda a bactéria, foi então calculada através do desvio padrão da altura, isto é do valor da média quadrática ou *root mean square* da altura ( $R_{\text{rms}}$ ), segundo a equação 3:

$$R_{\text{rms}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_i - z_m)^2}{(N-1)}} \quad \text{Equação 3}$$

em que,  $N$  é o total de imagens consideradas,  $z_i$  é a altura do ponto  $i$  e  $z_m$  é a média da altura [5]. A rugosidade foi determinada em áreas com uma dimensão fixa de  $125 \times 125 \text{nm}^2$ . A média dos valores de rugosidade para cada amostra foi calculada no programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, utilizando uma ANOVA unidireccional para determinar estatisticamente a variância

das médias entre os diferentes grupos. De modo a determinar quais os grupos de médias cuja diferença observada é significativa foi utilizado o teste de Bonferroni, que permite a comparação de diversos conjuntos de dados, que podem ou não possuir o mesmo tamanho. Este teste permite ainda a eliminação de falsos positivos [54, 55]. O tratamento para os dados de inchaço foi idêntico, com omissão do passo de subtração da imagem submetida ao filtro à imagem de altura original, sendo utilizada a imagem da forma geral da bactéria ao invés da imagem achatada. Desta forma, apenas será avaliado o inchaço da bactéria, já que ao submeter a imagem ao filtro, a rugosidade deixa de ser um factor.

### 2.1. Ensaio hemolítico

A citotoxicidade dos péptidos em estudo em relação a células humanas foi avaliada pela sua capacidade hemolítica. Para este fim, isolaram-se eritrócitos a partir de sangue fresco. 4 a 5 gotas de sangue suspensas em 1 mL de PBS foram centrifugadas (Eppendorf mini spin) a 4000 g durante 1 minuto, para isolar os eritrócitos. O sobrenadante foi removido e os eritrócitos ressuspensos em 1 mL de PBS. Este último passo foi repetido 3 vezes. De seguida foi preparada uma solução de 0,25% (v/v) de eritrócitos em PBS. Numa placa de 96 poços de polipropileno (Costar 3879), foram adicionados 100 µL desta solução e 20 µL das diferentes concentrações de péptido testadas (concentrações finais de péptidos: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 e 0,39 µM). Como controlo negativo e positivo foram adicionados 20 µL de PBS e 20 µL de Triton X-100 1% (v/v) a 100 µL da solução de eritrócitos, respectivamente. Todos os poços foram realizados em triplicado em cada placa, à semelhança do realizado para o ensaio de determinação de MICs. As placas foram colocadas a incubar a 37°C durante 1 hora na estufa Incu-line IL53 e, posteriormente, centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm (Heraeus, Multifuge 1<sub>L-R</sub>). O sobrenadante foi retirado para placas de 96 poços de poliestireno (TPP 92096) e efectuou-se a leitura das mesmas no leitor de microplacas (Tecan, Infinite M200) a 415 nm. Este comprimento de onda corresponde ao comprimento de onda para o qual é visível o máximo de absorvância da hemoglobina, que é libertada por hemólise dos eritrócitos.

Assumindo que as amostras com Triton X-100 1% (v/v) representam 100% de lise e que as amostras com PBS 0% de lise, foi calculada a percentagem de hemólise, segundo a equação 4:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{PBS}})}{(A_{\text{Triton}} - A_{\text{PBS}})} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

em que  $A_{amostra}$  representa a absorvância da amostra,  $A_{PBS}$  a absorvância do controlo com PBS e  $A_{Triton}$  a absorvância do controlo com Triton X-100 1% (v/v) [56]. De forma a determinar a concentração de péptido necessária para lisar 50% dos eritrócitos, procedeu-se a uma regressão não-linear no programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, utilizando a equação *Sigmoidal dose-response (variable slope)* (equação 1, pág. 17), com a constrição de mínimo igual a 0% e máximo igual a 100%. Os valores de percentagem de hemólise, obtidos pela média dos triplicados presentes na placa de 96 poços, foram os valores utilizados para a realização da regressão não-linear.

Foi também calculado o índice terapêutico dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3. Este índice consiste na razão entre a concentração de péptido necessária para causar 50% de hemólise e a MIC<sub>50</sub> obtida para o péptido em estudo, nas diferentes condições estudadas.

## 2.2. Espectroscopia de fluorescência

As moléculas têm vários níveis electrónicos de energia, existindo diversos níveis vibracionais em cada nível electrónico. Na espectroscopia de fluorescência, um raio de luz ultravioleta excita os electrões das moléculas, que passam do estado fundamental de energia para um dos estados vibracionais de um nível electrónico de energia superior (estado excitado). Colisões com outras moléculas provocam a perda de energia vibracional e as moléculas atingem o nível vibracional de menor energia do estado electrónico excitado. Ao emitir um fóton a molécula decai até um dos níveis vibracionais do estado electrónico fundamental. Como as moléculas podem decair até níveis vibracionais diferentes, os fótons terão energias diferentes e, portanto, frequências diferentes. Deste modo, ao analisar as diferentes frequências e intensidades da luz emitida, a estrutura dos diferentes níveis vibracionais pode ser determinada [57]. Assim sendo, esta espectroscopia tem uma elevada relevância no estudo de péptidos, que podem possuir fluoróforos intrínsecos como é o caso dos resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (únicos resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais aromáticas absorvem ou emitem radiação na zona ultravioleta), ou extrínsecos, por acoplação de um cromóforo fluorescente [57, 58]. Contudo, a emissão de radiação pelos resíduos de fenilalanina raramente é detectável devido a baixos

valores de rendimento quântico e coeficiente de absorção molar, para além da proximidade de resíduos de aminoácidos com a capacidade de diminuir a intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência emitida pelo resíduo de tirosina também é ligeiramente afectada por estes factores, sendo o resíduo de triptofano o mais sensível às mudanças no microambiente que o rodeia [57].

Todos os espectros de fluorescência (emissão e excitação) foram obtidos num espectrofluorímetro Edinburgh FS900, em *cuvettes* de quartzo (Hellma) com um percurso óptico de 0,5 cm, utilizando o tampão HEPES 10 mM com NaCl 150 mM e pH 7,4 (Reagentes Merck, água millipore). O pH e a concentração de NaCl foram escolhidos com o intuito de mimetizar as condições fisiológicas. Neste estudo não foi tomada em conta a intensidade de fluorescência proveniente do resíduo de fenilalanina presente nos péptidos BP100, PepRYL e PepRWL pelos motivos descritos acima. Os espectros recolhidos em todos os ensaios foram tratados no programa Microsoft Office Excell 2007, à excepção das regressões não-lineares (p.e. curvas de partição) que foram realizadas no programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. Como controlo foram utilizadas soluções dos resíduos de aminoácidos livres L-tirosina (Sigma) e L-triptofano (Merck).

### **2.2.1. Efeito da concentração e caracterização espectral**

Para avaliar o efeito da concentração dos péptidos em estudo, BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3, em solução aquosa, foram adicionadas concentrações crescentes de péptido a 500 µL de tampão HEPES. Os comprimentos de onda de excitação utilizados são aqueles para os quais existe um máximo de absorção dos péptidos: 274 nm para BP100 e PepRYL que possuem um resíduo de tirosina e de 280 para PepRWL e Sub3 que possuem um resíduo de triptofano. Geralmente, a baixas concentrações de fluoróforo, a intensidade de fluorescência é directamente proporcional à concentração de fluoróforo. Contudo, em amostras com elevadas concentrações de fluoróforo, a intensidade da luz de excitação não é constante através de toda a solução, ocorrendo absorção da luz incidente assim como de fotões emitidos por outras moléculas de fluoróforos. Assim, apenas uma pequena percentagem de luz de excitação atinge

os fluoróforos que estão no centro da *cuvette* e, portanto, são visíveis para o sistema de detecção. Este efeito é conhecido pelo efeito de filtro interno. Uma vez que neste ensaio é aumentada a concentração de péptido até concentrações elevadas, foi medida a absorção ao comprimento de onda usado, de modo a corrigir os valores obtidos para o efeito de filtro interno. Esta correcção é realizada tendo em conta a equação seguinte:

$$I_c = I \times 10^{A/2} \quad \text{Equação 5}$$

em que  $I_c$  é a intensidade de fluorescência corrigida,  $I$  é a intensidade de fluorescência medida e  $A$  o valor de absorvância para o comprimento de onda de excitação [59]. Foram escolhidas as concentrações de 50  $\mu\text{M}$  para os péptidos BP100 e PepRYL e de 15  $\mu\text{M}$  para os péptidos PepRWL e Sub3, para os ensaios subsequentes, tendo em conta os resultados obtidos para o efeito da concentração e que os valores escolhidos possuem um valor de absorvância para o máximo de absorção inferior a 0,1. Estas concentrações foram escolhidas de modo a obter uma boa razão sinal/ruído, com baixo efeito de filtro interno. A concentração para os péptidos BP100 e PepRYL é superior para os péptidos PepRWL e Sub3 pois, tal como referido anteriormente, a intensidade de fluorescência emitida pelo resíduo de tirosina é menor que a emitida pelo resíduo de triptofano sendo, portanto, necessária uma maior concentração dos péptidos BP100 e PepRYL de forma a obter uma boa razão sinal/ruído. Foram realizados espectros de excitação, emissão e absorção dos péptidos em estudo nas concentrações acima mencionadas, de forma a caracterizá-los espectralmente.

### 2.2.2. Determinação do rendimento quântico

O rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos, sendo uma das características mais importantes de um fluoróforo, pois quanto maior, isto é, mais próximo da unidade for o rendimento quântico mais brilhante é a luz emitida pelo fluoróforo [57]. Nesta dissertação, o rendimento quântico relativo dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 foi determinado aos comprimentos de onda de excitação de 274 nm (BP100 e PepRYL) e de 280 nm (PepRWL e Sub3), recorrendo à seguinte equação:

$$\phi_F = \left( \frac{A_s}{A_x} \right) \left( \frac{F_x}{F_s} \right) \left( \frac{n_x}{n_s} \right)^2 \phi_{F(s)} \quad \text{Equação 6}$$

em que  $\phi_F$  é o rendimento quântico de fluorescência,  $A$  a absorvância ao comprimento de onda de excitação,  $F$  a área do espectro de emissão e  $n$  o índice de refração dos solventes utilizados. As letras  $s$  e  $x$  em índice referem-se à referência e à amostra, respectivamente [60]. Como solução de referência utilizou-se uma solução de L-triptofano para os péptidos PepRWL e Sub3 e uma solução de L-tirosina para os péptidos BP100 e PepRYL. Uma vez que tanto as soluções de referência como dos péptidos possuíam como solvente tampão HEPES, a razão  $n_x/n_s$  é igual a 1.

### 2.2.3. *Quenching* pela acrilamida

*Quenching* é o nome dado a qualquer processo responsável pela diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra (Ver Anexo C). A acrilamida é solúvel em solução aquosa, sendo incapaz de penetrar extensamente em membranas pelo que, apenas poderá provocar *quenching* de fluorescência de resíduos de aminoácidos acessíveis ao ambiente aquoso [57]. O *quenching* pela acrilamida é um procedimento muito comum em estudos biofísicos pois permite a obtenção de informação relativamente à exposição do fluoróforo ao ambiente aquoso. A acrilamida consegue extinguir eficientemente a fluorescência da tirosina bem como a do triptofano, tendo sido por este motivo o *quencher* escolhido [57]. As soluções de 50  $\mu\text{M}$  de BP100 e PepRYL e de 15  $\mu\text{M}$  de PepRWL e Sub3 foram adicionadas quantidades crescentes de acrilamida (Merck) a partir de uma solução-*stock* de 4 M. A concentração máxima de acrilamida atingida foi de 80 mM. Os comprimentos de onda de excitação utilizados, 284 para os péptidos com tirosina e 290 para os péptidos com triptofano, foram escolhidos por serem os comprimentos de onda para os quais a razão dos espectros de absorção de cada um dos péptidos com o espectro de absorção da acrilamida é maior. Deste modo, é reduzida a interferência da contribuição de absorvância do *quencher* nas medidas de emissão de fluorescência. Os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram corrigidos para o efeito de partilha de luz de excitação. Este efeito ocorre quando uma solução para além do fluoróforo possui outra molécula que absorve a luz de excitação ao comprimento de onda usado. À medida que a concentração de *quencher* aumenta, aumenta também uma parte da luz de excitação que é por ele absorvida, ocorrendo

uma menor penetração da luz de excitação na amostra. Assim, ocorrerá uma falsa diminuição na intensidade de fluorescência detectada, que pode ser corrigida pelo uso da equação 7:

$$I_c = I \frac{A_t}{A_f} \left( \frac{1 - 10^{-A_f}}{1 - 10^{-A_t}} \right) \quad \text{Equação 7}$$

em que  $I_c$  é o valor da intensidade de fluorescência corrigida,  $I$  é a intensidade de fluorescência medida,  $A_f$  é o valor de absorvância do fluoróforo e  $A_t$  é o valor de absorvância total da solução para o comprimento de onda de excitação utilizado [61].

De forma a comparar a eficiência do *quenching* pela acrilamida para os diferentes péptidos, foi calculada a constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) pela equação de Stern-Volmer (equação C1, pág. 115).

#### 2.2.4. Efeito da presença de ureia e de alteração de pH

A ureia é um potente desnaturante. Com o intuito de perceber se os péptidos teriam algum tipo de estrutura secundária e, em caso afirmativo, se esta seria perdida/modificada na presença de ureia foram adicionadas concentrações crescentes de ureia (J T Baker, 345) a uma solução de 50  $\mu$ M de BP100 e PepRYL e de 15  $\mu$ M de PepRWL e Sub3, a partir de uma solução-*stock* de 10 M. A concentração máxima de ureia atingida foi 2 M e os comprimentos de onda de excitação utilizados foram de 274 nm e 280 nm para os péptidos com tirosina e triptofano, respectivamente.

Do mesmo modo, com o intuito de verificar se haveria alguma alteração de estrutura provocada pela mudança de pH, as soluções dos péptidos em estudo, foram adicionados volumes de ácido clorídrico (HCl) pré-seleccionados de forma a obter uma gama de valores de pH de 7,24 (neutro) até 1,56 (ácido). Nesta gama de pHs os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL apresentam uma carga de + 5 e o péptido Sub3 uma carga de + 6. Por adição de pequenos volumes, 1 e 2  $\mu$ L, de HCl (3,26 mM) a uma solução tampão e medição do pH da mesma (Crison GLP 21), foi possível seleccionar os volumes e, conseqüentemente, os pHs a testar.



### 2.2.5. Efeito de *red edge* (*red edge Excitation Shift*, REES)

O efeito de *red edge* ocorre por alteração das interações fluoróforo-solvente que ocorrem quando uma molécula passa do estado energético fundamental para um estado energético excitado. Estas alterações dependem da alteração do momento dipolar do fluoróforo no estado excitado e, conseqüentemente, do tempo necessário para que as moléculas de solvente se reorganizem à sua volta. Quando o tempo de reorganização das moléculas de solvente é superior ao tempo de vida do fluoróforo e o comprimento de onda de excitação é superior ao comprimento de onda de absorção máxima do fluoróforo, apenas uma sub-população de fluoróforos estará excitada. Deste modo, a emissão provirá de um estado excitado relaxado, com um *red shift*. Por outro lado, ao utilizar o comprimento de onda de excitação correspondente ao comprimento de onda do máximo de absorção do fluoróforo, a emissão provirá do estado excitado original, ocorrendo a comprimentos de onda mais baixos e, portanto, com maior energia. Assim, o efeito de *red edge* é detectado pela visualização do aumento de comprimento máximo de emissão por aumento do comprimento de onda de excitação [58]. O estudo deste efeito permite caracterizar o microambiente que rodeia o fluoróforo, sendo possível a inferência da existência, ou não, de duas sub-populações de fluoróforos, uma excitada ao comprimento de onda máximo de absorção e outra excitada a comprimentos de onda superiores.

Para observar a existência de efeito de *red edge* nas amostras de péptidos com um resíduo de triptofano, foram alterados os comprimentos de onda de excitação e recolhidos os espectros de emissão. As amostras foram excitadas com comprimentos de onda de 270 a 320 nm, de 5 em 5 unidades.

### 2.2.6. Interação dos péptidos com modelos membranares

As membranas celulares possuem uma elevada complexidade sendo constituídas por diferentes tipos de fosfolípidos, esteróis e proteínas. Para avaliar a interação de péptidos com membranas celulares, foram desenvolvidos modelos membranares simples que mimetizem as principais características destes constituintes celulares. Um dos modelos mais utilizados são as vesículas lipídicas (ou lipossomas) que possuem diferentes tamanhos e uma ou mais bicamadas. Assim, existem vesículas unilamelares gigantes (*giant unilamellar vesicles*, GUVs), vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*, LUVs), vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles*, SUVs) e vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*, MLVs) que possuem várias bicamadas lipídicas [62]. As LUVs foram

o modelo membranar escolhido para realizar os ensaios de interacção péptido-membrana, pois o seu empacotamento lipídico é semelhante ao das membranas biológicas e são de fácil preparação [63].

### 2.2.6.1. Preparação das LUVs

Foram preparadas soluções de lípidos (Avanti Polar Lipids) em clorofórmio (específico para espectroscopia, Merck). Estas soluções eram constituídas por um único lípido ou uma mistura lipídica, com as proporções desejadas. As soluções foram então adicionadas a balões de fundo redondo e secas sob um fluxo de azoto de forma a criar um filme lipídico homogéneo ao longo das paredes do balão. Para garantir a evaporação total do clorofórmio estes balões foram colocados num excicador (Certilab) em vácuo, *overnight*. No dia seguinte, os lípidos foram ressuspensos em tampão HEPES de acordo com a concentração pretendida, sendo submetidos, de seguida, a oito ciclos de congelação/descongelação por imersão em azoto líquido e banho maria, respectivamente. Após este procedimento foram obtidas MLVs que por extrusão (utilizando os extrusores mini-extruder (Avanti Polar Lipids) ou EmulsiFlex (Avestin)), isto é, passagens repetidas da solução lipídica, sob pressão, através de uma membrana com um poro de tamanho definido, originaram LUVs. Uma vez que a membrana de policarbonato utilizada (Nucleopore-Whatman) possuía um poro de 100 nm, as LUVs obtidas possuíam 100 nm de diâmetro. A solução lipídica foi passada 21 vezes por esta membrana, assegurando a homogeneidade da solução obtida [64].

### 2.2.6.2. Estudos de partição

Ao realizar estudos de partição o factor mais importante a ser determinado é a constante de partição  $K_p$ , que fornece uma medida de comparação da afinidade dos diferentes péptidos para as vesículas com constituições lipídicas diferentes. Esta constante é dada pela razão de partição do péptido para a fase lipídica e aquosa (equação 8):

$$K_p = \frac{[Péptido]_{lipídica}}{[Péptido]_{aquosa}} \quad \text{Equação 8}$$

As constantes de partição foram determinadas através do recurso a espectroscopia de fluorescência, isto é, por medição do aumento da intensidade de fluorescência, por aumento da concentração lipídica, sendo calculadas pela equação 9:

$$I = \frac{I_W + K_P \gamma_L [L] I_L}{1 + K_P \gamma_L [L]} \quad \text{Equação 9}$$

em que  $I_W$  é a intensidade de fluorescência na ausência de lípido,  $I_L$  é o valor máximo de intensidade de fluorescência para as concentrações crescentes de lípido,  $\gamma_L$  é o volume molar de lípido e  $[L]$  é a concentração de lípido. Com o aumento da concentração lipídica, caso os péptidos particionem para a membrana, será observável um aumento da intensidade de fluorescência. Este deriva do aumento da emissão de fluorescência pelos fluoróforos, após inserção dos mesmos num ambiente mais hidrófobo (as vesículas lipídicas). Deste modo, ao seguir a intensidade de fluorescência será possível inferir a existência de partição dos péptidos em estudo em modelos membranares e a concentração de lípido à qual ocorre a saturação dos péptidos. Nestes estudos, as soluções de 50  $\mu\text{M}$  de BP100 e PepRYL e de 15  $\mu\text{M}$  de PepRWL e Sub3 (presentes numa *cuvette* de quartzo), foram adicionadas concentrações crescentes de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) ou de POPC com diferentes proporções de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POPG). Estes lípidos foram os escolhidos pois, à semelhança das membranas biológicas, cuja fase predominante à temperatura ambiente é a fase fluída, formam bicamadas lipídicas na fase fluída, à temperatura ambiente. Para os estudos de partição foram utilizadas vesículas constituídas apenas por POPC ou por misturas de POPC/POPG nas proporções de 4:1 e 1:1. POPC foi utilizado com o intuito de mimetizar membranas celulares humanas e as misturas lipídicas com o intuito de mimetizar membranas celulares bacterianas com diferentes intensidades de cargas negativas. As concentrações máximas de lípido utilizadas foram aquelas a partir do qual o sinal de intensidade de fluorescência já se encontrava constante. Após cada adição a amostra é agitada e deixada a incubar durante aproximadamente 5 minutos. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram os especificados acima. Para estes ensaios considerou-se  $\gamma_L$  igual a  $7,63 \times 10^{-1} \text{ dm}^{-3} \text{ mol}^{-1}$  (valor de volume molar para POPC) [65]. Os valores obtidos foram corrigidos para a diluição provocada pela adição consecutiva de vesículas lipídicas.

De forma a calcular a fracção molar de péptido efectivamente particionado na membrana,  $X_L$ , para a concentração de 1 mM de POPC, POPC/POPG 4:1 e POPC/POPG 1:1 foi utilizada a equação 10 [66]:

$$X_L = \frac{K_p \gamma_L [L]}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad \text{Equação 10}$$

### 2.2.6.3. Agregação de vesículas

Com o intuito de observar se os péptidos estudados provocariam a agregação de vesículas, a densidade óptica foi seguida pela medição da absorvância a 436 nm [67] das misturas lipídicas na ausência de péptido e na presença de péptido após adição do mesmo, aos 6 minutos. O efeito resultante desta adição foi seguido durante os 19 minutos seguintes. Foram utilizadas as mesmas misturas lipídicas estudadas nos ensaios de partição, POPC, POPC/POPG 4:1 e 1:1 com a concentração de 500  $\mu\text{M}$ . A concentração final de péptido utilizada foi de 50  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.6.4. *Quenching* em profundidade e com acrilamida

Com o objectivo de perceber em que zona da membrana ocorre a inserção dos péptidos em estudo procedeu-se a ensaios de *quenching* de fluorescência em profundidade e com acrilamida na presença de vesículas lipídicas constituídas por POPC e POPC/POPG 1:1. A acrilamida, tal como referido anteriormente, é um *quencher* solúvel em solução aquosa incapaz de se inserir em profundidade nas membranas. Por outro lado, os *quenchers* 5 e 16-NS são ácidos gordos derivatizados com um grupo *quencher*, o grupo doxilo ( $\text{NO}^\bullet$ ) nas posições 5 e 16, respectivamente [58]. Estes ácidos gordos possuem a capacidade de penetrar nas membranas, situando-se o grupo doxilo junto à interface membrana-ambiente aquoso no caso do 5-NS e no centro hidrófobo no caso do 16-NS [68]. Assim, por avaliação do *quenching* causado pela interacção entre os péptidos em estudo e dos três diferentes *quenchers*, será possível avaliar a inserção dos diferentes péptidos nas membranas lipídicas. Neste ensaio foram adicionadas às soluções de péptidos com as concentrações previamente referidas e de lípido com a concentração de 3 mM, concentrações crescentes de *quencher* até uma concentração máxima de 1,2 mM para 5-NS e 16-NS (de forma a manter a concentração de etanol final abaixo de 2% (v/v)) e de 80 mM para a acrilamida, à semelhança do realizado para o *quenching* pela acrilamida na ausência de lípido. Após cada adição, as amostras foram agitadas e deixadas em repouso aproximadamente durante 5 minutos. As soluções stock de 5 e 16-NS (Sigma-Aldrich), foram preparadas em etanol espectroscópico (Merck), com uma concentração de 70 mM. De forma a obter os valores de absorvância de 5 e 16-NS às

concentrações utilizadas para corrigir o efeito de partilha de luz de excitação foi preparada uma solução stock de tempol com 70 mM. Este *quencher* também possui o grupo doxilo que, tal como nos ácidos 5 e 16-NS é responsável pela extinção de fluorescência. No entanto, o tempol é solúvel em meio aquoso, sendo possível a leitura da sua absorvância. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram de 280 nm para os péptidos com triptofanos e de 282 nm para os péptidos com tirosina, pois são os comprimentos de onda para os quais existe um máximo no espectro resultante da razão dos espectros de absorção dos péptidos pelo espectro de absorção do tempol. A determinação da constante de Stern-Volmer foi realizada como descrito para o *quenching* pela acrilamida na ausência de lípido. Contudo a concentração de lípido utilizada para o cálculo de  $K_{SV}$ , no caso do 5 e 16-NS, foi a quantidade de lípido efectivamente particionada para a membrana. Estas concentrações foram calculadas pela equação 11:

$$[Q]_L \approx \frac{K_{p,Q}[Q]_T}{1 + K_{p,Q}\gamma_L[L]} \quad \text{Equação 11}$$

em que  $K_{p,Q}$  é o coeficiente de partição do quencher,  $[Q]_L$  é a concentração de lípido particionada no lípido e  $[Q]_T$  é a concentração de quencher total na solução [65]. Os valores de  $K_{p,Q}$  utilizados para 5 e 16-NS foram 89000 e 9730, respectivamente [65]. Foram observados desvios positivos e negativos à linearidade da equação de Stern-Volmer (equação C1, pág. 115), sendo então estes valores ajustados pela aplicação da equação do modelo da esfera activa (equação C2, pág. 115) e pela equação de Lehrer (equação C3, pág. 115), respectivamente.

#### 2.2.6.5. *Leakage*

De forma a observar a perturbação das membranas causada pelos péptidos em estudo procedeu-se a um estudo de *leakage*. Neste ensaio será acompanhado o aumento de fluorescência provocado pela saída da carboxifluoresceína incorporada no interior de vesículas lipídicas, por acção dos péptidos em estudo. A carboxifluoresceína é uma sonda fluorescente que se encontra em auto-*quenching* em altas concentrações. Contudo, quando ocorre *leakage* e esta se liberta das vesículas e se dilui no meio, deixa de ocorrer auto-*quenching*, podendo seguir-se o aumento da sua intensidade de fluorescência e correlacioná-lo com o aumento de carboxifluoresceína em solução e, portanto, com a percentagem de *leakage*. Deste modo foram preparadas vesículas de POPC e de POPC/POPG 1:1, do modo

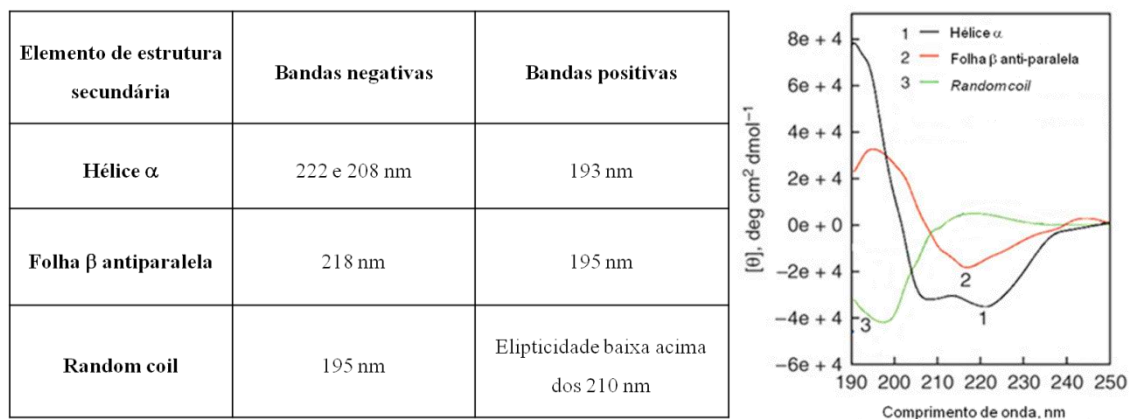
descrito anteriormente, em tampão HEPES 10 mM com 150 mM de NaCl e 50 mM de 5(6)-carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich). Ao preparar as vesículas desta forma, a carboxifluoresceína ficará presente tanto no interior das vesículas como no seu exterior. Ao passar a solução lipídica por uma coluna Econo-Pac 10 DG (Bio-Rad) a carboxifluoresceína passará a estar presente apenas no interior das vesículas. As vesículas foram diluídas com a passagem pela coluna, sendo depois quantificada a quantidade de lípido pelo método de Stewart [69], um método colorimétrico baseado na formação de um complexo entre fosfolípidos e ferrotiocianato de amónio. Neste método adicionou-se 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de solução de Stewart (constituída por cloreto de ferro e tiocianato de amónio) a diferentes concentrações de lípido, agitando e deixando repousar de seguida. Após retirar a solução de Stewart que ficou à superfície mediu-se a absorvância das diferentes soluções a 485 nm (comprimento de onda ao qual a absorvância do complexo tiocianato de ferro-fosfolípidos é muito elevada) construindo-se duas curvas de calibração: uma para POPC e outra para POPC/POPG 1:1. A 50 µM de vesículas foram adicionadas diferentes concentrações de péptido até um máximo de 100 µM (de forma a utilizar a mesma gama de concentrações utilizadas na determinação das MICs), sendo utilizado Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich) como controlo. A intensidade máxima de fluorescência obtida com Triton X-100 corresponde a 100% de lise. As amostras foram preparadas com 30 segundos de intervalo de forma a garantir um tempo de incubação de pelo menos 5 minutos. Foram também realizados ensaios de cinética com 50 µM de lípido, posterior adição de 25 µM de péptido e ainda depois de Triton X-100 0,1% (v/v). Os valores de fluorescência foram corrigidos para a diluição provocada pela adição de Triton X-100. Os resultados foram calculados sobre a forma de percentagem de *leakage*, dada pela equação 12:

$$\% \textit{leakage} = \frac{(I - I_o)}{(I_{Triton} - I_o)} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

em que  $I$  corresponde à intensidade de fluorescência na presença de péptido,  $I_o$  à intensidade de fluorescência na ausência de péptido e  $I_{Triton}$  é a intensidade de fluorescência na presença de Triton X-100 0,1% (v/v).

### 2.3. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica de elevada relevância na determinação da estrutura secundária de proteínas. Nesta técnica, um raio de luz será polarizado (i.e. passará a propagar-se circularmente segundo um único plano), ao passar através de um polarizador. Este raio polarizado pode ser dividido em dois componentes:  $E_R$  que “roda” circularmente na direcção dos ponteiros do relógio e  $E_L$  que “roda” na direcção contrária. Quando moléculas assimétricas interagem com este raio de luz, absorvem em diferentes extensões a luz polarizada  $E_R$  e  $E_L$ , passando a luz a propagar-se com uma forma elíptica. Na zona do UV distante (240-190 nm) a ligação peptídica é o componente que mais contribui para a absorvância e, como cada elemento de estrutura secundária apresenta um espectro característico, é possível acompanhar as mudanças de estrutura secundária que ocorrem numa proteína ou péptido (figura 7) [70, 71]. Os dados podem ser obtidos em unidades de  $\Delta E$ , a diferença de absorvância entre  $E_R$  e  $E_L$  por uma molécula assimétrica, ou de graus de elipticidade, definida como o ângulo cuja tangente é a razão do menor ao maior eixo da elipse  $[\theta]$ . A elipticidade molar é dada em  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  [70].



**Figura 7 – Espectros de dicroísmo circular característicos dos elementos de estrutura secundária mais comuns.** Espectro da poli-L-lisina a pH 11,1 com conformação de hélice  $\alpha$  (preto), de folha antiparalela  $\beta$  (vermelho) e a pH 5,7 de *random coil* (verde). Imagem adaptada de [70].

Neste trabalho experimental, foram realizados estudos de dicroísmo circular para perceber se os quatro péptidos em estudo teriam estrutura secundária em solução aquosa e/ou se sofreriam uma alteração estrutural por mudança do ambiente em que se inserem. Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectropolarímetro Jasco J-815, usando uma *cuvette* de quartzo com um percurso óptico de 0,1 cm (Hellma). Estes foram recolhidos

entre os comprimentos de onda de 195 a 260, com um intervalo de 0,2 nm, com integração de 10 *scans*, medidos a uma velocidade de 50 nm/mim. Com o intuito de perceber se ocorreria uma modificação da estrutura secundária de BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 por interacção com vesículas lipídicas carregadas negativamente ou num ambiente com pH ácido ou com a presença de ureia, foram realizados espectros de 50  $\mu\text{M}$  de péptido com 500  $\mu\text{M}$  de vesículas POPC/POPG 1:1 (razão péptido/lípido de 1/10), de 50  $\mu\text{M}$  de péptido na presença de um pH de 2, conseguido por adição de ácido clorídrico (José Manuel Gomes dos Santos, Lda) e de 50  $\mu\text{M}$  de péptido na presença de 5 mM de ureia. Como controlo foram realizados espectros apenas com tampão, com 50  $\mu\text{M}$  de péptido em tampão, HCl em tampão e na presença de 5 mM de ureia em tampão. O tampão utilizado foi o tampão de fosfatos com fluoreto de sódio (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaF) pois o tampão fosfatos possui uma baixa absorvância acima de 190 nm em *cuvettes* com 0,1 cm e o fluoreto de sódio é um sal que, ao contrário dos sais que possuem iões cloreto na sua constituição, não absorvem muito abaixo dos 195 nm [71]. O tampão foi ainda filtrado (filtros VWR 514-0073, com membrana de polietersulfona com um poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e seringas estéreis de 5 mL BD Discardit™ II) já que o oxigénio absorve luz abaixo dos 200 nm [70]. Os espectros foram tratados utilizando o software Spectra manager™ II, sendo subtraídos aos espectros obtidos, os espectros dos brancos respectivos, sendo os resultantes convertidos a elipticidade molar. O *smoothing* dos espectros foi realizado utilizando as rotinas fornecidas pelo software Spectra manager™ II.



### 3. Apresentação e discussão dos resultados

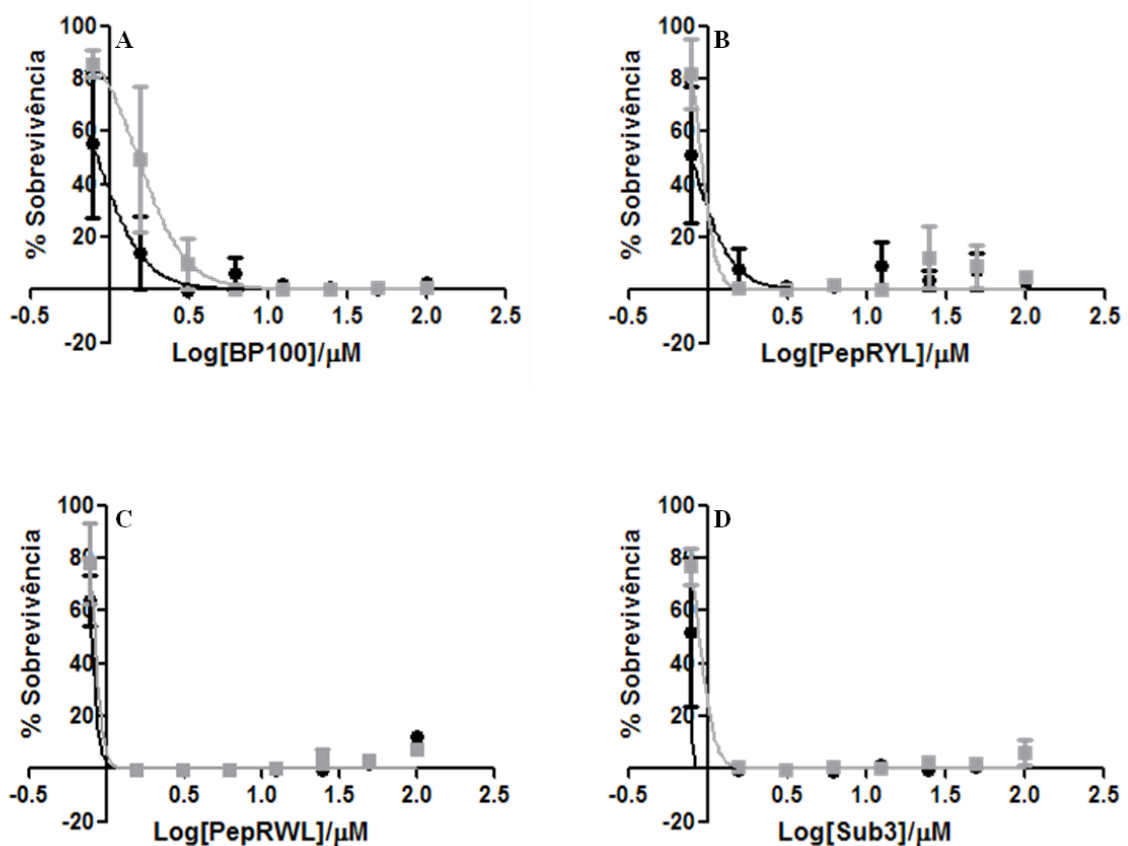
#### 3.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias

A determinação das concentrações mínimas inibitórias (MICs) consiste em determinar a concentração mínima de um composto com actividade antimicrobiana à qual não ocorre crescimento bacteriano, por morte ou inibição do crescimento de uma bactéria [48]. As MICs podem ser determinadas tanto em meio sólido como em meio líquido, sendo neste trabalho a determinação das MICs realizada em meio líquido. A determinação de MICs em meio sólido tem como vantagem a possibilidade de testar vários compostos de uma vez e, conseqüentemente, exactamente nas mesmas condições, mas é necessária uma quantidade superior de composto a testar e não é o método aconselhado para testar vários compostos num pequeno número de bactérias. Por outro lado, a diluição em meio líquido implica uma menor quantidade de composto e é o método mais aconselhável para testar diferentes compostos ou o seu efeito em diferentes bactérias [48]. Uma vez que foram testados quatro péptidos em três bactérias diferentes, o meio líquido foi o escolhido. Realizou-se o método de microdiluição para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e de macrodiluição para a bactéria *H. pylori*, já que esta última possui requisitos de crescimento especiais. Os meios líquidos utilizados foram MHB que é o meio recomendado para determinação de MICs [72] e BB pois possui 5 g/L de cloreto de sódio, permitindo visualizar as diferenças que possam existir na acção dos péptidos em estudo na ausência e presença de sal.

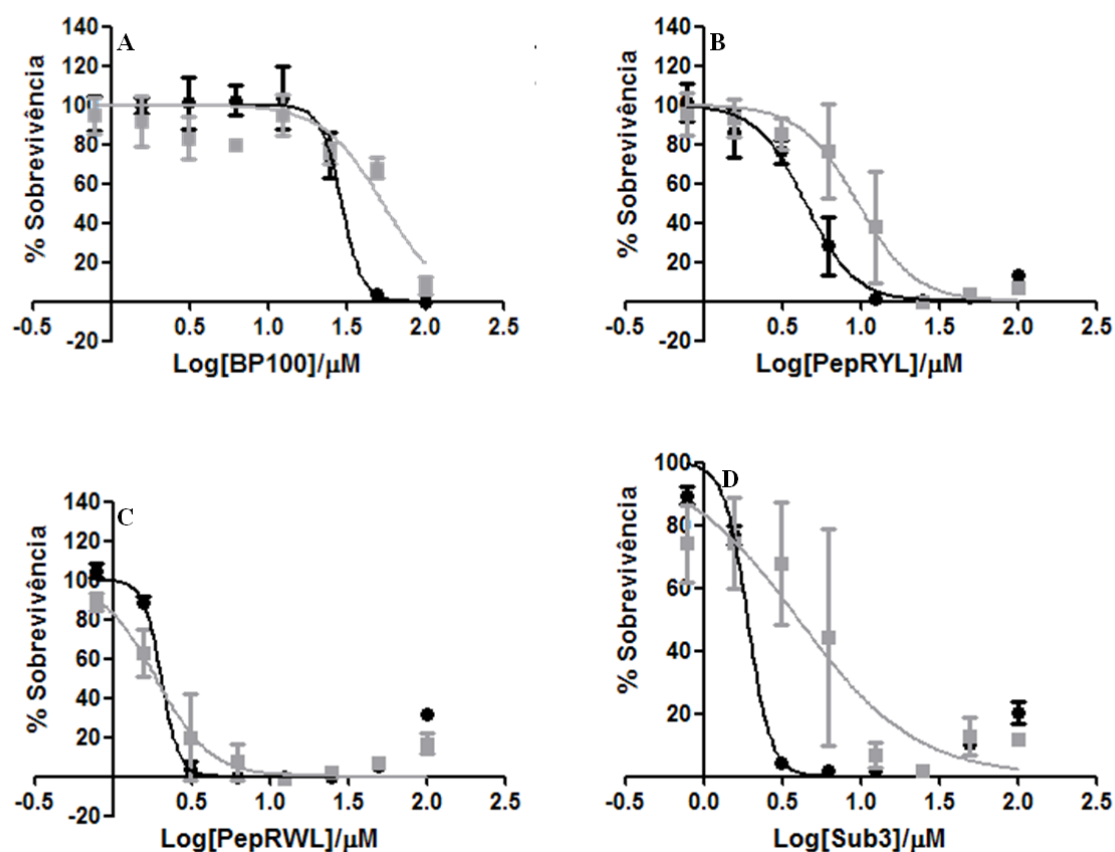
De forma a determinar as MICs dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 sobre as três bactérias em estudo, os valores de OD a 600 nm obtidos foram convertidos em percentagem de sobrevivência, sendo considerado como 100% de sobrevivência o valor obtido para o poço sem péptido. Posteriormente, no caso das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, foi calculada a média de percentagem de sobrevivência dos três replicados. Para a bactéria *E. coli* não foram considerados três valores de percentagem de sobrevivência para o Sub3 em meio MHB e dois para o PepRYL e Sub3 em meio BB, devido a uma elevada disparidade em relação aos valores obtidos para os outros dois replicados. Os valores de concentração de péptido correspondentes são de 1,56, 3,13 e 6,25  $\mu\text{M}$  para o Sub3 em MHB e de 1,56 e 3,13  $\mu\text{M}$  para PepRYL e Sub3 em BB.

A estas médias foi ajustada uma regressão não-linear de forma a calcular a  $\text{MIC}_{50}$ , isto é, o valor de concentração de péptido responsável pela morte de 50% das células bacterianas

(Ver pág. 17), obtendo-se as representações gráficas presentes nas figuras 8 e 9, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. A partir dos valores de MIC<sub>50</sub> obtidos e dos respectivos declives foram calculados os valores de MIC<sub>90</sub> (que corresponde à concentração de péptido responsável pela morte de 90% das células bacterianas) por meio da equação 2 (pág.17), enquanto que os valores de MIC<sub>100</sub> foram determinados por observação directa dos resultados de percentagem de sobrevivência obtidos. Uma vez que os valores de concentração de péptido utilizados são valores descontínuos e que a MIC<sub>100</sub> provém de uma observação directa dos mesmos, esta pode encontrar-se ligeiramente sobre ou subestimada.



**Figura 8 – Representação gráfica da percentagem de sobrevivência de *E.coli* nos meios de cultura líquidos MHB e BB em função do logaritmo da concentração de péptido.** A percentagem de sobrevivência resulta da média dos três replicados, tendo sido realizada uma regressão não linear aos resultados de forma a obter o valor de MIC<sub>50</sub>. São apresentadas as barras representativas do erro padrão da média. (●) Meio líquido Mueller Hinton Broth, (■) meio líquido Brucella Broth, (A) BP100, (B) PepRYL, (C) PepRWL e (D) Sub3.



**Figura 9 - Representação gráfica da percentagem de sobrevivência de *S.aureus* nos meios de cultura líquidos MHB e BB em função do logaritmo da concentração de péptido.** A percentagem de sobrevivência resulta da média dos três replicados, tendo sido realizada uma regressão não linear aos resultados de forma a obter o valor de MIC<sub>50</sub>. São apresentadas as barras representativas do erro padrão da média. (●) Meio líquido Mueller Hinton Broth, (■) meio líquido Brucella Broth, (A) BP100, (B) PepRYL, (C) PepRWL e (D) Sub3.

Os valores dos três diferentes tipos de MICs determinados nos dois meios líquidos utilizados, encontram-se nas tabelas 2 e 3 para *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente.

**Tabela 2 – Valores de MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>100</sub> determinados para *E. coli* em meio MHB ou BB.**

Meio	Péptido	MIC <sub>50</sub> <sup>[a]</sup> (µM)	MIC <sub>90</sub> <sup>[b]</sup> (µM)	MIC <sub>100</sub> <sup>[c]</sup> (µM)
MHB	BP100	0,84 ± 1,13	1,76 ± 4,69	1,56
	PepRYL	0,79 ± 1,11	1,47 ± 5,26	1,56
	PepRWL	0,81 <sup>*</sup>	0,91 <sup>§</sup>	1,56
	Sub3	0,78 <sup>*</sup>	0,81 <sup>§</sup>	1,56
BB	BP100	1,52 ± 1,11	3,24 ± 5,21	6,25
	PepRYL	0,91 ± 1,44	1,15 ± 46,75	1,56
	PepRWL	0,85 <sup>*</sup>	0,97 <sup>§</sup>	1,56
	Sub3	0,89 ± 1,15	1,13 ± 20,38	1,56

<sup>[a]</sup> Os valores de MIC<sub>50</sub> foram obtidos a partir do ajuste de uma regressão não-linear (Ver pág. 17). <sup>[b]</sup> Os valores de MIC<sub>90</sub> foram obtidos por intemédio da Equação 1 2 (pág.17). <sup>[c]</sup> Os valores de MIC<sub>100</sub> foram obtidos por observação directa dos resultados de percentagem de sobrevivência obtidos. <sup>\*</sup> Os valores de erro não são apresentados por dificuldade no ajuste de valores. Esta dificuldade deverá dever-se ao facto de nunca ser atingido o valor de 100% de sobrevivência o que dificulta a determinação do valor de concentração de péptido necessário para que haja apenas 50% de sobrevivência. <sup>§</sup> Os valores de erro não são apresentados pois a equação utilizada para calcular a MIC<sub>90</sub> depende dos parâmetros provenientes do ajuste para determinar a MIC<sub>50</sub>.

Analisando os resultados obtidos para a *E. coli* em meio MHB observa-se uma MIC<sub>100</sub> idêntica para os quatro péptidos em estudo. Contudo, como já foi referido anteriormente, esta provém de uma análise directa de valores de concentração descontínuos, podendo as MIC<sub>100</sub> ser diferentes entre os diferentes péptidos embora em torno de 1,56 µM. Por observação das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> os péptidos Sub3 e PepRWL parecem ser os mais eficazes, já que apesar de o PepRYL possuir um menor valor de MIC<sub>50</sub> que o PepRWL, o aumento da concentração necessária para atingir a MIC<sub>90</sub> é superior à observada para o PepRWL. Num trabalho previamente publicado [5] a concentração de BP100 necessária para inibir o crescimento da mesma estirpe de *E. coli* em mais de 50%, em MHB, determinada directamente por ensaios de determinação de MICs, encontra-se entre o intervalo de concentrações de 2 a 4 µM. Este valor encontra-se mais próximo do valor da MIC<sub>100</sub> obtido neste estudo, pois embora dois dos replicados possuíssem uma percentagem de sobrevivência de aproximadamente zero a 1,56 µM, um dos replicados apenas a apresentava a 3,13 µM. Isto é ainda corroborado pela obtenção de um valor de MIC<sub>90</sub> de aproximadamente 1,76 µM, o que sugere um valor de

MIC<sub>100</sub> superior a 1,56 µM. Deste modo, pode inferir-se que os valores de MIC obtidos para o BP100 sobre *E.coli* em MHB apresentam ligeiras diferenças em relação aos resultados obtidos previamente. Uma vez que são diferenças muito pequenas, estas poderão dever-se a diferenças protocolares, uma vez que o crescimento bacteriano foi realizado de forma diferente e que, no presente trabalho, o conteúdo das placas de polipropileno foi transferido para placas de poliestireno antes da leitura. No caso do Sub3 um valor de 0,5 µg/mL de péptido foi determinado como MIC<sub>100</sub> no mesmo meio líquido, contra uma estirpe diferente de *E. coli* [10]. Convertendo este valor de concentração, obtém-se uma concentração de 0,283 µM, um valor bastante inferior ao valor de MIC<sub>100</sub> de 1,56 µM obtido. Contudo, no estudo de Hilpert et al [10] a determinação das MICs foi realizada por observação ocular directa de qual o poço onde não existia crescimento bacteriano e foi utilizada uma estirpe diferente. Estas diferenças podem justificar a discrepância entre as concentrações de péptido determinadas, já que a determinação por observação ocular é menos sensível que a medição de densidade óptica e a estirpe utilizada poderá ser mais sensível à acção deste péptido.

Por utilização do meio BB e, portanto, na presença de NaCl, observa-se um aumento da concentração de BP100 necessária para inibir o crescimento de *E. coli*. Isto poderá dever-se à observação que usualmente o aumento da força iónica conduz a uma diminuição da actividade dos péptidos antimicrobianos, provavelmente por enfraquecimento das interacções electrostáticas necessárias na fase inicial de atracção do péptido (carregado positivamente) à superfície da bactéria (carregada negativamente) [9]. Para os restantes péptidos existe um aumento muito ligeiro dos valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, não sendo o aumento da força iónica um factor limitante da sua acção.

**Tabela 3 - Valores de MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>100</sub> determinados para *S. aureus* em meio MHB ou BB.**

Meio	Péptido	MIC <sub>50</sub> (µM)	MIC <sub>90</sub> (µM)	MIC <sub>100</sub> (µM)
MHB	BP100	29,51 ± 1,11	41,48 ± 250,35	100
	PepRYL	4,47 ± 1,10	9,85 ± 8,53	25
	PepRWL	2,04 ± 1,13	2,71 ± 15,69	6,25
	Sub3	1,91 ± 1,07	2,78 ± 8,46	12,50
BB	BP100	54,08 ± 1,15	141,41 ± 85,19	-
	PepRYL	9,61 ± 1,19	24,19 ± 20,71	25
	PepRWL	1,89 ± 1,03	4,53 ± 5,24	12,50
	Sub3	4,03 ± 1,33	26,76 ± 12,02	25

<sup>[a]</sup> Os valores de MIC<sub>50</sub> foram obtidos a partir do ajuste de uma regressão não-linear (Ver pág. 17). <sup>[b]</sup> Os valores de MIC<sub>90</sub> foram obtidos por intermédio da equação 2 (pág. 17). <sup>[c]</sup> Os valores de MIC<sub>100</sub> foram obtidos por observação directa dos resultados de percentagem de sobrevivência obtidos.

No caso da *S. aureus* em meio MHB, observa-se que o BP100 apenas inibe o seu crescimento a 100% a uma concentração de 100 µM. Esta concentração é muito elevada, não sendo vantajoso o seu desenvolvimento como composto antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas. Num estudo prévio não foi observada actividade de BP100 sobre a mesma estirpe de *E. coli* até 200 µM [5], mas, tal como referido anteriormente, esta discrepância pode dever-se a diferenças protocolares. Para os restantes péptidos pode observar-se um aumento dos valores obtidos para as MICs, continuando os péptidos PepRWL e Sub3 a serem os mais eficazes. No estudo de Hilpert et al [10] foi obtido um valor de MIC<sub>100</sub> de 2 µg/mL para o péptido Sub3 que equivale a aproximadamente 1,134 µM. À semelhança do observado para a *E. coli*, este valor encontra-se um pouco aquém do valor obtido, o que poderá dever-se às diferenças protocolares mencionadas acima já que a estirpe de *S. aureus* utilizada foi a mesma.

Por utilização do meio BB, observa-se um aumento das MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> obtidas para o BP100, não sendo possível a determinação da MIC<sub>100</sub>, uma vez que a concentração máxima de péptido utilizada foi de 100 µM. No caso dos péptidos PepRYL e Sub3 observa-se um aumento da MIC<sub>90</sub> e de MIC<sub>50</sub>, mantendo-se o valor de MIC<sub>100</sub> constante para o PepRYL.

Pelo contrário, o valor de MIC<sub>100</sub> para os péptidos PepRWL e Sub3 aumentou. Porém, como o valor de MIC<sub>100</sub> de PepRYL em MHB era superior aos determinados para os péptidos PepRWL e Sub3, e que os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> para este péptido aumentaram pode inferir-se que a sua acção também foi influenciada pelo aumento da concentração iónica. O péptido PepRWL parece ser o mais eficaz e menos afectado pela presença de NaCl.

Por comparação dos resultados obtidos para o BP100 e seus análogos contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* pode inferir-se que as substituições de aminoácidos realizadas na sequência do BP100 foram vantajosas, possuindo os péptidos desenvolvidos uma maior actividade contra a *E. coli* que o BP100 e tendo ainda a vantagem de serem activos contra a *S. aureus*, enquanto que o BP100 possui fraca actividade contra este microrganismo. No entanto, os valores de MICs obtidos para *S. aureus* são superiores aos obtidos para *E. coli*. A actividade superior dos péptidos contra bactérias Gram-negativas pode dever-se a uma carga negativa superior na sua parede celular, já que o LPS existe em maior quantidade na parede celular de bactérias Gram-negativas que os ácidos teicóicos na parede celular das bactérias Gram-positivas [19]. Para além deste factor, a parede celular de bactérias Gram-positivas possui várias camadas de peptidoglicano, que constituem 90% da mesma. Na parede celular de bactérias Gram-negativas, por outro lado, o peptidoglicano constitui apenas 10% da parede celular [19]. Deste modo, a passagem de moléculas hidrófobas pela parede celular de bactérias Gram-negativas é mais fácil. Do mesmo modo, na coloração de Gram, o complexo insolúvel de cristal violeta-iodo formado no interior da célula é removido das bactérias Gram-negativas pois o etanol (agente que remove o complexo) atravessa facilmente a membrana externa rica em fosfolípidos e a camada fina de peptidoglicano. Pelo contrário, na parede celular das bactérias Gram-positivas, o complexo não é removido pois o etanol não consegue penetrar nas diferentes camadas de peptidoglicano [19]. Assim, a actividade antimicrobiana superior dos péptidos em estudo para bactérias Gram-negativas pode dever-se também a uma maior facilidade de acesso à membrana plasmática deste tipo de bactérias.

A presença de NaCl afectou negativamente a actividade de todos os péptidos em estudo, não impedindo no entanto, a sua acção contra bactérias Gram-negativas e de PepRYL, PepRWL e Sub3 contra bactérias Gram-positivas.

Uma vez que é possível ver uma diferença nas MICs determinadas na ausência e presença de sal, e que a última situação se encontra mais perto das condições fisiológicas, os

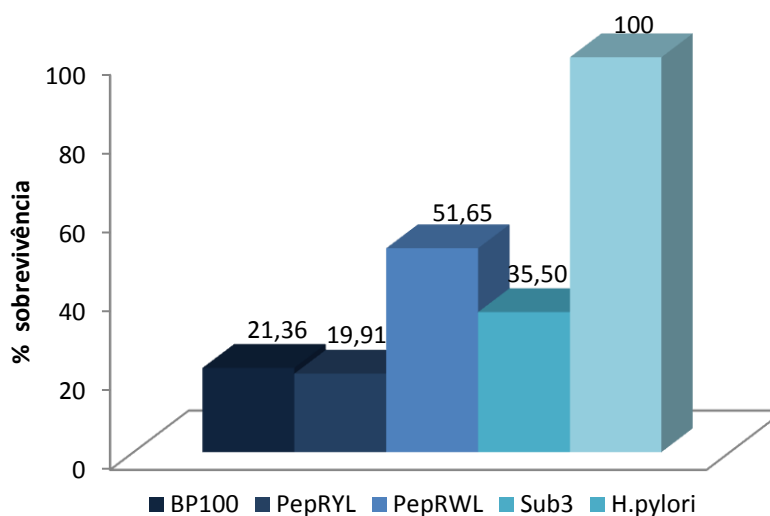
ensaios para a *H. pylori* foram realizados em meio BB suplementado com 10% de soro de sangue, pois este meio possui 5 g/L de NaCl.

### 3.1.1. *Helicobacter pylori*

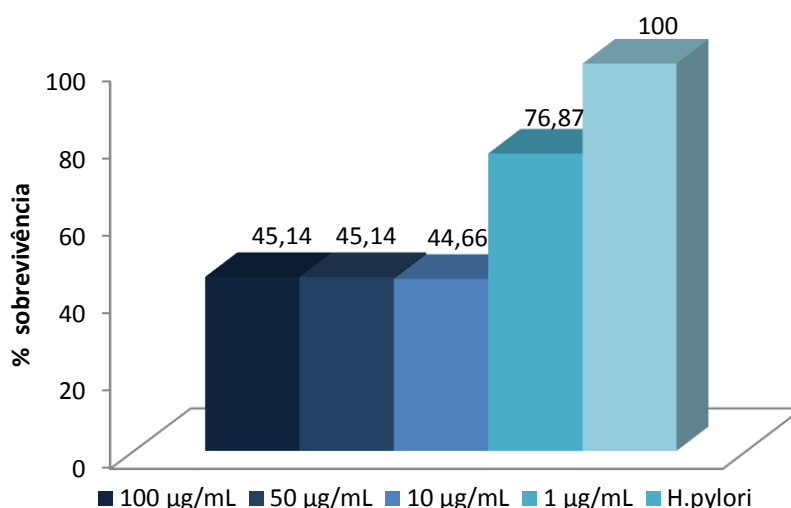
A *H. pylori*, tal como já foi referido, é uma bactéria fastidiosa que requer condições de crescimento bastante rigorosas. A optimização das suas condições de crescimento foi um dos principais desafios do presente trabalho, encontrando-se ainda em curso. Após vários testes, foi possível determinar que o seu crescimento exigia uma densidade óptica inicial muito superior à necessária para o crescimento em meio líquido das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Do mesmo modo, o tempo necessário para o seu crescimento é também muito superior. Assim, esta bactéria cresce durante quatro dias em placas de meio selectivo para *H. pylori* sendo as colónias obtidas suspensas em meio BB suplementado com 10% de soro de cavalo, sendo plaqueada de novo em placas de meio sólido selectivo. Após dois dias, a camada uniforme de bactéria presente na superfície das placas é suspensa em meio BB suplementado e podem ser realizados os ensaios de determinação de MICs utilizando como OD a 600 nm inicial 0,25. Contudo, por observação dos resultados obtidos para incubação desta bactéria com 100 µM dos péptidos em estudo, ou com diferentes concentrações de tetraciclina, chegou-se à conclusão que poderá ser necessário realizar os ensaios utilizando uma OD inicial mais baixa ou um tempo de incubação menor. Nestes ensaios, o tempo de incubação foi de 30 horas, mas a OD da bactéria atingiu valores muito elevados: aproximadamente 1 que corresponde a aproximadamente  $5 \times 10^8$  cfu/mL [47], sendo estes valores de unidades formadoras de colónias muito elevados para este tipo de estudos. Para além destes factores, devido a problemas de fornecimento de material, os ensaios não foram realizados nas placas de polipropileno encomendadas, mas sim em placas de poliestireno com um tratamento para menor aderência de proteínas celulares. Assim, e apesar de terem sido realizados testes, poderá dar-se o caso do revestimento destas placas não impedir completamente a interacção dos péptidos com as paredes dos poços, não ficando estes completamente disponíveis para actuarem sobre as bactérias em solução. Por estas razões, os resultados apresentados de seguida são preliminares, sendo necessária a optimização das condições de realização dos ensaios. Na figura 10 encontram-se os resultados de percentagem de sobrevivência obtidos para a *H. pylori* por incubação da mesma com 100 µM dos péptidos em estudo e na figura 11 os resultados de percentagem de sobrevivência após incubação com diferentes concentrações de tetraciclina. Por análise dos resultados é observável a inexistência da inibição completa do



crescimento bacteriano quer por tratamento com os péptidos em estudo, quer por tratamento com tetraciclina. Os resultados da figura 10 sugerem ainda que o péptido PepRYL é o péptido mais eficaz contra *H. pylori*, mas, no entanto, não é possível retirar qualquer conclusão definitiva. Os péptidos em estudo parecem ser mais activos que o antibiótico tetraciclina, o que apesar de poder ser um resultado encorajador, não é 100% fiável já que seria de esperar que este antibiótico possuísse uma actividade superior à observada, uma vez que as resistências observadas a este antibiótico são muito raras [49, 50]. Esta observação vem suportar a necessidade de optimização das condições em que decorre o ensaio.



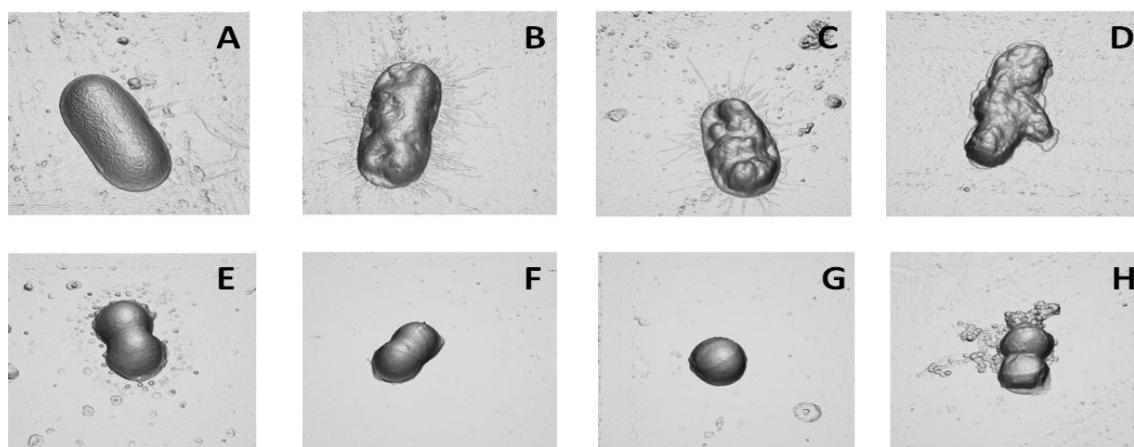
**Figura 10 - Percentagem de sobrevivência da bactéria *Helicobacter pylori* após tratamento com 100 µM dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3.** Os péptidos estiveram incubados com a suspensão bacteriana durante 30 horas.



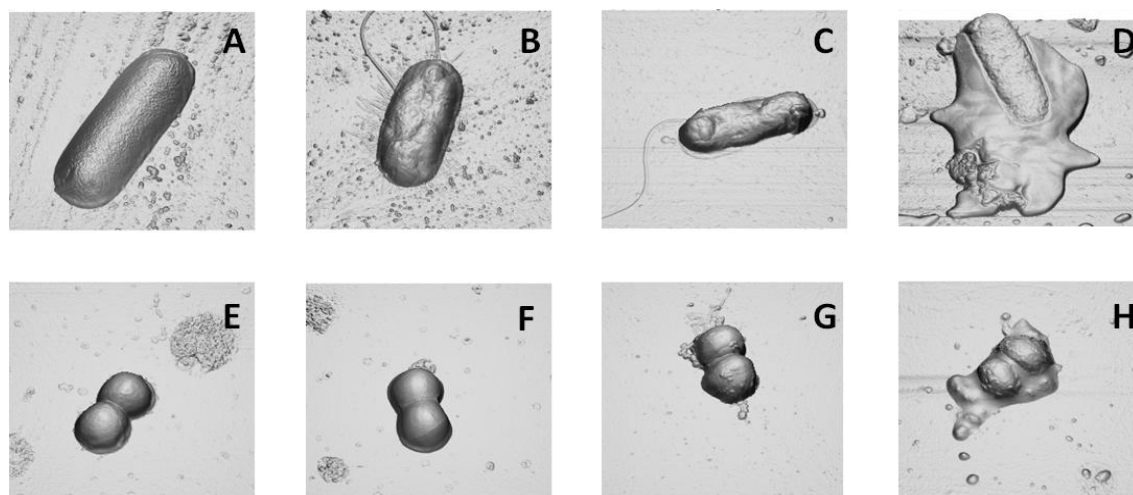
**Figura 11 - Percentagem de sobrevivência da bactéria *Helicobacter pylori* após tratamento com 100, 50, 10 e 1 µg/mL de tetraciclina.** As diferentes concentrações de antibiótico foram incubadas com a suspensão bacteriana durante 30 horas.

### 3.2. Estudos de microscopia de força atômica

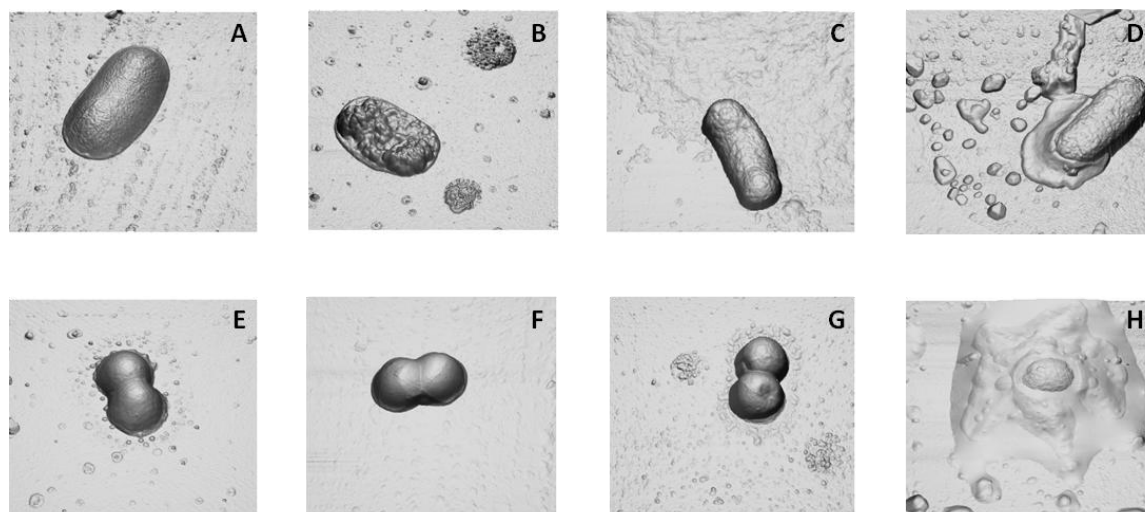
A microscopia de força atômica (AFM) permite o estudo de interações ao nível molecular e a realização de imagens tridimensionais à nanoescala [51, 53]. Esta microscopia tem como vantagem a possibilidade de visualizar tridimensionalmente o efeito dos péptidos em estudo sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Não foi possível observar o efeito de BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 sobre a bactéria *H. pylori*, pois ainda não se conseguiu otimizar o protocolo de forma a que estas continuem saudáveis. Da figura 12 a 15 encontram-se as imagens obtidas pela incubação de  $2 \times 10^7$  cfu/mL de bactéria por duas horas na ausência ou na presença de 1, 10 ou 100 µM de péptido.



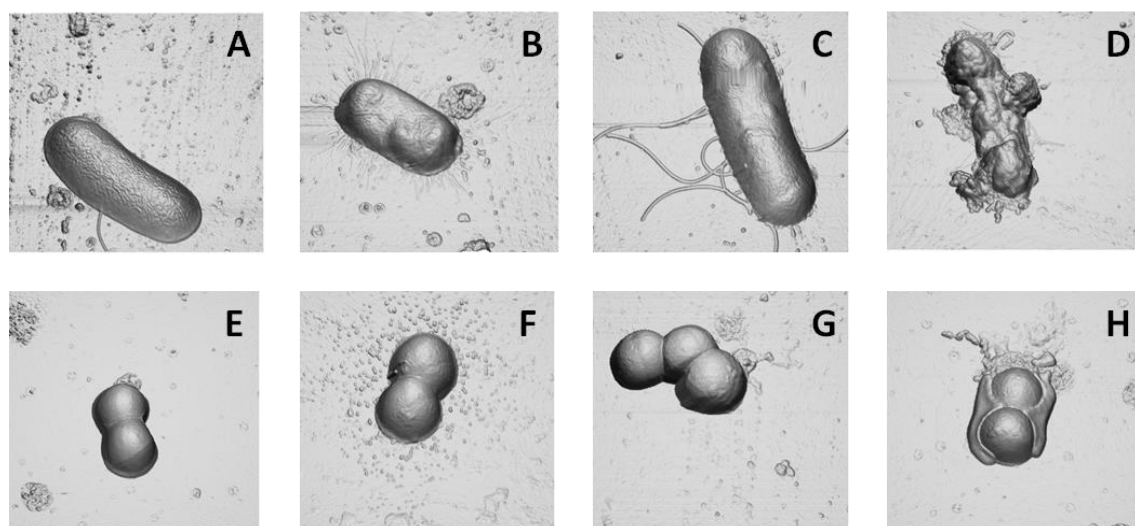
**Figura 12 - Efeito dependente da concentração de BP100 contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.** A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de BP100 (A, E) e na presença de BP100 1  $\mu\text{M}$  (B, F), 10  $\mu\text{M}$  (C, G) e 100  $\mu\text{M}$  (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 13 - Efeito dependente da concentração de PepRYL contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.** A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de PepRYL (A, E) e na presença de PepRYL 1  $\mu\text{M}$  (B, F), 10  $\mu\text{M}$  (C, G) e 100  $\mu\text{M}$  (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ .

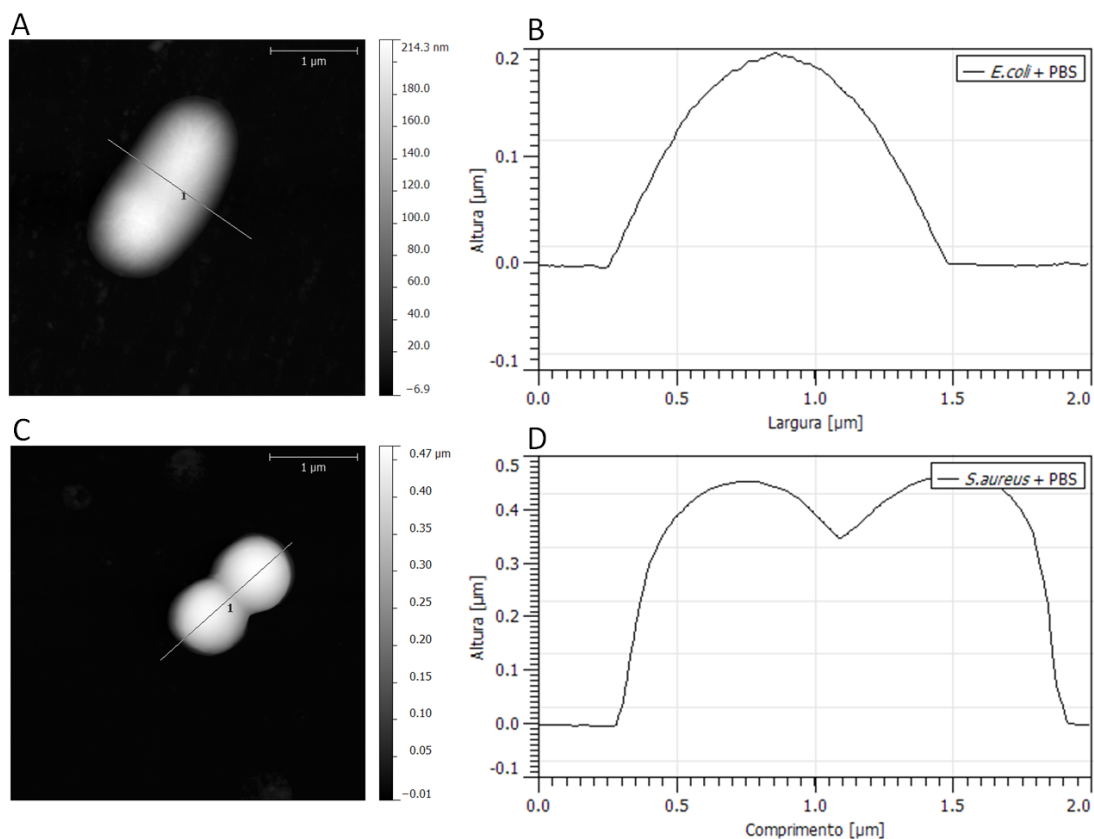


**Figura 14 - Efeito dependente da concentração de PepRWL contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.** A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de PepRWL (A,E) e na presença de PepRWL 1  $\mu\text{M}$  (B,F), 10  $\mu\text{M}$  (C,G) e 100  $\mu\text{M}$  (D,H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 15 - Efeito dependente da concentração de Sub3 contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.** A-H imagens de projecção ortogonal tridimensional (derivadas das imagens de altura) de células de *E. coli* (A-D) e *S. aureus* (E-H) incubadas por 2 horas na ausência de Sub3 (A, E) e na presença de Sub3 1  $\mu\text{M}$  (B, F), 10  $\mu\text{M}$  (C, G) e 100  $\mu\text{M}$  (D, H). A área total da imagem é de  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ .

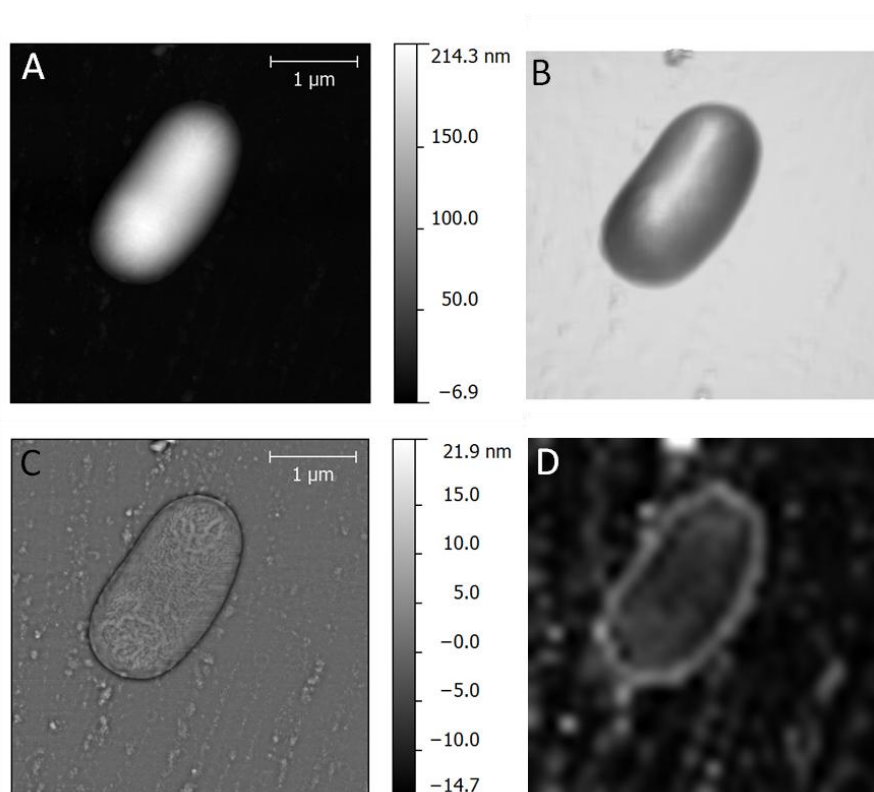
Analisando as figuras acima é visível que as bactérias sem tratamento se encontram saudáveis com uma estrutura sem qualquer perturbação, tendo sido observado que duas horas de incubação em tampão não altera a morfologia das bactérias [5]. As dimensões médias de altura, largura e comprimento obtidas para a *E. coli* foram de  $0,200 \pm 0,004$  nm,  $1,160 \pm 0,029$  nm,  $2,730 \pm 0,260$  nm e para a *S. aureus* de  $0,402 \pm 0,035$  nm,  $1,06 \pm 0,048$  nm e  $1,664 \pm 0,154$  nm, respectivamente. As medidas obtidas para as bactérias *E. coli* sem tratamento estão de acordo com o observado anteriormente [5] e apresentam valores aproximados àqueles existentes na literatura [19, 24]. As dimensões obtidas para as células bacterianas *S. aureus* sem tratamento encontram-se também de acordo com o presente na literatura [30]. Estas medidas foram determinadas realizando secções nas imagens de altura das bactérias controle (n=5) como exemplificado na figura 16.



**Figura 16 – Imagens de *E. coli* e *S. aureus* sem tratamento.** Imagens de altura de *E. coli* (A) e *S. aureus* (C) com as secções realizadas de forma a originar os gráficos altura vs largura para *E. coli* (B) e altura vs comprimento para a *S. aureus* (D).

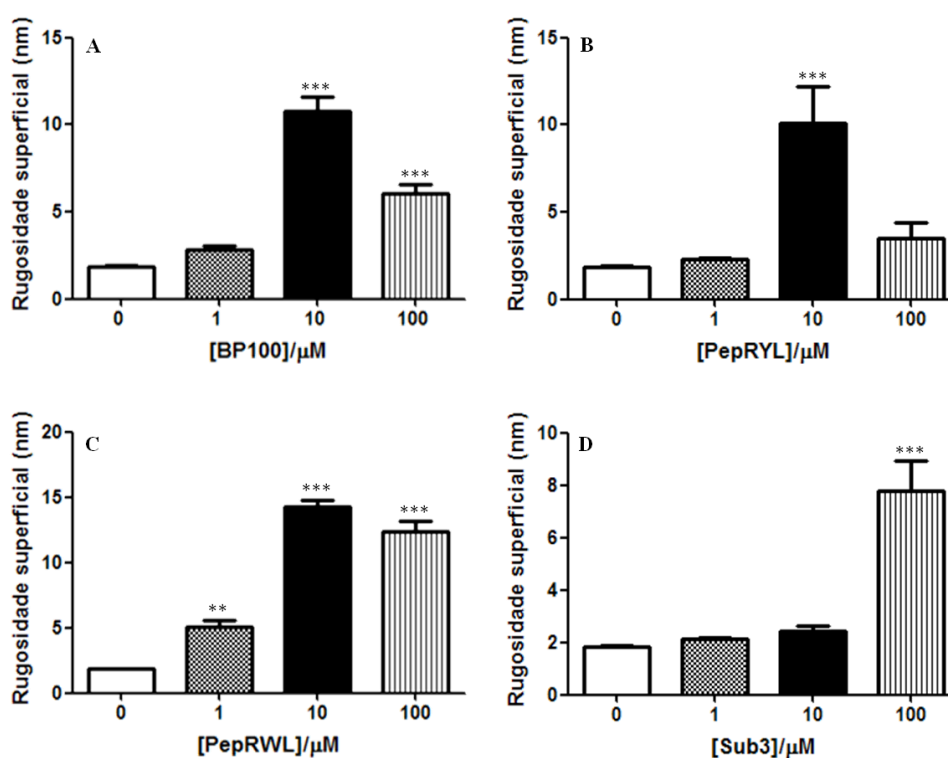
No caso da *E. coli*, todos os péptidos utilizados à concentração de  $1 \mu\text{M}$  induzem o aparecimento de protuberâncias na superfície celular das bactérias, efeito ainda mais pronunciado à concentração de  $10 \mu\text{M}$ . A existência destas protuberâncias indica a existência

de uma perturbação da membrana. À concentração de 100  $\mu\text{M}$  a estrutura membranar encontra-se disrompida por ação dos quatro péptidos, observando-se a existência de conteúdo intracelular no exterior das células bacterianas. O péptido Sub3 é aquele cujo comportamento a 100  $\mu\text{M}$  mais difere dos restantes, pois apesar de ocorrer um pequeno vazamento do conteúdo intracelular, ocorre principalmente a formação de várias protuberâncias. Para os restantes péptidos, a perda de estrutura parece ser a principal característica. Estas observações são confirmadas por análise da rugosidade superficial, representada na figura 17, já que um aumento do número de protuberâncias na superfície bacteriana levará a um aumento dos valores de rugosidade. Estes valores foram obtidos da seguinte forma: 1) aplicação de um filtro de valores médios à imagem de altura obtida (figura 17A); 2) a imagem resultante (figura 17B) foi subtraída à imagem inicial originando uma imagem sem altura (figura 17C) e 3) a imagem sem altura foi tratada calculando a média quadrática (equação 3, pág.20) dos valores de altura da superfície inteira da bactéria em áreas com dimensões de  $125 \times 125 \text{ nm}^2$  (figura 17D).



**Figura 17 – Análise da rugosidade superficial aplicada às imagens de AFM.** À imagem de altura obtida inicialmente (A) foi aplicado um filtro de valores médios para estimar a forma geral das bactérias (B). A imagem obtida é subtraída à imagem inicial de altura, originando uma imagem achatada (C) que foi analisada por medição da média quadrática dos valores de altura da superfície bacteriana em áreas com dimensões de  $125 \times 125 \text{ nm}^2$  (D). Nesta figura o processo de análise foi exemplificado para uma célula de *E. coli*.

Por interpretação dos dados de rugosidade da superfície bacteriana, presentes na figura 18, é possível observar um aumento de rugosidade nas bactérias tratadas com 1  $\mu\text{M}$  de péptido e um aumento ainda superior para a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . À concentração de 100  $\mu\text{M}$  os valores de rugosidade decrescem devido ao rebentamento das células e, conseqüentemente, esvaziamento do conteúdo celular e perda da estrutura bacteriana. Apenas para o Sub3 ocorre o aumento da rugosidade para as células bacterianas tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de Sub3, o que está de acordo com as imagens de AFM obtidas (figuras 12 a 15). Isto sugere que o Sub3 possui um modo de ação diferente dos restantes péptidos. As imagens obtidas e os valores de rugosidade estão de acordo com os valores de MIC obtidos, já que foi determinado um valor de  $\text{MIC}_{100}$  de 1,56  $\mu\text{M}$  para os quatro péptidos em estudo.



**Figura 18 – Análise de rugosidade das bactérias *E. coli*.** Valores de rugosidade superficial obtidos para as células bacterianas de *E. coli* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1  $\mu\text{M}$  (padrão axadrezado), 10  $\mu\text{M}$  (preto) e 100  $\mu\text{M}$  (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

Os valores médios de rugosidade superficial obtido para as bactérias *E. coli* sem tratamento e tratadas com os AMPs em estudo encontram-se na tabela 4.

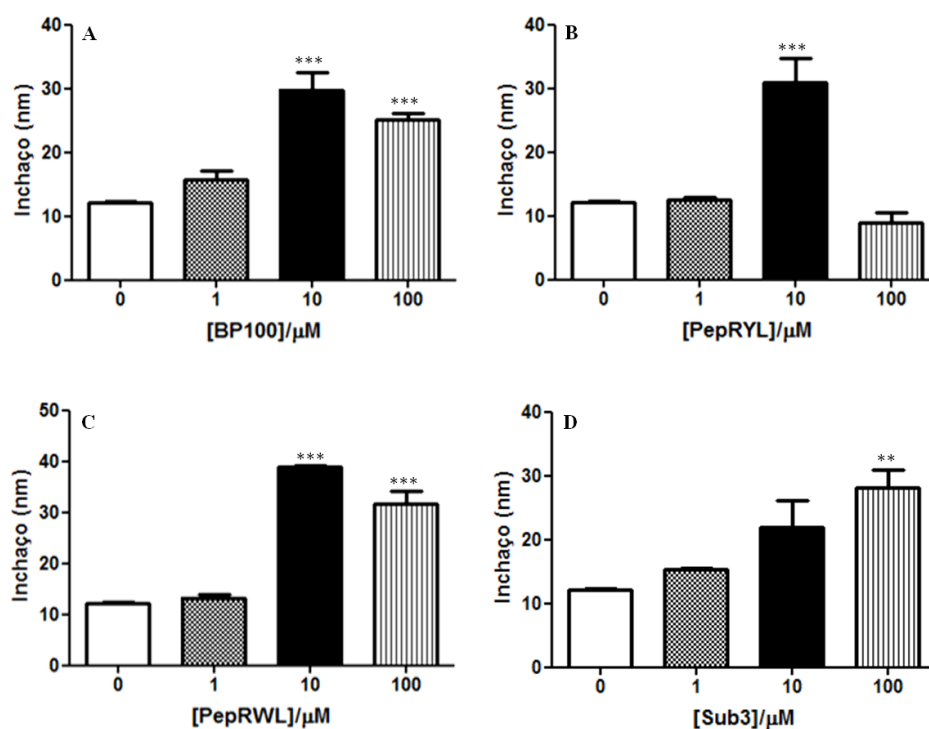
**Tabela 4 – Valores médios de rugosidade superficial para as células de *E. coli* tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média.**

Péptido	[Péptido]/ $\mu\text{M}$	Rugosidade (nm) $\pm$ SEM <sup>[a]</sup>
Controlo	0	1,84 $\pm$ 0,06
	1	2,84 $\pm$ 0,23
BP100	10	10,78 $\pm$ 1,79
	100	6,05 $\pm$ 0,49
PepRYL	1	2,27 $\pm$ 0,1
	10	10,07 $\pm$ 2,11
	100	3,52 $\pm$ 0,92
PepRWL	1	5,06 $\pm$ 0,47
	10	14,23 $\pm$ 0,57
	100	12,38 $\pm$ 0,75
Sub3	1	2,11 $\pm$ 0,05
	10	2,41 $\pm$ 0,23
	100	7,76 $\pm$ 1,18

<sup>[a]</sup> Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

A obtenção dos valores de rugosidade média e de inchaço permitirão inferir sobre o aumento da formação de protuberâncias e do inchaço da célula bacteriana. Estas transformações refletem as alterações estruturais que ocorrem na estrutura bacteriana por efeito dos péptidos em estudo. Desta forma, com o intuito de perceber o efeito causado pelos péptidos sobre as células bacterianas, foram analisadas as imagens obtidas de forma a determinar a alteração dos níveis de inchaço. As imagens sofreram o mesmo tratamento realizado para a análise de rugosidade superficial calculando o valor da média quadrática da altura às imagens submetidas a um filtro de valores médios. Deste modo, ao realizar o restante tratamento sobre a imagem com a forma geral da bactéria, elimina-se a rugosidade superficial, sendo considerado apenas o inchaço. Na figura 19 encontram-se as representações dos valores de inchaço em ordem às concentrações de péptido utilizadas no tratamento das células de *E. coli*.





**Figura 19 - Análise de inchaço das bactérias *E. coli*.** Valores de inchaço obtidos para as células bacterianas de *E. coli* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1 μM (padrão axadrezado), 10 μM (preto) e 100 μM (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

Os valores médios de inchaço obtidos para as bactérias *E. coli* sem tratamento e tratadas com os AMPs em estudo encontram-se presentes na tabela 5.

**Tabela 5 - Valores médios de inchaço para as células de *E. coli* tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média.**

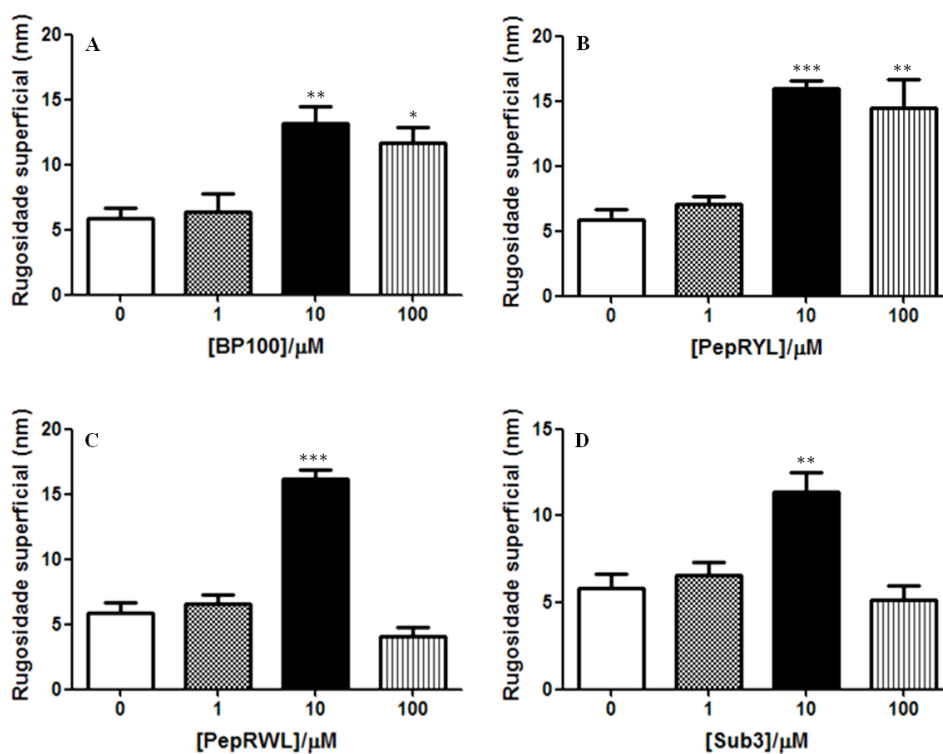
<b>Péptido</b>	<b>[Péptido]/<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Inchaço (nm) <math>\pm</math> SEM<sup>[a]</sup></b>
Controlo	0	12,14 $\pm$ 0,12
	1	15,79 $\pm$ 1,28
	10	29,82 $\pm$ 2,70
	100	25,14 $\pm$ 0,91
BP100	1	12,53 $\pm$ 0,38
	10	30,91 $\pm$ 3,92
	100	8,86 $\pm$ 1,61
PepRYL	1	13,7 $\pm$ 0,62
	10	38,89 $\pm$ 0,32
	100	31,72 $\pm$ 0,54
PepRWL	1	15,23 $\pm$ 0,22
	10	21,99 $\pm$ 0,61
	100	28,16 $\pm$ 1,37
Sub3	1	15,23 $\pm$ 0,22
	10	21,99 $\pm$ 0,61
	100	28,16 $\pm$ 1,37

<sup>[a]</sup> Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

É possível inferir um comportamento de inchaço semelhante ao comportamento de rugosidade, sendo que o péptido Sub3 apresenta, mais uma vez, um comportamento diferente ao observado para os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL. Assim, para estes três péptidos, ocorre um aumento do inchaço das bactérias nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$  e uma diminuição abrupta a 100  $\mu\text{M}$ , concentração à qual o conteúdo intracelular é libertado. No caso do Sub3, ocorre um aumento do inchaço até aos 100  $\mu\text{M}$ , pois não ocorre saída do conteúdo celular. Esta observação apoia a possibilidade do Sub3 possuir um mecanismo de acção diferente de BP100, PepRYL e PepRWL.

No caso da bactéria *S. aureus*, por análise das projecções ortogonais das imagens de altura (figuras 12 a 15), observa-se que as bactérias incubadas com o péptido BP100 apenas apresentam alterações na sua estrutura à concentração de 100  $\mu\text{M}$ , o que está de acordo, com os valores de MICs obtidos. As bactérias tratadas com PepRYL apresentam a formação de protuberâncias e algum vazamento do conteúdo intracelular à concentração de 10  $\mu\text{M}$  e a 100  $\mu\text{M}$  observa-se o completo rebentamento da estrutura membranar. Embora o valor de MIC<sub>100</sub> determinado seja de 25  $\mu\text{M}$ , uma vez que a MIC<sub>90</sub> é de 9,85  $\mu\text{M}$  era expectável a existência de uma perturbação da estrutura bacteriana a 10  $\mu\text{M}$ . O efeito de PepRWL apenas se torna visível a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$  o que se encontra de acordo com os valores de MIC

obtidos, já que a MIC<sub>100</sub> determinada foi de 6,25 µM. Ao contrário do observado para a *E. coli* é observável a saída de conteúdo intracelular à concentração de 100 µM nas bactérias de *S. aureus* tratadas com Sub3, sendo visível o aparecimento de poucas protuberâncias e a saída de uma pequeníssima quantidade de material intracelular a 10 µM o que também está de acordo com os valores de MICs determinadas, já que o valor de MIC<sub>100</sub> determinado foi de 12,5 µM. A representação dos valores de rugosidade superficial obtidos para as células de *S. aureus* na ausência ou presença de tratamento com os péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 encontra-se na figura 20.



**Figura 20 - Análise de rugosidade das bactérias *S. aureus*.** Valores de rugosidade superficial obtidos para as células bacterianas de *S. aureus* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1 µM (padrão axadrezado), 10 µM (preto) e 100 µM (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

Os valores de rugosidade obtidos estão de acordo com o comportamento observado para a *E. coli* em que se observou o aumento da rugosidade superficial até ao tratamento das células bacterianas com 100 µM de péptido, concentração à qual ocorre libertação de

conteúdo intracelular. A única exceção é o péptido Sub3, onde se observa um aumento dos valores de rugosidade à concentração de 100  $\mu\text{M}$  para *E. coli*. Contudo, este comportamento não se observa para *S. aureus*, havendo uma diminuição dos valores de rugosidade superficial para as células tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de Sub3. Seria de esperar que, para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PepRYL, o valor de rugosidade para as células de *S. aureus* fosse um pouco menor devido à ruptura da estrutura membranar observada na figura 13D e que o valor de rugosidade de 10  $\mu\text{M}$  obtido para as bactérias tratadas com BP100 fosse menor. Contudo, as discrepâncias observadas podem ser explicadas pelos valores de inchaço determinados e apresentados na figura 21.

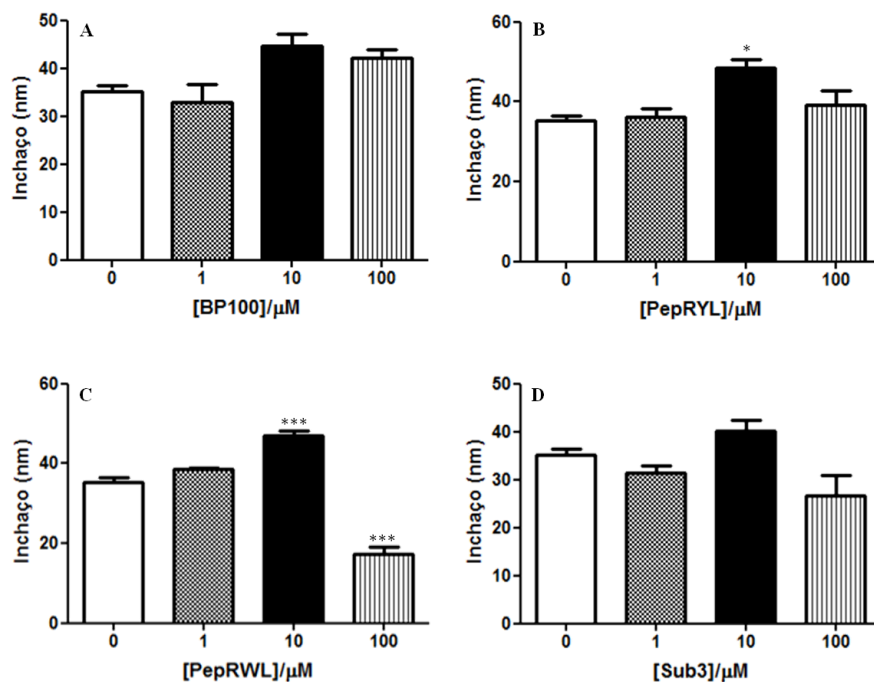
Os valores médios de rugosidade superficial obtidos para as bactérias *S. aureus*, sem tratamento, e tratadas com os AMPs encontram-se presentes na tabela 6.

**Tabela 6 - Valores médios de rugosidade para as células de *S. aureus* tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média.**

<b>Péptido</b>	<b>[Péptido]/<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Rugosidade (nm) <math>\pm</math> SEM<sup>[a]</sup></b>
Controlo	0	5,83 $\pm$ 0,75
	1	6,40 $\pm$ 1,35
BP100	10	13,16 $\pm$ 1,30
	100	11,71 $\pm$ 1,12
	1	7,07 $\pm$ 0,64
PepRYL	10	16,01 $\pm$ 0,56
	100	14,46 $\pm$ 2,20
	1	6,60 $\pm$ 0,63
PepRWL	10	16,20 $\pm$ 0,68
	100	4,05 $\pm$ 0,68
	1	6,57 $\pm$ 0,73
Sub3	10	11,41 $\pm$ 1,10
	100	5,15 $\pm$ 0,86

<sup>[a]</sup>Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

Estes valores encontram-se de acordo com as representações gráficas da figura 20. Abaixo, na figura 21, encontram-se as representações gráficas de inchaço em função de diferentes concentrações dos péptidos em estudo.



**Figura 21 - Análise de inchaço das bactérias *S. aureus*.** Valores de inchaço obtidos para as células bacterianas de *S. aureus* sem tratamento (branco) e com tratamento para 1 µM (padrão axadrezado), 10 µM (preto) e 100 µM (padrão de riscas verticais) de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D). As barras representam os valores de erro padrão da média (SEM) e os asteriscos representam o nível de significância de diferença entre células tratadas com diferentes concentrações dos péptidos em estudo e as células sem tratamento: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  e \*  $0,01 < p < 0,05$ . Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

Nas células bacterianas tratadas com BP100 não existem diferenças significativas em termos de níveis de inchaço o que poderá explicar o efeito inferior deste péptido sobre as bactérias *S. aureus*. Deste modo, apesar de ocorrer um aumento de rugosidade superior ao esperado para o BP100, observa-se que este não é acompanhado pelo aumento de inchaço. Assim o BP100, apesar de provocar o aumento de rugosidade pela formação de protuberâncias na superfície bacteriana é incapaz de provocar um aumento do inchaço significativo, característica verificada antes da perda de estrutura celular bacteriana. Esta observação poderá confirmar a baixa actividade deste péptido contra bactérias Gram-positivas. No caso das células tratadas com PepRYL continua a não ser vista uma diferença tão pronunciada como o esperado para a concentração de 100 µM. Para os restantes péptidos os valores de inchaço estão de acordo com os resultados observados para a rugosidade.

Os valores médios de inchaço obtidos para as bactérias *S. aureus* sem tratamento e tratadas com os AMPs em estudo encontram-se presentes na tabela 7.

**Tabela 7 - Valores médios de inchaço para as células de *S. aureus* tratadas com BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 acompanhados dos erros padrão da média.**

Péptido	[Péptido]/ $\mu\text{M}$	Inchaço (nm) $\pm$ SEM <sup>[a]</sup>
Controlo	0	35,17 $\pm$ 1,34
	1	32,80 $\pm$ 3,92
BP100	10	44,66 $\pm$ 2,61
	100	42,13 $\pm$ 1,80
	1	36,07 $\pm$ 2,31
PepRYL	10	48,40 $\pm$ 2,14
	100	39,24 $\pm$ 3,69
	1	38,55 $\pm$ 2,11
PepRWL	10	47,04 $\pm$ 1,47
	100	17,39 $\pm$ 1,85
	1	31,49 $\pm$ 1,50
Sub3	10	40,21 $\pm$ 1,68
	100	26,68 $\pm$ 2,97

<sup>[a]</sup> Para cada concentração de péptido foram analisadas 5 células bacterianas.

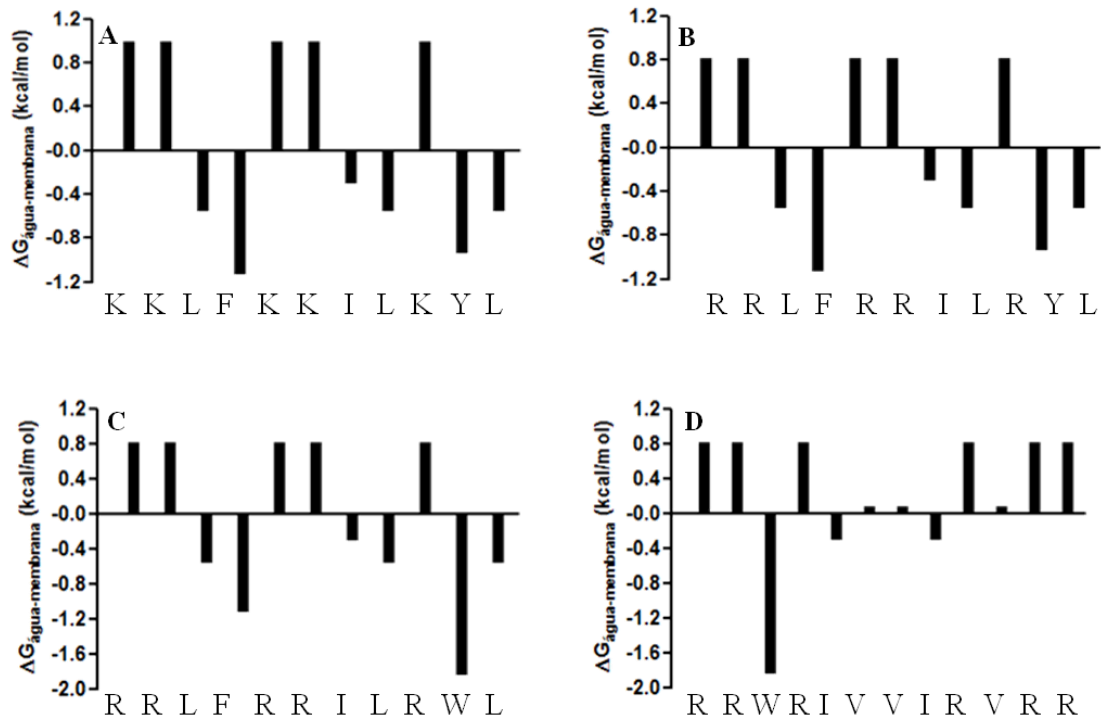
Por comparação dos valores de rugosidade e inchaço obtidos para as bactérias *E. coli* (rugosidade: 1,84  $\pm$  0,06 nm; inchaço: 12,14  $\pm$  0,12 nm) e *S. aureus* (rugosidade: 5,83  $\pm$  0,75 nm; inchaço: 35,17  $\pm$  1,34 nm) sem tratamento observa-se que *S. aureus* possui um valor de rugosidade superficial superior. Contudo, este resultado deve-se, essencialmente, ao facto de se incluir no cálculo dos valores de rugosidade os rebordos das bactérias, que no caso das *S. aureus* possuem valores de média quadrática significativamente superiores aos valores obtidos para as *E. coli*. *S. aureus* possui também um maior volume, já que o seu valor de inchaço em células sem tratamento com AMPs é superior ao obtido para a *E. coli*. Este resultado encontra-se de acordo com o observado nas figuras 12 a 15.

É assim possível inferir que os resultados obtidos por microscopia de força atómica apoiam os resultados obtidos para os valores de concentrações mínimas inibitórias.

### 3.3. Previsão teórica da afinidade dos péptidos para membranas

Com o intuito de prever teoricamente a afinidade dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 para membranas, foram representadas as energias livres de transferência da água para interfaces membranares constituídas por POPC,  $\Delta G_{\text{Água-membrana}}$ , dos resíduos

constituintes destes péptidos. Estas representações encontram-se na figura 22 e considera-se que um valor negativo de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$  indica uma maior afinidade para a interface membrana.



**Figura 22 - Previsão da afinidade dos péptidos em estudo para membranas.** Afinidade dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) para membranas, por representação das energias livres de transferência dos resíduos da água para interfaces membranares constituídas por POPC ( $\Delta G_{\text{água-membrana}}$ ). Resíduos com  $\Delta G_{\text{água-membrana}} < 0$  têm maior afinidade para região de interface da membrana. Valores de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$  retirados de [73].

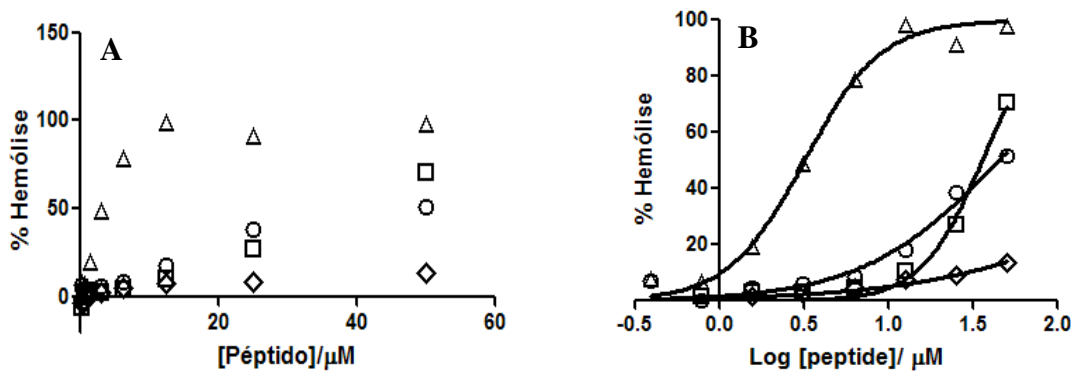
Assim, por análise da representação A e B é possível inferir que o péptido PepRYL terá uma maior afinidade para as interfaces membranares que o péptido BP100. A diferença entre estes dois péptidos reside na presença de cinco resíduos de aminoácidos de arginina, ao invés de cinco aminoácidos de lisina. Uma vez que os resíduos de arginina possuem valores de energia livre de transferência menores que os resíduos de lisina, o péptido PepRYL deverá apresentar uma maior afinidade que o péptido BP100. Para além deste factor, já foi observado que os resíduos de arginina favorecem as interações com as membranas lipídicas que outros resíduos aminoácidos carregados positivamente como é o caso da lisina [74]. O péptido PepRWL parece ser o péptido com maior afinidade para as interfaces membranares pois possui um resíduo de triptofano, que tem um menor valor de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$  que o resíduo de

tirosina presente nos péptidos BP100 e PepRYL. O Sub3 por seu lado parece ser o péptido que menos afinidade terá para as interfaces membranares pois possui três resíduos de valina que apesar de serem resíduos de aminoácidos hidrófobos apresentam valores de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$  positivos, ao contrário do que é observado para os resíduos de fenilalanina e leucina presentes nos restantes péptidos. Não obstante, nos ensaios de determinação de MICs, este péptido foi bastante eficaz. Esta observação poderá dever-se ao facto do Sub3 possuir seis resíduos carregados positivamente, ao invés dos cinco existentes nos restantes péptidos. Deste modo, quando em contacto com as membranas bacterianas carregadas negativamente, poderá estabelecer um maior número de interacções electrostáticas assumindo estas interacções um papel mais proeminente que as interacções hidrófobas. Esta previsão poderá ainda reforçar a hipótese de que o Sub3 possua um mecanismo de acção diferente do dos restantes péptidos, como sugerido pelos resultados de AFM para a bactéria *E. coli*. Todavia estas previsões terão de ser confirmadas por meio de estudos biofísicos e hemolíticos.

### 3.4. Determinação da citotoxicidade dos péptidos

De forma a antever a aplicabilidade dos péptidos em estudo como agentes antibacterianos em humanos foi determinada a citotoxicidade dos péptidos em estudo, por realização de um teste de hemólise. Neste teste foram utilizados como controlos positivo e negativo o detergente Triton X-100 e o tampão PBS, respectivamente. Na figura 23 encontram-se as representações gráficas dos valores de percentagem de hemólise em função da concentração de péptido (figura 23A) e de percentagem de hemólise em função ao logaritmo da concentração de péptido (figura 23B). Foi realizado um ajuste de uma regressão não-linear aos valores da figura 23B de modo a determinar a concentração de péptido necessária para atingir 50% de hemólise.





**Figura 23 – Resultados obtidos para o ensaio hemolítico.** (A) Representação dos valores de percentagem de hemólise versus concentração de péptido. (B) Representação dos valores de percentagem de hemólise versus logaritmo da concentração de péptido. A estes valores foi realizada uma regressão não linear. ( $\Delta$ ) PepRWL, ( $\square$ ) PepRYL, ( $\circ$ ) BP100 e ( $\diamond$ ) Sub3.

Por observação das representações gráficas acima é possível inferir que o péptido PepRWL é o péptido mais hemolítico, seguido do PepRYL, BP100 e Sub3. A observação dos valores presentes nas tabelas 8 e 9 permitirá analisar os resultados de uma forma mais pormenorizada.

**Tabela 8 – Valores de percentagem de hemólise obtidos para as diferentes concentrações dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3.**

[Péptido]/mM	% hemólise			
	BP100	PepRYL	PepRWL	Sub3
0,39	7,23	-5,64	7,70	-3,02
0,78	0,03	1,66	6,57	-2,09
1,56	4,65	3,07	19,27	1,79
3,13	6,13	3,03	48,78	2,68
6,25	8,52	4,67	78,41	4,82
12,50	18,04	10,46	98,30	7,35
25	38,49	27,09	91,31	8,90
50	51,34	70,67	97,60	13,55

**Tabela 9 – Valores de concentração dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 necessárias para atingir uma percentagem de 50% de hemólise celular.**

<b>Péptido</b>	<b>[Péptido]<sub>50% hemólise</sub>/μM</b>
<b>BP100</b>	45,07
<b>PepRYL</b>	35,96
<b>PepRWL</b>	3,18
<b>Sub3</b>	689,50

Analisando os valores presentes na tabela 8, é visível uma percentagem hemolítica muito elevada para o PepRWL que se aproxima de 100% nas concentrações de péptido mais elevadas. Também o péptido PepRYL apresenta uma taxa hemolítica elevada, ainda que mais baixa que a do PepRWL, para 50 μM de péptido. Todavia, para as restantes concentrações, incluindo as MICs para as bactérias estudadas, os valores de percentagem de hemólise são muito inferiores aos observados para o PepRWL e, de uma forma geral, próximos aos obtidos para o BP100, encontrando-se a concentração de PepRYL necessária para provocar 50% de hemólise próxima, embora ligeiramente inferior, à determinada para o BP100. Assim, apesar de possuir um perfil ligeiramente mais hemolítico a concentrações de péptido mais elevadas, este análogo possui uma maior actividade que o seu precursor, sendo necessária uma menor concentração para que ocorra efeito o que reforça o sucesso da substituição dos resíduos de aminoácidos. A concentração de PepRWL necessária para induzir 50% de hemólise, como seria de esperar, por observação dos valores de percentagem de hemólise obtidos, é de 3,18 μM, sendo significativamente mais baixa do que as obtidas para os restantes péptidos. O Sub3 é o péptido menos hemolítico, o que o torna extremamente favorável já que possui uma elevada actividade antimicrobiana contra as bactérias estudadas. A capacidade hemolítica inferior deste péptido pode dever-se ao facto de este possuir uma base de desenvolvimento diferente dos restantes péptidos. Os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL foram desenvolvidos de forma a possuírem uma estrutura de hélice  $\alpha$  com carácter anfipático [12] enquanto que o Sub3 foi desenvolvido tendo por base uma variante linear do AMP *bactenecin* [10]. A análise da previsão teórica presente na figura 22 (pág.57), assim como os resultados de AFM obtidos para a *E. coli*, tinham já sugerido a existência de um mecanismo de acção diferente para o péptido Sub3. Os resultados obtidos neste estudo apoiam esta observação e confirmam a previsão de que o Sub3 deveria ser o péptido com menor carácter hemolítico, já que era também o péptido com resíduos hidrófobos com menores valores de  $\Delta G_{\text{água-membrana}}$ .

Foi realizado anteriormente um estudo de citotoxicidade para o péptido BP100 em que o valor de percentagem de hemólise para uma concentração de 50  $\mu$ M de péptido era igual a  $3 \pm 0,1$  % [12]. Existe uma elevada discrepância entre este valor e o valor de 51,34 % obtido. Porém, esta diferença pode ser explicada por diferenças protocolares, uma vez que no presente ensaio foi utilizada uma solução com 0,25% (v/v) de eritrócitos, enquanto que no estudo de Badosa et al [12], foi utilizada uma solução de 5% (v/v) de eritrócitos e, portanto o valor obtido nesse estudo teria de ser 20 vezes superior para a concentração de eritrócitos utilizada neste trabalho.

De forma a avaliar a aplicabilidade clínica dos quatro péptidos em estudo foi calculado o índice terapêutico. Este índice consiste na razão entre o seu efeito tóxico e o seu efeito terapêutico. O índice terapêutico foi calculado fazendo a razão entre a concentração necessária para induzir 50% de hemólise e os valores de MIC<sub>50</sub> obtidos para os péptidos nas diferentes condições testadas, encontrando-se os valores obtidos na tabela 10.

**Tabela 10 – Valores de índice terapêutico obtidos para os diferentes péptidos**

Bactéria	Meio	Péptido			
		BP100	PepRYL	PepRWL	Sub3
<i>E. coli</i>	MHB	53,65	45,52	3,93	883,97
	BB	29,65	39,52	3,74	774,72
<i>S.aureus</i>	MHB	1,53	8,04	1,56	360,99
	BB	0,83	3,74	1,68	171,09

Por análise dos valores de índice terapêutico observa-se que o péptido Sub3 é o péptido com maiores valores de índice terapêutico. O BP100 e o PepRYL no caso da *E. coli* possuem também valores elevados de índice terapêutico nos dois meios estudados, apesar de no meio BB, estes valores serem mais baixos devido ao efeito do aumento da concentração da força iónica na acção dos péptidos. O péptido PepRWL possui valores de índice terapêutico muito baixos devido ao seu elevado carácter hemolítico, assim como, o péptido BP100 para a *S. aureus* devido à sua baixa actividade antimicrobiana contra esta bactéria (<10) [75]. Os valores de índice terapêutico para o PepRYL contra a bactéria *S. aureus* são significativamente inferiores aos observado para a *E. coli*, devido ao aumento do valor de MIC<sub>50</sub>. Contudo, estes valores são bastante superiores aos observados para o BP100 e para o PepRWL.

A partir dos estudos de hemólise e da determinação dos valores de índice terapêutico é possível inferir que os péptidos Sub3 e PepRYL são bastante promissores, pois combinam uma baixa actividade hemolítica com uma elevada actividade antimicrobiana e que, o péptido PepRWL apesar de ser o péptido que possui uma maior actividade antimicrobiana, necessita de sofrer algumas alterações sequenciais de forma a reduzir o seu carácter hemolítico. Com o intuito de contornar o seu perfil hemolítico, podem realizar-se novas substituições de resíduos de aminoácidos de forma a diminuir o seu carácter hidrófobo e, evitar assim, a hemólise de células com membranas com carácter neutro, já que a capacidade de hemólise dos péptidos está correlacionada com a capacidade de inserção dos mesmos na zona hidrófoba [14]. Assim, poderia realizar-se a substituição de resíduos hidrófobos como os resíduos de leucina e fenilalanina por resíduos carregados positivamente como os resíduos de arginina, de forma a manter a sua elevada actividade antibacteriana e diminuir o seu carácter hemolítico. Estas alterações vão de encontro ao observado para o péptido Sub3 que combina uma actividade antimicrobiana elevada com um perfil hemolítico fraco. O objectivo inicial do presente trabalho era incorporar a sequência deste péptido, em ciclótidos com o objectivo de reduzir o seu carácter hemolítico e criar péptidos com uma elevada actividade e estabilidade. Os ciclótidos são péptidos cíclicos com estruturas extremamente estáveis, sendo resistentes à degradação térmica, química ou enzimática. Estes péptidos possuem também uma estrutura molde, onde foram já realizados enxertos de sequências lineares com êxito [75]. Na Universidade de Queensland, ao abrigo da colaboração existente com o grupo do professor David Craik, foi realizado o enxerto das sequências dos péptidos PepRYL e PepRWL num ciclótido. Porém, este não foi, bem sucedido devido à incapacidade dos péptidos resultantes adquirirem o *fold* correcto. Não obstante, a substituição dos resíduos de lisina por arginina e de tirosina por triptofano realizadas levaram ao aumento da actividade dos péptidos resultantes, podendo estas alterações servir de base para o melhoramento de sequências de resíduos de aminoácidos de ciclótidos, conduzindo ao mesmo efeito final: péptidos com elevada estabilidade e actividade antimicrobiana.

### 3.5. Ensaio biofísicos

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica não invasiva, com elevada sensibilidade que permite o estudo da estrutura e dinâmica de péptidos e proteínas. Neste trabalho, por utilização da fluorescência intrínseca dos péptidos em estudo, foi realizada uma caracterização dos mesmos em solução aquosa e diferentes aspectos da sua interacção com

modelos membranares foram avaliados. No caso dos péptidos BP100 e PepRYL foi seguida a intensidade de fluorescência do resíduo de tirosina, não sendo considerado o resíduo de fenilalanina já que a fluorescência emitida por este resíduo raramente é detectável pois é o resíduo fluorescente com menores valores de coeficiente de extinção molar e de rendimento quântico. No caso dos péptidos PepRWL e Sub3 foi seguida a intensidade de fluorescência do resíduo de triptofano, não sendo, para o PepRWL, considerado a fluorescência proveniente do resíduo de fenilalanina pelos motivos acima referidos. Os coeficientes de extinção molar,  $\epsilon$ , foram estimados com base no  $\epsilon$  dos resíduos de tirosina (BP100 e PepRYL) ou (PepRWL e Sub3) [58]. Deste modo, assumiu-se que o  $\epsilon$  de cada péptido era igual ao  $\epsilon$  do resíduo fluorescente presente na sequência (tabela 11).

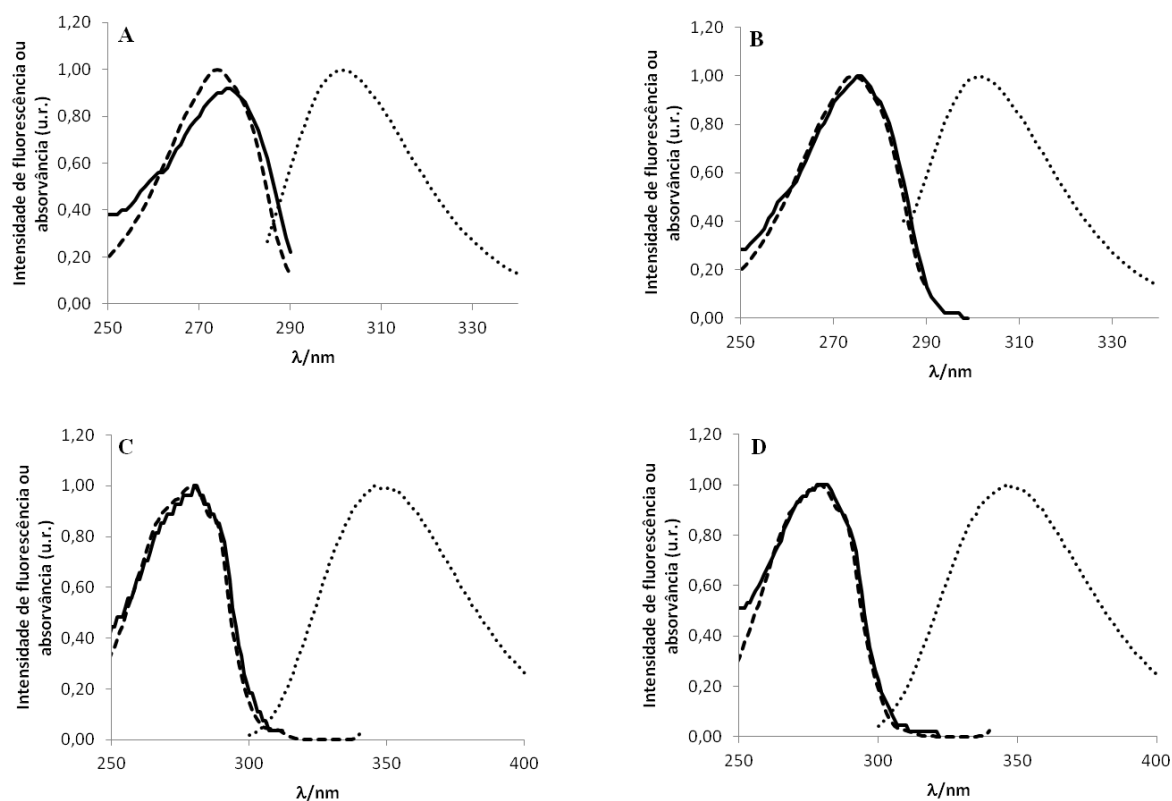
**Tabela 11 – Principais características dos péptidos em estudo.** Os valores de coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ), massa molar (M) e de ponto isoelétrico (pI) são os valores teóricos obtidos por recurso à ferramenta ProtParam.

Péptido	Sequência	Carga	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	M (Da)	pI teórico
<b>BP100</b>	KKLFFKKILKYL	+5	1490	1421,8	10,30
<b>PepRYL</b>	RRLFRRILRYL	+5	1490	1561,9	12,18
<b>PepRWL</b>	RRLFRRILRWL	+5	5500	1584,9	12,60
<b>Sub3</b>	RRWRIVVIRVRR	+6	5500	1665,0	12,70

Uma vez que os valores dos pontos isoelétricos dos quatro péptidos em estudo são sempre superiores a 10 e que todos os ensaios foram realizados a um valor de pH fisiológico e, portanto, de aproximadamente 7, todos os péptidos apresentavam nessas condições carga positiva.

### 3.5.1. Caracterização espectral

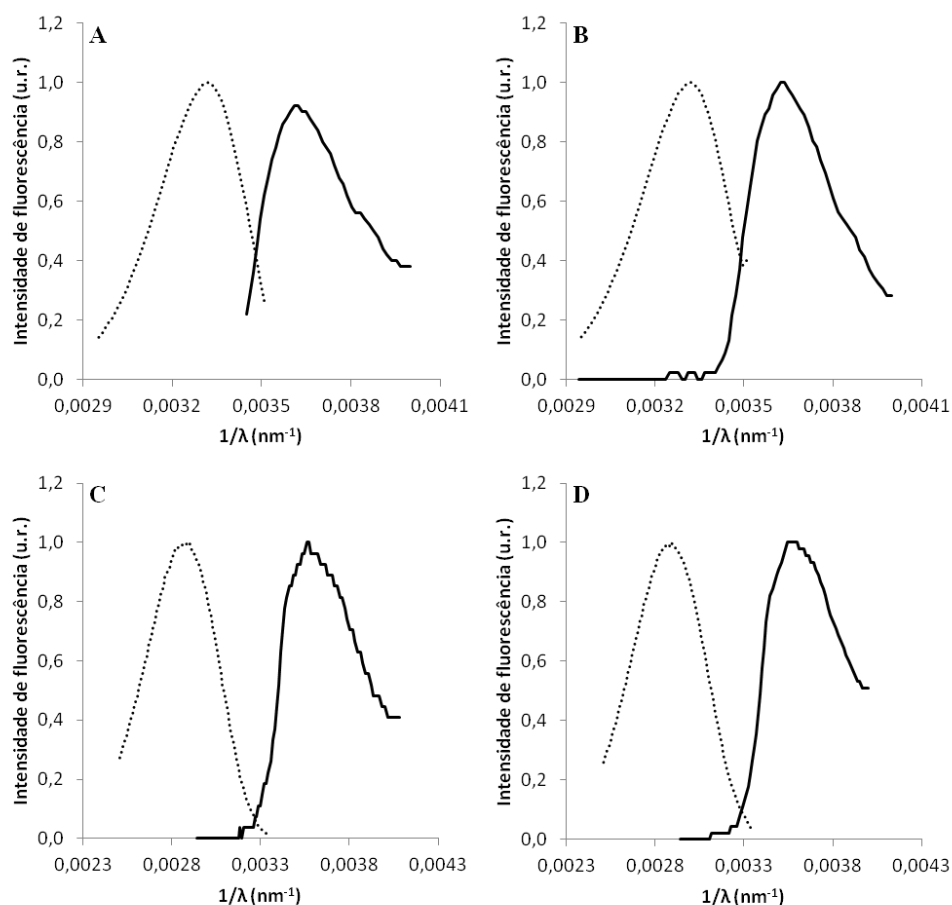
De forma a determinar quais os comprimentos de onda máximos para a absorção ( $\lambda_{abs}$ ), emissão ( $\lambda_{em}$ ) e excitação ( $\lambda_{exc}$ ) dos péptidos em estudo e de forma a compará-los com os espectros da tirosina (tyr) e do triptofano (trp) realizou-se a caracterização espectral dos péptidos em solução aquosa. Os espectros obtidos para os diferentes péptidos encontram-se na figura 24.



**Figura 24 – Caracterização espectral dos péptidos em estudo.** Espectros de absorção (—), emissão (····) e excitação (— —) dos péptidos BP100 (A) e PepRYL (B) a 50  $\mu\text{M}$  e de PepRWL (C) e Sub3 (D) a 15  $\mu\text{M}$  em tampão HEPES, normalizados para o valor máximo.

Por observação das representações gráficas acima é possível inferir que os espectros obtidos para os péptidos em estudo são semelhantes aos espectros de L-tirosina e L-triptofano em solução aquosa. Assim, o comprimento de onda ao qual ocorre o máximo de absorção dos espectros de absorção e de excitação é muito aproximado do observado para os resíduos de aminoácidos livres em solução: 274 nm para os péptidos BP100 e PepRYL e 280 nm para os péptidos PepRWL e Sub3, por comparação com 275 nm para a tirosina e 280 nm para o triptofano [58]. Também o  $\lambda_{\text{em}}$  máximo se encontra próximo do esperado, sendo de 302 nm para os péptidos com tirosina e 347 nm para os péptidos com triptofano. Os valores presentes na literatura para estes comprimentos de onda são de 303 nm para a tirosina e 348 nm para o triptofano a pH fisiológico à temperatura ambiente [58]. É ainda visível um “ombro” a 288 nm nos espectros de excitação e absorção dos péptidos PepRWL e Sub3, típico dos espectros de absorção e excitação do resíduo de triptofano [58].

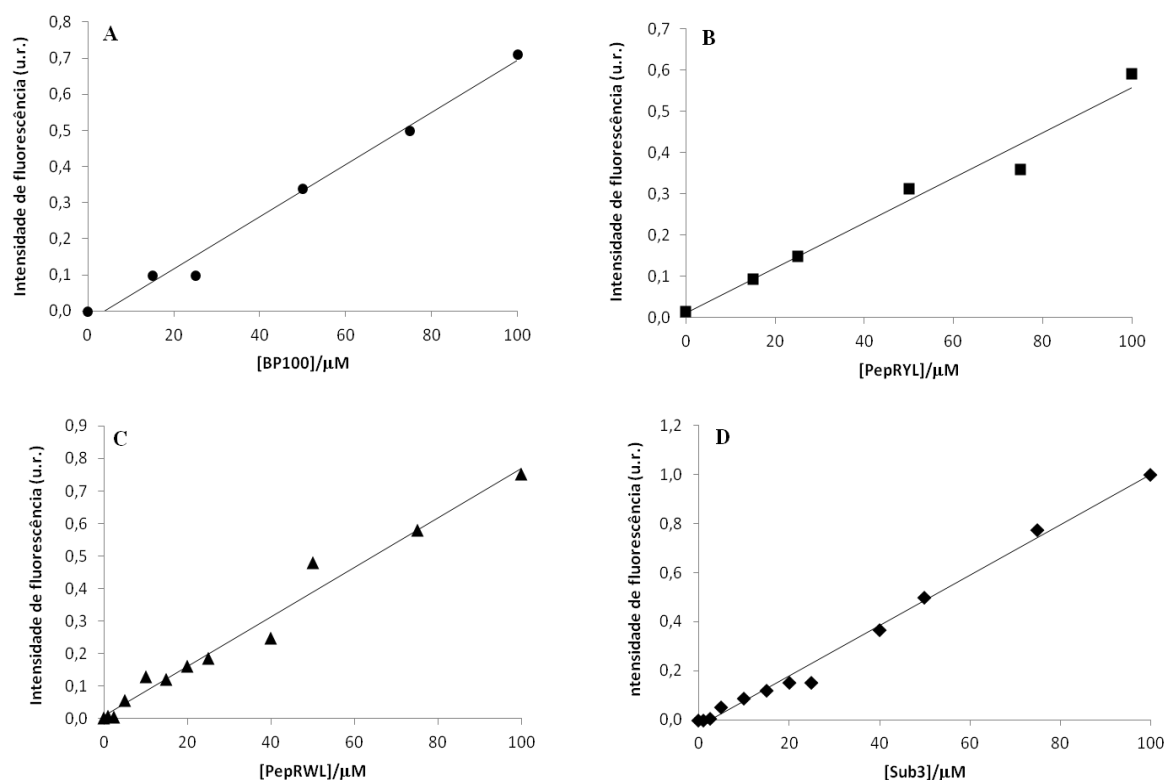
Analisando a figura 25 é perceptível a existência de simetria entre os espectros de emissão e absorção dos diferentes péptidos, obedecendo estes à regra do espelho, que resulta da existência do mesmo tipo de transições nos fenómenos de emissão e absorção. Para a maioria dos fluoróforos o espectro de emissão é a imagem no espelho da absorvância resultante da transição do estado basal para o primeiro estado excitado singuleto ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) [57]. Caso ocorram transições para o segundo estado excitado singuleto ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) observa-se a existência de um segundo pico no espectro de absorção para comprimentos de onda mais baixos e portanto com maior energia, que não é, contudo, observável no espectro de emissão [57]. Deste modo, pela análise espectral dos péptidos em estudo é possível inferir que as principais transições observadas resultam da passagem dos electrões do estado basal de energia para o primeiro estado excitado singuleto.



**Figura 25 – Simetria dos espectros de emissão (.....) e absorção (—) dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D).**

### 3.5.2. Efeito da concentração

Com o intuito de avaliar a existência de agregação e *self-quenching* (i.e. um fluoróforo provocaria o *quenching* da sua intensidade de fluorescência) dos péptidos em solução aquosa, avaliou-se a relação entre a intensidade de fluorescência e as concentrações crescentes de péptido.



**Figura 26 – Efeito da concentração de péptido na intensidade de fluorescência medida.** Representações da intensidade de fluorescência medida em função da concentração de BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) até uma concentração máxima de 100 μM.

A análise da figura 26 sugere a inexistência de fenômenos de agregação ou *self-quenching* dos péptidos já que não há alteração do rendimento quântico com o aumento de concentração de péptido. Esta inferência é apoiada pela observação de uma relação linear entre os valores de intensidade de fluorescência e os valores crescentes de concentração de péptido testadas. Testaram-se concentrações até 100 μM que corresponde à concentração máxima de péptido utilizada nos ensaios de MICs e AFM. A existência de uma relação linear entre os valores de absorvância e a gama de concentrações de péptido testadas foi previamente confirmada.



### 3.5.3. Determinação do rendimento quântico

O rendimento quântico ( $\phi_F$ ) expressa a quantidade de moléculas que regressam ao estado energético fundamental por emissão de fótons, sendo dado pela razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos [57, 60]. O rendimento quântico determina a eficiência do processo de fluorescência e, uma vez que é uma propriedade do fluoróforo, foi determinado de forma a caracterizar os fluoróforos dos péptidos em estudo. Contudo, uma vez que a determinação do  $\phi_F$  absoluto envolve a determinação precisa da quantidade de luz de excitação recebida pela amostra, é necessária a utilização de equipamento específico. Deste modo, foi determinado o  $\phi_F$  relativo, em que a eficiência do processo de fluorescência é comparada com a de uma solução padrão. O padrão escolhido deve idealmente possuir bandas de absorção e de emissão próximas das obtidas para os péptidos em estudo [60]. Neste trabalho, foram escolhidos como padrões soluções do resíduo de tirosina para os péptidos BP100 e PepRYL e de triptofano para os péptidos PepRWL e Sub3. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 12.

**Tabela 12 – Valores de rendimento quântico obtidos para os diferentes péptidos em estudo.** Estes valores foram obtidos utilizando o comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) e de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) apresentados a 21,4 °C para o péptido BP100, 21,7 °C para PepRYL e a 21°C para PepRWL e Sub3.

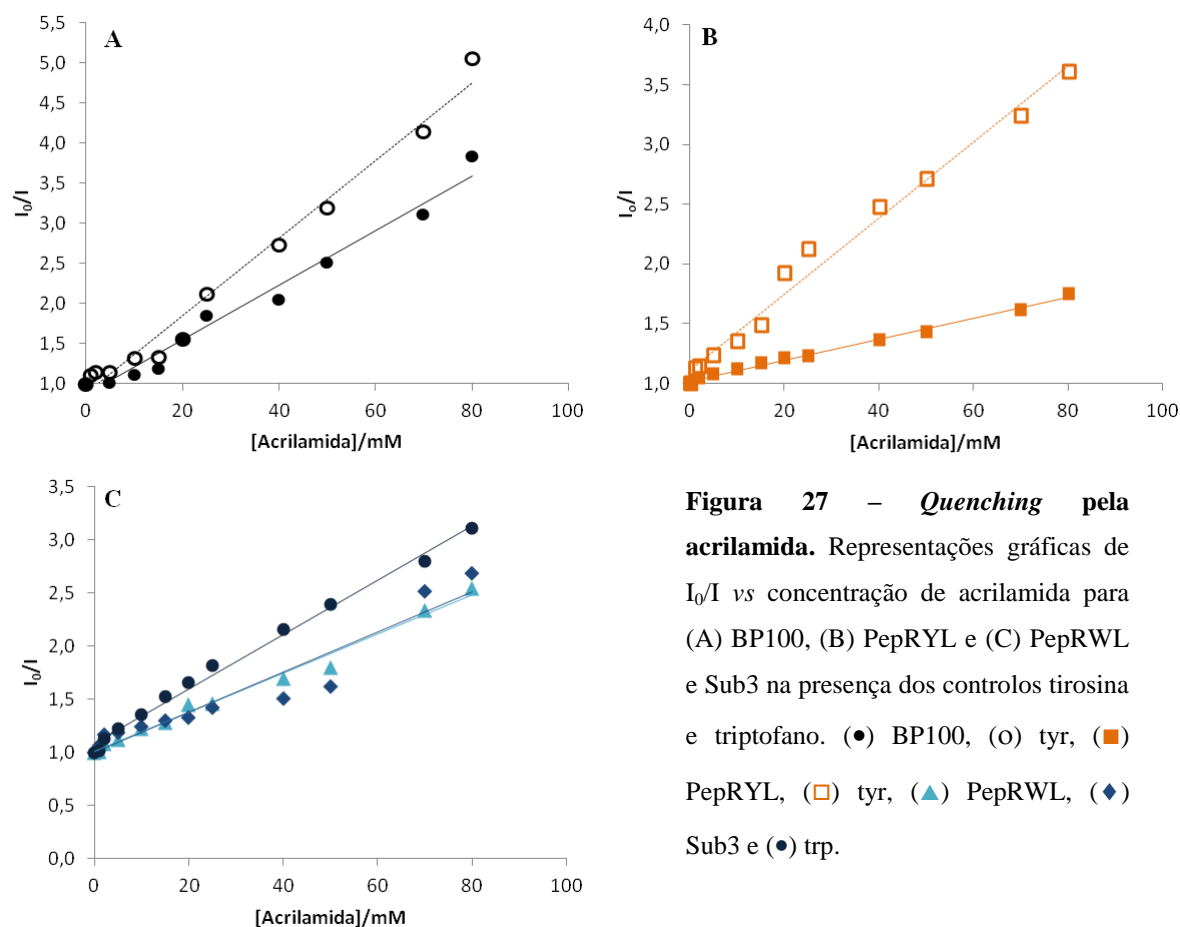
Péptido	$\lambda_{em}$	$\lambda_{exc}$	$\phi_F$
BP100	302	274	0,08
PepRYL	302	274	0,05
PepRWL	347	280	0,09
Sub3	347	280	0,11

Tendo em conta que os valores teóricos de  $\phi_F$  para os resíduos de triptofano e tirosina são de 0,13 e 0,14, respectivamente, observa-se que os valores obtidos experimentalmente para os péptidos PepRWL, Sub3 e BP100 se encontram próximos do valores teóricos de  $\phi_F$  para os resíduos de triptofano (PepRWL e Sub3) e tirosina (BP100), enquanto que, o valor obtido para o  $\phi_F$  do fluoróforo do péptido PepRYL se encontra ligeiramente mais baixo que o valor teórico para o resíduo de tirosina [57]. Esta diminuição do valor de  $\phi_F$  para o péptido PepRYL poderá dever-se à substituição do resíduo de lisina pelo resíduo de arginina, adjacente ao resíduo de tirosina. A presença de um grupo amida na cadeia lateral deste

aminoácido poderá diminuir a quantidade de intensidade de fluorescência emitida pelo grupo fenol, como anteriormente descrito [76].

#### 3.5.4. *Quenching* pela acrilamida

*Quenching* é um processo em que ocorre diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra, podendo ser dinâmico (também designado por colisional) ou estático (ver Anexo C). A acrilamida é um *quencher* solúvel em solução aquosa incapaz de penetrar extensivamente nas membranas [57]. Uma vez que para que ocorra *quenching* é necessário contacto entre o fluoróforo e o *quencher*, a acrilamida apenas reduzirá a intensidade de fluorescência de fluoróforos completa ou parcialmente acessíveis à solução aquosa [57]. Os resultados deste tipo de ensaios são normalmente representados em gráficos de razão entre a intensidade de fluorescência na ausência de *quencher* e na sua presença -  $I_0/I$  – em função da concentração de *quencher* -  $[Q]$  - derivados da equação de Stern-Volmer (equação C1, pág. 115). Os declives das rectas resultantes correspondem à constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), que representa a eficiência do *quenching*. Deste modo, quanto maior for esta constante mais significativo será o *quenching*. Neste ensaio foi realizado o *quenching* pela acrilamida de soluções dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 e dos controlos tirosina e triptofano em tampão HEPES. As representações gráficas obtidas encontram-se na Figura 33 e os valores de  $K_{SV}$  na tabela 13.



**Figura 27 – Quenching pela acrilamida.** Representações gráficas de  $I_0/I$  vs concentração de acrilamida para (A) BP100, (B) PepRYL e (C) PepRWL e Sub3 na presença dos controlos tirosina e triptofano. (●) BP100, (○) tyr, (■) PepRYL, (□) tyr, (▲) PepRWL, (◆) Sub3 e (●) trp.

**Tabela 13 – Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtidos para o quenching pela acrilamida dos péptidos em estudo e dos controlos tirosina e triptofano.**

Péptido	BP00	Tyr <sup>[a]</sup> (BP100)	PepRYL	Tyr <sup>[a]</sup> (PepRYL)	PepRWL	Sub3	Trp
$K_{SV}$ (M <sup>-1</sup> )	34,1	48,5	8,8	31,9	18,4	18,8	25,6

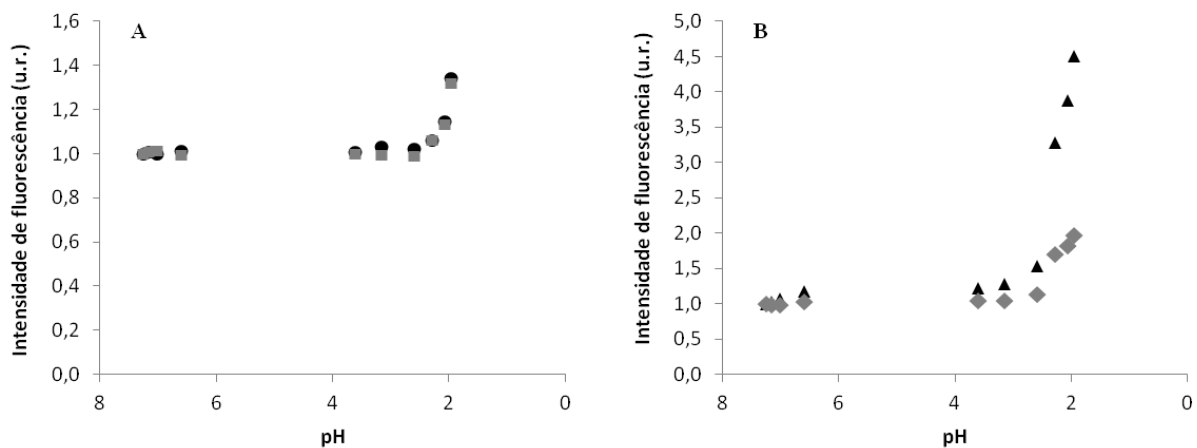
<sup>[a]</sup> Foram realizados dois ensaios de quenching pela acrilamida da solução de resíduo de tirosina livre pois os ensaios para os péptidos BP100 e PepRYL foram realizados em dois dias diferentes.

Por observação das representações gráficas obtidas parece haver uma menor acessibilidade do resíduo de tirosina presente no péptido PepRYL, quando comparado com o resíduo de tirosina livre em solução. Esta observação é corroborada pela análise dos valores de  $K_{SV}$  obtidos. Assim, é possível observar uma grande diminuição do valor de  $K_{SV}$  quando comparado com o valor da solução padrão de tirosina. Este resultado sugere a existência de algum nível de estrutura secundária que diminua a acessibilidade do resíduo ao ambiente aquoso. Caso se verifique a ausência de estrutura secundária deste péptido em solução aquosa, esta diminuição poderá dever-se aos resíduos de aminoácidos adjacentes, arginina e leucina

que poderão contribuir para a incompleta acessibilidade deste fluoróforo ao solvente. Os restantes péptidos apresentam valores aproximados aos valores obtidos para os controlos, estando apenas ligeiramente mais baixos. Deste modo, os fluoróforos de BP100, PepRYL e PepRWL parecem estar acessíveis ao solvente.

### 3.5.5. Efeito da presença de ureia e alteração do pH

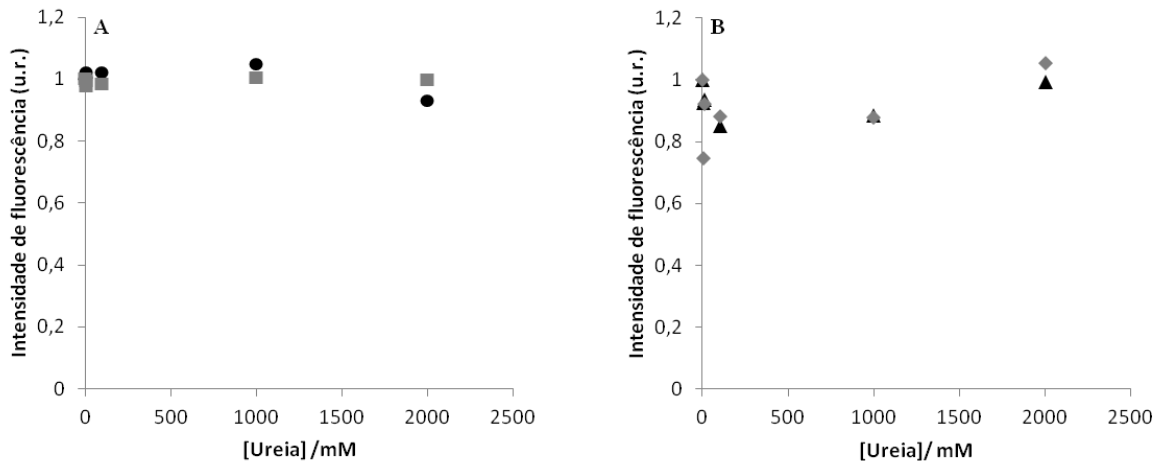
A ureia é um potente desnaturante, utilizado muitas vezes para o estudo de *unfolding* de proteínas [77]. A alteração do pH de uma solução, por sua vez, pode também provocar uma alteração da conformação de proteínas em solução podendo conduzir à sua desnaturação [77]. Com o intuito de perceber se os péptidos em estudo possuíam estrutura secundária em solução aquosa, estes foram titulados com concentrações crescentes de ureia ou de ácido clorídrico (HCl). Estes ensaios possuíam ainda uma elevada relevância, pois o passo seguinte no estudo do efeito dos péptidos em estudo sobre a bactéria *H. pylori* envolverá estudos a pH acídicos e, por consequência, na presença de ureia de forma a garantir a sobrevivência desta bactéria. Os resultados obtidos para o efeito da diminuição do pH encontram-se representados na figura 28 e para o aumento da concentração de ureia na figura 29.



**Figura 28 - Efeito da diminuição do pH.** Foi seguida a intensidade de fluorescência durante a titulação de uma solução dos péptidos BP100 (●), PepRYL (■), PepRWL (▲) e Sub3 (◆) com ácido clorídrico. Os valores apresentados encontram-se normalizados ao padrão utilizado: tirosina para BP100 e PepRYL (A) e triptofano para PepRWL e Sub3 (B).

Por análise da figura 28 é observável que a intensidade de fluorescência se mantém constante com a diminuição do pH, havendo um aumento da intensidade de fluorescência para

pH  $\approx$  2 ou inferior. Este efeito é mais significativo para o péptido PepRWL que para o péptido Sub3, apesar deste último apresentar um efeito superior ao observado para os péptidos BP100 e PepRYL. O aumento da intensidade de fluorescência poderia denotar a perda de estrutura secundária (caso esta exista) dos péptidos em estudo devido a uma maior acessibilidade dos fluoróforos tirosina e triptofano à solução aquosa.



**Figura 29 - Efeito do aumento da concentração de ureia.** Foi seguida a intensidade de fluorescência durante a titulação de uma solução dos péptidos BP100 (●), PepRYL (■), PepRWL (▲) e Sub3 (◆) com ureia. Os valores apresentados encontram-se normalizados ao padrão utilizado: tirosina para BP100 e PepRYL (A) e triptofano para PepRWL e Sub3 (B).

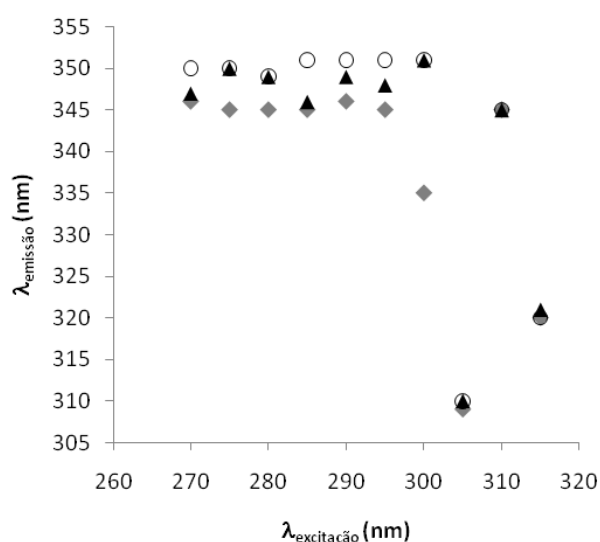
Já por análise da figura 29, não são visíveis alterações significativas na intensidade de fluorescência medida aquando do aumento das concentrações de ureia. Este resultado sugere que os péptidos não possuem estrutura, uma vez que não há alteração da intensidade de fluorescência dos resíduos de tirosina e triptofano na presença de ureia.

Em conjunto, a variação de pH e da concentração de ureia têm uma fraca influência na emissão de fluorescência dos péptidos, o que sugere que os péptidos em condições fisiológicas, se encontra numa forma não estruturada. Para determinar com certeza a existência de estrutura secundária destes péptidos em solução aquosa são necessários outros estudos. Neste caso foram realizados estudos de dicroísmo circular.

### 3.5.6. Efeito de *red edge*

O efeito de *red edge* é visível pelo aumento do comprimento de onda máximo de emissão por aumento do comprimento de onda de excitação. Este depende de alterações das

interacções fluoróforo-solvente que ocorrem quando uma molécula passa do estado fundamental para o estado excitado [58]. Quando ocorre efeito de *red edge* existem normalmente duas sub-populações de fluoróforos: uma excitada ao comprimento de onda máximo de absorção e outra excitada a comprimentos de onda superiores e, portanto, de menor energia [57]. Neste estudo, apenas foi realizado o estudo de *red edge* para os péptidos PepRWL e Sub3 pois o estudo desta alteração é utilizado, normalmente, como uma ferramenta para caracterizar o microambiente que rodeia o resíduo de triptofano [58].



**Figura 30** – Representação gráfica da variação do  $\lambda_{em}$  (nm) em função do  $\lambda_{exc}$  (nm). (▲) PepRWL, (◆) Sub3 e (○) triptofano.

Por observação da figura 30 é possível inferir a inexistência de efeito de *red edge* uma vez que não ocorre um aumento do comprimento de onda de emissão com o aumento do comprimento de onda de excitação. Para além disso, o comportamento de PepRWL e Sub3 é igual ao observado para o comportamento da solução de L-triptofano. A partir do  $\lambda_{exc}$  de 300 nm é visível uma diminuição dos valores de  $\lambda_{em}$  que se poderá dever à razão sinal/ruído ser muito pequena, sendo o sinal medido muito fraco devido à inexistência de uma sub-população excitada a estes comprimentos de onda.

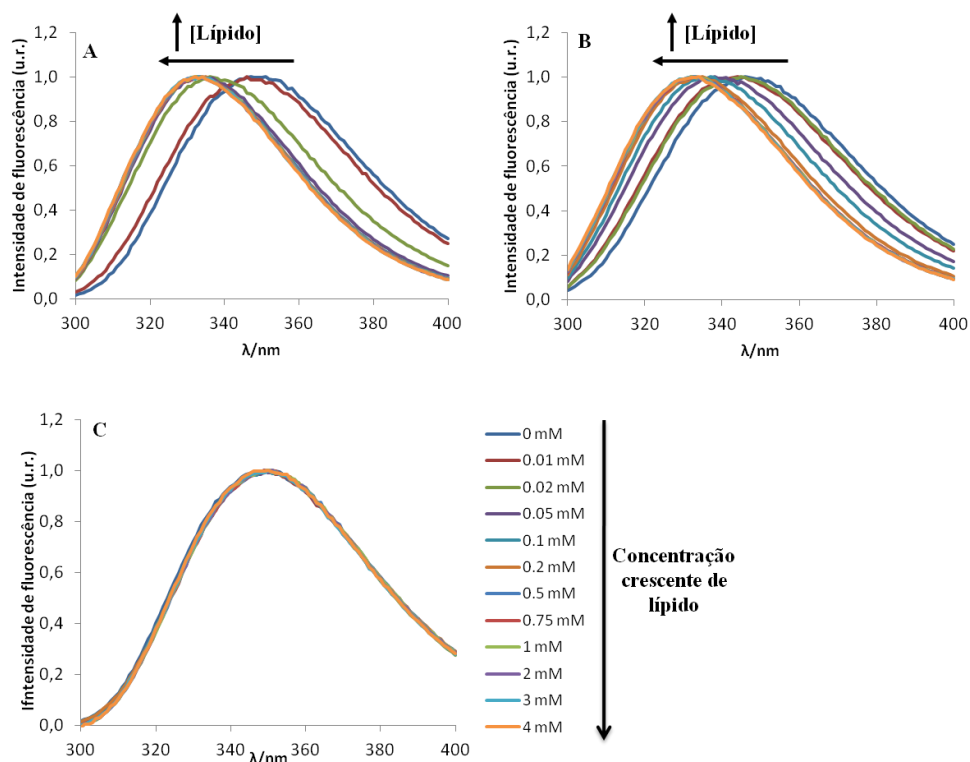
### 3.5.7. Estudos de partição

Os estudos de partição são de elevada relevância para a caracterização da interacção péptido-membrana [78]. De forma a avaliar se os péptidos em estudo têm afinidade para a membrana, soluções de péptido foram tituladas com diferentes lípidos ou misturas lipídicas.

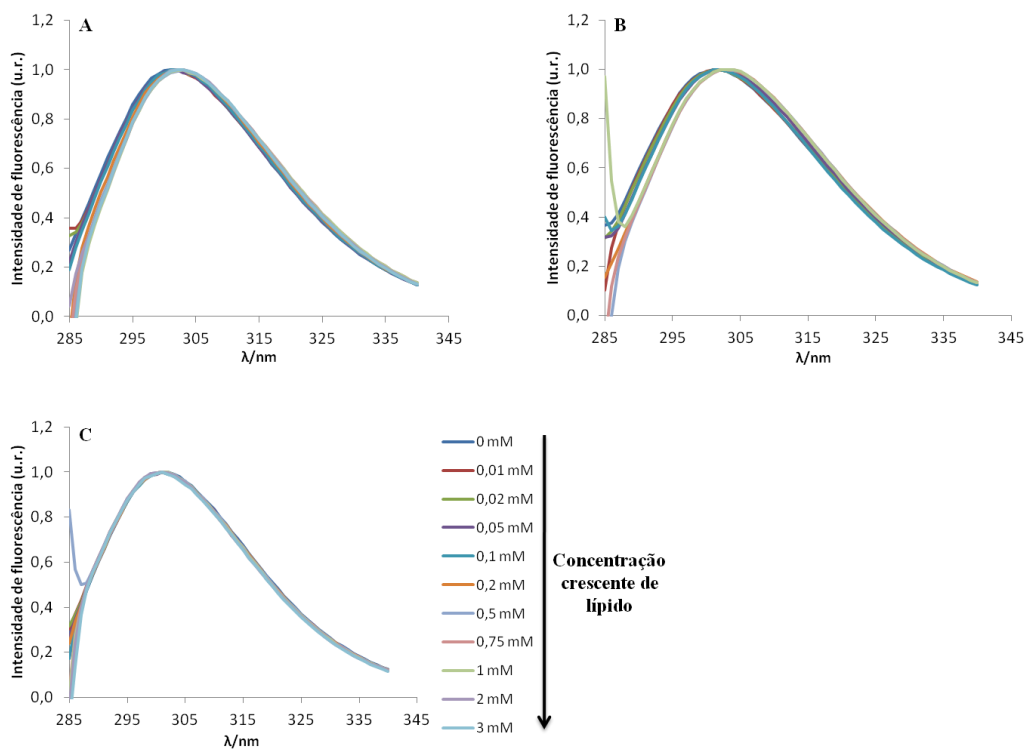
Pela titulação com o lípido foi possível observar um aumento do  $\phi_F$  o que indica que os resíduos de tirosina e de triptofano se encontram num ambiente mais apolar. Esta observação sugere que os péptidos particionam na membrana. Pela variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de lípido titulado é possível comparar a afinidade dos péptidos para a membrana pelo cálculo da constante de partição  $K_p$  (i.e a razão entre a concentração de péptido em lípido e a concentração de péptido em água) pela equação 9. Valores mais elevados de  $K_p$  sugerem uma maior afinidade do péptido em estudo para o modelo membranar. Paralelamente ao aumento da intensidade de fluorescência, quando o microambiente que rodeia os resíduos de triptofano se torna mais apolar, como quando ocorre a sua inserção em membranas, ocorre geralmente um deslocamento do máximo de intensidade de fluorescência para o azul (i.e. para comprimentos de onda menores e, portanto de maior energia). Este efeito é denominado *blue-shift* [57].

Neste estudo foi também calculada a fracção molar de péptido particionado na membrana,  $X_L$ , quando na presença de 1 mM de lípido (POPC ou POPC/POPG) segundo a equação 10 (pág.30). A determinação deste parâmetro permite comparar os diferentes péptidos nos diferentes sistemas lipídicos estudados para uma concentração fixa de lípido.

Nas figuras 31 e 32 foram realizadas representações gráficas de intensidade de fluorescência em função do  $\lambda_{em}$  dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3, assim como dos resíduos de tirosina e triptofano com o intuito de observar a ocorrência ou não de *blue-shift*. Estas representações foram realizadas para a mistura lipídica de POPC/POPG 1:1 pois é aquela para a qual teoricamente os péptidos terão uma maior afinidade. Na figura 33 encontram-se representadas as curvas de partição obtidas por aplicação de uma regressão não-linear aos valores experimentais obtidos. Do ajuste não-linear realizado foram obtidos os valores da constante de partição  $K_p$  e de  $I_L/I_W$  (i.e. a razão entre a intensidade de fluorescência do péptido quando se encontra particionado no lípido,  $I_L$ , e a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência de lípido,  $I_W$ ) presentes na tabela 14.

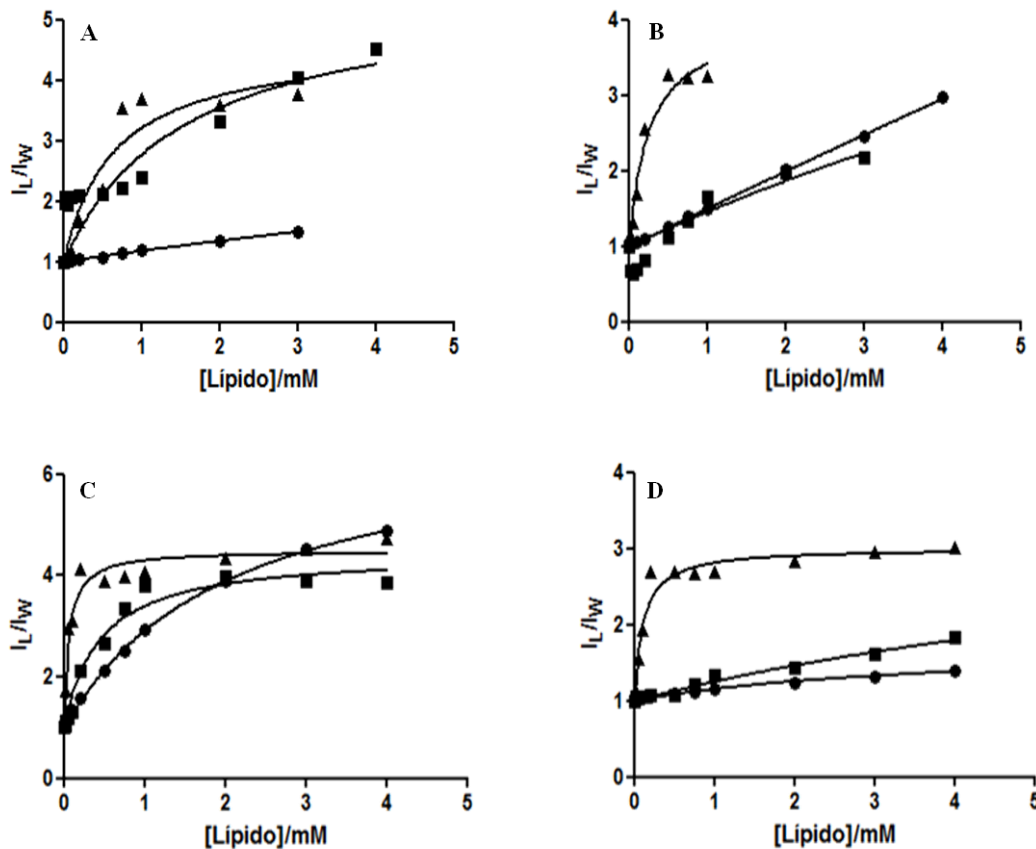


**Figura 31 – Representação da intensidade de fluorescência vs  $\lambda_{em}$  dos péptidos PepRWL (A), Sub3 (B) e do resíduo de triptofano (C) por interação com concentrações crescentes de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1.**



**Figura 32 - Representação da intensidade de fluorescência vs  $\lambda_{em}$  dos péptidos BP100 (A), PepRYL (B) e do resíduo de tirosina (C) por interação com concentrações crescentes de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1.**





**Figura 33 – Curvas de partição.** Ajuste da regressão não-linear aos valores experimentais obtidos para BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D) em modelos membranares constituídos por POPC (●), POPC/POPG 4:1 (■) ou POPC/POPG 1:1 (▲).

Por observação das curvas de partição obtidas parece haver uma preferência dos péptidos em estudo pelas vesículas constituídas por POPC/POPG 1:1. Os resultados sugerem ainda que apenas o péptido PepRWL consegue particionar nas LUVs constituídas apenas por POPC. Da mesma forma, por análise da figura 31 é possível inferir a existência de inserção dos péptidos PepRWL e Sub3 nos modelos membranares já que é observável um desvio do máximo de intensidade de fluorescência para o azul, para além do aumento de intensidade de fluorescência observado na figura 33. Este efeito não é visível para o triptofano livre, uma vez que este não particiona para membranas, tal como esperado. A emissão de fluorescência dos péptidos que contêm tirosina, figura 32, não apresentam *blue-shift* quando titulados com lípido. Esta observação deve-se ao facto de o resíduo de triptofano ser mais sensível ao microambiente em que se insere que o resíduo de tirosina [57].

A análise dos valores presentes na tabela 14 permitirá uma análise mais acertiva destes resultados.

**Tabela 14 – Valores de  $K_p$ , da razão  $I_L/I_W$  e de  $X_L$  determinados para as diferentes misturas lipídicas utilizadas para cada um dos péptidos em estudo.**

Péptido	Mistura lipídica	$K_p$ ( $\times 10^3$ ) <sup>[a]</sup>	$I_L/I_W$ <sup>[a]</sup>	$X_L$ <sup>[b]</sup>	<i>Blue-shift</i> (nm) <sup>[c]</sup>
<b>BP100</b>	POPC	0,05 ± 0,02	5,47 ± 3,08	0,04 ± 0,01	-
	POPC/POPG (4:1)	0,87 ± 0,61	5,53 ± 6,66	0,40 ± 0,29	-
	POPC/POPG (1:1)	2,08 ± 0,80	4,62 ± 3,11	0,61 ± 0,27	-
<b>PepRYL</b>	POPC	0,01 ± 0,01	56,34 ± 37,66	0,01 ± 0,01	-
	POPC/POPG (4:1)	0,08 ± 0,34	9,01 ± 47,24	0,06 ± 0,24	-
	POPC/POPG (1:1)	5,29 ± 1,40	4,02 ± 1,89	0,80 ± 0,16	-
<b>PepRWL</b>	POPC	0,63 ± 0,04	6,90 ± 0,70	0,32 ± 0,02	10
	POPC/POPG (4:1)	3,05 ± 0,64	4,44 ± 1,71	0,70 ± 0,15	17
	POPC/POPG (1:1)	22,44 ± 4,697	4,49 ± 1,91	0,94 ± 0,20	18
<b>Sub3</b>	POPC	0,34 ± 0,07	1,75 ± 0,65	0,21 ± 0,04	0
	POPC/POPG (4:1)	0,13 ± 0,08	3,75 ± 3,13	0,28 ± 0,13	5
	POPC/POPG (1:1)	12,78 ± 2,75	3,00 ± 1,24	0,91 ± 0,20	13

<sup>[a]</sup> Os valores de  $K_p$  e da razão  $I_L/I_W$  foram determinados directamente a partir da regressão não-linear realizada. <sup>[b]</sup>

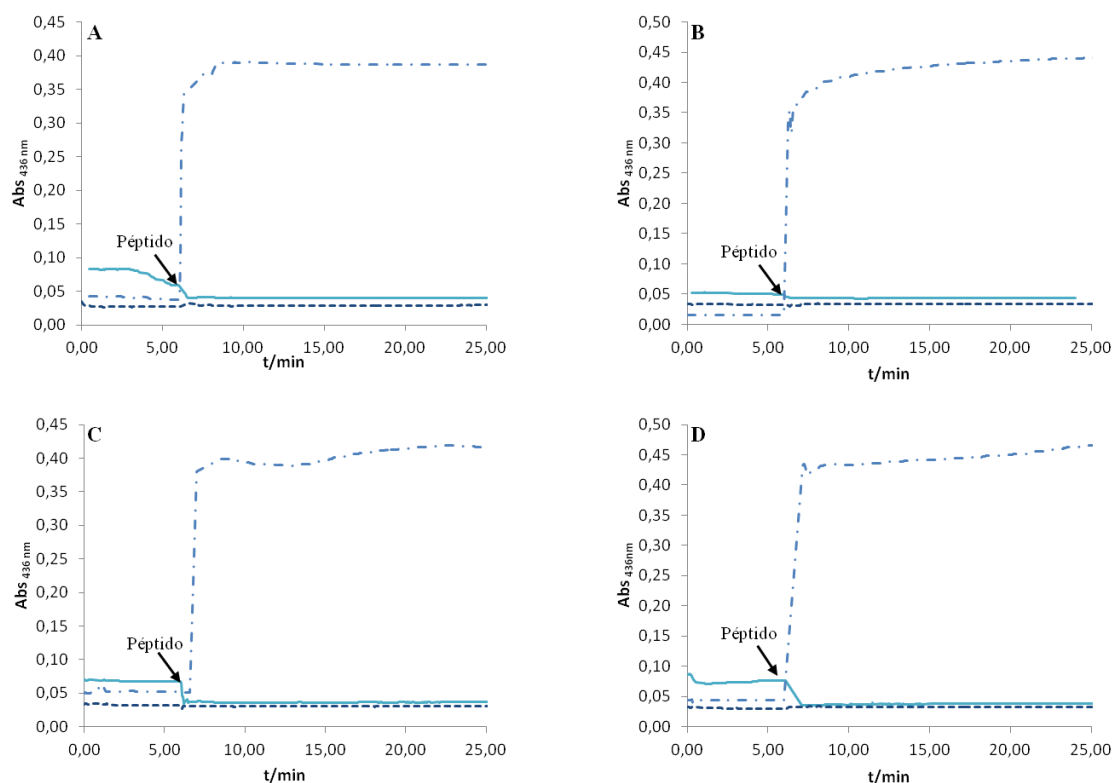
Os valores de  $X_L$  foram determinados por aplicação da equação 10. <sup>[c]</sup> Os valores de *blue-shift* foram obtidos por observação do comprimento de onda máximo para as concentrações de 0 e 1 mM de lípido. Não foram calculados para os péptidos BP100 e PepRYL, devido à menor sensibilidade da tirosina ao microambiente em que se insere.

Assim por observação dos valores presentes na tabela 14 é possível concluir que a afinidade dos péptidos para LUVs aumenta com o aumento da carga negativa na membrana, já que o valor de  $K_p$  mais baixo foi observado para as vesículas zwitteriónicas (POPC) e o mais alto em vesículas de POPC/POPG 1:1. Estes valores encontram-se de acordo com o esperado, uma vez que a atracção entre a carga positiva dos péptidos e a carga negativa das membranas será maior, para uma carga negativa mais elevada. O péptido com maior afinidade para vesículas zwitteriónicas é o PepRWL, o que está de acordo com o esperado a partir dos resultados de hemólise já que este era o péptido que apresentava um maior carácter hemolítico. O péptido Sub3 também apresenta uma afinidade superior para este tipo de membranas quando em comparação com os péptidos BP100 e PepRYL, apesar de ser o péptido menos hemolítico e de a sua previsão teórica não estar de acordo com o observado. Contudo, o seu valor de  $I_L/I_W$  é inferior ao obtido para todos os outros péptidos, podendo-se

inferir que este não se encontra inserido profundamente no lípido, podendo encontrar-se apenas adsorvido à superfície da membrana. Esta observação é ainda reforçada pela observação da inexistência de *blue-shift* quando titulado com LUVs constituídas por POPC, o que está de acordo com o seu fraco carácter hemolítico. O valor de  $I_L/I_W$  obtido para PepRYL na presença de LUVs constituídas por POPC é bastante discrepante. Isto poderá dever-se à impossibilidade de ajuste devido à fraca partição deste péptido em vesículas zwitteriónicas. Para o sistema lipídico constituído por POPC/POPG 4:1 obtiveram-se valores intermédios para a constante de partição e da concentração de lípido particionada no lípido. Deste modo é observável uma preferência por membranas com maior carga negativa já que um aumento da proporção do lípido POPG leva a um aumento de afinidade dos péptidos em estudo pelas membranas. Este resultado está de acordo com o esperado, revelando que os péptidos preferem membranas bacterianas carregadas negativamente, relativamente a membranas humanas neutras. Poderá também explicar a preferência destes péptidos contra bactérias Gram-negativas já que estas possuem uma maior carga negativa superficial que as bactérias Gram-positivas devido à existência mais abundante de LPS que de ácidos lipoteicóicos nas suas paredes celulares.

### 3.5.8. Agregação de vesículas

A inserção dos péptidos nos sistemas lipídicos utilizados pode conduzir à destabilização dos mesmos, conduzindo à sua agregação devido à alteração da densidade de carga superficial e à desidratação dos grupos polares dos lípidos. Este fenómeno tem como objectivo o aumento de estabilidade das vesículas e depende, essencialmente, de forças de Van der Waals, de repulsão electrostáticas e hidratação [79]. Para estudar este efeito foi seguida a variação de OD das vesículas lipídicas com as três composições utilizadas nos estudos de partição com uma concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Após adição de péptido a variação de OD foi seguida durante 19 minutos. As representações gráficas obtidas encontram-se na figura 34.

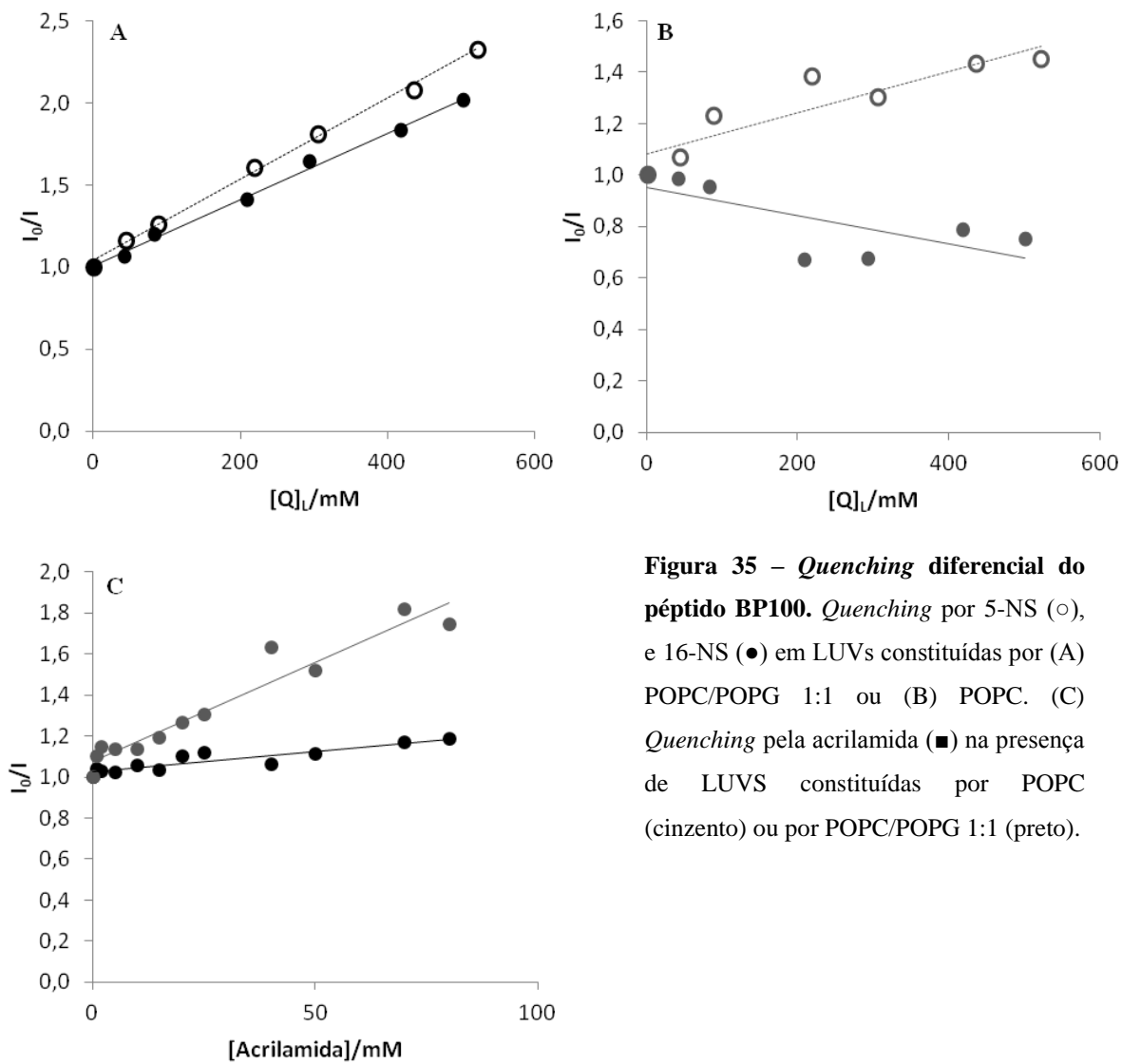


**Figura 34 – Agregação de vesículas induzida pelos péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D).** Aos 6 minutos foram adicionados 50  $\mu\text{M}$  de péptido a 500  $\mu\text{M}$  de LUVs constituídas por POPC (—), POPC/POPG 4:1 (- · -) e 1:1 (- - -).

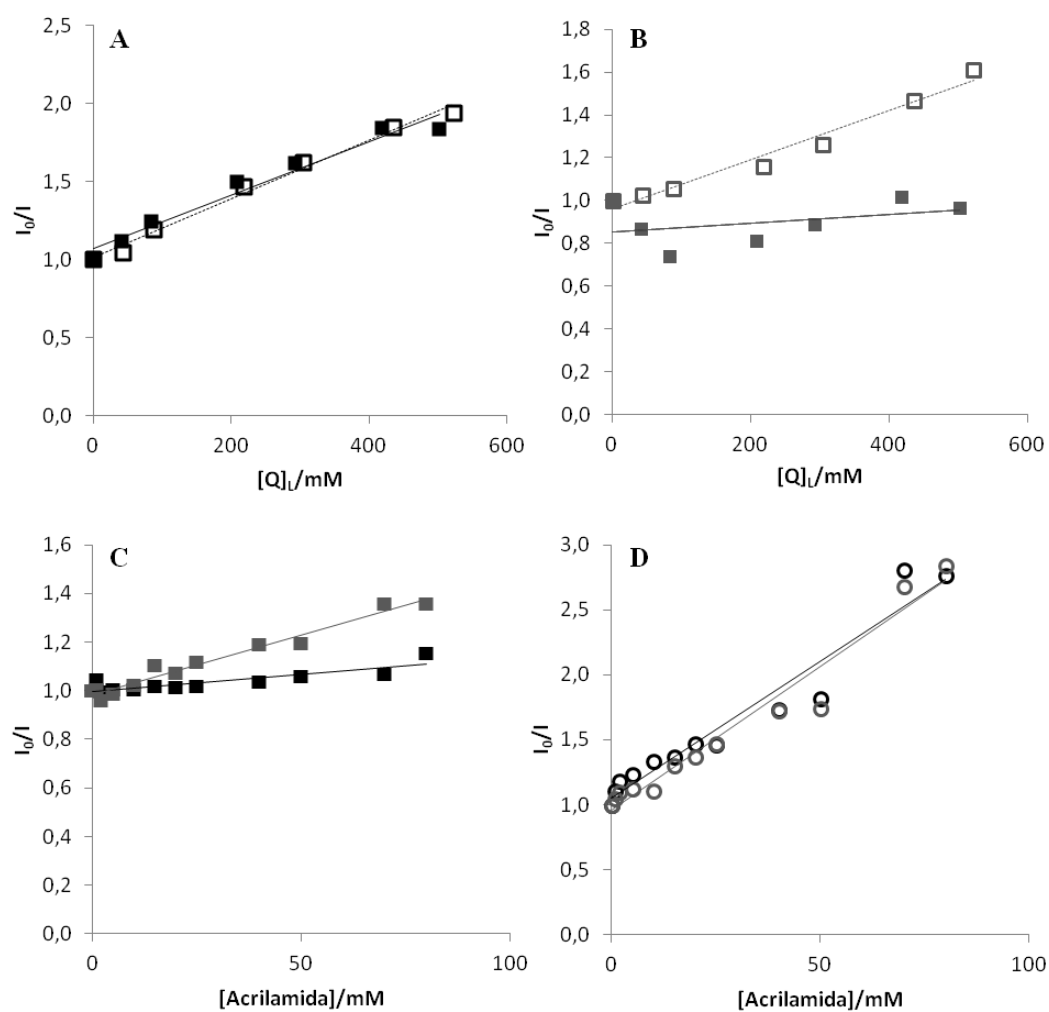
Por análise das representações gráficas acima é possível observar que todos os péptidos induzem a agregação de vesículas constituídas por POPC/POPG 1:1 e que o mesmo não ocorre para vesículas constituídas por POPC ou POPC/POPG 4:1. Assim, da mesma forma que é para esta mistura lipídica que ocorre uma maior partição dos péptidos na membrana é também nesta mistura que ocorre uma maior perturbação das membranas, ocorrendo a agregação das mesmas. Apesar dos valores da constante de partição e da concentração de lípido particionado nas membranas também serem significativos para os modelos membranares constituídos por POPC/POPG 4:1 observa-se que a introdução dos péptidos na membrana, ainda que significativa, pode não ser o suficiente para provocar o grau de destabilização das vesículas necessário para que ocorra agregação das mesmas. Para as vesículas constituídas apenas por POPC não era esperado qualquer efeito, tal como foi observado, já que os péptidos não particionam extensivamente neste modelo membranar, apresentando maior afinidade para modelos membranares carregados negativamente.

### 3.5.9. *Quenching* em profundidade e com a acrilamida

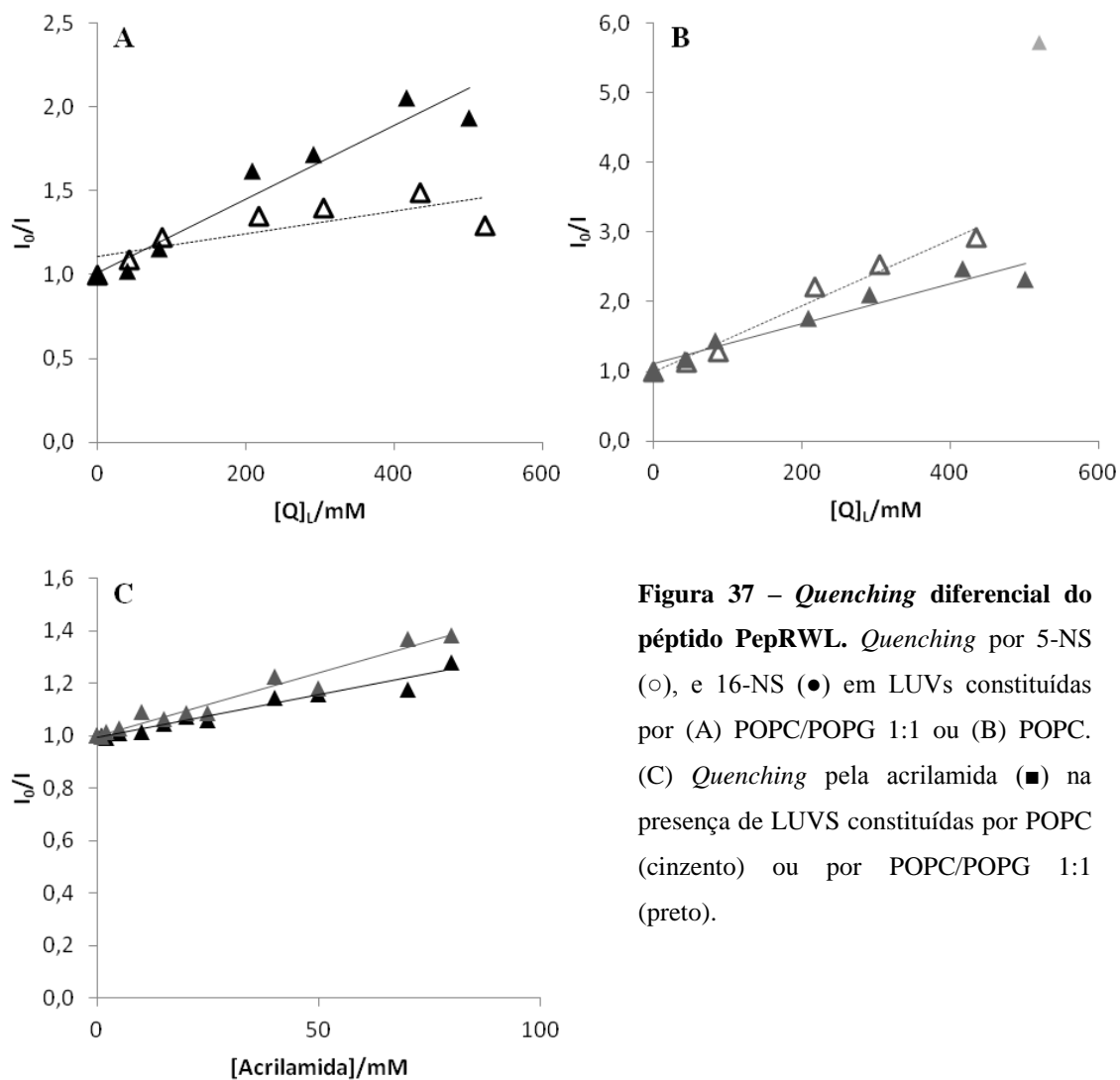
A localização dos resíduos fluorescentes dos péptidos em estudo pode ser prevista através da realização de ensaios de *quenching* comparativos, em que são utilizados *quencher*s com diferentes graus de inserção na membrana [80]. A acrilamida, como já foi referido anteriormente, é solúvel em solução aquosa provocando o *quenching* dos fluoróforos acessíveis ao meio aquoso, sendo incapaz de particionar extensivamente na membrana [57]. Já os *quencher*s 5 e 16-NS são ácidos gordos derivatizados com um grupo *quencher*, o grupo doxilo (NO\*) nas posições 5 e 16, respectivamente [58]. Estes ácidos gordos possuem a capacidade de penetrar nas membranas. No 5-NS o grupo doxilo localiza-se junto à interface membrana-ambiente aquoso, enquanto que no 16-NS este grupo se localiza no centro hidrófobo [68]. Assim, por realização de ensaios de *quenching* com acrilamida, 5 e 16-NS na presença de modelos membranares, é possível estimar o grau de inserção dos péptidos na membrana, complementando deste modo os resultados anteriores. Foram calculados e comparados os valores de  $K_{SV}$  obtidos pela equação de Stern-Volmer (Equação C1, pág. 115). Os ensaios de *quenching* pela acrilamida na presença de LUVs foram realizados para os controlos tirosina e triptofano à semelhança do realizado nos ensaios de *quenching* na ausência de LUVs. Utilizaram-se LUVs constituídas por POPC e por POPC/POPG 1:1 com o intuito de comparar o grau de inserção dos péptidos em modelos membranares de células humanas, ou bacterianas, respectivamente. Os gráficos de Stern-Volmer obtidos para os três ensaios de *quenching* para os quatro péptidos, assim como para a tirosina e triptofano, no caso do *quenching* pela acrilamida encontram-se nas figuras 35 a 38. As concentrações de *quencher* utilizadas para a determinação das constantes de Stern-Volmer foram as concentrações de *quencher* efectivamente particionadas no lípido, calculadas pela equação 11 (pág. 31).



**Figura 35 – Quenching diferencial do péptido BP100.** Quenching por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou (B) POPC. (C) Quenching pela acrilamida (■) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).

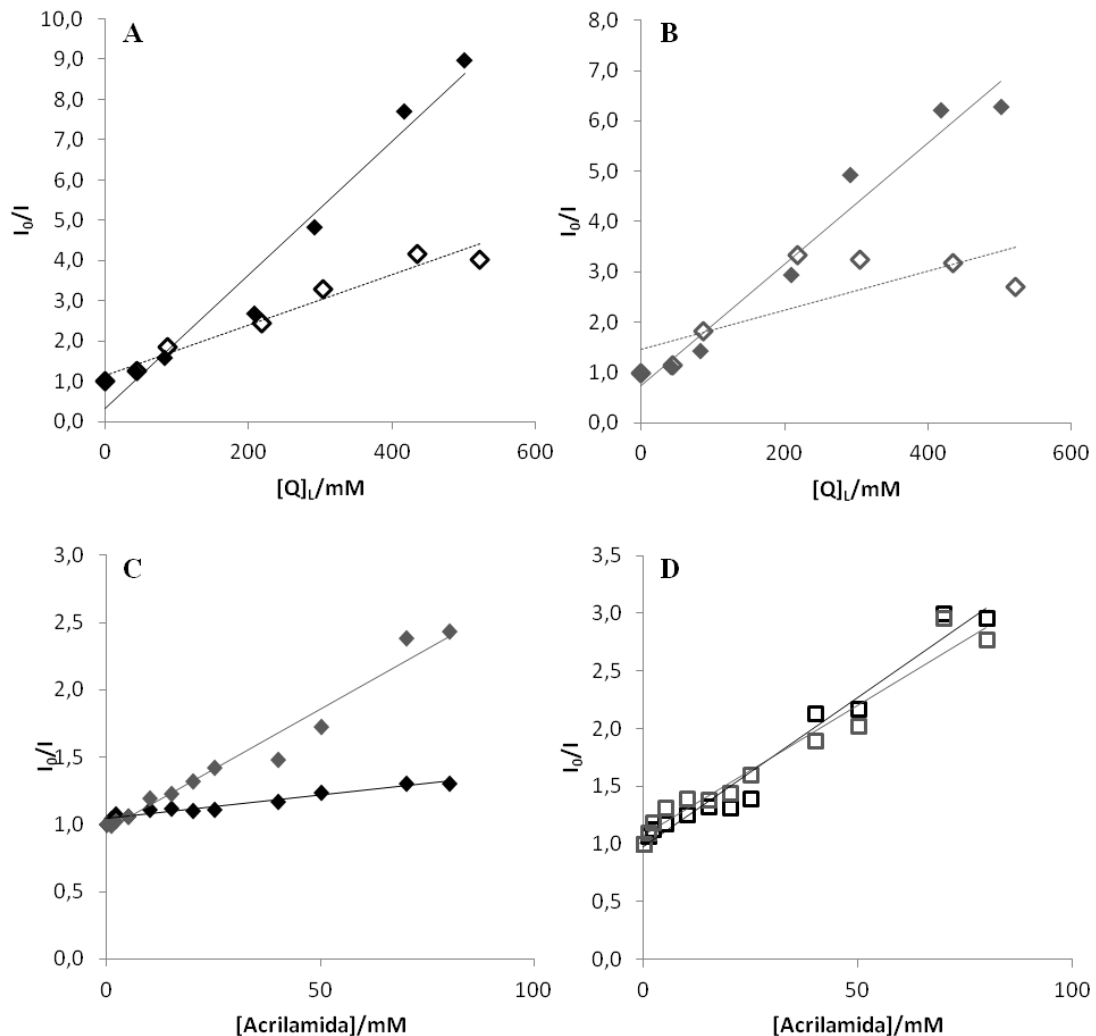


**Figura 36 - Quenching diferencial do péptido PepRYL.** Quenching por 5-NS ( $\circ$ ), e 16-NS ( $\bullet$ ) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou por (B) POPC. (C) Quenching do péptido PepRYL pela acrilamida ( $\blacksquare$ ) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou POPC/POPG 1:1 (preto). (D) Quenching da solução do resíduo de tirosina livre pela acrilamida ( $\circ$ ) em LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).



**Figura 37** – *Quenching* diferencial do péptido PepRWL. *Quenching* por 5-NS (○), e 16-NS (●) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou (B) POPC. (C) *Quenching* pela acrilamida (■) na presença de LUVS constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).





**Figura 38 - Quenching diferencial do péptido Sub3.** Quenching por 5-NS ( $\circ$ ), e 16-NS ( $\bullet$ ) em LUVs constituídas por (A) POPC/POPG 1:1 ou por (B) POPC. (C) Quenching do péptido Sub3 pela acrilamida ( $\blacksquare$ ) na presença de LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou POPC/POPG 1:1 (preto). (D) Quenching da solução do resíduo de tirosina livre pela acrilamida ( $\circ$ ) em LUVs constituídas por POPC (cinzento) ou por POPC/POPG 1:1 (preto).

Por observação da figura 36 é observável um desvio positivo no *quenching* do PepRYL pelo 5-NS em LUVs constituídas por POPC. O mesmo pode ser observado para o *quenching* do péptido Sub3 pelo 16-NS em LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. Os desvios positivos à linearidade na representação de Stern-Volmer podem ser explicados pelo modelo da esfera activa em que se considera uma esfera centrada no fluoróforo, dentro da qual *quencher* e fluoróforo se encontrarão ocorrendo o fenómeno de *quenching*. Para realizar o ajuste dos valores para este modelo foi utilizada então a equação C2 (pág. 115). Por outro lado, na figura 38 são visíveis desvios negativos à linearidade no *quenching* do péptido Sub3

pelo 5-NS em LUVs constituídas por POPC e por POPC/POPG 1:1. Os desvios negativos à linearidade na representação de Stern-Volmer podem ser explicados pela existência de duas populações de fluoróforos com diferentes acessibilidades ao solvente. Os valores de  $I_0/I$  para estes dois *quenchings* foram então ajustados pela equação C3 (pág.115). Para comparar a fracção de intensidade de fluorescência proveniente da fracção de fluoróforo acessível ao quencher,  $f_B$ , com a fracção de intensidade de fluorescência proveniente da fracção de fluoróforo particionada no lípido,  $f_L$ , foram calculados os valores de  $f_L$ . Na tabela 15 encontram-se os valores da constante de Stern-Volmer determinados para o *quenching* pela acrilamida, 5 e 16-NS na presença de LUVs com diferentes constituições lipídicas.

**Tabela 15 – Valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtidos para o *quenching* diferencial dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 com 5 e 16-NS e acrilamida.**

Péptido	Sistema lipídico	$K_{SV, 5-NS}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{SV, 16-NS}$ ( $M^{-1}$ )	$K_{SV, acrilamida}$ ( $M^{-1}$ )
BP100	POPC	$0,80 \pm 0,16$	$0,55 \pm 0,23$	$9,60 \pm 0,82$
	POPC/POPG (1:1)	$2,47 \pm 0,06$	$2,02 \pm 0,06$	$1,94 \pm 0,29$
PepRYL	POPC	$1,36 \pm 2,10^*$	$0,21 \pm 0,22$	$4,88 \pm 0,30$
	POPC/POPG (1:1)	$1,88 \pm 0,09$	$1,72 \pm 0,15$	$1,37 \pm 0,26$
PepRWL	POPC	$7,48 \pm 1,47$	$2,86 \pm 0,34$	$4,79 \pm 0,34$
	POPC/POPG (1:1)	$0,68 \pm 0,24$	$2,19 \pm 0,27$	$3,23 \pm 0,21$
Sub3	POPC	$25,43 \pm 17,07^{\S}$	$12,07 \pm 1,02$	$17,99 \pm 1,06$
	POPC/POPG (1:1)	$10,32 \pm 2,32^{\S}$	$6,53 \pm 2,02^*$	$3,51 \pm 0,26$
Tirosina	POPC	-	-	$22,05 \pm 1,49$
	POPC/POPG (1:1)	-	-	$21,13 \pm 1,64$
Tryptofano	POPC	-	-	$22,45 \pm 1,50$
	POPC/POPG (1:1)	-	-	$25,78 \pm 1,05$

\* Valores de  $K_{SV}$  obtidos por ajuste da equação C2, devido à observação de um desvio positivo à linearidade na representação de Stern-Volmer.  $\S$  Valores de  $K_{SV}$  obtidos por ajuste da equação C3, devido à observação de um desvio negativo à linearidade na representação de Stern-Volmer.

Na tabela 16 encontram-se os valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida pela população de fluoróforos particionados na membrana  $f_L$  e os valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida pela população de fluoróforos,  $f_B$ , acessíveis aos *quenchers* 5 e 16-NS.

**Tabela 16 – Valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida a partir da população de fluoróforos particionados no lípido ( $f_L$ ) e dos valores de fracção de intensidade de fluorescência emitida a partir da população de fluoróforos acessíveis aos quenchers 5-NS ( $f_{B, 5-NS}$ ) e 16-NS ( $f_{B, 16-NS}$ ).**

Sistema lipídico	$f_L$	$f_{B, 5-NS}$	$f_{B, 16-NS}$
POPC	$0,578 \pm 0,674$	$0,744 \pm 1,155$	-
POPC/POPG 1:1	$0,989 \pm 1,243$	$0,907 \pm 0,785$	-

Por comparação dos valores da constante de Stern-Volmer para o *quenching* pela acrilamida na ausência/presença de LUVs constituídas por POPC ou por POPC/POPG 1:1 presentes nas tabela 13 (pág. 69) e 15, é visível uma diminuição significativa dos valores desta constante. Esta observação pode dever-se à aquisição de estrutura pelos péptidos por contacto com os modelos membranares ou pela inserção dos péptidos nas membranas, já que estas alterações poderão conduzir a uma menor exposição dos resíduos de tirosina e triptofano ao meio aquoso. A única excepção a este comportamento é o péptido Sub3, observando-se um valor de  $K_{SV}$  para o *quenching* pela acrilamida na presença de LUVs constituídas por POPC semelhante ao obtido na ausência de lípido. Porém, uma vez que é observado um desvio negativo à linearidade na representação de Stern-Volmer, poderão existir duas populações de fluoróforos. Uma estará acessível à acrilamida e, portanto, acessível ao meio aquoso, enquanto que outra estará particionada na membrana e, assim, acessível aos *quenchers* 5 e 16-NS. Pelos estudos de partição foi possível observar e quantificar a partição dos péptidos nos modelos membranares utilizados e, concordantemente, os valores de  $K_{SV}$  obtidos para a acrilamida são inferiores na presença de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1 que na presença de LUVs constituídas por POPC, sugerindo que os péptidos ficam menos acessíveis ao ambiente aquoso. Da mesma forma, os valores de  $K_{SV}$  para os *quenchers* 5 ou 16-NS são superiores na presença de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1, indicando a ocorrência de uma maior penetração dos péptidos na membrana.

O péptido BP100, na presença de LUVs constituídas apenas por POPC, é eficientemente *quenchedo* pela acrilamida mas, no entanto, o resíduo de tirosina encontra-se menos acessível ao solvente que na ausência de lípido (valor presente na tabela 13). Esta observação poderá dever-se à inserção do BP100 nos modelos membranares ou por aquisição de estrutura secundária, aquando da interacção com os modelos membranares. Na presença de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1 observa-se que o resíduo de tirosina fica ainda menos acessível ao solvente, obtendo-se um valor de  $K_{SV}$  significativamente inferior ao obtido

na preseça de LUVs constituídas por POPC, indicando a inserção do BP100 na membrana, apoiando os resultados obtidos para os ensaios de partição em que era observada uma maior afinidade para LUVs carregadas negativamente. Quanto aos valores de  $K_{SV}$  para os quenchers 5 e 16-NS, observa-se que na presença dos dois sistemas lipídicos em estudo o *quenching* pelo 5-NS é ligeiramente mais eficiente que o *quenching* pelo 16-NS, sugerindo que apesar de uma sub-população do péptido poder estar inserida no centro hidrófobo e, portanto, acessível ao *quenching* pelo 16-NS, o péptido situa-se maioritariamente na zona de interface membrana – sistema aquoso, sofrendo ainda algum *quenching* pela acrilamida.

Da mesma forma, por comparação dos valores de  $K_{SV}$  para a acrilamida observa-se que o resíduo de tirosina do péptido PepRYL se encontra menos acessível ao solvente na presença que na ausência de lípido (valor na tabela 13), diminuindo ainda mais na presença de vesículas de POPC/POPG 1:1 que de vesículas constituídas por POPC. Esta observação confirma a inserção do péptido na membrana como observado nos ensaios de partição. Os valores de  $K_{SV}$  para 5-NS são superiores nos dois sistemas lipídicos utilizados. Contudo, na presença de LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1 é visível um aumento significativo do valor de  $K_{SV}$  para o 16-NS, sugerindo uma inserção mais profunda do péptido na membrana. PepRYL apresenta, portanto, um comportamento semelhante ao observado para o BP100.

No caso do péptido PepRWL, à semelhança do observado para BP100 e PepRYL, é observável a diminuição do valor de  $K_{SV}$  para a acrilamida na presença de lípido, sendo este valor inferior ao obtido na ausência de lípido (valor presente na tabela 13), encontrando-se o resíduo de triptofano menos acessível ao solvente. Na presença de POPC/POPG 1:1, o valor de  $K_{SV}$  da acrilamida é inferior ao observável na presença de POPC o que apoia os resultados de partição já que a menor acessibilidade do resíduo de triptofano ao solvente dever-se-á provavelmente a uma maior inserção do péptido na membrana. O valor de  $K_{SV}$  observado para o 5-NS é superior ao observado para o 16-NS na presença de POPC mas, na presença de POPC/POPG 1:1, o valor de  $K_{SV}$  é superior para o 16-NS. Deste modo, é possível inferir que o PepRWL se insere mais profundamente na membrana que os péptidos BP100 e PepRYL, situando-se próximo do centro hidrófobo.

Por outro lado o péptido Sub3 possui um valor de  $K_{SV}$  para a acrilamida na presença de POPC muito próximo do valor observado na ausência de lípido, sugerindo que o resíduo de triptofano mantém, aproximadamente, a mesma acessibilidade ao meio aquoso. No entanto, este valor diminui significativamente na presença de POPC/POPG 1:1, sugerindo a inserção

do péptido na membrana e, portanto, uma menor acessibilidade do resíduo de triptofano ao solvente. Estes resultados estão de acordo o baixo valor de  $I_L/I_W$  na presença de POPC e sugerem que este péptido está apenas adsorvido na membrana. Os valores de  $K_{SV}$  para o 5-NS são superiores aos valores de  $K_{SV}$  para o 16-NS nos dois sistemas lipídicos estudados o que sugere a localização preferencial deste péptido na interface membrana-sistema aquoso. O desvio negativo à linearidade observado na representação de Stern-Volmer do *quenching* pelo 5-NS sugere a existência de duas populações de péptido com diferentes acessibilidades aos *quenchers* em estudo. Assim, por análise dos valores da tabela 16, é possível inferir que a fracção de intensidade de fluorescência emitida pela população de fluoróforos particionados nas misturas lipídicas é idêntica à fracção de intensidade de fluorescência emitida pela população de fluoróforos acessíveis ao *quencher* 5-NS, pois as diferenças observadas entre os valores obtidos se encontra dentro do erro dos parâmetros. Deste modo, todos os fluoróforos particionados no lípido se encontram acessíveis a este *quencher*. Não foi possível calcular e, portanto, comparar  $f_B$  para o caso do 16-NS na presença de POPC/POPG 1:1 pois o ajuste destes valores foi realizado segundo o modelo da esfera activa. O valor de  $f_B$  para o *quenching* realizado por 16-NS na presença de POPC é aproximadamente 1, já que existe linearidade na representação de Stern-Volmer.

Tal como seria de esperar, por observação dos estudos de partição, todos os péptidos se inserem mais profundamente em modelos membranares carregados negativamente, provocando uma maior destabilização dos mesmos tal como foi observado nos estudos de agregação de vesículas. Os péptidos BP100, PepRYL e Sub3 parecem inserir-se na interface membrana-sistema aquoso, enquanto que o péptido PepRWL parece localizar-se mais perto do centro hidrófobo. O péptido Sub3 insere-se preferencialmente na interface membrana-sistema aquoso, sugerindo os resultados obtidos que este péptido possa estar apenas adsorvido na membrana na presença de POPC. Na presença de POPC/POPG 1:1 este insere-se mais extensivamente ficando, portanto, o resíduo de triptofano menos acessível ao solvente. A diferença no modo de inserção deste péptido poderá dever-se à posição do seu resíduo de triptofano. Este resíduo encontra-se na posição 3 (Ver tabela 11, pág. 63), enquanto que nos restantes péptidos, o resíduo cuja intensidade de fluorescência é seguida se encontra na posição 11. Para além disso, o resíduo de triptofano encontra-se entre dois resíduos de arginina e, portanto, com carga positiva e afinidade para os grupos fosfato dos fosfolípidos. O estabelecimento de interações entre estes dois grupos poderá dificultar a inserção extensiva do Sub3 na membrana, ficando este apenas adsorvido à superfície da mesma. Na presença de

POPC/POPG 1:1 este poderá inserir-se mais profundamente, pois com o aumento das interações entre as cargas positivas dos resíduos de arginina e das cargas negativas dos grupos fosfato, os resíduos hidrófobos, nomeadamente o triptofano, poderão inserir-se mais profundamente na membrana.

### 3.5.10. Estudos de *Leakage*

Os ensaios de *leakage* permitem a observação da disrupção da estrutura membranar por ação dos péptidos em estudo, dependendo o efeito lítico dos péptidos da sua sequência e da composição da membrana. Pela análise das imagens obtidas por microscopia de força atômica foi possível observar a disrupção das membranas das bactérias *E. coli* e *S. aureus* por ação dos péptidos BP100, PepRYL e PepRWL. O péptido Sub3, por outro lado, não parecia disromper a estrutura membranar de *E. coli*, observação reforçada pelos resultados de rugosidade superficial e inchaço obtidos. É assim importante a comparação da extensão de perturbação/ruptura de modelos membranares causada pelos diferentes péptidos, ainda que este tipo de ensaios não forneça informação sobre o tipo de mecanismo de disrupção [81]. Neste ensaio, foram preparadas LUVs com carboxifluoresceína no seu interior e foi acompanhado o aumento de intensidade de fluorescência provocado pela saída desta sonda do interior das vesículas lipídicas devido à ação lítica dos péptidos em estudo. Após cálculo da percentagem de *leakage* causado por várias concentrações dos péptidos em estudo foram obtidas as representações presentes na figura 39 no caso do modelo membranar constituído apenas por POPC e as representações presentes na figura 40 no caso do modelo membranar constituído por POPC/POPG 1:1.

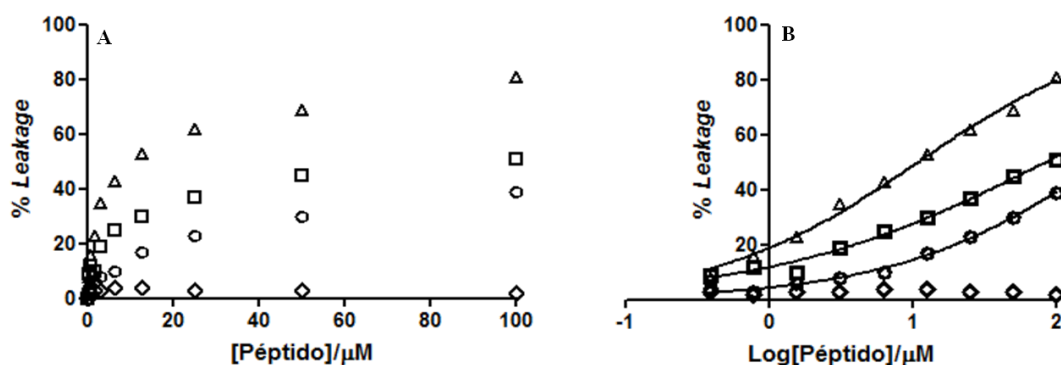


Figura 39 - Representações gráficas da percentagem de *leakage* vs concentração de péptido (A) ou logaritmo da concentração de péptido (B) em LUVs constituídas por POPC. Aos dados da figura B foi ajustada uma regressão não-linear de forma a obter os valores de concentração de péptido necessária para induzir 50% de *leakage*. (○) BP100, (□) PepRYL, (△) PepRWL e (◇) Sub3.

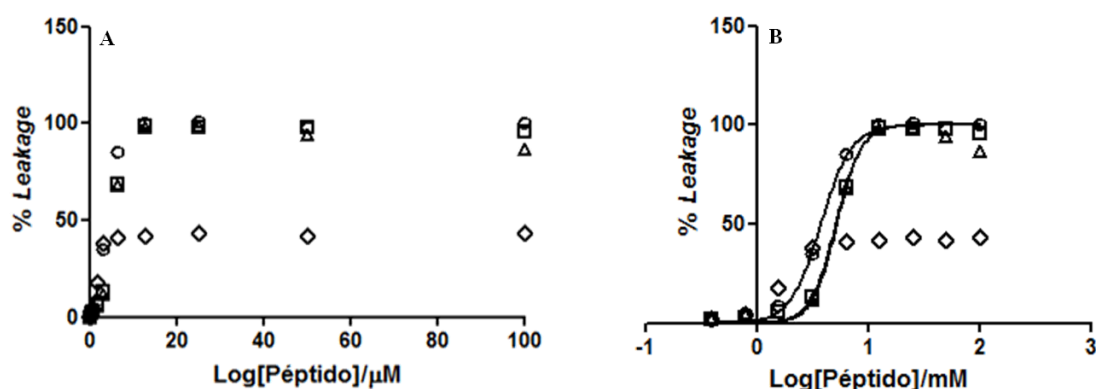


Figura 40 - Representações gráficas da percentagem de *leakage* vs concentração de péptido (A) ou logaritmo da concentração de péptido (B) em LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. Aos dados da figura B foi ajustada uma regressão não-linear de forma a obter os valores de concentração de péptido necessária para induzir 50% de *leakage*. (○) BP100, (□) PepRYL, (△) PepRWL e (◇) Sub3.

Os valores de percentagem de *leakage* obtidos, assim como os valores de concentração de péptido necessário para induzir 50% de *leakage* obtidos a partir das regressões não-lineares realizadas encontram-se nas tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 – Valores de percentagem de *leakage* obtidos para os péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3.

Mistura lipídica	[Péptido]/ $\mu\text{M}$	% <i>leakage</i>			
		BP100	PepRYL	PepRWL	Sub3
POPC	0,39	4,09	8,78	8,38	2,74
	0,78	3,47	11,73	15,56	2,48
	1,56	6,11	10,42	22,78	2,63
	3,13	8,30	19,18	34,56	2,56
	6,25	10,02	24,53	43,08	4,29
	12,50	17,01	29,59	53,11	4,03
	25	22,60	37,26	62,18	3,41
	50	29,94	44,93	69,49	2,69
	100	38,87	50,83	80,89	2,22
	POPC/POPG (1:1)	0,39	3,16	2,25	2,48
0,78		5,21	3,28	3,79	3,57
1,56		9,48	5,60	-	17,69
3,13		35,25	12,62	11,88	37,91
6,25		85,12	68,51	67,52	41,32
12,50		99,57	98,97	98,14	41,54
25		101,15	98,49	98,74	43,43
50		98,49	97,78	93,81	41,68
100	99,87	96,35	86,56	43,02	

**Tabela 18 – Valores da concentração dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 necessária para induzir 50% de *leakage* em modelos membranares constituídos por POPC ou por POPC/POPG 1:1.**

Mistura lipídica	[Péptido] <sub>50% leakage</sub> (µM)			
	BP100	PepRYL	PepRWL	Sub3
POPC	216,20	83,28	10,71	-
POPC/POPG 1:1	3,71	5,06	5,16	-

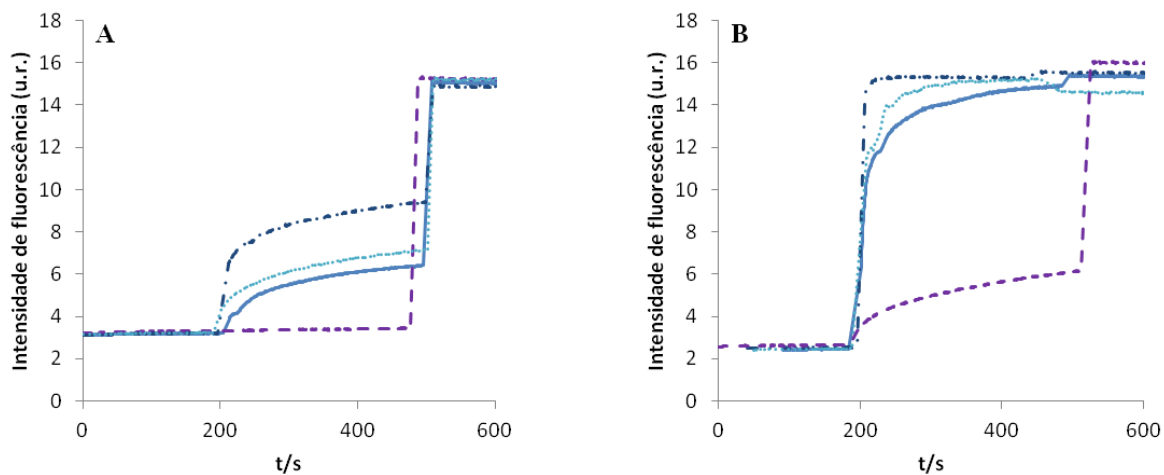
Não foi possível determinar os valores de concentração de Sub3 necessários para induzir 50% de *leakage*, tanto no modelo membranares constituído por POPC, como no modelo constituído por POPC/POPG 1:1 pois este possui valores de percentagem de *leakage* muito baixos, impedindo o ajuste da equação. Por análise dos valores nas tabelas acima é possível observar que o péptido Sub3 praticamente não induz *leakage* em LUVs constituídas por POPC e em LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1 atinge um máximo de 43% de *leakage* na gama de concentrações testadas. Deste modo, apesar de o Sub3 particionar extensivamente para modelos membranares, mesmo quando constituídos apenas por POPC e de induzir agregação de vesículas quando estas são constituídas por POPC/POPG 1:1, este efeito de perturbação não é suficiente para induzir o *leakage* das vesículas. Estas observações encontram-se de acordo com o baixo perfil hemolítico obtido para o Sub3 e corroboram a hipótese de que este possua um mecanismo de acção diferente dos restantes péptidos. Estes resultados estão ainda de acordo com os resultados de AFM obtidos para este péptido em que o Sub3 induz a alteração de estrutura da bactéria *E.coli* sem que no entanto ocorresse a libertação do conteúdo intracelular.

PepRWL é o péptido que causa maior *leakage* em vesículas de POPC (atinge um máximo de 81%). Este resultado era o esperado, já que este PepRWL é o péptido com maior capacidade hemolítica. O péptido BP100 é, dos péptidos testados, aquele que induz menor *leakage* de membranas de POPC, atingindo um máximo de 39% de *leakage* à concentração máxima testada. Contudo, para vesículas de POPC/POPG 1:1, para as quais todos os péptidos apresentam preferência, BP100 é o péptido que necessita de menor concentração para induzir 50% de *leakage*, atingindo 100% de *leakage* a uma concentração de 12,5 µM, seguido do péptido PepRYL.

A cinética de *leakage* foi avaliada por adição de 25 µM de péptido a 50 µM de vesículas lipídicas constituídas por POPC ou por POPC/POPG 1:1. Triton X-100 (0,1%) (v/v)



foi utilizado para estimar 100% de *leakage*. As representações destas cinéticas encontram-se na figura 41.



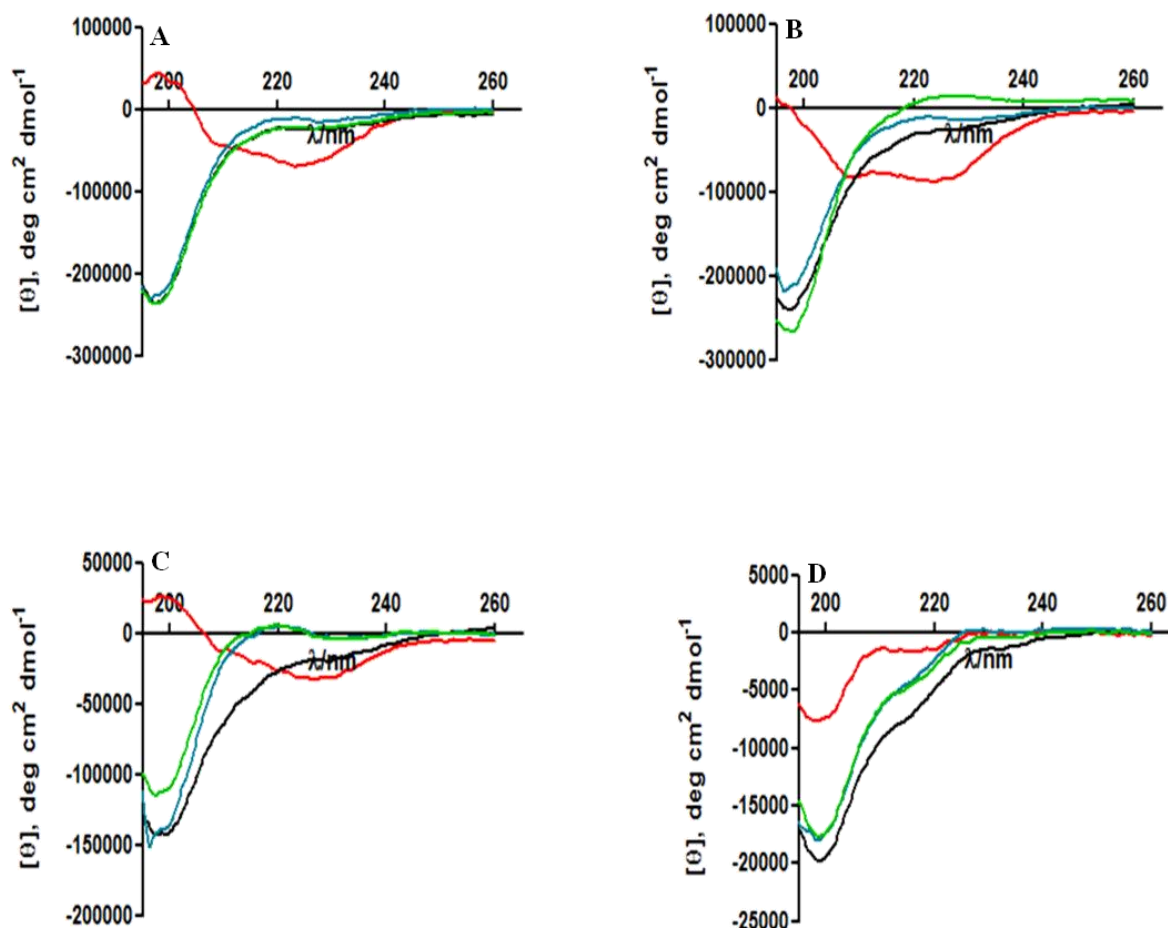
**Figura 41** – Cinéticas de *leakage* dos péptidos em estudo em vesículas constituídas por POPC (A) ou por POPC/POPG 1:1 (B). (—) BP100, (....) PepRYL, (- - -) PepRWL e (- · -) Sub3.

Quando o *leakage* das vesículas de POPC é comparado para os 4 péptidos (figura 41A) é possível observar que o péptido PepRWL é aquele que possui uma cinética mais rápida e que provoca uma maior percentagem de *leakage*. Os péptidos BP100 e PepRYL apresentam velocidades e efeitos aproximados, apesar de PepRYL apresentar uma cinética ligeiramente mais rápida e induz o *leakage* mais eficientemente. O péptido Sub3 não induz *leakage* nestas condições, havendo apenas *leakage* das vesículas aquando da adição de Triton X-100. Estas observações estão de acordo com o esperado tendo em conta os resultados anteriores. Relativamente às membranas de POPC/POPG 1:1 (figura 41B), os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL induzem *leakage* com uma eficácia idêntica. No entanto, PepRWL é o péptido que induz *leakage* mais rapidamente. No caso do Sub3, o *leakage* é inferior (aproximadamente 43%).

### 3.6. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica muito utilizada na determinação dos elementos de estrutura secundária de péptidos e de proteínas, tendo por base a absorção diferenciada dos componentes de luz polarizada pelas moléculas assimétricas em estudo [70]. Os ensaios foram realizados na zona do UV distante (240-190 nm), onde a ligação peptídica é o componente mais absorvente, tendo os vários elementos de estrutura secundária espectros

característicos [71]. Deste modo, esta espectroscopia foi utilizada com o objectivo de perceber se os péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 teriam estrutura em solução aquosa ou em caso negativo se a adquiririam por interacção com membranas carregadas negativamente.



**Figura 42 – Espectros de dicroísmo circular para os péptidos BP100 (A), PepRYL (B), PepRWL (C) e Sub3 (D).** Foram realizados os espectros de uma solução de 50  $\mu\text{M}$  de péptido com 500  $\mu\text{M}$  de POPC/POPG 1:1 (—), numa solução de pH 2 (—), na presença de 5 mM de ureia (—) ou apenas em tampão (—).

A análise da figura 42 permite inferir que todos os péptidos em estudo possuem uma estrutura secundária *random coil* em solução aquosa já que é observada uma banda negativa por volta dos 195 nm [70] no espectro realizado para a solução de 50  $\mu\text{M}$  dos péptidos em tampão fosfatos. É ainda possível inferir que a mudança do pH da solução ou a presença de ureia não afecta a conformação dos péptidos. Contudo, por adição de 500  $\mu\text{M}$  de POPC/POPG 1:1 observa-se a alteração da conformação de *random coil* para hélice  $\alpha$ , nos péptidos BP100, PepRYL e PepRWL, já que são visíveis as características bandas negativas a 208 e 222 nm e uma banda positiva por volta dos 193 nm [70]. Esta alteração conformacional

está de acordo com o que seria de esperar uma vez que estes péptidos foram desenvolvidos tendo como modelo a estrutura de hélice  $\alpha$  com carácter anfipático. Este *design* favorece a interacção electrostática inicial entre os péptidos carregados positivamente e as membranas carregadas negativamente e a subsequente inserção da porção hidrófoba do péptido na membrana [13, 22]. Deste modo, os péptidos ao interagirem com o modelo membranar bacteriano, isto é, LUVs carregadas negativamente, adquirem uma conformação de hélice  $\alpha$ , penetrando nas membranas como já foi inferido pelos resultados de  $K_p$  obtidos e provocando a morte das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. No caso do péptido Sub3 não é observada uma alteração conformacional, continuando a possuir uma estrutura *random coil* após interacção com os modelos membranares carregados negativamente. Na presença de lípido, o sinal do Sub3 é reduzido, provavelmente, pela ocorrência de agregação das vesículas aquando da adição do péptido (Ver figura 34), o que interfere nas leituras devido ao aumento da dispersão de luz. Estes resultados indicam que, apesar do Sub3 se inserir na membrana lipídica (Ver figuras 31 e 38) a sua estrutura não sofre alterações conformacionais quando no ambiente membranar. Como já foi dito anteriormente, o Sub3 tem como base sequencial uma variante linear do péptido *Bactenecin*, AMP que possui uma estrutura cíclica pois possui uma ligação *per-sulfureto* intramolecular [10, 82]. Os resultados obtidos por dicroísmo circular para o péptido Sub3 sugerem um diferente modo de inserção do mesmo nos modelos membranares carregados negativamente, o que poderá corroborar a existência de um mecanismo de acção diferente deste péptido. Esta observação está ainda de acordo com os resultados obtidos para os ensaios de partições e de *quenching* diferencial deste péptido em que é inferido que este se insere preferencialmente na interface membrana-sistema aquoso, podendo encontrar-se apenas adsorvido na presença de POPC.

Procurou-se realizar uma análise quantitativa da estrutura secundária dos diferentes péptidos utilizando o software CDPro. Contudo, a falta de concordância entre os valores obtidos para cada um dos três diferentes programas utilizados (SELCON3, CONTINLL e CDSSTR) [83] dificultou a avaliação do teor de cada estrutura secundária presente nos diferentes péptidos pelo que não se prosseguiu com a análise.

### 3.7. Representação tridimensional dos péptidos

A estrutura tridimensional dos péptidos BP100, PepRYL, PepRWL e Sub3 foi modelada no programa PyMOL de forma a estimar o comprimento de cada péptido quando particionado na membrana. De acordo com os resultados obtidos em CD sabe-se que o BP100,

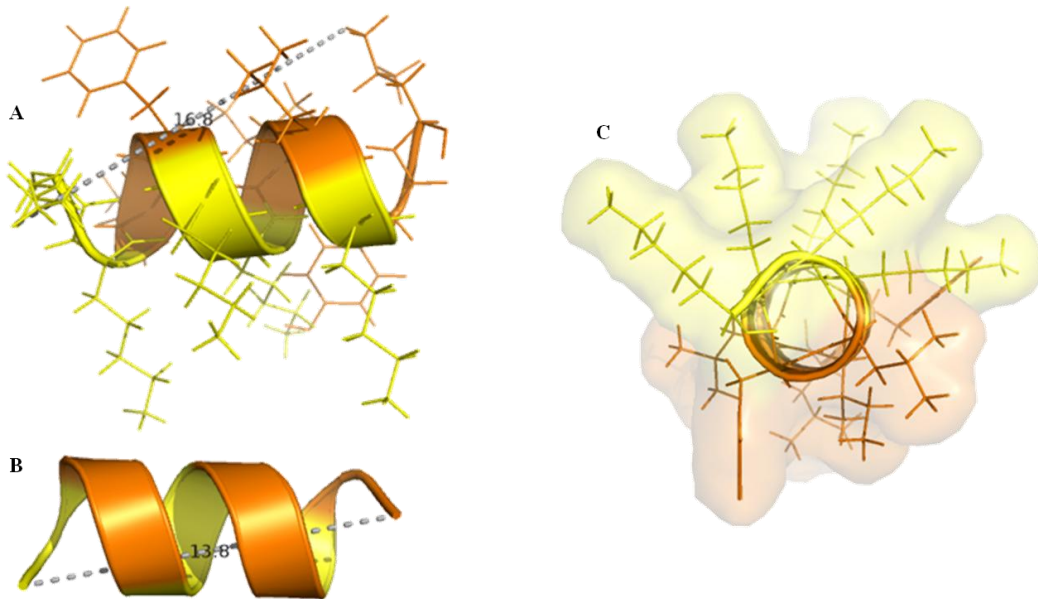
PepRYL e PepRWL adquirem uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice quando interactivam com a membrana. O Sub3 apresenta uma estrutura *random coil*.

Por observação das figuras 43 a 45 é possível observar o carácter anfipático da estrutura helicoidal dos péptidos BP100, PepRYL e PepRWL. A distância entre as cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos situados na extremidade dos péptidos ronda os 17 Å e a distância entre as cadeias principais dos resíduos mencionados é de aproximadamente 13,8 Å para os três péptidos.

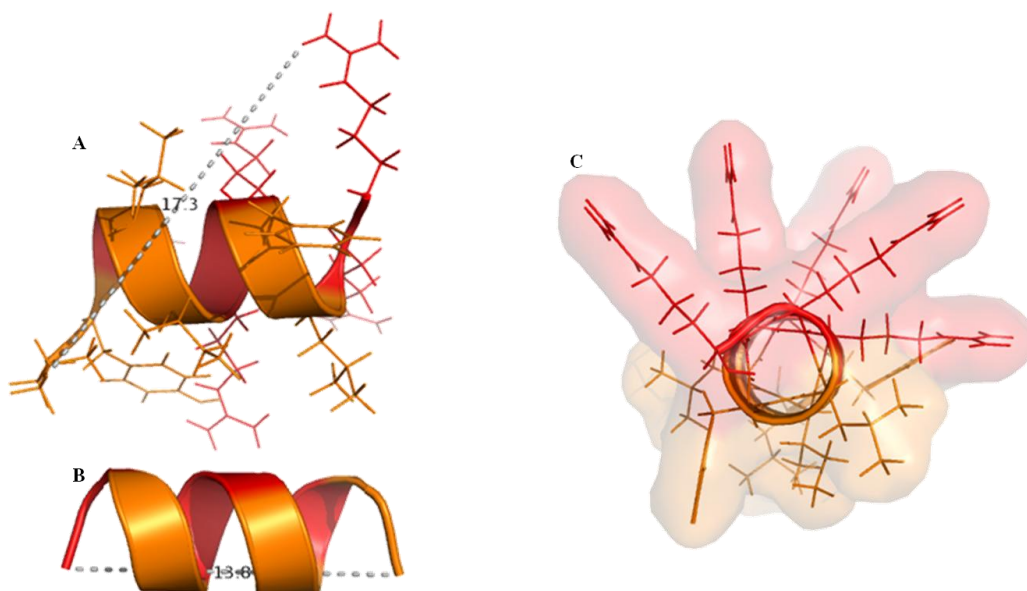
O Sub3, uma vez que não sofre alteração da sua estrutura secundária por interacção com membranas carregadas negativamente mantendo-se em *random coil* (figura 46), possui um comprimento superior ao dos restantes péptidos. A distância entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos terminais é de 41 Å e entre as cadeias principais dos resíduos em questão é de 38,2 Å.

A determinação do comprimento aproximado dos péptidos em estudo é informativo para a determinação do seu mecanismo de acção. A espessura de uma bicamada lipídica que possui POPC é de aproximadamente 25,8 Å [84]. O péptido sub3 é mais longo que a espessura da membrana, o que apoia a hipótese de que o Sub3 se encontra apenas adsorvido em membranas constituídas por POPC ou POPC/POPG.

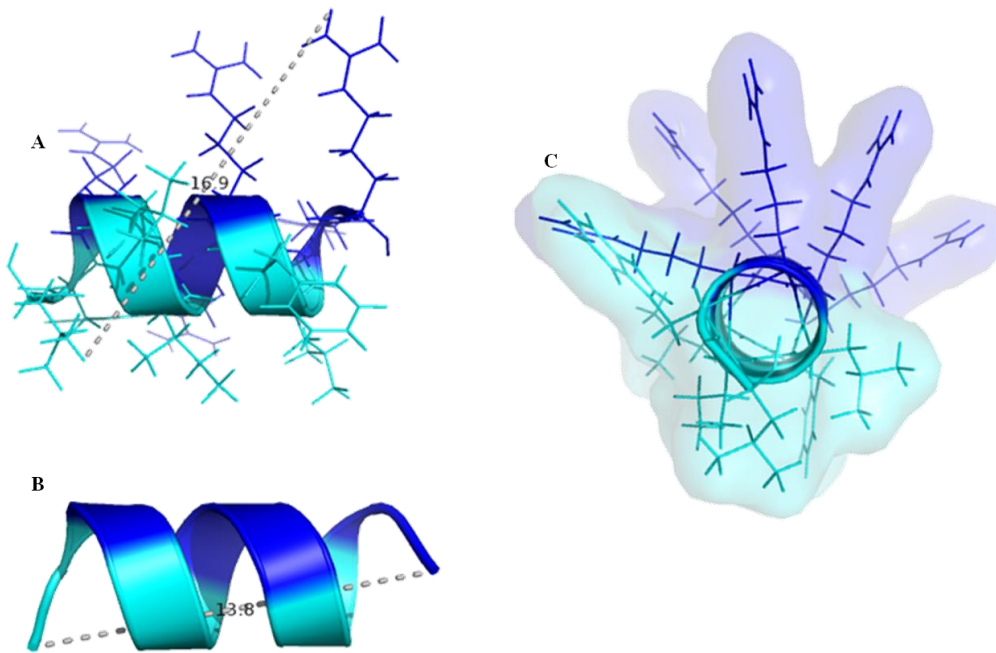
Os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL, devido ao seu carácter anfipático, quando penetram nas membranas, poderão possuir uma ligeira inclinação de forma a que os seus resíduos de aminoácidos polares interactuem com os grupos fosfato dos fosfolípidos e que os seus resíduos apolares se possam introduzir no ambiente hidrófobo. Devido a esta inclinação e ao seu comprimento, estes péptidos não deverão ter acesso ao folheto interno da bicamada fosfolipídica.



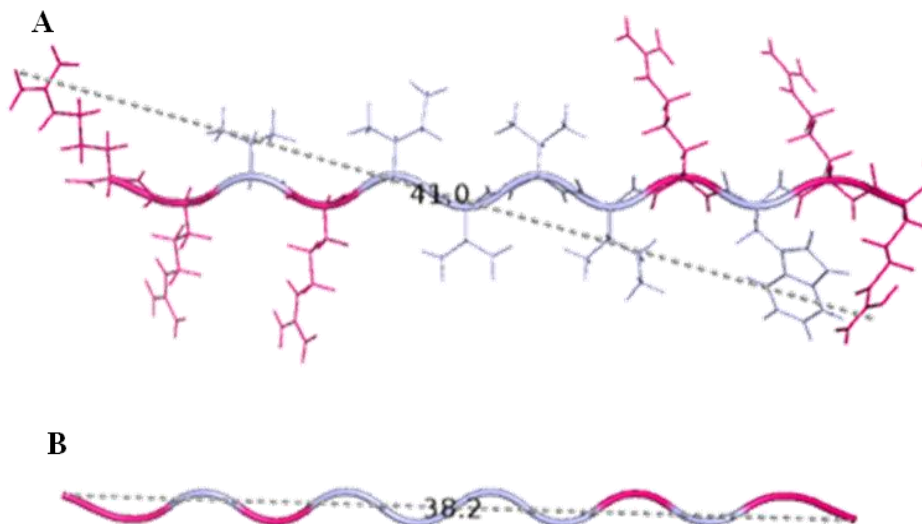
**Figura 43 – Representações tridimensionais do péptido BP100.** (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de lisina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre as cadeias principais dos resíduos de lisina e leucina situados nas extremidades de BP100 para estimar o comprimento do péptido quando particionado na membrana. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de BP100. Resíduos polares coloridos de amarelo e resíduos apolares coloridos de cor-de-laranja.



**Figura 44 - Representações tridimensionais do péptido PepRYL.** (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre as cadeias principais dos resíduos de arginina e leucina situados nas extremidades de PepRYL para estimar o comprimento do péptido quando particionado na membrana. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de PepRYL. Resíduos polares coloridos de vermelho e resíduos apolares coloridos de cor-de-laranja.



**Figura 45 - Representações tridimensionais do péptido PepRWL.** (A) Representação da estrutura de hélice do péptido e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina e leucina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre as cadeias principais dos resíduos de arginina e leucina situados nas extremidades de PepRWL para estimar o comprimento do péptido quando particionado na membrana. (C) Vista de topo da hélice permite visualizar o carácter anfipático de PepRWL. Resíduos polares coloridos de azul-escuro e resíduos apolares coloridos de azul-claro.



**Figura 46 - Representações tridimensionais do péptido Sub3.** (A) Representação do péptido Sub3 e das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido. Distância entre as duas cadeias laterais dos resíduos de arginina situadas nas extremidades do péptido. (B) Distância entre as cadeias principais dos resíduos de arginina situados nas extremidades de Sub3 para estimar o comprimento do péptido quando particionado na membrana. Resíduos polares coloridos de cor-de-rosa e resíduos apolares coloridos de violeta.

## Conclusão

O aumento das resistências bacterianas ao tratamento com antibióticos tem ganho maior relevo nos últimos anos, havendo a necessidade de desenvolver novos agentes antimicrobianos [3]. Neste trabalho foram desenhados dois novos análogos do BP100, PepRYL e PepRWL, tendo-se avaliado o seu comportamento antimicrobiano bem como o seu mecanismo de acção. Estes novos péptidos foram comparados com o análogo BP100 e com um outro AMP, o Sub3.

Pelos resultados obtidos é possível concluir que os novos derivados de BP100, para além de serem mais efectivos contra a bactéria *E. coli* (Gram-negativa) (tabela 2, pág. 38) que o análogo BP100, possuem um espectro de acção mais alargado, com actividade contra a *S. aureus* (Gram-positiva). É importante notar que os novos péptidos possuem uma actividade comparável com a obtida com o Sub3, sendo o péptido PepRWL ainda mais eficaz que o péptido Sub3 (tabela 3, pág. 40). Os resultados obtidos para a *H. pylori* são ainda preliminares (figuras 10 e 11, pp. 43 e 44), sendo necessária a continuação da optimização das condições de crescimento e de realização dos ensaios, devido às condições de crescimento extremamente exigentes desta bactéria.

Quando se avaliou o efeito da presença de NaCl na actividade antimicrobiana dos diferentes péptidos, é evidente que todos os péptidos são menos efectivos na presença de NaCl, sendo esta diminuição de eficiência mais significativa contra a *S. aureus*. Estes resultados mostram que o aumento da força iónica afecta a acção dos péptidos, sugerindo que as atracções electrostáticas são importantes para a actividade destes péptidos e que a interacção com a membrana é essencial ao seu modo de acção. Assim, as interacções electrostáticas são provavelmente necessárias para o primeiro passo de interacção dos péptidos (com uma carga positiva no seu lado hidrófilo) com as membranas bacterianas (com carga negativa superficial) [9]. A preferência dos péptidos estudados para a *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, poderá dever-se ao facto destas bactérias apresentarem uma carga superficial negativa mais intensa do que as bactérias Gram-positivas, devido à presença de LPS em maiores quantidades que os ácidos lipoteicóicos ou por estas apresentarem uma camada menos espessa de peptidoglicano e, portanto, uma maior facilidade de acesso à membrana [19].

Pelos estudos de AFM, a actividade microbiana dos diferentes péptidos foi comprovada e apoiam um mecanismo dependente da interacção com a membrana. As

imagens mostram a perturbação das membranas celulares ou mesmo a completa perda de estrutura celular por incubação das células bacterianas com baixas concentrações de péptido (figuras 12 a 15, pp. 45 e 46). O tratamento destas imagens permitiu avaliar a alteração da rugosidade e do inchaço das bactérias, causada pela acção dos péptidos em estudo. Esta análise quantitativa comprovou os resultados qualitativos das imagens de AFM: um aumento da rugosidade e inchaço das bactérias até ao seu rebentamento (tabelas 4 a 7, pp. 50 a 56). Após perda da estrutura celular e saída de material intracelular ocorreu a diminuição destes valores. A única excepção a este comportamento foi o péptido Sub3, que apesar de provocar a alteração da estrutura das bactérias *E. coli* não provocava a libertação de conteúdo intracelular.

Estudos hemolíticos mostram que BP100 e os seus análogos, PepRYL e PepRWL são citotóxicos e que devem ser aperfeiçoados, nomeadamente, por substituição de alguns dos seus resíduos hidrófobos por resíduos carregados positivamente de forma a diminuir o seu carácter hemolítico (tabelas 8 e 9, pp. 59 e 60). O carácter hemolítico é especialmente acentuado no péptido PepRWL que possui um índice terapêutico próximo de 4 para a *E. coli* e de 2 para a *S. aureus* (tabela 10, pág. 61).

De forma a entender o modo de acção dos vários péptidos, foram realizados estudos de biofísica em solução aquosa e com modelos de membranes. Estes estudos são essenciais, não só porque ajudam a entender a sua actividade antimicrobiana, mas também porque ajudam a uma futura optimização da actividade bacteriana e redução das propriedades hemolíticas. Estes estudos foram seguidos por fluorescência, uma vez que o BP100 e o PepRYL possuem propriedades de fluorescência características do resíduo de tirosina, enquanto que, o PepRWL e Sub3 têm propriedades fluorescentes características do resíduo de triptofano, que possuem na sua sequência (figura 24, pág. 64).

Os estudos de fluorescência sugerem que os péptidos não agregam e se encontram numa forma não estruturada em solução aquosa. Estas conclusões baseiam-se no facto dos péptidos apresentarem o mesmo rendimento quântico na gama de concentrações testadas (figura 26, pág. 66), que não é alterado na presença de ureia ou por variação do pH do tampão. A não existência de uma estrutura e/ou de uma forma agregada é ainda apoiada pelo facto da fluorescência dos diferentes péptidos não possuir efeito de *red edge* e de sofrerem uma redução significativa de fluorescência em função da concentração de acrilamida, o que sugere que os fluoróforos se encontram acessíveis ao ambiente aquoso (figuras 28-30, pp.70 a



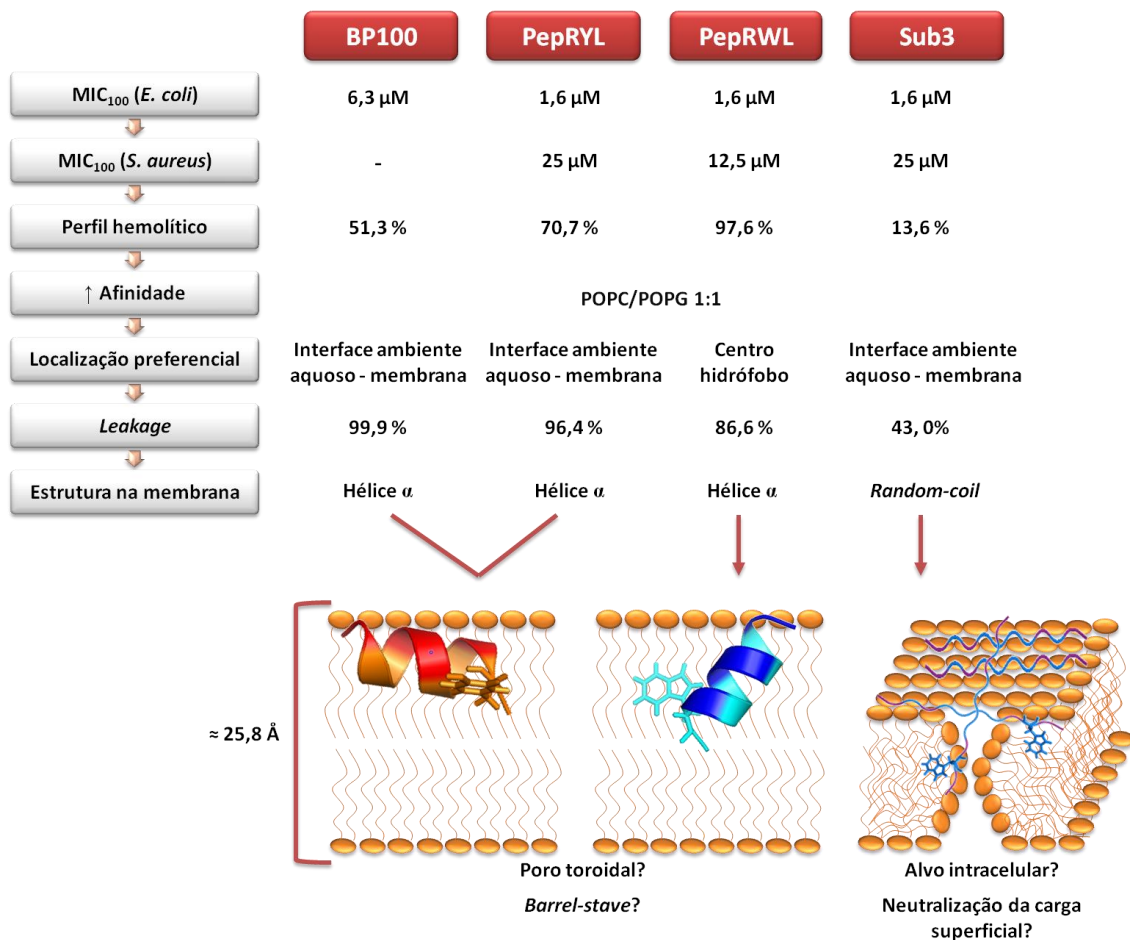
72). Esta hipótese foi confirmada por espectroscopia de dicroísmo circular (figura 42, pág. 92) que mostra uma estrutura *random coil* para todos os péptidos em solução aquosa. Esta estrutura não sofre alteração quer pela introdução da ureia, quer pela alteração do pH.

Na presença de modelos membranares carregados negativamente os péptidos BP100, PepRYL e PepRWL adquiriam uma conformação de hélice  $\alpha$ , enquanto que o péptido Sub3 manteve a conformação *random coil*. A aquisição de conformação de hélice  $\alpha$  quando na presença de lípido, sugere que o BP100, PepRYL e PepRWL penetram no domínio hidrófobo da membrana. No caso do Sub3, a não existência de uma conformação de hélice  $\alpha$  sugere um mecanismo de inserção na membrana distinto do dos restantes péptidos.

Para todos os péptidos em estudo, foi observado o aumento da afinidade para membranas com o aumento da carga negativa (tabela 14, pág. 76). A preferência por membranas com carga negativa foi confirmada pelos estudos de *quenching* diferencial e de agregação de vesículas. Pelos estudos de *quenching* diferencial observou-se a existência de uma inserção mais profunda na presença de vesículas carregadas negativamente que na presença de vesículas neutras, tendo os péptidos BP100, PepRYL e Sub3 uma localização preferencial na interface membrana e o péptido PepRWL no centro hidrófobo (tabela 15, pág. 84). Já pelos estudos de agregação, observou-se que todos os péptidos induzem perturbação em vesículas com elevada carga negativa, o que não acontece com vesículas zwitteriónicas (figura 34, pág. 78). Por realização de ensaios de *leakage* inferiu-se que todos os péptidos induzem *leakage* em LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1, tendo os dois derivados e o BP100 comportamentos muito semelhantes, atingindo aproximadamente 100% de *leakage* no intervalo de concentrações testadas. No caso das LUVs constituídas apenas por POPC a acção do péptido PepRWL destaca-se por ser significativamente superior à dos restantes péptidos. O péptido Sub3 possui um comportamento divergente não causando *leakage* em LUVs constituídas por POPC e não atingindo uma percentagem de *leakage* acima de 43% em vesículas constituídas por POPC/POPG 1:1 (tabelas 17 e 18, pág. 89 e 90). Estes resultados sugerem a existência de um mecanismo de acção distinto para o péptido Sub3, sendo apoiados pelas observações da existência de um perfil hemolítico bastante inferior ao dos restantes péptidos e de que apesar de causar a morte de *E. coli*, não induz a libertação do conteúdo intracelular como observado nas imagens de AFM.

Em resumo, podemos concluir que a substituição de aminoácidos foi bem sucedida originando novos AMPs com um espectro de acção e com uma actividade antimicrobiana

aumentada, apesar de serem necessários ajustes com vista a tornar estes péptidos em melhores candidatos a agentes antimicrobianos com aplicação em humanos. Apesar do seu mecanismo de acção não ter sido ainda determinado, em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que ocorra a permeabilização da membrana. O péptido Sub3 por outro lado, parece ter um mecanismo de acção diferente. Possíveis mecanismos de acção serão a existência de um alvo intracelular ou a neutralização de carga superficial da membrana celular. As principais conclusões retiradas deste estudo encontram-se sumarizadas na figura 47.



**Figura 47 – Representação das principais conclusões retiradas.** Os resultados de MIC<sub>100</sub> apresentados foram obtidos para o meio BB; os valores apresentados para o perfil hemolítico e *leakage* foram obtidos para a concentração mais elevada de péptido utilizada (50 µM no ensaio de hemólise e 100 µM no ensaio de *leakage*) nos ensaios com LUVs constituídas por POPC/POPG 1:1. As estruturas dos péptidos têm em evidência as cadeias laterais dos resíduos de Tyr (BP100 e PepRYL) e de Trp (PepRWL e Sub3).

## Perspectivas futuras

Com a realização deste trabalho foi possível identificar algumas substituições de aminoácidos favoráveis ao desenvolvimento de novos péptidos com actividades antimicrobianas melhoradas. Contudo, o padrão hemolítico do péptido PepRWL tem ainda de ser melhorado, provavelmente por substituição de aminoácidos com carácter hidrófobo por aminoácidos carregados positivamente, tais como argininas que favorecem a atracção péptido-membrana [74]. Estas observações poderão ainda ser úteis para a substituição de resíduos de aminoácidos em ciclótidos de forma a originar novos péptidos que combinem elevada estabilidade com uma elevada actividade antimicrobiana. Posteriormente, após optimização destes compostos, terão de ser realizados novos ensaios *in vitro* com o intuito de determinar o mecanismo de acção destes péptidos, assim como, ensaios *ex vivo* com linhas celulares e *in vivo* utilizando modelos animais com o intuito de determinar se estes poderão ser utilizados como agentes antimicrobianos em humanos. Para os novos derivados aqui desenvolvidos, PepRYL e PepRWL, poderão ser realizados ensaios de potencial zeta para observar se ocorre a neutralização da carga negativa superficial das membranas bacterianas por acção destes péptidos e ensaios de fusão e translocação de vesículas de forma a tentar revelar o seu mecanismo de acção. De forma a testar a acção destes péptidos sobre a bactéria *H. pylori* terá de se prosseguir com a optimização das condições de determinação de concentrações mínimas inibitórias e dos ensaios de microscopia de força atómica.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação em conjunto com o trabalho a ser realizado deverá conduzir ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Estes, ao terem como principal alvo as membranas bacterianas, deverão possuir selectividade e as bactérias contra os quais são activos deverão possuir dificuldade em criar resistências. Deverá ainda ser possível o esclarecimento dos seus mecanismos de acção, trabalho já iniciado nesta dissertação.

## Referências bibliográficas

- [1] G. Shama, Antibiotics: the BBC, penicillin, and the second world war, *Bmj* 337 (2008) a2746.
- [2] F.M. Steinberg, J. Raso, Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview, *J Pharm Pharm Sci* 1 (1998) 48-59.
- [3] D.I. Andersson, D. Hughes, Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?, *Nat Rev Microbiol* 8 (2010) 260-271.
- [4] Disponível, em [www.euro.who.int](http://www.euro.who.int) (acedido em 08/07/2011).
- [5] C.S. Alves, M.N. Melo, H.G. Franquelim, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Bardaji, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes, M.A. Castanho, Escherichia coli cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR, *J Biol Chem* 285 (2010) 27536-27544.
- [6] R. Ferre, M.N. Melo, A.D. Correia, L. Feliu, E. Bardaji, M. Planas, M. Castanho, Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100, *Biophys J* 96 (2009) 1815-1827.
- [7] W.C. Wimley, Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model, *ACS Chem Biol* 5 (2010) 905-917.
- [8] E. Glukhov, L.L. Burrows, C.M. Deber, Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: the two thresholds, *Biopolymers* 89 (2008) 360-371.
- [9] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389-395.
- [10] K. Hilpert, R. Volkmer-Engert, T. Walter, R.E. Hancock, High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity, *Nat Biotechnol* 23 (2005) 1008-1012.
- [11] M.N. Melo, R. Ferre, M.A. Castanho, Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations, *Nat Rev Microbiol* 7 (2009) 245-250.
- [12] E. Badosa, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Besalu, J. Cabrefiga, E. Bardaji, E. Montesinos, A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria, *Peptides* 28 (2007) 2276-2285.
- [13] S.T. Henriques, D. Craik, Discovery of peptide drugs from natural sources In "Peptide Drugs: peptide chemistry and drug design", John Wiley and Sons 2010, submitted.

- [14] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev* 55 (2003) 27-55.
- [15] M. Edidin, Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 414-418.
- [16] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 112-124.
- [17] C. Tanford, The hydrophobic effect and the organization of living matter, *Science* 200 (1978) 1012-1018.
- [18] M. Kranenburg, B. Smit, Phase behavior of model lipid bilayers, *J Phys Chem B* 109 (2005) 6553-6563.
- [19] J.M.M. Michael T. Madigan, Jack Parker, *Microbiologia de Brock* 10 ed., Prentice Hall, São Paulo, 2004.
- [20] Disponível, em <http://water.me.vccs.edu/courses/ENV195Micro/clipart/cellwall.gif>, (acedido em 26/07/2011).
- [21] K. Shahidullah, E. London, Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids, *J Mol Biol* 379 (2008) 704-718.
- [22] J. Seelig, Thermodynamics of lipid-peptide interactions, *Biochim Biophys Acta* 1666 (2004) 40-50.
- [23] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol* 2 (2004) 123-140.
- [24] P. Eaton, J.C. Fernandes, E. Pereira, M.E. Pintado, F. Xavier Malcata, Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Ultramicroscopy* 108 (2008) 1128-1134.
- [25] J.P. Nataro, J.B. Kaper, Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev* 11 (1998) 142-201.
- [26] N.Y. Shpigel, S. Elazar, I. Rosenshine, Mammary pathogenic *Escherichia coli*, *Curr Opin Microbiol* 11 (2008) 60-65.
- [27] W.C. Rice, Application of amplicon length polymorphism to differentiate amongst closely related strains of bacteria, In: Vilas, A.M., editor. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2, 2010, pp. 1509-1516.
- [28] Disponível, em <http://hamap.expasy.org/proteomes/ECOL5.html>, (acedido em 11/07/2011).

- [29] F.D. Lowy, Staphylococcus aureus infections, *N Engl J Med* 339 (1998) 520-532.
- [30] B. Fang, S. Gon, M. Park, K.N. Kumar, V.M. Rotello, K. Nusslein, M.M. Santore, Bacterial adhesion on hybrid cationic nanoparticle-polymer brush surfaces: Ionic strength tunes capture from monovalent to multivalent binding, *Colloids Surf B Biointerfaces* 87 109-115.
- [31] T. Huda, H. Nair, E. Theodoratou, L. Zgaga, A. Fattom, S. El Arifeen, C. Rubens, H. Campbell, I. Rudan, An evaluation of the emerging vaccines and immunotherapy against staphylococcal pneumonia in children, *BMC Public Health* 11 Suppl 3 (2011) S27.
- [32] A.P. Johnson, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the European landscape, *J Antimicrob Chemother* 66 Suppl 4 (2011) iv43-iv48.
- [33] S.E. Cosgrove, G. Sakoulas, E.N. Perencevich, M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli, Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis, *Clin Infect Dis* 36 (2003) 53-59.
- [34] Helicobacter pylori - Da infecção à clínica, Permanyer, Portugal, 2001.
- [35] K.A. Karlsson, The human gastric colonizer Helicobacter pylori: a challenge for host-parasite glycobiology, *Glycobiology* 10 (2000) 761-771.
- [36] D.B. Polk, R.M. Peek, Jr., Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond, *Nat Rev Cancer* 10 (2010) 403-414.
- [37] Y. Saikawa, K. Fukuda, T. Takahashi, R. Nakamura, H. Takeuchi, Y. Kitagawa, Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis, *Gastric Cancer* 13 (2010) 11-24.
- [38] T.H. Henriksen, A. Lia, R. Schoyen, T. Thoresen, A. Berstad, Assessment of optimal atmospheric conditions for growth of Helicobacter pylori, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19 (2000) 718-720.
- [39] N. Sainsus, V. Cattori, C. Lepadatu, R. Hofmann-Lehmann, Liquid culture medium for the rapid cultivation of Helicobacter pylori from biopsy specimens, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27 (2008) 1209-1217.
- [40] M. Douraghi, S.S. Kashani, H. Zeraati, M. Esmaili, A. Oghalaie, M. Mohammadi, Comparative evaluation of three supplements for Helicobacter pylori growth in liquid culture, *Curr Microbiol* 60 (2009) 254-262.
- [41] M. Shahamat, U.E. Mai, C. Paszko-Kolva, H. Yamamoto, R.R. Colwell, Evaluation of liquid media for growth of Helicobacter pylori, *J Clin Microbiol* 29 (1991) 2835-2837.

- [42] N.F. Azevedo, C. Almeida, L. Cerqueira, S. Dias, C.W. Keevil, M.J. Vieira, Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment, *Appl Environ Microbiol* 73 (2007) 3423-3427.
- [43] D.Y. Graham, A. Shiotani, New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5 (2008) 321-331.
- [44] *Helicobacter pylori* - Basic Mechanisms to Clinical Cure, Kluwer Academic, Canada, 1994.
- [45] L. Cascales, S.T. Henriques, M.C. Kerr, Y.H. Huang, M.J. Sweet, N.L. Daly, D.J. Craik, Identification and characterization of a new family of cell penetrating peptides: Cyclic cell penetrating peptides, *J Biol Chem* (2011).
- [46] V.J. Boyle, M.E. Fancher, R.W. Ross, Jr., Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks, *Antimicrob Agents Chemother* 3 (1973) 418-424.
- [47] J. Taneera, A.P. Moran, S.O. Hynes, H.O. Nilsson, W. Al-Soud, T. Wadstrom, Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp, *Microbiology* 148 (2002) 677-684.
- [48] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat Protoc* 3 (2008) 163-175.
- [49] V. Cattoir, J. Nectoux, C. Lascols, L. Deforges, J.C. Delchier, F. Megraud, C.J. Soussy, E. Cambau, Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility, *Int J Antimicrob Agents* 29 (2007) 389-396.
- [50] E. Cambau, V. Allerheiligen, C. Coulon, C. Corbel, C. Lascols, L. Deforges, C.J. Soussy, J.C. Delchier, F. Megraud, Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol* 47 (2009) 3600-3607.
- [51] J.M. Edwardson, R.M. Henderson, Atomic force microscopy and drug discovery, *Drug Discov Today* 9 (2004) 64-71.
- [52] Y.F. Dufrene, Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology, *J Bacteriol* 184 (2002) 5205-5213.
- [53] J.L. Alonso, W.H. Goldmann, Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology, *Life Sci* 72 (2003) 2553-2560.

- [54] S.D. Walter, M. Eliasziw, A. Donner, Sample size and optimal designs for reliability studies, *Stat Med* 17 (1998) 101-110.
- [55] J.P. Shaffer, Multiple Hypothesis Testing, *Annual Review of Psychology* 46 (1995) 561-584.
- [56] Y.H. Huang, M.L. Colgrave, R.J. Clark, A.C. Kotze, D.J. Craik, Lysine-scanning mutagenesis reveals an amendable face of the cyclotide kalata B1 for the optimization of nematocidal activity, *J Biol Chem* 285 10797-10805.
- [57] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed., Springer 2006.
- [58] N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Fluorescence spectroscopy methodologies on the study of proteins and peptides. On the 150<sup>th</sup> anniversary of protein fluorescence, *Trends in Applied Spectroscopy* 4 (2002) 113-125.
- [59] M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson, Experimental Correction for the Inner-filter Effect in Fluorescence Spectra, *Analyst* 119 (1994) 417-419.
- [60] S. Fery-Forgues, D. Lavabre, Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky To Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products, *Journal of Chemical Education* 76 (1999) 1260-1264.
- [61] A. Coutinho, M. Prieto, Ribonuclease T<sub>1</sub> and Alcohol Dehydrogenase Fluorescence Quenching by Acrylamide *Journal of Chemical Education* 70 (1993) 425-428.
- [62] N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Liposomes: Has The Magic Bullet Hit The Target?, *Química Nova* 25 (2002) 1181-1185.
- [63] A.S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S.H. White, How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?, *Anal Biochem* 285 (2000) 235-245.
- [64] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochim Biophys Acta* 858 (1986) 161-168.
- [65] S.T. Henriques, M.A. Castanho, Environmental factors that enhance the action of the cell penetrating peptide pep-1 A spectroscopic study using lipidic vesicles, *Biochim Biophys Acta* 1669 (2005) 75-86.
- [66] N.C. Santos, M. Prieto, M.A. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim Biophys Acta* 1612 (2003) 123-135.
- [67] D. Persson, P.E. Thoren, B. Norden, Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles, *FEBS Lett* 505 (2001) 307-312.



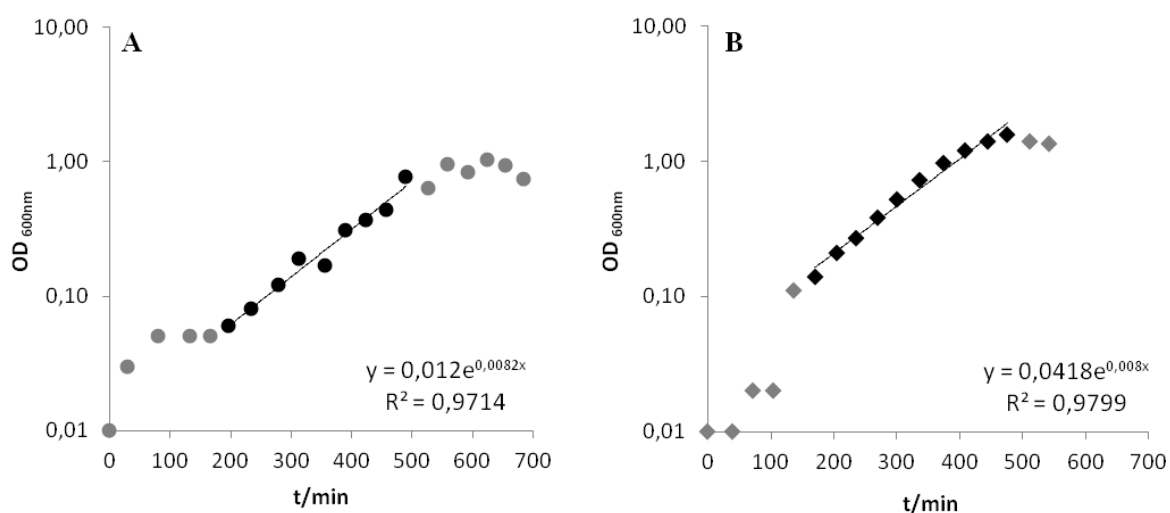
- [68] M.X. Fernandes, J. Garcia de la Torre, M.A. Castanho, Joint determination by Brownian dynamics and fluorescence quenching of the in-depth location profile of biomolecules in membranes, *Anal Biochem* 307 (2002) 1-12.
- [69] J.C. Stewart, Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate, *Anal Biochem* 104 (1980) 10-14.
- [70] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc* 1 (2006) 2876-2890.
- [71] S.M. Kelly, N.C. Price, The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Curr Protein Pept Sci* 1 (2000) 349-384.
- [72] EUCAST, Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, vol. 9, 2003, pp. 1-7.
- [73] S.H. White, W.C. Wimley, Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces, *Biochim Biophys Acta* 1376 (1998) 339-352.
- [74] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Peptide Res.* 56 (2000) 318-355.
- [75] S.T. Henriques, D.J. Craik, Cyclotides as templates in drug design, *Drug Discov Today* 15 (2010) 57-64.
- [76] J. Mrozek, A. Rzeska, K. Guzow, J. Karolczak, W. Wiczak, Influence of alkyl group on amide nitrogen atom on fluorescence quenching of tyrosine amide and N-acetyltyrosine amide, *Biophys Chem* 111 (2004) 105-113.
- [77] A. Berteotti, A. Barducci, M. Parrinello, Effect of urea on beta-hairpin conformational ensemble and protein denaturation mechanism, *J Am Chem Soc* (2011).
- [78] M.M. Ribeiro, M.N. Melo, I.D. Serrano, N.C. Santos, M.A. Castanho, Drug-lipid interaction evaluation: why a 19th century solution?, *Trends Pharmacol Sci* 31 (2010) 449-454.
- [79] S.T. Henriques, M.A. Castanho, Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles, *Biochemistry* 43 (2004) 9716-9724.
- [80] G.A. Caputo, E. London, Using a novel dual fluorescence quenching assay for measurement of tryptophan depth within lipid bilayers to determine hydrophobic alpha-helix locations within membranes, *Biochemistry* 42 (2003) 3265-3274.

- 
- [81] E.E. Ambroggio, F. Separovic, J.H. Bowie, G.D. Fidelio, L.A. Bagatolli, Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein, *Biophys J* 89 (2005) 1874-1881.
- [82] J.Y. Lee, S.T. Yang, H.J. Kim, S.K. Lee, H.H. Jung, S.Y. Shin, J.I. Kim, Different modes of antibiotic action of homodimeric and monomeric bactenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide, *BMB Rep* 42 (2009) 586-592.
- [83] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal Biochem* 287 (2000) 252-260.
- [84] F.A. Nezil, M. Bloom, Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes, *Biophys J* 61 (1992) 1176-1183.
- [85] N. Rodeia, M. Santos, M. Carolino, R. Tenreiro, M. Barata, A.M. Reis, L. Chambel, C.S. José, *Guia Prático de Biologia Microbiana* 2007/2008.

## Anexos

### Anexo A – Optimização do crescimento microbiano

De forma a otimizar e uniformizar o crescimento da bactéria *S. aureus* foram realizadas as curvas de crescimento destas bactérias nos dois meios de cultura líquidos utilizados para os ensaios biológicos. Assim, uma colónia de *S. aureus* foi retirada de uma placa de meio MHA ou BA e ressuspensa em 5 mL de meio MHB ou BB. O frasco foi a incubar, sendo retirados 100  $\mu$ L de 30 em 30 minutos para medir o valor da OD a 600 nm. As medições foram realizadas até os valores de OD estabilizarem. Na Figura A1 é possível visualizar a representação gráfica, em escala logarítmica, dos valores obtidos. Foram seleccionados os valores obtidos para a fase de crescimento exponencial de forma a ajustar uma linha de tendência exponencial e retirar a equação da mesma, com o intuito de determinar o ponto médio da fase exponencial de crescimento. Tomando para o crescimento de *S. aureus* em MHB o ponto médio aos 400 minutos e para o crescimento de *S. aureus* em BB o ponto médio aos 325 minutos, por substituição na recta obtêm-se os valores de OD a 600 nm de 0.319 e 0.563, respectivamente. Estes serão os valores de OD que a bactéria terá de atingir para que possam ser realizados os ensaios biológicos.



**Figura A1 – Curvas de crescimento de *S.aureus* em meio MHB (A) e BB (B).** O ajuste foi realizado apenas para os valores de crescimento exponencial (preto), não sendo consideradas as restantes fases de crescimento (cinzento).

Após determinação do ponto médio da fase exponencial de crescimento, colocou-se uma colónia de *S. aureus* retirada de uma nova placa de MHA ou BA em 5 mL de meio líquido MHB ou BB e deixou-se crescer até à OD necessária para atingir o ponto médio da fase exponencial (0.319 para *S. aureus* em MHB e 0.563 para *S. aureus* em BB). Prepararam-se diluições sucessivas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  e plaquearam-se, em triplicado, em placas de MHA ou BA, as diluições  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$ . Contaram-se as colónias 24 horas depois. Os valores de colónias foram então convertidos para cfu/mL por utilização da Equação A1:

$$N = \frac{C \times 10^D}{V_i} \quad \text{Equação A1}$$

em que N = cfu/mL, C = número médio de colónias contadas, D = número da diluição 1:10 e  $V_i$  = volume do inóculo. Para um volume de 100  $\mu$ L, vem:

$$N = C \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{10^{-D}} \Leftrightarrow N = \frac{C \times 10}{10^{-D}} \quad \text{Equação A2}$$

Estes ensaios foram realizados em triplicado, de forma independente. Assim, foi realizada a média das diluições mais representativas obtendo-se o valor de  $2,735 \times 10^8$  cfu/mL para uma OD de 0,319 e de  $3,20 \times 10^8$  cfu/mL para uma OD de 0,563.

## **Anexo B – Composição e modo de preparação dos meios de cultura**

### **B1. Meio Mueller Hinton Broth**

Infusão de carne.....	300 g/L
Hidrolisado de caseína .....	17,5 g/L
Amido .....	1,5 g/L

O meio MHB foi adquirido à empresa Oxoid, na forma de pó, com os seus constituintes nas proporções necessárias para se obterem as concentrações indicadas acima. Este meio foi preparado por adição de 2,1 g do meio a 100 mL de água destilada. Posteriormente agitou-se até dissolver e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Após preparação o meio MHB deverá possuir um pH de  $7,3 \pm 0,1$  a 25°C.

### **B2. Meio Mueller Hinton Ágar**

Infusão de carne .....	300 g/L
Hidrolisado de caseína .....	17,5 g/L
Amido.....	1,5 g/L
Ágar .....	17,0 g/L

O meio MHA foi adquirido à empresa Oxoid, na forma de pó, com os seus constituintes nas proporções necessárias para se obterem as concentrações indicadas acima. Este meio foi preparado por adição de 3,8 g do meio a 100 mL de água destilada. Posteriormente agitou-se até dissolver e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Caso não houvesse dissolução completa, o meio deveria ser fervido. Após ligeiro arrefecimento, o meio foi distribuído por caixas de petri estéreis que após 1-2 horas foram guardadas na arca a 4°C, de forma invertida (i.e. com a tampa para baixo, de forma a evitar que a condensação caía no meio de cultura). Para confirmar a esterilidade do meio recém-preparado uma placa é colocada na estufa durante 24 horas, sendo avaliado no dia seguinte o possível crescimento de microorganismos. Após preparação o meio MHA deverá possuir um pH de  $7,3 \pm 0,1$  a 25°C.

### B3. Meio Brucella Broth

Caseína enzimática hidrolisada .....	15,0 g/L
Digestão péptica de tecido animal .....	5,0 g/L
Extracto de levedura .....	2,0 g/L
Dextrose .....	1,0 g/L
Cloreto de sódio .....	5,0 g/L
Bissulfito de sódio .....	0,1 g/L

O meio BB foi adquirido à empresa Fisher Scientific (Remel), na forma de pó, com os seus constituintes nas proporções necessárias para se obterem as concentrações indicadas acima. Este meio foi preparado por adição de 2,8 g do meio a 100 mL de água destilada. Posteriormente agitou-se até dissolver e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Para suplementar este meio com soro de cavalo, realizou-se o mesmo procedimento. Após autoclavagem deixou-se arrefecer o meio até aproximadamente 45/50°C (temperatura à qual se consegue segurar o frasco na mão) e adicionou-se o soro. Após preparação o meio BB deverá possuir um pH de  $7,0 \pm 0,2$  a 25°C.

### B4. Meio Brucella Ágar

Caseína enzimática hidrolisada .....	15,0 g/L
Digestão péptica de tecido animal .....	5,0 g/L
Extracto de levedura .....	2,0
Dextrose .....	1,0 g/L
Cloreto de sódio .....	5,0 g/L
Bissulfito de sódio .....	0,1 g/L
Ágar .....	15,0 g/L

O meio BA foi adquirido à empresa Fisher Scientific (Remel), na forma de pó, com os seus constituintes nas proporções necessárias para se obterem as concentrações indicadas

acima. Este meio foi preparado por adição de 4,3 g do meio a 100 mL de água destilada. Posteriormente agitou-se até dissolver e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Caso não houvesse dissolução completa, o meio deveria ser fervido. Após ligeiro arrefecimento, o meio foi distribuído por caixas de petri estéreis que após 1-2 horas foram guardadas na arca a 4°C, de forma invertida (i.e. com a tampa para baixo, de forma a evitar que a condensação caía no meio de cultura). Para confirmar a esterilidade do meio recém-preparado uma placa é colocada na estufa durante 24 horas, sendo avaliado no dia seguinte o possível crescimento de microrganismos. Após preparação o meio BA deverá possuir um pH de  $7,0 \pm 0,2$  a 25°C.

### **B5. Meio selectivo para *Helicobacter pylori***

Este meio tem por base o meio de cultura Wilkins-Chalgren, um meio de cultura utilizado normalmente para determinação de concentrações mínimas inibitórias de microrganismos anaeróbios. Para além desta base, este meio é ainda suplementado com sangue, NAD<sup>+</sup> (factor de crescimento sob a forma de ampolas de polyvitex) e antibióticos (indicados abaixo), de forma a permitir o crescimento selectivo da *H. pylori*. A composição deste meio foi elaborada pelo grupo da Doutora Mónica Oleastro do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e feito, por encomenda, pela empresa Biogerm.

Sangue de cavalo desfibrinado .....	10%
Ampolas de polyvitex (fonte de NAD <sup>+</sup> ) .....	2/100 mL sangue
Vancomicina (10 mg/mL) .....	1 mL
Trimetoprim (5 mg/mL) .....	1 mL
Fungizona (1 mL/mL) .....	1 mL
Cefsulodina (2 mg/mL) .....	1 mL

## Anexo C – Fundamentos teóricos suplementares

### C1. Método de esgotamento do inóculo

O método de esgotamento do inóculo é uma técnica de isolamento de colónias em culturas de microrganismos (bactérias ou leveduras), com o objectivo de obter colónias isoladas a partir de um inóculo concentrado de células [19, 85]. Uma ança estéril é utilizada para retirar uma porção de solução stock, que se encontra líquida após descongelamento e espalhar sobre uma placa de meio sólido. Após semear o segmento inicial da caixa, a sementeira deve prosseguir arrastando o inóculo para os próximos quadrantes, diluindo-o Figura C1. Caso necessário, pode reesterilizar-se a ansa à chama de forma a diluir ainda mais o inóculo [19].

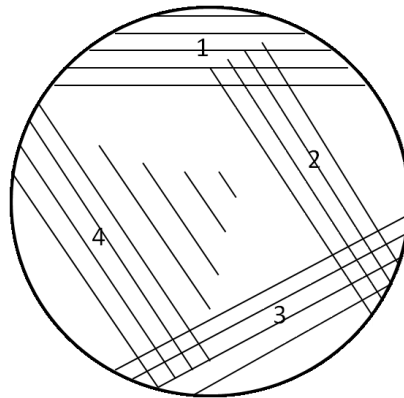


Figura C1 - Sementeira de uma placa de meio de cultura sólido segundo o método do esgotamento do inóculo.

### C2. *Quenching* de fluorescência

De uma forma geral, o termo *quenching* de fluorescência é utilizado para qualquer processo em que ocorra a diminuição da intensidade de fluorescência [58]. Este fenómeno deve-se ao encontro entre o fluoróforo no estado excitado e um *quencher* (molécula ou grupo funcional), resultando no retorno do fluoróforo ao estado fundamental sem emissão de radiação, ocorrendo uma diminuição da intensidade de fluorescência [57]. O encontro entre fluoróforo e *quencher* pode resultar de processos dinâmicos (colisionais), em que o *quencher* se difunde e encontra o fluoróforo durante o estado excitado do mesmo, ou estáticos, em que se forma um complexo não fluorescente entre o fluoróforo no estado excitado e o *quencher* (assim que o complexo absorve luz, decaí imediatamente para o estado fundamental, sem emissão de fótons) [57]. O processo dinâmico é representado pela equação de Stern-Volmer:



$$\frac{I_o}{I} = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Equação C1}$$

em que  $I_o$  é a intensidade de fluorescência na ausência de *quencher*,  $I$  é a intensidade de fluorescência na presença de *quencher*,  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer (que pode ser dada pela multiplicação da constante de velocidade bimolecular  $k_q$  pelo tempo de vida do fluoróforo na ausência de *quencher*  $\tau_o$ ) e  $[Q]$  é a concentração de *quencher* [57, 58]. Esta equação considera a existência de uma relação linear entre  $I_o/I$  e  $[Q]$ , mas podem ocorrer desvios positivos ou negativos a esta linearidade. Os desvios positivos podem ser explicados pelo modelo da esfera activa em que se considera uma esfera de volume  $V$  centrada no fluoróforo, na qual ocorre *quenching* com uma eficiência  $\gamma$  e se assume que o fluoróforo e o *quencher* se encontrarão dentro da esfera. Este modelo é descrito pela Equação C2:

$$\frac{I_o}{I} = (1 + K_{SV} [Q]) e^{V[Q]N_A\gamma} \quad \text{Equação C2}$$

em que  $N_A$  é a constante de Avogadro [57, 58]. Por outro lado, a existência de desvios negativos à linearidade podem ser justificados pela existência de duas populações de fluoróforos com diferentes acessibilidades ao *quencher*. Este fenómeno é descrito pela equação de Lehrer:

$$\frac{I_o}{I} = \frac{1 + K_{SV} [Q]}{(1 + K_{SV} [Q])(1 - f_B) + f_B} \quad \text{Equação C3}$$

em que  $f_B$  é a fracção de intensidade de fluorescência do péptido acessível ao *quencher* e é dado pela razão  $f_B = \frac{I_{o,B}}{I_o}$  e  $I_{o,B}$  é a intensidade de fluorescência da população de fluoróforos que se encontra acessível ao *quencher*, na sua ausência [57, 58]. De forma a avaliar a fracção de intensidade de fluorescência da população de fluoróforo acessível ao *quencher*,  $f_B$ , é vantajoso o cálculo da fracção de intensidade de fluorescência da população de péptido particionado no lípido,  $f_L$ :

$$f_L = \frac{\left(\frac{I_L}{I_W}\right) K_p \gamma_L [L]}{1 + \left(\frac{I_L}{I_W}\right) K_p \gamma_L [L]} \quad \text{Equação C4}$$

em que  $K_p$  é a constante de partição,  $I_L/I_W$  é a razão entre a intensidade de fluorescência do péptido quando todo particionado no lípido e a intensidade de fluorescência na ausência de lípido,  $\gamma_L$  é o volume molar de lípido e  $[L]$  é a concentração de lípido [65].

Já no *quenching* estático, a associação entre o fluoróforo  $F$  e o *quencher*  $Q$  dá origem ao complexo  $FQ$  [57]. A formação deste complexo é descrita pela constante de associação  $K_a$ :

$$K_a = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad \text{Equação C5}$$

Como o complexo é não fluorescente, a restante fracção de fluorescência é produzida pela fracção de fluoróforo que não está complexado:  $f = \frac{I}{I_o}$ . Uma vez que a concentração total de fluoróforo é dada por  $[F]_t = [F] + [FQ]$ , rearranjando a Equação C5 obtém-se a Equação C6:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + K_a [Q]_t \quad \text{Equação C6}$$

que é idêntica à equação que descreve o processo de *quenching* dinâmico. Contudo, estas duas formas de *quenching* podem ser distinguidas por alteração das condições de temperatura e viscosidade ou por realização de ensaios de tempos de vida [57].

Caso o fluoróforo sofra ambos os tipos de *quenching*, pode observar-se um desvio positivo à linearidade na representação de Stern-Volmer, sendo a intensidade de fluorescência obtida proveniente da fracção de fluoróforos não *quenchedos* colisionalmente e pela fracção de fluoróforos não complexados:

$$\frac{I_o}{I} = (1 + K_{sv}[Q])(1 + K_a[Q]) \quad \text{Equação C7}$$

De forma a quantificar a contribuição de cada uma das duas formas de *quenching* pode modificar-se algebricamente a Equação C7 de modo a separar graficamente  $K_{SV}$  e  $K_a$ , ou em alternativa efectuar ensaios de tempo de vida para determinar a porção dinâmica de *quenching* [57].