



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA PPGQUIM**

ELIELMA DE ARAUJO PRAZERES

**ESTUDOS BIOFÍSICO-QUÍMICOS DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DE
PEPTÍDEOS COM MICELAS POLIMÉRICAS**

**ILHÉUS - BAHIA
2016**

ELIELMA DE ARAUJO PRAZERES

**ESTUDOS BIOFÍSICO-QUÍMICOS DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DE
PEPTÍDEOS COM MICELAS POLIMÉRICAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Estadual de Santa Cruz, área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia, linha de Pesquisa: Físico-Química teórica Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Salay

**ILHÉUS - BAHIA
2016**

P921 Prazeres, Elielma de Araujo.

Estudos biofísico-químicos das interações moleculares de peptídeos com micelas poliméricas / Elielma de Araujo Prazeres. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.
80 f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Salay.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.

Inclui referências.

1. Físico-química. 2. Peptídeos. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Fluorescência. 5. Calorimetria. 6. Absorção da Luz. 7. Luz – Espalhamento. I. Título.

CDD 541.3

ELIELMA DE ARAUJO PRAZERES

**ESTUDOS BIOFÍSICO-QUÍMICOS DAS INTERAÇÕES
MOLECULARES DE PEPTÍDEOS COM MICELAS POLIMÉRICAS**

Ilhéus-BA, 06 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Luiz Carlos Salay
Doutor em Físico-Química University of Leeds - Inglaterra
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC
(Orientador)



Prof. Dr. Fernando Cesário Rangel
Doutor em Química - UNB
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC



Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Doutor em Ciências - UNIFESP
Universidade Federal da Bahia – UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, na procura do nosso ideal percorremos veredas com passos tímidos e inseguros e Tu, com tua grandiosidade, nos fez substituir aos poucos a incerteza pela segurança o medo pela vitória.

A Fapesb pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores, pela compreensão, pelo encorajamento e palavras amigáveis que muitas vezes me deu força para continuar, obrigada também pelas broncas, pois elas também contribuíram para que hoje eu estivesse terminando essa etapa.

Ao professor Dr. Luiz Carlos Salay pelo apoio e orientação a qual contribuiu muito para que esse estudo se realizasse.

Ao professor Dr. Raildo Mota de Jesus, atual coordenador do programa de pós-graduação em química da UESC, pelo grande apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Eduardo Maffud Cilli pela cooperação e disponibilidade sempre que precisei para a síntese do Peptídeo.

Ao professor Dr. Eloi da Silva Feitosa pela disponibilidade do equipamento DSC, DLS sempre que necessário e pela grande cooperação e orientação.

Aos meus pais, que amo, de forma mais intensa, de maneira mais completa. De vocês recebemos o dom mais precioso do universo: "a vida".

Aos meus avôs maternos Vicência Alves Araújo e Manuel Nascimento Araújo, pelo grande amor e carinho que sempre me foi dado, o que me encorajava e animava para vencer todas as barreiras que encontrei na vida.

Aos meus irmãos, especialmente a Enoque de Araujo Prazeres pelo grande apoio.

Aos Ausentes. Quão radiantes pousavam seus olhos quando nascemos, mas que chamados para o descanso eterno, cerraram os olhos antes de verem o testemunho de seus esforços tornarem-se realizado.

Aos colegas e amigos, especialmente a Nélida Marin pelo incentivo e pelo apoio constante.

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos têm despertado um grande interesse no mundo científico devido à sua atividade e especificidade contra bactérias, fungos, vírus e até contra células cancerígenas. A grande atração por essa nova alternativa de fármaco esta no fato dos peptídeos possuírem um peculiar mecanismo de ação, o qual dificulta a criação de resistência por parte dos microrganismos patogênicos. A tritripticina é um PAM (peptídeo antimicrobiano) pertencente à família das catelicidinas e que possui uma ampla atividade contra bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas e também certa atividade hemolítica. Neste estudo buscamos investigar o mecanismo de interação da tritripticina com micelas poliméricas do plurônico F127. Para tal estudo foram utilizadas técnicas espectroscópicas de fluorescência e de dicroísmo circular bem como técnicas termoanalíticas como calorimetria diferencial de varredura (DSC) e técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e de medidas potencial zeta. Os estudos de fluorescência e supressão de fluorescência mostraram que o peptídeo interage com agregados moleculares de plurônico F127. Os espectros de CD indicaram que a interação do peptídeo com as micelas poliméricas de plurônico altera sua conformação e provoca um leve deslocamento das bandas espectrais. As curvas DSC de F127 mostraram ausência de histerese térmica e um único evento endotérmico, numa faixa de temperatura em torno de 31,5°C, com entalpia ΔH_m de aproximadamente 207 kJ/mol. Já a curva DSC do peptídeo antimicrobiano tritripticina na ausência de plurônico F 127, demonstra o primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura em torno de 27,5°C, com entalpia ΔH_m 198,2 kJ/mol. Tal pico é característico do peptídeo TRP3. No entanto ao interagir o plurônico com a tritripticina há um alargamento e deslocamento do pico para temperaturas menores, indicando que houve interação da tritripticina com o plurônico. Através de estudos com DLS percebemos que o raio hidrodinâmico do plurônico aumenta com o aumento de sua concentração, no entanto ao interagir a tritripticina com diferentes concentrações de plurônico houve um aumento significativo no diâmetro dos aglomerados de plurônico, chegando a tamanhos referentes à formação de complexos, com D_H médio de aproximadamente 550 nm, e isso sugere a interação do peptídeo com o plurônico. As medidas de potencial zeta (ζ) estão em concordância com as medidas do diâmetro hidrodinâmicos, pois quanto maior o diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados menor será ζ , uma vez que ζ mede a capacidade de mobilidade das partículas e quanto maior o tamanho da partícula menor será a sua mobilidade.

Diante destes resultados pode-se concluir que há interação entre o peptídeo antimicrobiano tritripticina e o plurônico F127.

Palavras chave: Peptídeo antimicrobiano, tritripticina, micela polimérica, fluorescência, calorimetria diferencial de varredura, dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico.

Abstract

The antimicrobial peptides have aroused great interest in the scientific world due to their high activity and specificity against bacteria, fungus, virus and even against cancer cells. The great attraction for this new drug alternative is in the fact that he has a unique mechanism of action, which hinders the creation of resistance by pathogenic microorganisms. The tritrpticin is a PAM (antimicrobial peptide) belonging to the family of cathelicidins and has a broad activity against gram-positive and gram-negative bacteria and hemolytic activities. This study aimed to investigate the interaction of tritrpticin with polymeric micelles of pluronic F127. For this study it was used the spectroscopic techniques of circular dichroism and fluorescence as well as the thermoanalytical technique differential scanning calorimetry (DSC) and the dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurement techniques. Fluorescence and fluorescence quenching studies have shown that peptides interact with the polymeric micelles of the pluronic F127. CD spectra indicated that the interaction of peptides with the pluronic polymeric micelles alter their conformation and causes a slight shift of the bands. The F127 DSC curves showed absence of thermal hysteresis and one endothermic event at a temperature range around 31.5 ° C with enthalpy ΔH_m approximately 207 kJ / mol. The DSC curve antimicrobial peptide tritrpticin in the absence of pluronic F 127 shows the first endothermic event at temperature range around 27.5 ° C with enthalpy ΔH_m 198.2 kJ / mol. This peak is characteristic of the denaturing process of TRP3 peptide. However when interacting with the pluronic with tritrpticin there is a widening and shifting of the peak to lower temperatures, indicating that there was interaction between tritrpticin and pluronic. Through studies DLS we realized that the hydrodynamic radius of pluronic increases with increasing concentration, but when interacting tritrpticin with different pluronic concentrations there was a significant increase in the diameter of the micelles, reaching the formation of complexes with D_H medium around 550 nm, and this suggests the interaction of the peptide with the pluronic. The zeta (ζ) potential measurements are consistent with the measurements of the hydrodynamic diameter, because the larger the agglomerates hydrodynamic diameter the smaller will be ζ , since ζ measures mobility capability of the particles and the larger particles the smaller will be their mobility.

From these results it can be concluded that there is interaction between the tritrpticina antimicrobial peptide and Pluronic F127.

Keywords: antimicrobial peptide, tritrpticin, polymeric micelle, fluorescence, differential scanning calorimetry, circular dichroism, dynamic light scattering.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Peptídeo Antimicrobiano:Tritrpticina.....	15
1.1.1 Tritrpticina.....	17
1.2 Mecanismo de ação dos PAMs.....	20
1.3 Plurônico F127.....	22
2. OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivos Geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1Materiais.....	28
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Síntese do peptídeo tritrpticina.....	28
3.2.1.1 Reações de Clivagem	30
3.2.1.2 Purificação e caracterização dos peptídeos	31
3.2.2 Preparação das amostras.....	31
3.2.2.1Preparação da solução tampão.....	31
3.2.2.2 Preparação da solução de plurônico F127.....	32
3.2.2.3 Preparação das soluções de tritrpticina	32
3.3 Experimentos.....	32
3.3.1 Análise da fluorescência da tritrpticina	32
3.3.2 Análise de supressão por acrilamida.....	33
3.3.3 Experimento de Anisotropia.....	33
3.3.4 Experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular	34
3.3.5 Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico.....	34
3.3.6 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura.....	35

3.3.7 Potencial zeta.....	35
3.4 Técnicas Utilizadas.....	36
3.4.1 Espectroscopia de Fluorescência.....	36
3.4.2 Processos de supressão de Fluorescência.....	38
3.4.3 Anisotropia de fluorescência.....	39
3.4.4 Espctroscopia de dicroísmo Circular.....	42
3.4.5 DSC.....	45
3.4.6 DLS.....	46
3.4.7 Potencial Zeta.....	47
4 Resultado e Discussão	50
4.1 Síntese do peptídeo tritripticina	50
4.2 Investigação da interação da tritripticina com o plurônico por meio de espectroscopia de fluorescência.	51
4.3 Estudos dos aspectos conformacionais da interação da tritripticina com aglomerados molecular de plurônico F127 por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).	56
4.4 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do Plurônico F127em solução aquosa.....	58
4.5 Estudo da interação da tritripticina com o Plurônico F127 por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	61
4.6 Efeito da interação da tritripticina no tamanho hidrodinâmico e no potencial zeta dos aglomerados molecular de plurônico F127.....	64
4.7 Medidas de Potencial zeta (ζ)	66
5 Conclusão	68
6 Referências.....	69

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TRP3; tritripticina

CD: Dicroísmo Circular

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

ϵ : Constante dielétrica

K_{sv} : Constante de Stern-Volmer

$\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$: Comprimento de onda de máxima emissão

θ : Elipticidade molar

cmc: concentração micelar crítica

F 127 : Plurônico F127

K_B : Constante de Boltzmann

PEO: poli(óxido de etileno)

PO: óxido de propileno

ΔH_m : Variação de entalpia da transição principal

$\Delta T_{1/2}$: Largura do pico na meia altura

ζ ; Potencial Zeta

μ_e : Mobilidade eletroforética

η : Viscosidade do meio

K : Comprimento de Deye

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz

OMS: Organização Mundial de Saúde

WHO: World Health Organization

PAM: Peptídeo antimicrobiano

Trp: Triptofano

Pro: Prolina

Arg: Arginina

CMT: Temperatura Micelar Crítica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de ligação peptídica por condensação.....	15
Figura 2: Estrutura da tritripticina.....	18
Figura 3: Mecanismo de ação PAMs ,A) Formação de barril B) Formação de tapete e C) Poro toroidal	22
Figura 4: Estrutura química do Plurônico, EO: Oxietileno, PO: oxipropileno.....	23
Figura 5: Formas micelar formada espontaneamente em meio aquoso.....	24
Figura 6: Representação da estrutura do hidrogel.....	25
Figura 7: Micela de tribloco de Plurônico.....	26
Figura 8: Reação que ocorre durante o teste de ninidrina.....	29
Figura 9: Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.....	30
Figura 10: Diagrama de Jablonski. Representação dos processos de absorção e relaxação de uma molécula e seus tempos característicos.....	37
Figura 11: Representação esquemática das medidas de anisotropia de fluorescência.....	39
Figura 12: Esquema da luz natural, luz Polarizada linearmente na vertical / horizontal e Luz Polarizada parcialmente.....	40
Figura 13: Efeitos de excitação polarizada e difusão de rotação na polarização ou anisotropia de emissão.....	41
Figura 14: Diagrama de componentes de campo elétrico luz não polarizada.....	42
Figura 15: Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas ER e EL.....	43
Figura 16: Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e Ψ	44
Figura 17: Partícula esférica negativamente carregada dispersa líquido.....	48

Figura 18: Comportamento do potencial zeta de uma solução em função da variação do pH.....	49
Figura 19: Espectro de massas referente ao peptídeo tritripticina.....	50
Figura 20: Perfil Cromatográfico referente ao peptídeo tritripticina.....	50
Figura 21: Espectros de fluorescência da tritripticina $20 \mu\text{molL}^{-1}$ na presença de Plurônico F127.....	52
Figura 22: Fluorescência relativa da tritripticina $20\mu\text{molL}^{-1}$ na presença de plurônico F127.....	52
Figura 23: Espectro da fluorescência de tritripticina e plurônico na presença de acrilamida.....	54
Figura 24: Gráficos de fluorescência relativa da tritripticina em solução e na presença de plurônico em função da concentração de acrilamida.....	54
Figura 25: Espectros de dicroísmo circular de tritripticina em solução e na presença de micelas de plurônico F127.....	57
Figura 26: Termogramas DSC de aquecimento de F127 em diferentes concentrações.....	59
Figura 27: Variação da CMT e ΔH de F127 em função da concentração do F127, na ausência da tritripticina.....	60
Figura 28: Curvas de DSC de aquecimento da interação de tritripticina $50 \mu\text{M}$ com diferentes concentrações de Plurônico F127.....	62
Figura 29: Variação da CMT (a) e ΔH (b) com a concentração de F127, na ausência e na presença do peptídeo, obtidos da Figura 28.....	63
Figura 30: Diâmetro hidrodinâmico das micelas de F127 em função da concentração, na ausência (a) e na presença da tritripticina $50 \mu\text{M}$ (b)	65
Figura 31: Potencial zeta em função da concentração de F127, na presença de TRP3 $50 \mu\text{M}$	66

1 INTRODUÇÃO

O surgimento de bactérias multirresistentes devido à capacidade que alguns microrganismos possuem de resistirem a determinados fármacos através das mutações genéticas tem crescido de forma alarmante. Isso tem preocupado a sociedade e impulsionado pesquisadores na busca por novas substâncias antimicrobianas, Tal problemática tem também mobilizado a Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual vem fazendo sucessivas alertas a respeito do assunto (LOHNER, 2001; NORDBERG et al., 2005; WHO, 2013, 2014; 2015).

Nos compostos naturais encontramos uma fonte inesgotável de estruturas químicas que dependendo de sua atividade biológica eles podem ser utilizados no combate de doenças. Os peptídeos antimicrobianos (PAM) destacam-se dentre esses compostos bioativos, devido à peculiaridade no seu mecanismo de ação microbicida agindo na membrana celular dos microrganismos, e tais peptídeos são raramente capazes de induzir resistência em microrganismos (BULLETT et al., 2004).

Os PAMs constitui parte importante do sistema imune inato de fungos, bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (BROGDEN, 2005; JENSSEN et al., 2006). Os mesmos foram inicialmente identificados por Steiner e colaboradores em 1981 na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia*. Em virtude do seu grande potencial contra os micro-organismos as pesquisas aumentaram muito e desde então, mais de 2.500 peptídeos já foram e isolados e caracterizados (BULLETT et al., 2004; WANG et al., 2009).

A descoberta de novos agente antimicrobianos faz-se necessário e é de suma importância ultimamente, pois poucos antibióticos convencionais foram descobertos nos últimos anos. No período entre 1983-1987 foram introduzidos dezesseis novos compostos, porém, no período entre 1998-2002 apenas sete antibióticos foram introduzidos (SPELLBERG et al., 2004).

A utilização de peptídeos antimicrobianos é visto como uma nova alternativa de fármacos antimicrobianos. No entanto, a utilização do mesmo como fármaco ainda é um desafio para as pesquisas biotecnológicas, devido às limitações que dificultam o transporte e liberação dessas substâncias no organismo, dentre essas limitações estão a fato dos peptídeos serem instáveis nas soluções fisiológicas, e possuírem baixa permeabilidade, o que possibilita a degradação enzimática dos

peptídeos no local de administração como também durante o seu percurso para o local de ação (ALMEIDA e SOUTO, 2007).

Para sanar essa problemática tem sido realizados estudos com utilização de micelas poliméricas como veículo de entrega de fármacos. Dentre as vantagens da utilização de nano-partículas para entrega de fármacos estão: a redução de efeitos adversos, a proteção do composto e liberação controlada da substância nelas encapsuladas e o aumento da penetração intracelular (TEIXEIRA et al., 2005).

Esta dissertação descreve o estudo realizado da interação do peptídeo antimicrobiano Trrpticina (TRP3) com agregados molecular de Plurônico (F127), visando obter informações físico-químicas sobre as propriedades conformacionais do peptídeo TRP3, bem como sua solubilidade e auto-associação em presença de agregados molecular do Plurônico F127. O estudo de tal interação é inédito, visto que não se tem relato de estudos anteriores.

Estudos anteriores relataram que a tritrpticina possui grande atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas (SELSTED et al.,1992). Por outro lado, devido à biocompatibilidade, o plurônico F127 é um polímero com grande utilidade como constituinte de veículo de entrega de fármacos no organismo e é também utilizado no emprego da síntese de nanopartícula de ouro (KOWALCZUK et al., 2014; SHI et al., 2015).

Pretende-se com os resultados dos estudos explorar a versatilidade e as propriedades de ambos os sistemas (peptídeos antimicrobianos e micelas poliméricas) sob o ponto de vista físico-químico e nanobiotecnológico para o potencial desenvolvimento de nanocompósitos funcionais com propriedades controladas e moduladas diante de mudanças de vários parâmetros externos tais como pH, concentração, tempo, temperatura, etc. Tal nível de controle possibilitará o potencial uso desses nanocompósitos em varias aplicações, tais como sistemas de entrega controlada de drogas e filmes antimicrobianos.

1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos são biopolímeros de baixa massa molecular em comparação as proteínas, com atividade inibitória contra microrganismos, além de desempenharem várias funções bioquímicas e que tem como monômeros os aminoácidos, os quais estão ligados entre si através da ligação peptídica (IZADPANA e GALLO, 2005). De acordo com a classificação nutricional os aminoácidos podem ser classificados em: essenciais, não essenciais, e condicionalmente essenciais (NELSON e COX, 2008).

A ligação peptídica é formada pela remoção da água (condensação) de um grupo α -carboxila de um aminoácido e de um grupo α -amino de outro aminoácido como mostrado na Figura 1. Os aminoácidos que compõem os peptídeos são denominados resíduos de aminoácidos, pois perderam um hidrogênio do grupo α -amino e uma hidroxila do grupo α -carboxílico. O resíduo de aminoácido na extremidade carboxila é chamado resíduo carboxiterminal (C-terminal) e o resíduo presente na extremidade α -amino é chamado de aminoterminal (N-terminal) (NELSON e COX, 2008).

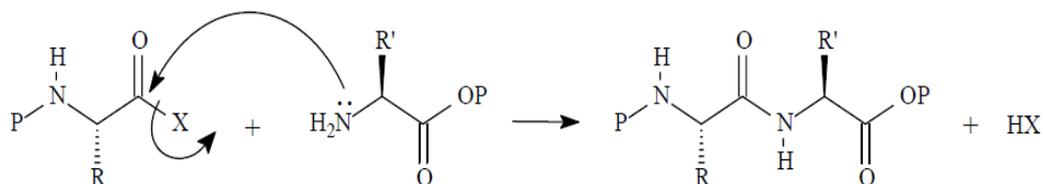


Figura 1: Reação de ligação peptídica por condensação (NELSON e COX, 2008).

Uma característica peculiar dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) é o fato de serem moléculas pequenas e de baixa massa molecular em comparação com as proteínas. Em sua maioria possuem caráter catiônico, com carga positiva em pH fisiológico, devido à predominância dos resíduos de aminoácidos com carga positiva como: arginina, lisina. Além de serem catiônicos os PAMs possuem uma estrutura anfipática, apresentando também uma região hidrofóbica (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Dessa forma a interação e inserção dos PAMs nas superfícies da

membrana aniônica dos microrganismos é facilitada pelo caráter catiônico associado a tendência de adotar uma estrutura anfipática. (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Apesar das suas similaridades, os PAMs possuem consideráveis diferenças em relação à extensão da cadeia polipeptídica e quanto às estruturas primária e secundária apresentadas. Levando tais características em consideração, várias propostas têm sido feitas para classificá-los com base na sequência e estrutura secundária, uma delas é a reportada por Brogden a qual classifica os peptídeos em: peptídeos aniônicos, peptídeos que formam α -hélice, peptídeos que contêm cisteínas e formam ligações dissulfeto, e peptídeos ricos em aminoácidos específicos. (BROGDEN, 2005):

Peptídeos aniônicos. São carregados negativamente em pH fisiológico e necessitam de zinco como cofator, estes peptídeos possuem uma pequena sequência de aminoácidos possuindo até 10 resíduos. Os peptídeos aniônicos podem ser encontrados em extratos de surfactantes pulmonares em concentrações da ordem de mM, como também em células epiteliais das vias respiratórias. Um representante desse grupo é a dermicina humana.

Peptídeos que formam α -hélice. São carregados positivamente em pH fisiológico e não possuem resíduos de cisteína. São curtos possuindo até 40 resíduos de aminoácidos, a maioria dos PAMs descritos até o momento faz parte desse grupo. Na presença de solventes indutores de estrutura secundária ou membranas modelo, tais peptídeos adquirem uma conformação (anfipática) em α -hélice. Um exemplo desse grupo é a magainina II de anfíbios.

Peptídeos que contem cisteínas e formam ligações dissulfeto. Podem ser carregados tanto negativamente como positivamente em pH fisiológico, formam ligações dissulfeto, possuem resíduos de cisteínas, e adquirem uma conformação anfipática em folha β . Um representante desse grupo é a defensina A de insetos.

Peptídeos ricos em aminoácidos específicos. Não possuem cisteína e são carregados positivamente em pH fisiológico. As conformações tendem a se diferenciar da α -hélice e folha- β , porém o caráter anfipático é mantido. Um representante desse grupo é a Histatina-5 de humanos e primatas superiores.

1.1.1 Trrpticina

O PAM tritrpticina (TRP3) é um dos peptídeos que pertence à família das Catelicidinas e é encontrado em neutrófilos suínos (PELEGRINE et al., 2011). As Catelicidinas pertencem a família de PAMs mais estudada (ZANETTI, 2005).

Deve-se a Romeo e colaboradores a descoberta da catelicidinas, a mesma ocorreu em 1988, quando tais pesquisadores estudavam a atividade antimicrobiana do extrato de neutrófilo bovino e isolaram um peptídeo de doze resíduos de aminoácidos ciclizado por uma ligação dissulfeto. Posteriormente mais dois peptídeos antimicrobianos de neutrófilos foram purificados, o Bac 5 (um peptídeo de 43 resíduos) e Bac 7 (um peptídeo com 60 resíduos, rico em prolina) (GENNARO et al. 1989). Em 1995 o termo catelicidinas foi proposto para classificar tal grupo de peptídeos, o nome catelicidinas foi escolhido com o intuito de reconhecer a existência da relação evolutiva de uma nova família de proteínas com a catelina, uma proteína isolada dos neutrófilos suínos (ZANETTI et al.,1995).

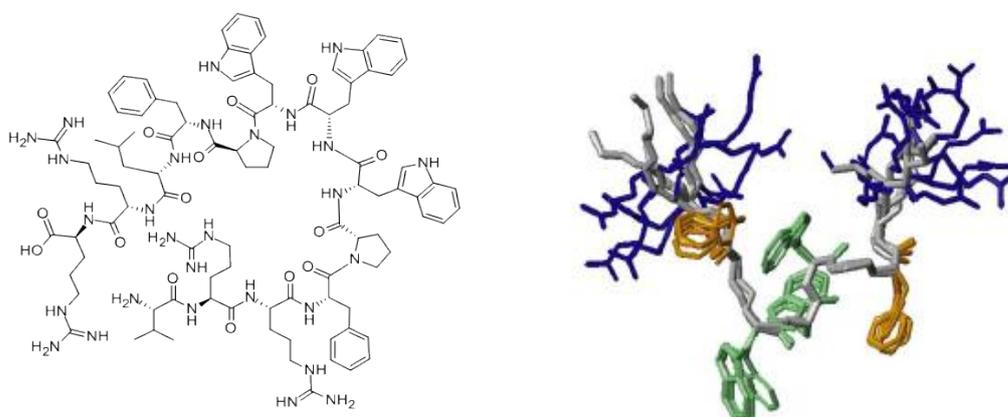
Pungercar e colaboradores (1993), objetivando identificar peptídeos com atividade antimicrobiana e uma proteína precursora da catelina, realizaram um screening na biblioteca de cDNA da medula suína e identificaram dois clones relacionados, tais clones codificavam um precursor potencial. O maior deles codificava uma proteína com duzentos e vinte e oito resíduos, sendo que noventa e oito resíduos da extremidade N- terminal eram similares a catelina; e cento e um resíduos no C-terminal possuíam grande quantidade de resíduos de R e P.

Para identificar a atividade funcional deste precursor potencial, foram sintetizados peptídeos de vários tamanhos correspondentes ao C-terminal da proteína, e identificaram, assim, uma sequência com ampla atividade antimicrobiana, do peptídeo tritrpticina (TRP3) (LAWYER et al.,1996). Este, peptídeo é catiônico em pH neutro, contém uma sequência de 13 resíduos de aminoácidos VRRFPWWPFLRR, e alta porcentagem de Arg 30% e Trp 23%. O PAM TRP3 tem um largo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, alguns fungos e células de mamíferos, sendo estas tumorais ou não (LAWYER et al.,1996; FARNAUD et al., 2004; YANG et al., 2009; INFANTE et al., 2011), bem como atividade hemolítica, porém, tal atividade só acontece a

concentração extremamente superior a requerida para atividade antimicrobiana (YANG et al., 2002).

O potencial de ação da tritripticina segue a ordem decrescente, em que a ação contra as bactérias (Gram-positiva e Gram-negativas) estão no topo, logo em seguida vem a ação contra os fungos e por último ação contra as células de mamíferos (tumoriais ou não). Estudos também mostraram um efeito sinérgico entre o PAM tritripticina e outros antibióticos contra bactérias gram-negativas (CIRIONI et al., 2006; GHISELLI et al. 2006).

Estudos mostraram que a atividade de TRP3 varia com a substituição dos resíduos de aminoácidos. Schibli e colaboradores perceberam um aumento de atividade contra bactéria Gram-positivas e diminuição da atividade hemolítica com o aumento da carga líquida do peptídeo de + 4 para + 5 e com C- terminal aminado (SCHIBLI et al., 2006). A Figura 2 mostra a estrutura do peptídeo tritripticina.



Figuras 2: Estrutura da tritripticina (CHAN et al.,2006).

A denominação tritripticina deste peptídeo é devido aos três resíduos de Trp consecutivos. (LAWYER et al.,1996). Os resíduos de Trp estão envolvidos na condensação das proteínas formando a parte hidrofóbica (KLEIN_SEETHARAMAN et al., 2002). Enquanto que os dois resíduos de Pro na tritripticina desempenham uma função estrutural permitindo uma conformação bem definida de “turn–turn” quando ligado a uma membrana (ROZEK et al.,2000; SCHIBLI et al.,1999).

A sequência de resíduos dos aminoácidos que compõem o peptídeo tritripticina é quase palindrômica, pois possui dois resíduos catiônicos de Arg nas proximidades de ambos os terminais seguidos por Phe e dois resíduos de Pro que blindam os três resíduos de Trp centrais, isso faz com que o peptídeo adote uma conformação anfipática assemelhando-se a uma forma de cunha em micelas de SDS (SCHIBLI et al.,1999).

A característica anfipática desempenha um papel chave no mecanismo de ação antimicrobiana, pois a porção hidrofílica inicia a interação do peptídeo com as cabeças polares negativamente carregadas dos fosfolipídios da superfície da bactéria. A porção hidrofóbica permite que os peptídeos entrem no interior da membrana (WU et al., 1999).

De acordo com experimentos de supressão de fluorescência do triptofano os resíduos hidrofóbicos de Trp interagem com a região interfacial da bicamada lipídica (SCHIBLI et al.,1999), pois o anel indólico tem uma forte preferência para a região interfacial, (CHAN et al., 2006; PLANQUE et al., 2003) enquanto os resíduos catiônicos de Arg interage com as cargas superficiais aniônicas da bicamada. A conformação anfipática da tritripticina ocorre, pois a mesma rompe várias interações de hidrogênio intra-moleculares que seriam criados se formasse uma estrutura secundária normal, tal como uma hélice ou de uma folha de β (SCHIBLI et al.,1999; SCHIBLI et al., 2002). A estrutura primária da tritripticina é notável em virtude de seu alto teor de Arg, Trp e resíduos Pro, os quais são cruciais para a sua interação com fosfolipídios (NAGPAL et al.,2002).

Vários estudos para entender o mecanismo de ação do PAM TRP3 em membranas lipídicas foram realizados (YANG, 2002; NAGPAL et al.,2002). No entanto, seu mecanismo de ação não está totalmente estabelecido. Em estudos da interação do peptídeo tritripticina com bicamadas lipídicas planas verificou-se que o peptídeo possui atividade tipo canal iônico e foi proposto atuar através de um mecanismo de poro toroidal (SALAY et al., 2004). Resultados usando filmes de Langmuir (SALAY et al.,2012) e de experimentos espectroscópicos (BOZZELI et al., 2012) corroboram com esse mecanismo.

O processo inicial da interação entre o peptídeo e a membrana lipídica se dá através da atração eletrostática entre os PAMs catiônicos e a membrana dos microrganismos procariontes carregada negativamente. Os resíduos de Arg

possibilitam esta interação, pois são catiônicos e estabelecem interações de hidrogênio estáveis com os grupos fosfodiéster (MANDELL et al., 2007; WOODS e FERRE, 2005). Os resíduos de Arg ao interagir com a membrana lipídica puxam o fosfodiéster, grupos de cabeça fosfolipídicas através da parte hidrofóbica da membrana enquanto arrasta simultaneamente interações de hidrogênio com moléculas de água para formar um poro toroidal permeável (LIU e WILSON, 2010).

Estudos realizados por Salay e colaboradores com bicamadas lipídicas planas mostraram que o TRP3 tem preferência em interagir com bicamadas carregadas negativamente (SALAY et al., 2004). Além dessa preferência de interação com lipídios carregados negativamente, a TRP3 exibe seletividade para lipídios com a cabeça polar PG, tal seletividade foi notada em estudos com monocamadas lipídicas (SALAY et al., 2012)

Estudos recentes mostraram que o PAM tritripticina é capaz de inibir a síntese de RNA, DNA e proteínas em *E. coli*. Essa inibição foi atribuída ao colapso das funções bacterianas em decorrência da permeabilização da membrana (ARIAS et al., 2015). Foi observado, em sistema modelo que houve vazamento do compartimento aquoso interno de vesículas lipídicas encapsuladas com sondas fluorescentes, o qual foi induzido pela ação do TRP3 (SCHIBLI et al., 2006; ANDRUSHCHENKO et al., 2008; NGUYEN et al., 2011; BAGHERI et al., 2012). Estudos demonstraram também que o peptídeo TRP3 tem a capacidade de despolarizar a membrana plasmática de *E. coli* e *S. aureus* (YANG et al., 2006; ZHU et al., 2006).

1.2 Mecanismo de ação dos PAMS

Nos antibióticos clássicos o mecanismo de ação baseia-se na inibição enzimática e tal processo é lento, sendo que os mesmos agem sobre um número limitado de macromoléculas (LOHNER e PRENNER, 1999; FISCHBACH e WALSH, 2009). Dessa forma os PAMs levam vantagem em relação aos antibióticos convencionais, pois, atuam na escala de tempo de minutos, interagindo na superfície de células bacterianas causando modificação na estrutura da bicamada lipídica

levando a lise celular. Outra vantagem que os PAMs têm, é a capacidade de agirem sobre múltiplos alvos macromoleculares como: membrana, ácidos nucleicos, mitocôndria, proteínas citoplasmáticas (BROGDEN, 2005; JENSSEN et al, 2006; FJELL et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2012). Tal peculiaridade dos PAMs em relação ao seu mecanismo de ação e reduzido tempo de resposta impossibilita aos microrganismos a criação de resistência. (BULET et al.,2004).

Os PAMs com potencial citotóxico são seletivos e induzem a apoptose celular por meio da acumulação de ROS (estresse oxidativo), especialmente o radical hidroxila, causando o vazamento do material do citocromo por despolarização completa da membrana mitocondrial (MCILWAIN et al, 2013; OYINLOYE et al., 2014).

Os PAMs possuem duas características físicas significativas, os resíduos hidrofóbicos e carga catiônica (LOHNER, 2001). A hidrofobicidade tem grande importância na interação entre peptídeos e a membrana plasmática (YEAMAN e YOUNT, 2003), pois ela permite que um composto desloque da fase aquosa para a fase hidrofóbica da membrana (ZHAO, 2003).

A carga positiva dos peptídeos faz com que eles sejam atraídos por componentes com carga negativa, Em bactérias Gram-positivas os peptídeos são atraídos pelo ácido lipoteicoico, já em bactérias Gram-negativas os peptídeos são atraídos pelo sulfato de heparina, presentes na membrana externa da mesma (JENSSEN, 2006). De fato, os peptídeos antimicrobianos possuem seletividade específica ao tipo de grupo cabeça, como por exemplo, a própria tritripticina (SALAY et al., 2012; BOZELLI et al., 2012).

A membrana plasmática dos microrganismos procarióticos possui uma constituição diferente da composição dos seres eucariotos o que favorece a seletividade dos PAMs por seres procarióticos. Tais diferenças constitucionais entre as membranas resultam também na diferenciação das características físico-químicas entre as membranas dos seres procariontes e dos seres eucariontes (YEAMAN e YOUNT, 2003).

Os principais grupos cabeça de fosfolipídios que constituem a membrana dos eucariotos são: esfingomiélna (EM); fosfatidilcolina (PC); fosfatidiletanolamina (PE). Já os seres procariontes possuem na constituição da sua membrana moléculas lipídica, grupos com cabeças de carga negativa, tais como: cardiolipina (CL);

fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), ácido lipoteicoico e heparina as quais atraem os peptídeos catiônicos (YEAMAN e YOUNT, 2003).

Alguns modelos têm sido proposto para explicar a permeabilização da membrana por PAMs (TEIXEIRA et al., 2012) Entre os modelos propostos três são mais aceitos. Os quais são: formação de Barril; formação de Tapete e Poro Toroidal. Tais modelos apresentam uma etapa inicial em comum que corresponde a atração eletrostática dos peptídeos catiônicos pela membrana aniônica dos seres procariontes (Figura 3).

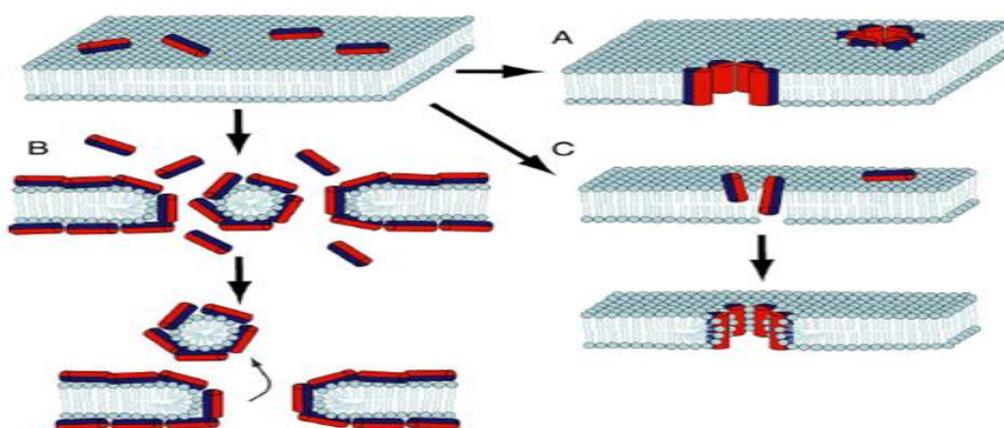


Figura 3: Mecanismo de ação PAMs: A) Formação de barril B) Formação de tapete e C) Poro toroidal (POKORNY e ALMEIDA, 2005).

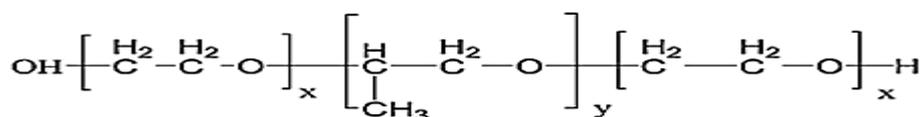
1.3 Plurônico F127.

Diversos sistemas poliméricos tais como, as micro e nanopartículas poliméricas e os hidrogéis poliméricos estão sendo estudados para o transportes de drogas farmacêuticas, peptídeos e proteínas. A utilização destes sistemas sana a problemática encontrada na administração de peptídeos e proteínas em relação a degradação enzimática e neutralização no organismo e favorece a liberação prolongada dos fármacos resultando em maior atividade (STEVENS,1999).

Polímeros são substâncias de alta massa molar constituídos de unidades repetitivas denominadas de monômeros, que estão presentes na natureza na forma de carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e peptídeos e desempenham importantes funções biológicas. A reatividade química bem como as propriedades dos polímeros depende da unidade monomérica e da maneira como eles estão

reunidos (STEVENS, 1999). Os polímeros são classificados de acordo com o tipo e a quantidade de monômeros que possuem. Os homopolímeros são os que possuem apenas uma unidade monomérica, já aqueles que possuem duas ou mais unidades monoméricas são denominadas de heteropolímeros. Os polímeros também podem ser classificados de acordo com a disposição de seus monômeros como: em bloco, alternado, estatístico e enxertado (YOKOYAMA, 1992).

O plurônico é um polímero anfifílico formado por monômeros de polioxietileno e polioxipropileno, sua estrutura é mostrada na Figura 4, estes polímeros se organizam em micelas poliméricas, e tal comportamento permite que fármacos sejam solubilizados no interior da micela polimérica (KABANOV et al., 1992) ou, que o fármaco fique alternativamente conjugado com o polímero formador das micelas (YOKAYAMA et al., 1998).



Plurônico F127: EO100-PO65-EO100

Figura 4. Estrutura química do Plurônico, EO: Oxietileno, PO: oxipropileno (SEZGIN et al., 2006)

Existe uma grande variedade de copolímeros em bloco que apresentam caráter anfifílico, ou seja, possuem um bloco de caráter apolar (hidrofóbico) e outro bloco de caráter polar, ou hidrofílico (MYERS, 1992). Moléculas anfifílicas se auto-organizam para formar uma variedade de estruturas em nano- e microescala em solução aquosa (SCHREIER et al., 2000). As mais comuns estruturas tridimensionais incluem micelas (Figura 5), vesículas e géis moleculares (BRANCO e SCHNEIDER, 2009).

Micelas consistem tipicamente de um núcleo interno hidrofóbico que é cercado por uma camada hidrofílica exposta ao solvente (BROMBERG, 2008); Estruturas micelares tendem a se formar espontaneamente a partir de moléculas anfifílicas acima da concentração micelar crítica (CMC) e da temperatura micelar crítica (TMC). Essa espontaneidade na formação de micelas é possível, pois há uma redução na energia livre do sistema, que ocorre em virtude de um ganho entrópico de solvatação, pois o segmento do polímero hidrófobo é removido do ambiente aquoso e agrupado (MONDON et al., 2008). O seguimento hidrofóbico é agrupado

através de interações de Van der Waals enquanto o segmento hidrofílico restabelece uma rede através de interações de hidrogênio com água (TORCHILIN, 2007).

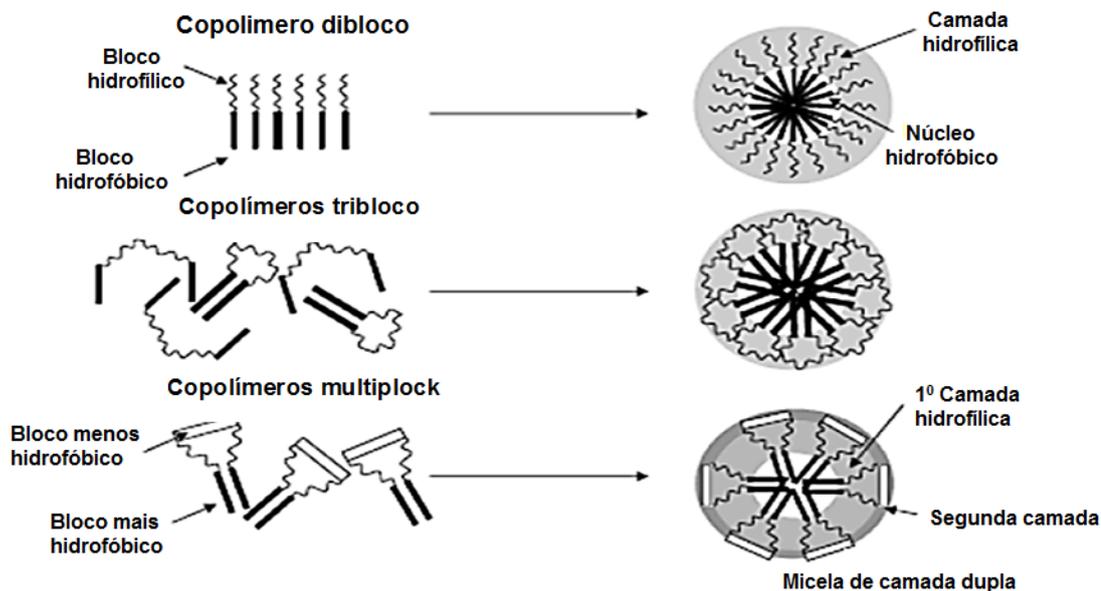


Figura 5. Formas micelares formadas espontaneamente em meio aquoso (TORCHILIN, 2007).

As vesículas são estruturas esféricas formadas por uma bicamada de moléculas anfifílicas (DISHER e EISENBERG, 2002). Alguns parâmetros do copolímero como a fração de volume de cada bloco e a energia de interação entre os monômeros irão determinar se a membrana de dupla camada irá fechar-se espontaneamente em uma vesícula, ou formar uma estrutura lamelar plana (HAMLEY, 2005).

Os géis moleculares ou hidrogéis (Figura 6) são sistemas que apresentam estrutura tridimensional de cadeias de polímeros solúveis em água altamente porosa que pode ser facilmente modelada pelo controle do número de ligações cruzadas e pela hidrofiliicidade. A porosidade permite a liberação de fármacos a uma taxa dependente do coeficiente de difusão das moléculas no hidrogel. A biodegradação ou dissolução desses sistemas pode ocorrer por via enzimática, hidrolítica ou dependente de modificações do meio (pH, temperatura ou campo elétrico) (LEE e YUK, 2007).

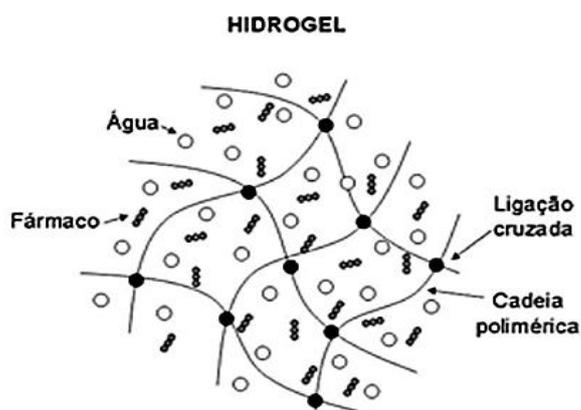


Figura 6: Representação da estrutura do hidrogel. (MELO et al., 2012).

Os géis sensíveis à temperatura são sistemas promissores para o desenvolvimento de formulações injetáveis. Soluções aquosas de certos polímeros exibem baixa viscosidade a temperatura ambiente, permitindo que a solução flua pela seringa durante a injeção, e exibe um intenso aumento de viscosidade em temperaturas mais elevadas, produzindo um gel como um depósito do fármaco a temperatura corporal. Muitos polímeros com essa sensibilidade térmica têm surgido tais como o copolímero dos óxidos de etileno e propileno (LIU et al., 2007).

O plurônico F127 é um gel termo reversível (YEON et al., 2000). Esta propriedade permite que o plurônico seja utilizado como um veículo de entrega para a maioria das vias administrativas incluindo a via oral, tópica (PADILLA et al., 2000), intranasal (JAIN et al., 1991), vaginal, retal (RYU et al., 1999), ocular (LI e SUNG, 2000), e vias parenterais (KOLLER e BURI, 1987). Também tem sido descrita a utilização potencial do plurônico F-127 como uma pele artificial (DIBIASE & RHODES, 1996).

Recentemente Li e colaboradores desenvolveram um sistema para encapsulamento e entrega direcionada do anti-cancerígeno Doxorubicina, utilizando nanocarregadores a partir do plurônico F127 funcionalizados com sequencias do aminoácido peptídico PV7 em sua extremidade. Tal sistema obteve uma eficácia de encapsulamento de 72,66% e as nanomicelas funcionalizadas apresentaram uma maior absorção celular como também se mostraram mais eficientes na liberação da Doxorubicina (LI et al., 2013).

ALAKHOV e colaboradores estudaram a possibilidade de encapsulamento e administração oral do acetato de magestrol, o qual é um fármaco hidrofóbico

utilizado no combate ao câncer de mama, e obtiveram resultados que apontaram um aumento de 1,5 a 2 vezes na biodisponibilidade do fármaco nos ratos modelos em comparação ao sistema de controle, isso denota a eficiência dos sistemas nanoencapsulados formados pelo plurônico F127 (ALAKHOV et al., 2010).

A solubilidade do plurônico F127 diminui à medida que a temperatura aumenta devido a diminuição do efeito de solvatação e das interações de hidrogênio (GILBERT et al., 1986).

As micelas de copolímero tribloco são compostas de um núcleo hidrofóbico que serve como uma cavidade para a encapsulação de agentes hidrofóbicos, e um escudo hidrofílico que proporciona estabilidade aquosa (HALL et al., 2007; LOW et al., 2007). Portanto, as micelas podem ser usadas para carregar alta concentração de fármacos para terapia do câncer. Além disso, estas micelas têm estabilidade metabólica e maior tempo de circulação no sangue. O plurônico (F127) é um copolímero tribloco (Figuras 5 e 7) que forma nanopartículas micelares, os plurônicos são considerados como os polímeros biocompatíveis mais usados para estudos *in vivo* (PAN et al., 2003).

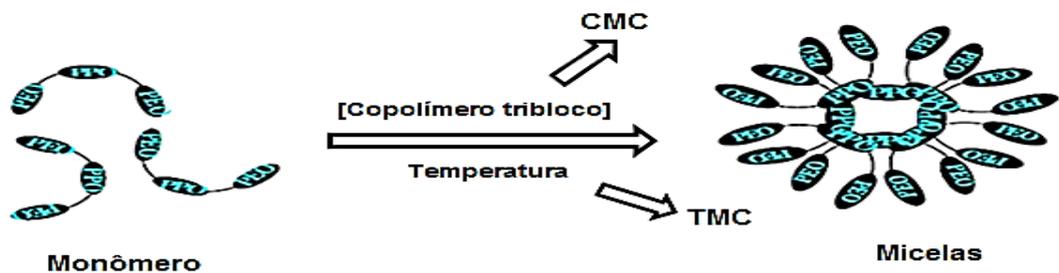


Figura 7: Micela de tribloco de Plurônico (SINGH et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a auto-associação e a interação molecular do peptídeo antimicrobiano tritripticina TRP3, com micelas poliméricas não iônicas de Plurônico F127.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o Peptídeo Antimicrobiano Tritripticina (TRP3);
- Obter informações sobre a solubilidade e auto-associação do peptídeo TRP3 em presença de aglomerados molecular de Plurônico F127;
- Investigar aspectos estruturais e dinâmicos dos peptídeos nesse sistema, através de espectroscopias de Fluorescência e de Dicroísmo Circular;
- Avaliar as possíveis interações do peptídeo TRP3 com agregados moleculares de Plurônico F127, através das técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Potencial Zeta.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Ácido cítrico (MM, 210,14 g mol⁻¹), Potássio fosfato monobásico (MM, 136,09 g mol⁻¹), Ácido bórico (MM, 61,83 g mol⁻¹), Aminoácidos: Fmoc-Arg-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH, Resina Wang, N,N-dimetilformamida (DMF), Diclorometano (DCM), Eter, Plurônico F127 (MM 12.600g mol⁻¹, Sigma- Aldrich), Acrilamida, água ultrapura, qualidade Milli- Q resistividade 18,2 MΩ.cm.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese do peptídeo tritripticina

Inicialmente os peptídeos foram sintetizados utilizando a técnica denominada de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Tal técnica foi desenvolvida por Bruce Merrifield o que lhe garantiu ao Prêmio Nobel de química em 1984, com a síntese da bradicinina (CAREY; 1996) podemos encontrar publicação de diversas revisões com esse método de síntese (Merrifield, 1964; Fields e Noble, 1990). Este método apresenta como principal vantagem a obtenção de uma variedade de sequências peptídicas diferentes em um curto espaço de tempo. Tal técnica baseia-se no crescimento da cadeia peptídica adicionando-se aminoácido a aminoácido à sua região N-terminal. Desta forma, a síntese ocorre da direção C-terminal para a N-terminal, permanecendo o peptídeo ligado a um suporte polimérico ou resina (fase sólida) durante todo o processo.

Nesta pesquisa foi utilizada a resina Fmoc- Arg- Wang na síntese do peptídeo tritriptina. A resina de Wang é um material inerte, não-solúvel que tem grupos funcionais de álcool primário. Os grupos hidroxilo podem ser facilmente esterificados com os grupos carboxilo de aminoácidos N-protetidos no processo de derivatização de resina.

São empregadas duas estratégias para a SPFS: a química Boc, usando o composto *t*-butiloxicarbonila para a proteção dos grupos N-terminais dos aminoácidos, e a química Fmoc, que utiliza o composto 9-fluorenilmetiloxicarboxila (Fmoc).

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação: O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato (HBTU). Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram usados com 2 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. A retirada do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pela lavagem em 20% metil-piperidina/DMF durante 20 min. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

Buscando conhecer a eficiência dos acoplamentos foi feito o teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970). A ninidrina reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul, sendo, portanto um indicativo da eficiência dos passos de acoplamento. (Figura 8).

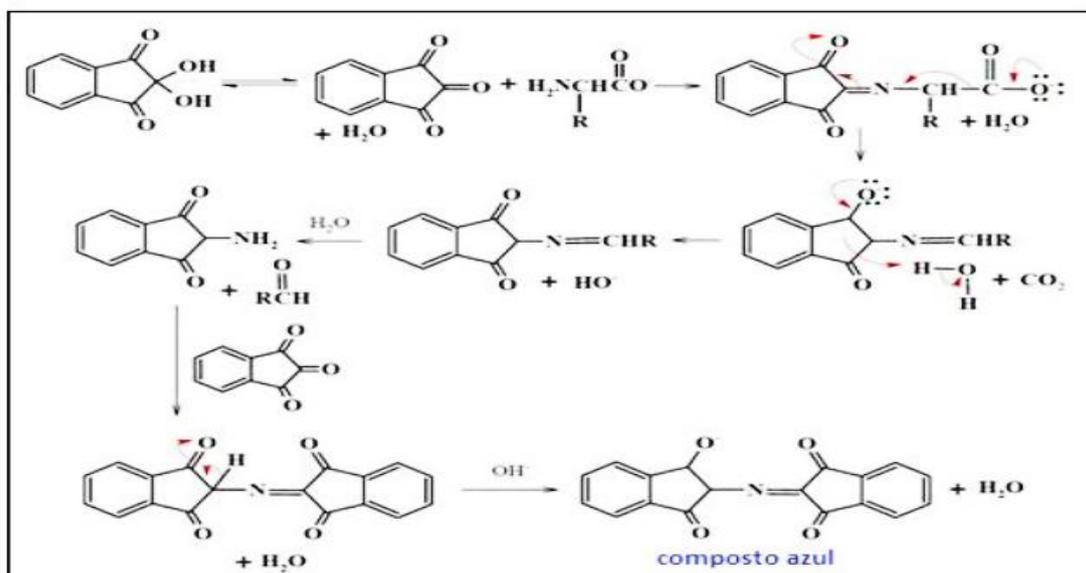


Figura 8: Reação que ocorre durante o teste de ninidrina. Extraído de: Chemicals and reagents, 2008–2010, Merck.

Para a síntese do peptídeo tritripticina foi utilizado o protocolo apresentado na Figura 9.

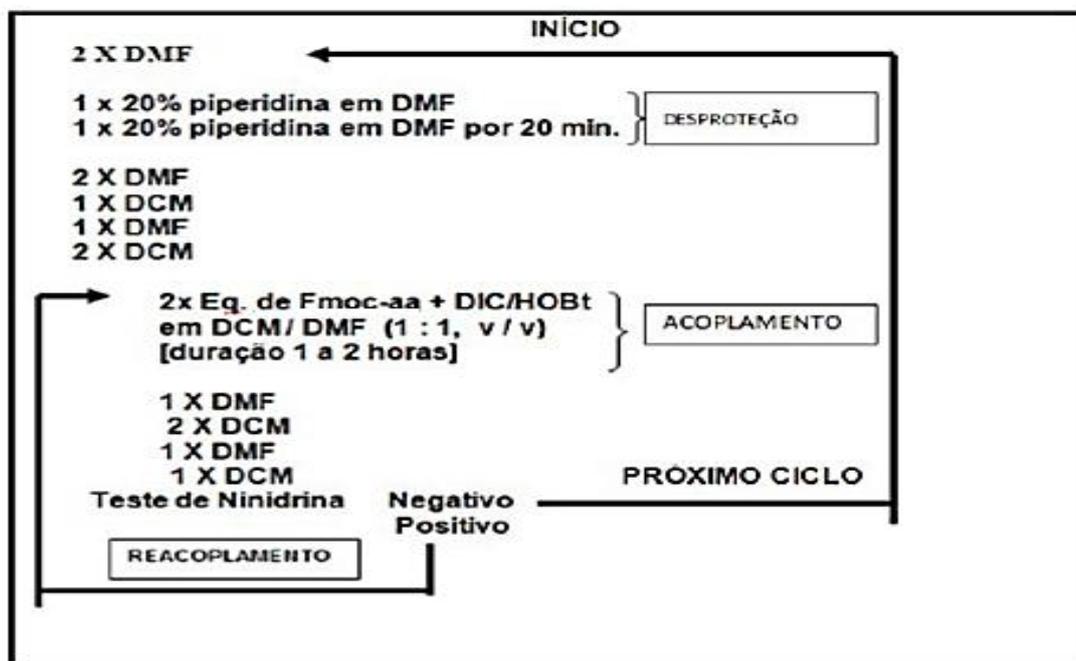


Figura 9: Esquema da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.

3.2.1.1 Reações de Clivagem

Para a realização da clivagem do peptídeo ao final da síntese foram utilizadas diferentes soluções as quais continham o ácido trifluoracético - TFA (Merck®), responsável pela clivagem e os supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®) e água Milli-Q®;

A clivagem foi feita em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois da clivagem foi feita a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado, descartando-se o sobrenadante. No final para separar a resina o peptídeo foi dissolvido com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e centrifugado, depois liofilizou o sobrenadante resultante contendo o peptídeo.

3.2.1.2 Purificação e caracterização dos peptídeos

A purificação do peptídeo sintetizado foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H₂O) e solvente B (0,036% de TFA em ACN), com fluxo de 5 mL/min e comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm). Ao terminar a purificação e liofilização dos materiais obtidos, foi realizada a análise de pureza de cada fração, por meio de CLAE em um aparelho analítico Shimadzu, com coluna 4,6 mm x 150 mm, de fase reversa C18 Ultrasphere Phenomenex, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm, detecção em 220 nm, utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL/min.

Para confirmar a obtenção do material desejado foi feita a análises da massa molecular do peptídeo, por meio de espectrometria de massas com aparelho Bruker injeção ion trap, modo eletrospray positivo (MS+) faixa de 200-2000 g/mol.

3.2.2 Preparação das amostras

3.2.2.1 Preparação da solução tampão PBC

Para a preparação da solução tampão PBC (Fosfato-Borato-Citrato) 5 mmol L⁻¹ com pH = 7,4 foi 0,10507 g pesado ácido cítrico, 0,0309 g ácido bórico e 0,0680 g potássio fosfato monobásico e diluído em água ultra pura, depois ajustou-se o pH para 7,4 com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol L⁻¹.

3.2.2.2 Preparação da solução de plurônico F127

Inicialmente foi preparado uma solução estoque com concentração de 2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de plurônico F127 para a preparação dessa solução foi pesado 0,02585 g de plurônico F127 e diluído em 1025,8 mL de solução tampão PBC 5 mmol L^{-1} com pH 7,4. Depois esta solução estoque foi diluída para concentrações menores de acordo com a necessidade dos diferentes experimentos utilizados.

3.2.2.3 Preparação da solução de tritripticina

Foi feito uma solução estoque do peptídeo tritripticina com concentração de 76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a preparação dessa solução foi pesado 0,00029 g do peptídeo tritripticina e diluído em 2,0 mL de solução tampão PBC 5 mmol L^{-1} com pH 7,4. Depois esta solução estoque foi diluída para concentrações menores de acordo com a necessidade dos diferentes experimentos utilizados.

3.3 Experimentos

3.3.1 Análise da fluorescência da tritripticina

A tritripticina é um PAM constituído de 13 resíduos de aminoácidos sendo que 3 desses resíduos são de Triptofano. Este aminoácido é fluorescente quando excitado em λ_{ex} 280 nm (comprimento de onda de máxima absorção) ele emite um espectro muito bem definido com um máximo de emissão em 353 nm em água com pH neutro (LAKOWICZ, 2006).

Os estudos de espectroscopia de fluorescência foram realizados em um equipamento da Shimadzu modelo RF-5301PC. Os experimentos foram feitos em temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$); o comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e o espectro de emissão foi adquirido entre 300 e 450 nm. O experimento foi realizado com uma cubeta de quartzo, específica para fluorescência, de caminho óptico de 2 mm.

O primeiro passo da experiência foi medir a fluorescência do peptídeo tritripticina livre na solução tampão PBC 5 mmol L^{-1} , pH 7,4. Foi colocado na cubeta $350 \mu\text{L}$ de uma solução do peptídeo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, após essa medida inicial do branco foi inserida alíquota de solução de plurônico em tampão PBC 5 mmol L^{-1} , pH 7,4 com concentração de $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de modo a se obter curva de intensidade de fluorescência versus concentração de micelas poliméricas.

3.3.2 Experimento de supressão por acrilamida

Para os experimentos de supressão de fluorescência do Trp, foi adicionado em solução tampão PBC 5 mmol L^{-1} , $350 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de plurônico e $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de tritripticina depois foi acrescentado diferentes concentrações de acrilamida. Comprimento de onda de excitação de 280 nm foi utilizado e as intensidades de fluorescência foram monitoradas a cada adição de acrilamida.

3.3.3 Experimento de Anisotropia

Foram realizados duas medidas de anisotropia uma em tritripticina $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução PBC 5 mmol L^{-1} e outra medida da tritripticina com plurônico $350 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para realização das medidas foi utilizado dois polarizadores, um polarizador para polarizar a luz de emissão e outro para polarizar a luz de excitação. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm.

3.3.4 Experimento de espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-815, acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco modelo PFD-425S, os espectros foram obtidos a 21 °C, na faixa λ de 190 a 250 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 0,1 mm de caminho óptico, em seis varreduras consecutivas por amostra.

Para investigar os aspectos conformacionais, peptídeos liofilizados foram dissolvidos em solução tampão PBC 5 mmol L⁻¹ em pH 7,4 obtendo assim uma solução de peptídeo de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.3.5 Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas de DLS foram realizadas para solução de tritripticina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de plurônico F127 com diferentes concentrações. E também para solução de F127 em tampão PBC 5 mmol L⁻¹ nas com diferentes concentrações.

As medidas foram realizadas na Universidade Estadual Paulista- UNESP - departamento de física - Laboratório de Física de Colóides sob a orientação do professor Dr. Eloi da Silva Feitosa, utilizando um instrumento Brookhaven Instruments Corp, Holtsville, EUA, equipado com laser de comprimento de onda 633 nm, com ângulo de espalhamento ajustável operando a uma potência ajustável de até 15 mW, e temperatura da amostra ajustável através de um banho termostático (Poly Science temperature control, modelo 91A0A11B).

3.3.6 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas para solução de tritripticina $50 \mu\text{molL}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de plurônico F127. E também para solução de F127 em tampão PBC 5 mmol L^{-1} com diferentes concentrações.

As medidas foram realizadas na Universidade Estadual Paulista- UNESP - departamento de física - Laboratório de Física de Colóides sob a orientação do professor Dr. Eloi da Silva Feitosa em um microcalorímetro diferencial de varredura (DSC), modelo VP-DSC (Microcal. Inc. Northampton. MA – EUA), e a análise dos resultados foi realizada usando o software Origin 7.0.

3.3.7 Medidas de Potencial zeta

As medidas de Potencial Zeta foram realizadas para solução de tritripticina $50 \mu\text{molL}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de plurônico F127. E também para diferentes concentrações de solução de F127 em tampão PBC 5 mmol L^{-1} .

As medidas foram realizadas na Universidade Estadual Paulista- UNESP - departamento de física - Laboratório de Física de Colóides sob a orientação do professor Dr. Eloi da Silva Feitosa em um o equipamento de DELS (Zeta Pals, Brookhaven instruments Corporation, Holtsvile, EUA) tal equipamento possui alta potência 35 mW e é equipado com um laser de diodo.

3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.4.1 Espectroscopia de Fluorescência

O fenômeno de luminescência ocorre na maioria das vezes na região do UV/Visível (VALEUR, 2001). Stokes em 1852 desenvolveu o primeiro estudo sobre luminescência. Neste estudo ele utilizou sulfato de quinina e observou que a luz emitida tinha um comprimento de onda maior que o da luz absorvida. A diferença na energia de absorção e emissão é denominada de deslocamento de Stokes (STOKES, 1852). A luminescência é classificada em fluorescência e fosforescência dependendo do processo de relaxação (LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência é a emissão de fóton a partir de um estado excitado singlete, em que a orientação de spin não muda pelo elétron excitado, continuando emparelhado. Dessa forma o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. A taxa de emissão de fluorescência é da ordem de 10^8 s^{-1} , então o tempo de vida de fluorescência típico é da ordem de 10^{-9} s . Porém, a fosforescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, no qual a orientação de spin é mudada pelo elétron excitado e fica desemparelhado com o elétron que permaneceu no orbital fundamental. Isto faz com que as transições para o estado fundamental sejam proibidas e as taxas de emissão sejam mais lentas, estando compreendidas na faixa de $10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$. Deste forma, o tempo de vida da fosforescência é da ordem de milissegundos à segundos possibilitando grande tempos de vida. Os processos de desativação tais como o decaimento não radioativo e processos de supressão competem com a emissão o que faz com que a emissão de fosforescência não seja comumente observada em soluções fluidas à temperatura ambiente (LAKOWICZ, 2006).

A técnica de fluorescência se baseia na propriedade que alguns grupos, chamados fluoróforos, possuem de emitir luz na faixa de comprimento de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta. Os fluoróforos podem ser do tipo intrínseco, os quais estão contidos nas moléculas e emitem luz

naturalmente, ou extrínsecos que são adicionados ao sistema para desempenharem a função de sonda (LAKOWICZ, 2006).

Vários tipos de estudos utilizam as técnicas de fluorescência, pois as sondas utilizadas nesta técnica dão informações relativas a parâmetros da estrutura e dinâmica do microambiente que as contém, fluidez/viscosidade, polaridade e permite também determinar a forma em que ocorre a variação de temperatura (VALEUR, 2001). Outra grande vantagem em utilizar técnicas de fluorescência é a sua elevada sensibilidade e possibilidade de estudar processos que ocorrem durante período de tempo muito curto entre 10^{-10} s até 10^4 s (GONÇALVES, 2001).

O diagrama de Jablonski (Figura 10) ilustra os processos de excitação e de relaxação de uma molécula.

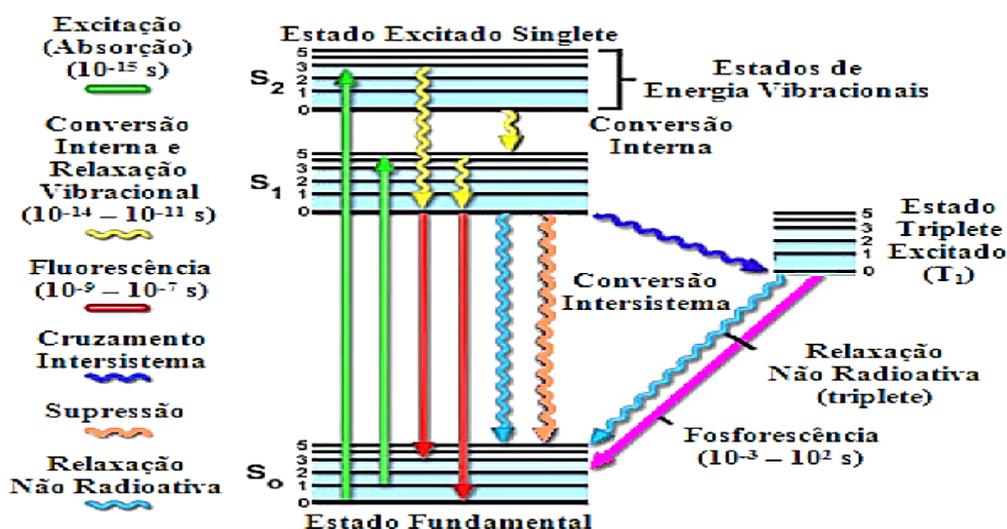


Figura 10- Diagrama de Jablonski. Representação dos processos de absorção e relaxação de uma molécula e seus tempos característicos (LAKOWICZ, 2006).

Ao observar o diagrama de Jablonski podemos notar o deslocamento de Stokes, ou seja, que a fluorescência (emissão) ocorre em menores energias ou comprimentos de onda mais longos que o processo de absorção (STOKES, 1852).

Uma amostra se torna fluorescente quando há a emissão de fóton. Assim sendo a fluorescência é um tipo de decaimento radiativo, o qual ocorre após uma molécula ter sido excitada eletronicamente, sendo que este decaimento radiativo é resultante da liberação do excesso de energia da molécula excitada ao retornar ao seu estado fundamental (LAKOWICZ, 2006).

A absorção do triptofano é devido a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel indólico. A banda de comprimento de onda curto (220 nm) é devido à transição 1B_b enquanto a banda de comprimento de onda longo (260-290 nm) é constituído pelas duas transições sobrepostas enquanto a banda de comprimento de onda longo (260-290 nm) é constituído pelas duas transições sobrepostas 1L_A e 1L_B com vetores quase perpendiculares uma à outra. A transição $^1L^A$ é sensível à polaridade dando origem a um ligeiro deslocamento no espectro de absorbância. Acredita-se que transição 1L_A é o principal contribuinte para a emissão (LAKOWICZ, 2006).

3.4.2 Processos de supressão de fluorescência

Supressão de fluorescência é a capacidade que algumas substâncias possuem de desativar a emissão de fluorescência de uma molécula excitada em virtude de interações com outra molécula, não excitada (BALTROP e COYLE, 1978). Este fenómeno de supressão é observado através da diminuição do rendimento quântico de fluorescência (BUSHUEVA et al., 1978).

Várias interações moleculares assim como moléculas podem suprimir a fluorescências de determinados fluoróforo. Dentre as interações moleculares que podem resultar em supressão de fluorescência estão: formação de complexo no estado fundamental, rearranjo molecular, transferência de energia (TE), transferência de elétron (Te-) e acoplamento spin-orbital e reações no estado excitado (LAKOWICZ, 1999).

Já em relação às moléculas que funcionam como supressor está o oxigênio, o iodeto, brometo, acrilamida, peróxido de hidrogênio, dicloroacetamida, cloridrato de piridínio (KAUTSKY, 1939). Dentre essas moléculas que agem como supressoras o oxigênio é a mais conhecida (LAKOWICZ, 2006; ZHANG et al., 1997). As medidas de supressão fornecem informações sobre interações moleculares (TATISCHEFF e KLEIN, 1975).

3.4.3 Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência tem inúmeras aplicações na área da bioquímica, pois possibilita obter informações a respeito da rigidez dos diversos meios moleculares, do tamanho e da forma de várias proteínas, permite também determinar a fluidez de membranas, mobilidade molecular e associações entre proteínas (LAKOWICZ, 2006). A anisotropia de fluorescência determina o deslocamento angular entre os momentos dipolares de excitação e emissão de luz, que ocorre quando um fluoróforo, no seu estado excitado, sofre um processo despolarizante (LAKOWICZ, 2006). A anisotropia é uma medida adimensional.

A especificidade da estrutura dos fluoróforo faz com que os mesmos possuam momentos dipolares de transição orientados em determinadas direções específicas em eixos moleculares para cada fluoróforo (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006).

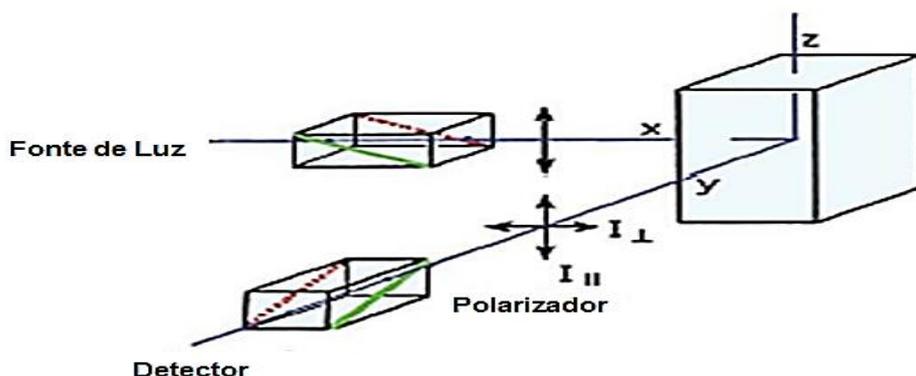


Figura 11: Representação esquemática das medidas de anisotropia de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

A anisotropia de fluorescência (r) é uma propriedade de fluorescência, que está relacionada com a orientação relativa dos momentos dipolares de excitação (μ_{exc}) e de emissão (μ_{em}), do fluoróforo (LAKOWICZ, 2006).

Os fluoróforo no estado fundamental estão orientados aleatoriamente. Ao incidir um feixe de luz polarizada com uma determinada orientação, vão ser excitados preferencialmente os fluoróforos que possuem momentos dipolares de excitação orientados paralelamente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente ($\mu_{exc} \parallel E$), ocorrendo assim uma excitação fotoseletiva, em que a população de

fluoróforos excitados é orientada parcialmente, levando a uma emissão de fluorescência parcialmente polarizada (LAKOWICZ, 2006).

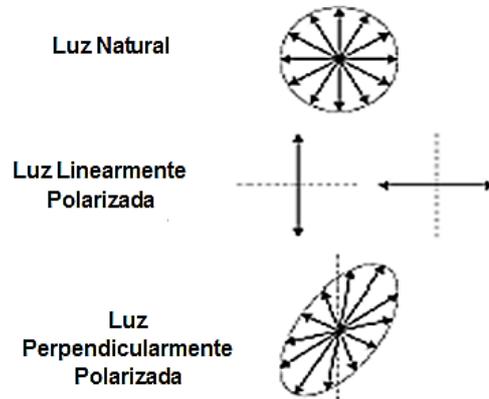


Figura 12: Esquema da luz natural, luz Polarizada linearmente na vertical / horizontal e Luz Polarizada parcialmente (VALEUR, 2001).

Para medir a anisotropia de fluorescência, a amostra deve ser irradiada por uma luz polarizada verticalmente, e o vetor de campo elétrico (E), da luz polarizada deve ser orientado paralelamente em relação ao eixo z da amostra. Os comprimentos de onda de absorção e emissão são escolhidos por monocromadores de absorção e emissão, sendo que desta forma, os monocromadores polarizam parcialmente a luz incidente e emitida pela amostra, fazendo com que os polarizadores de absorção e emissão sofram uma rotação para as posições vertical (V) e horizontal (H). Assim, tanto a luz incidente, como a luz emitida são polarizadas parcialmente, sendo que se o polarizador de emissão estiver orientado de forma paralela (I), à direção da luz polarizada incidente, a intensidade da luz polarizada emitida designa-se por I_{II} . (LAKOWICZ, 2006).

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (1)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2)$$

A anisotropia sofre a influência de vários fenômenos. A difusão rotacional (Figura 13) é um desses fenômenos que diminui a medida de anisotropia. Este

fenômeno ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. A medida de difusão rotacional fornece informações a respeito do deslocamento angular relativo do fluoróforo durante o tempo de absorção e emissão. Quando o fluoróforo está ligado a uma macromolécula o efeito de difusão rotacional é atenuado. Outro fenômeno que diminui a anisotropia é a transferência de excitação entre fluoróforo. Fluoróforos em solução não viscosa exibem valores de anisotropia próximos de zero, pois em solução de fluido a maioria dos fluoróforos giram extensivamente em 50 a 100 ps, dessa forma as moléculas podem rodar muitas vezes com tempos de vida de 1-10 ns (LAKOWICZ, 2006).

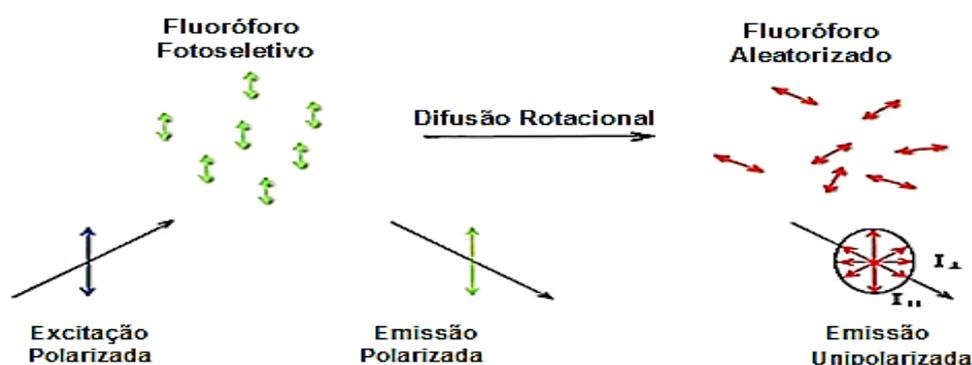


Figura 13: Efeitos de excitação polarizada e difusão de rotação na polarização ou anisotropia de emissão. (LAKOWICZ, 2006)

O ponto essencial é que os tempos de difusão rotacional para a maioria das proteínas são comparáveis a tempos de vida de fluorescência típicos. Como um resultado, as medições da anisotropia de fluorescência serão sensíveis a um elemento que afeta a velocidade de difusão de rotação. As taxas de rotação de fluoróforo em membranas celulares também ocorrem em uma faixa de tempo em nanoescala, e os valores de anisotropia são, portanto, sensíveis à composição da membrana. Por estas razões, as medições de polarização de fluorescência são amplamente utilizadas para estudar as interações de macromoléculas biológicas (LAKOWICZ, 2006).

3.4. 4 Espectroscopia de dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) fornece informações sobre as estruturas e conformações de peptídeos e proteínas, detectando a atividade óptica de moléculas quirais originada pela interação de centros assimétricos com a luz circularmente polarizada. (FASMAN, 1996; MASON, 2007). As moléculas quirais são moléculas assimétricas, ou seja, suas imagens no espelho não são idênticas (HAMMES, 2005), isto garante às moléculas quirais a vantagem de ter diferentes índices de refração para a luz polarizada circularmente pela direita e pela esquerda (Figura 14). Os feixes de luz viajam a velocidades diferentes e são absorvidos com diferentes graus, dependendo da energia. Gerando assim diferentes coeficientes de extinção molar para a luz circularmente polarizada direita e esquerda. (BEROVA, 2000; CANTOR e SCHIMMEL, 1980; SREERAMA e WOODY, 2004).

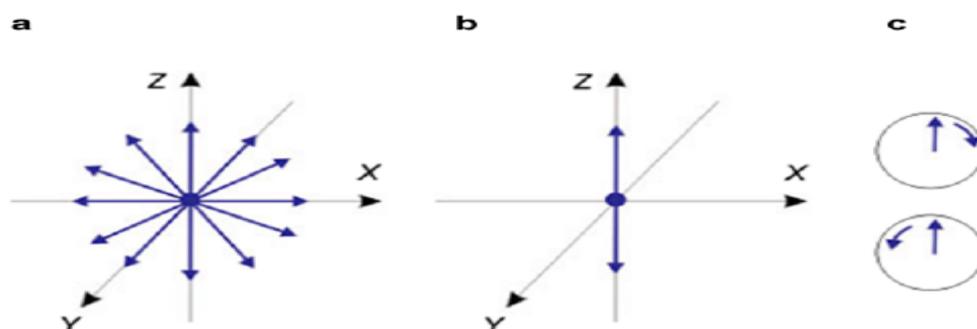


Figura 14. Diagrama de componentes de campo elétrico luz não polarizada (a), polarizada linearmente ou planas (b), a luz se move no eixo Y. Para luz não polarizada, movendo-se em todas as direções, enquanto para luz plana ou polarizada linearmente apenas na direção Z para a luz polarizada circularmente (c), o sentido de rotação pode ser horário ou anti-horário. (RANJBAR e GILL 2009).

O plano da luz linearmente polarizada (Figura 15) resulta do somatório de duas componentes circularmente polarizadas com igual magnitude, porém girando em sentidos contrários, sendo uma em sentido horário (ER) e outra em sentido anti-horário (EL). A Figura 15 (A) mostra os componentes de luz circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação polarizada (em verde). A Figura 15 (B) mostra componentes de magnitude diferente que resultam em uma luz elipticamente polarizada (elipse em verde) e a Figura 15

(C) mostra a elipcidade θ , tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse (KELLY, 2005).

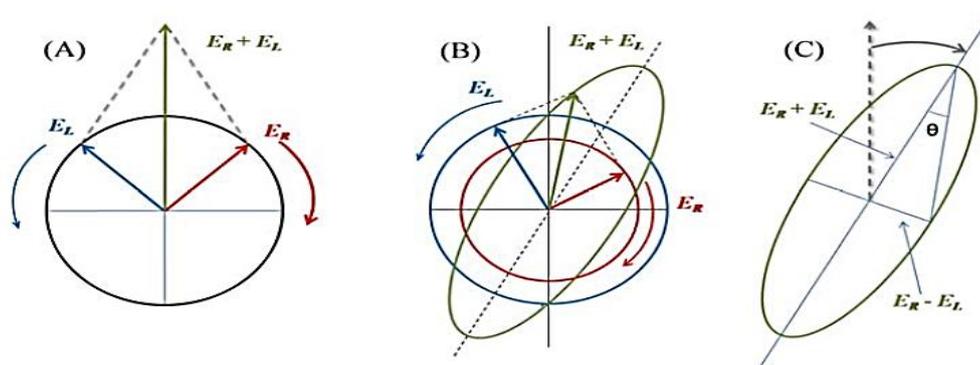


Figura 15 - Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas ER (sentido horário em vermelho) e EL (sentido anti-horário em azul). Figura adaptada de (KELLY, 2005).

A espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular baseia-se na absorção preferencial de uma das componentes circulares da luz polarizada linearmente pelos cromóforos de uma determinada amostra opticamente ativa. Se, depois que atravessarem a amostra, as magnitudes dos vetores elétricos da luz circularizada EL e ER são proporcionalmente alteradas, isso significa que as componentes EL e ER são absorvidas igualmente, dessa forma a recombinação regenera a radiação linearmente polarizada original (Figura 15A). Porém, se ao atravessarem a amostra, EL e ER são absorvidas em extensões diferentes, a luz passa a apresentar uma diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares, resultando numa polarização elíptica e sendo esta radiação resultante denominada de luz elipticamente polarizada (Figura 15B) (KELLY, 2005).

Os instrumentos de CD medem a diferença de absorbância das componentes circulares da luz polarizada linearmente ($\Delta E = E_L - E_R$) em função do comprimento de onda (λ). A elipcidade (θ) (Equação 3) descreve esta diferença, a qual é representada pela tangente obtida da razão entre o menor e o maior eixo da elipse conforme representada na Figura 15C (KELLY, 2000).

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (3)$$

As ligações amidas, os resíduos aromáticos de fenilalanina, triptofano e tirosina e as interações dissulfeto, são os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD em peptídeos e proteínas (MULKERRIN, 1996; WOODY, 2005).

O grupo amino que forma a ligação peptídica tem grande importância no estudo por dicroísmo circular (KRITTANAI e JOHNSON, 1997). Em proteínas e peptídeos as ligações covalentes peptídicas tem rotação restrita devido ao caráter de dupla ligação isto em função da coplanaridade dos átomos CONH. O que faz com que apenas duas ligações tenham rotação permitida: a C α -NH com ângulo de rotação denominado Φ e C α -CO com ângulo de rotação denominado Ψ (Figura 16). Através desses ângulos Φ e Ψ é possível determinar a estrutura dos peptídeos (NELSON e COX, 2008).

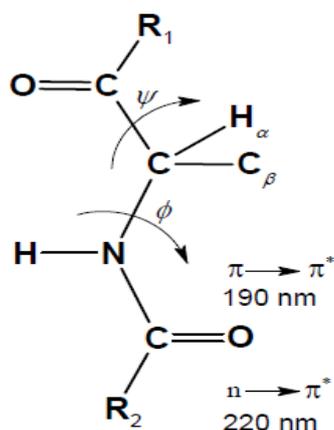


Figura 16: Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e Ψ (NELSON e COX, 2008).

Os ângulos Φ e Ψ definem as condições de coplanaridade dos orbitais presentes na ligação peptídica, Eles dependem do estado de agregação e das interações que a molécula faz com o solvente ou com outra molécula e da conformação do peptídeo os mesmos são específicos para cada tipo de estrutura secundária regular (WALTHO et al., 1993).

3.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica diz respeito a um conjunto de técnicas que possibilita avaliar as propriedades físicas de polímeros, proteínas e fármacos enquanto ele é submetido a uma variação controlada de temperatura. Dentre as técnicas de análise térmicas a calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma ferramenta amplamente utilizada (SOUZA, 2011; MENDONÇA et al., 2014). Tal ferramenta corresponde a uma técnica termoanalítica na qual as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte, sendo que tanto a amostra quanto o material de referência são simultaneamente submetidas a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO, 2004).

Quando a amostra sofre algum tipo de mudança de estado químico ou físico, ocorre a absorção ou liberação de calor. O calorímetro desenvolve uma importante função compensando o ganho ou a perda de calor, através de fornecimento ou remoção de calor para ou da amostra, possibilitando assim manter em equilíbrio as temperaturas da amostra e do material de referência, durante o evento térmico. Esse calor retirado ou fornecido é registrado no termograma em função da temperatura vs capacidade térmica (ΔC_p). (COOPER; NUTLEY; WADOOD, 2000; SOUZA, 2011).

O termograma representa as transições térmicas por picos em torno da temperatura de transição (e.g., T_m), cuja largura ($\Delta T_{m1/2}$) demonstra a velocidade da transição, tal experimento é realizado a pressão constante (BARRELEIRO et al., 2000; FEITOSA, 2010).

Através da técnica de DSC pode se acompanhar os efeitos de calor associado com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase, reação de óxido-redução, de dissociação, de desidratações, de decomposição, bem como a avaliação da estabilidade e decomposição térmica de medicamentos, entre outros capazes de causar variações de calor (IONASHIRO, 2004).

Em geral reduções, desidratações, transições de fase e algumas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que oxidações, cristalizações e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (IONASHIRO, 2004).

3.4.6 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O princípio da técnica de espalhamento de luz está relacionada com a interação da radiação visível com a matéria. Tal técnica consiste de um método não destrutivo para o estudo de fluídos complexos, como polímeros em solução (SILVEIRA; GIACOMELLI, 2008). Por meio da técnica de espalhamento de luz podemos determinar o raio hidrodinâmico (R_H).

O raio hidrodinâmico é obtido através da medida do coeficiente de difusão, dessa forma, o raio hidrodinâmico corresponde a soma do raio da partícula com a espessura da camada de solvatação, isto porque, na difusão a partícula arrasta consigo algumas camadas de moléculas de água ligadas a ela (CHU, 1991).

O coeficiente de difusão de macromoléculas em solução pode ser obtido através da técnica de DLS de forma rápida, a partir da detecção da intensidade de luz espalhada a um ângulo fixo. Ou seja, a partir da análise da distribuição dos tempos de relaxação das flutuações na intensidade de luz espalhada em uma dada direção.

Tais flutuações são originadas devido ao movimento Browniano das partículas, que provoca as variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, sendo assim, as flutuações locais dentro do volume de espalhamento estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de espalhamento por meio da equação 1 (SILVEIRA; GIACOMELLI, 2008).

$$D = \Gamma / q^2 \quad (4)$$

Sendo que: D é o coeficiente de difusão aparente, $\Gamma = 1/\zeta$ é a frequência de relaxação das partículas q é o vetor de espalhamento.

A técnica de espalhamento de luz explora os movimentos térmicos das partículas em suspensão sobre as quais incide o laser. O coeficiente de difusão (D) para uma partícula está relacionado ao raio hidrodinâmico (R_H) de acordo com a relação de Stokes-Einstein:

$$D = K_B T / 6\pi\eta R_H \quad (5)$$

Isolando R_H fica:

$$R_H = K_B T / 6\pi\eta D \quad (6)$$

Sendo que: K_B é a constante de Boltzmann; T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do meio (HEINECK et al., 2008; SANTOS et al., 2012).

A função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada, que decai exponencialmente com o tempo é detectada pelo sistema. E a partir de ajustes da junção exponencial o programa calcula a função distribuição do raio hidrodinâmico, cuja largura indica a polidispersividade do tamanho das partículas, e a posição caracteriza o valor médio de R_H (CHU, 1991).

3.4.7 Potencial Zeta

O potencial zeta (ζ) é uma grandeza de suma importância para o estudo da estabilidade de suspensões coloidais, principalmente em relação ao mecanismo eletrostático de estabilização (REED, 1995).

Teoricamente todas as partículas em contato com um líquido ou materiais macroscópicos, adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Esta carga superficial em partículas suspensas num líquido afeta a distribuição de íons que estão na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície, formando assim uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido (SCHAFFAZICK et al., 2003). De acordo com Delgado e colaboradores o potencial zeta é definido como o potencial eletrocinético que existe no plano de cisalhamento entre superfície de partículas carregadas e os contra-íons próximos da superfície e o fluido circundante (DELGADO et al., 2007).

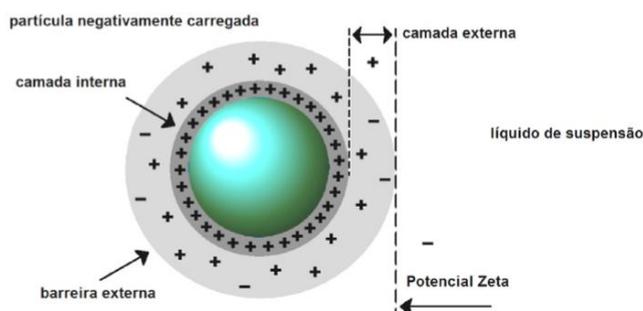


Figura 17: Partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado, com íons distribuídos em sua volta (ZETASIZER NANO SERIES, 2004).

O potencial zeta é calculado a partir das medidas de mobilidade eletroforética (μ_e), pois as medidas de potencial zeta não podem ser feitas diretamente. A mobilidade eletroforética está relacionada com o potencial zeta pela equação de Henry (PUJANA et al., 2012; BUSCHMANN et al., 2013; ROBLES et al., 2013).

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(Ka) \quad (7)$$

Onde:

$f(ka)$, é função dependente do modelo;

ε , é a constante dielétrica;

η , é a viscosidade do solvevente;

K , é um produto adimensional;

a , é o raio da unidade cinética.

Há dois modelos clássicos que resultam em dois limites, estes limites têm em comum a raiz do módulo de Ka : as equações de Smoluchowski e de Hückel, que se aplicam em limites opostos. Para limite em que $Ka \ll 1$, a equação de Henry se reduz à equação de Hückel: $\mu_e = (2\varepsilon\zeta)/3\eta$. Neste caso, $f(Ka)$ é igual a 1. No limite $Ka \gg 1$, a equação de Henry se reduz à equação de Smoluchowski $\mu_e = \varepsilon\zeta/\eta$ e $f(Ka)$ é igual a 1,5 (HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).

O valor do potencial zeta varia com o pH, em regiões ácidas o potencial zeta é normalmente positivo, e negativo em regiões básicas. O ponto isoelétrico (PIE) é valor de pH para o qual o potencial zeta é nulo. Do ponto de vista eletrostático a região em torno desse valor corresponde à região de menor estabilidade das

suspensões (REED, 1995). No entanto, a grandeza e o sinal do potencial zeta dependem também das condições da solução, tais como dos reagentes que façam ligações químicas com a superfície e da força iônica, resultando em valores de potencial zeta negativo ou positivo, independente da partícula ser neutra ou não (PUJANA et al., 2012; BUSCHMANN et al., 2013; ROBLES et al., 2013).

Como regra geral de estabilidade eletrostática da solução, temos a faixa de potencial zeta de ± 30 mV. Se o potencial da solução estiver fora dessa faixa, então a solução pode ser considerada instável conforme ilustrado na Figura 18.

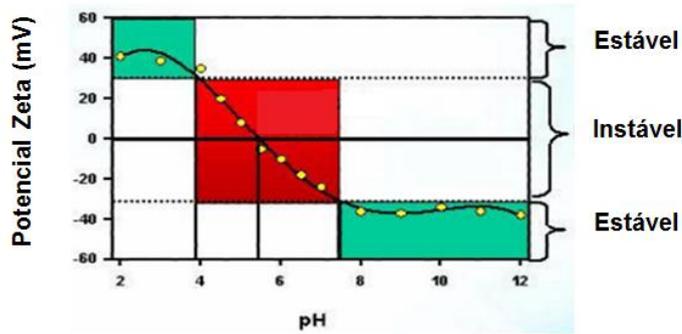


Figura 18: Comportamento do potencial zeta de uma solução em função da variação do pH. (ANDRANDE, 2008)

4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese do peptídeo

O peptídeo tritripticina cuja sequência de resíduos de aminoácidos é: VRRFPWWPFLRR foi sintetizado de acordo com a metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS), a qual foi descrita no procedimento experimental.

A espectrometria de massas confirmou a massa molar do peptídeo desejado: $1.902,0 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 19). O perfil cromatográfico do peptídeo bruto obtido está apresentado na Figura 20 com tempo de retenção de 15,0 min.

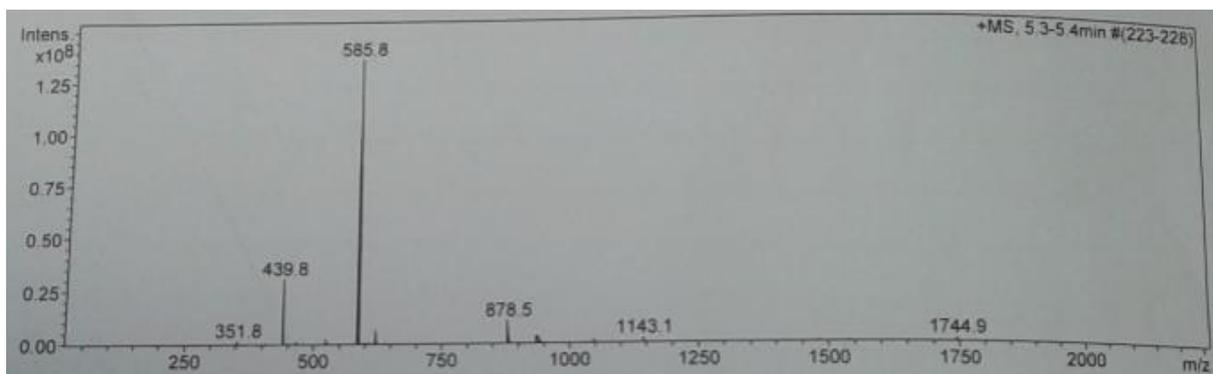


Figura 19: Espectro de massas referente ao peptídeo VRRFPWWPFLRR -COOH, massa molar de $1902,0 \text{ g mol}^{-1}$.

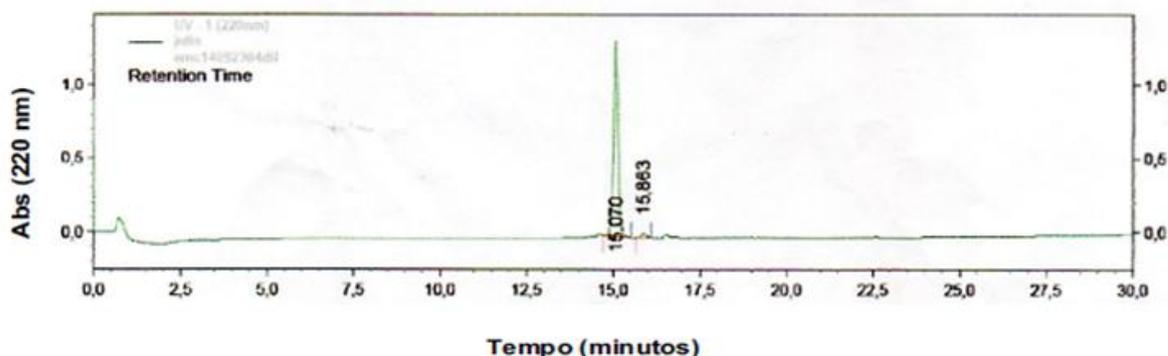


Figura 20: Perfil Cromatográfico referente ao peptídeo bruto VRRFPWWPFLRR -COOH, com tempo de retenção de 15,0 min (Coluna Analítica Fase Reversa C18, 4,6 mm x 150 mm, Ultrasphere Phenomenex com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 220 nm, 5 μm , 300 \AA , programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min).

4.2 Investigação da interação da tritripticina com o plurônico por meio de espectroscopia de fluorescência

A interação do peptídeo TRP3 com micelas poliméricas de plurônico F127 foi investigada através de espectroscopia de dicroísmo circular e de fluorescência bem como espalhamento de luz dinâmico, DLS e DSC.

A tritripticina é um peptídeo catiônico de atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e alguns fungos, bem como apresenta atividade hemolítica. O peptídeo tritripticina é catiônico em pH neutro e o plurônico F127 é não iônico. Estudos demonstraram que tal peptídeo tem interação preferencial quando interage com a bicamada lipídica plana carregada negativamente e estudos com monocamadas lipídicas reportaram que o TRP3 exibe seletividade para os lipídeos PG, fosfatidil glicerol. (SALAY, et al., 2004; SALAY, et al., 2012). No entanto, estudos de fluorescência e CD mostraram que interações com micelas têm uma menor contribuição de interações eletrostática e que, neste caso, outras forças (hidrofóbica, interação de hidrogênio, van der Waals, hidratação) também desempenham um papel na ligação (BOZELLI et al., 2012).

Além disso, estudos de DSC também mostraram maior afinidade do TRP3 por membranas lipídicas com carga superficial negativa, embora os resultados tenham mostrado que forças hidrofóbicas também desempenham um papel na ligação, a qual ocorre preferencialmente na fase fluída quando comparada com a fase gel (ANDRUSHCHENKO et al., 2007).

Dessa forma as forças responsável pela interação do peptídeo catiônico em pH neutro e das micelas poliméricas não iônicas de plurônico F127 podem ser as forças hidrofóbicas, as interação de hidrogênio, Van der Waals.

Para o estudo das interações do peptídeo com as micelas poliméricas foram realizadas medidas de fluorescência com diferente concentração de plurônico como mostrado na Figura 21 e 22.

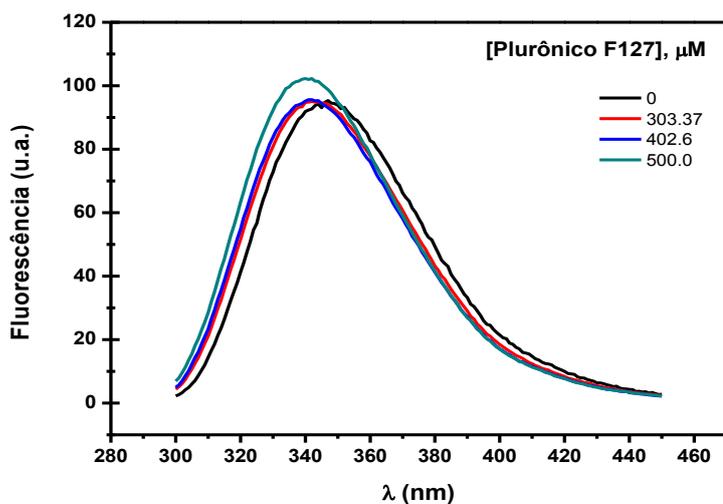


Figura 21: Espectros de fluorescência da tritripticina $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de Plurônico F127, tampão PBC 5 mmol L^{-1} pH 7.4. λ_{exc} 280 nm, fenda: 3 nm.

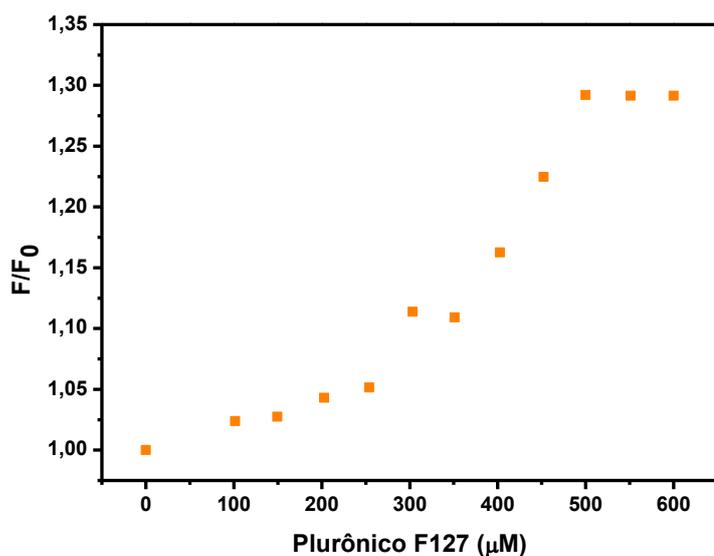


Figura 22: Fluorescência relativa da tritripticina $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de plurônico F127, tampão PBC 5 mmol L^{-1} pH 7,4. λ_{exc} 280nm fenda: 3 nm

Os espectros de fluorescência de TRP3 na presença de plurônico são mostrados no gráfico da Figura 21 e da fluorescência relativa na Figura 22 ao observarmos os mesmos podemos perceber que houve um aumento na intensidade de fluorescência e deslocamento do pico de máxima emissão para o azul o que sugere que houve a interação dos peptídeos com o plurônico e essa interação

ocorre com a parte apolar, pois teve um deslocamento para comprimento de ondas menores.

Apesar da efetividade da interação do peptídeo com diferentes micelas poliméricas tal interação varia de acordo com a natureza de cada micela. Os experimentos de fluorescência investigando a interação do TRP3 com micelas de SDS realizados por Schibli e colaboradores corroboram os nossos resultados, pois, demonstraram que a tritripticina interage de forma efetiva com micelas de SDS, provocando o mesmo efeito nos espectros de fluorescência, ou seja, deslocando para o azul e aumentando a intensidade de fluorescência ao adicionar as micelas do SDS à amostra do peptídeo, Os experimentos de supressão com acrilamida confirmaram tais resultados, visto que a supressão não foi intensa, pois os resíduos de triptofano estavam no interior da micela (SCHIBLI et al., 1999).

O aumento da intensidade de fluorescência é um indício de que o peptídeo assumiu uma forma com menor mobilidade. Quando o triptofano está em um meio onde ele possui grande mobilidade, parte da energia recebida para excitá-lo pode ser perdida nos processos de vibração e rotação, antes de ele decair para o estado fundamental e emitir um fóton, o que reflete na diminuição de intensidade de fluorescência. Porém, quando ele está em um meio com uma organização maior, isso diminui sua mobilidade e a perda por energia por vibração é menor, o que reflete em um aumento de intensidade de fluorescência, o aumento da intensidade de fluorescência indica também que o plurônico passou para um meio apolar (LAKOWICZ, 1999).

Foi realizado também estudo de supressão de fluorescência com acrilamida. A Figura 23 mostra os diferentes espectros de tritripticina em diferentes concentrações de acrilamida e a Figura 24 mostra o gráfico de fluorescência relativa da tritripticina em solução e na presença de plurônico em função da concentração de acrilamida.

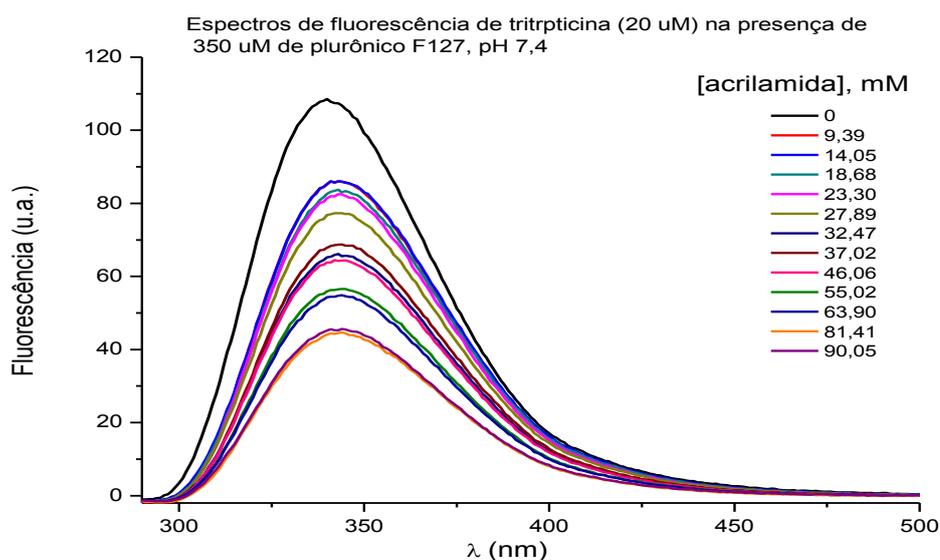


Figura 23: Espectro da fluorescência de tritripticina e plurônico na presença de acrilamida.

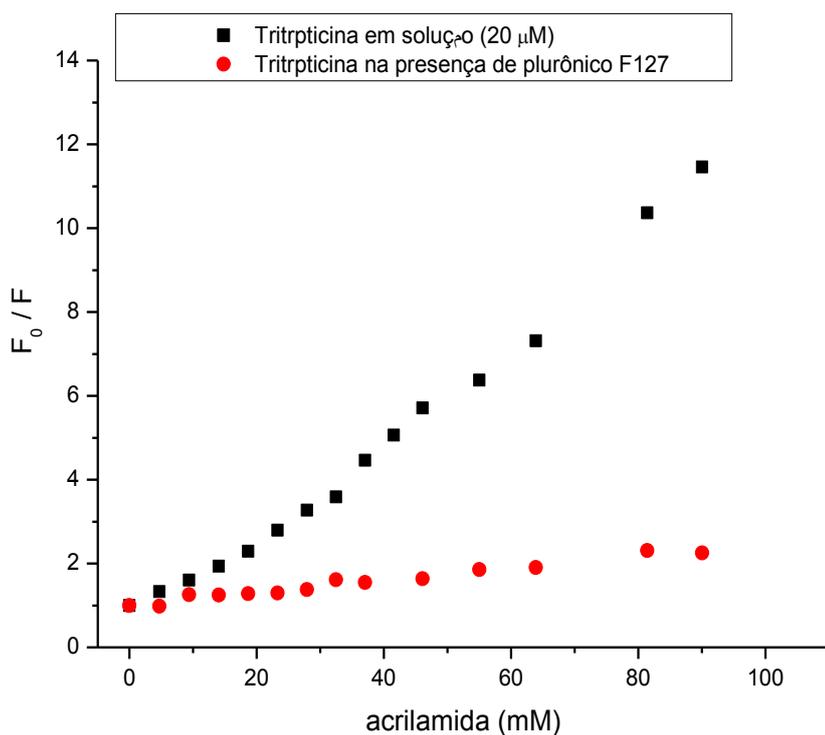


Figura 24: Gráficos de fluorescência relativa da tritripticina em solução e na presença de plurônico em função da concentração de acrilamida.

A supressão de fluorescência refere-se a um processo que diminui a intensidade ou rendimento quântico da emissão fluorescente. Várias interações

podem provocar essa supressão, entre as quais as reações no estado excitado, rearranjos moleculares, formação de complexos no estado fundamental e colisão entre uma molécula fluorescente e de um supressor (LAKOWICZ, 1999). As supressões mais comuns são a estática e a dinâmica. A primeira se refere às interações com formação de complexos não fluorescentes entre o fluoróforo e o supressor. Quando o complexo absorve luz, ele retorna ao estado fundamental sem emissão de um fóton. Já a supressão dinâmica ocorre por causa das colisões entre as moléculas do fluoróforo e do supressor, desativando o fluoróforo no estado excitado (LAKOWICZ, 1999).

A intensidade da emissão de fluorescência de um Trp sobre a superfície de uma proteína ou sobre a superfície de uma membrana diminuirá na presença de um supressor solúvel em água, como a acrilamida. Entretanto, a intensidade de um resíduo de Trp escondido no interior de uma membrana será menos afetada pelo supressor dissolvido (LAKOWICZ, 1999).

O mecanismo da supressão varia com o par fluoróforo-supressor. Por exemplo, a supressão do anel indol pela acrilamida é provavelmente devido à transferência de elétrons do indol para a acrilamida, no estado excitado. Além da supressão colisional, os fluoróforos podem formar complexos não fluorescentes com os agentes supressores (LAKOWICZ, 1999).

Ao observarmos a Figura 23 e 24 podemos perceber que houve uma intensa diminuição da fluorescência com a presença do supressor acrilamida, o que sugere que os triptofanos do peptídeo TRP3 estão interagindo na superfície dos aglomerados molecular de plurônico F127. Estudos utilizando com microscopia confocal corroboram esse resultado ao mostrar que o PAM tritripticina marcado com uma sonda fluorescente não penetra na célula de *E. coli* e *S. aureus* e se mantém associado na interface membrana-água (ZHU et al., 2006). E estudos de fluorescência e supressão de fluorescência com acrilamida, demonstraram que os três resíduos de (W⁶W⁷W⁸) da região central do peptídeo se encontrava na interface da bicamada micela/água (ZHU et al., 2006; BOZELLI et al., 2012).

A partir da Figura 24 foi calculado o K_{SV} da tritripticina em solução 0,105 e na presença de plurônico 0,015. O maior valor de K_{SV} em solução mostra que houve maior supressão da fluorescência do peptídeo em solução do que na presença da micela de plurônico esses dados sugerem que os peptídeos da tritripticina estejam

interagindo com a micela de plurônico. Através do valor de K_{sv} podemos ter a informação de quanto acessível à molécula fluorescente é ao supressor; quanto menor o valor de K_{sv} menor a acessibilidade. Dessa forma o valor de $K_{sv} = 0,015$ mostra que o fluoróforo triptofano está sendo protegido da supressão através da interação da tritripticina com os aglomerados moleculares de plurônico F127.

Foram feitos também cálculos de anisotropia (r) para verificar interação do peptídeo com os agregados moleculares de plurônico F127. As medições da anisotropia são comumente usadas nas aplicações bioquímicas de fluorescência. Através de medidas de anisotropia podemos obter informações sobre o tamanho e forma de proteínas ou a rigidez de diferentes ambientes moleculares. Os cálculos mostraram que, quando a tritripticina está em solução aquosa $r = 0,01877$ e quando a tritripticina está na presença de plurônico, $r = 0,04498$. O valor de r está relacionado ao movimento de difusão rotacional, em solução r aproxima-se de zero e na presença de plurônico o valor de r aumenta, pois há a diminuição do movimento de difusão rotacional. Portanto, o aumento do valor de r confirma o resultado de fluorescência (Figura 23), o qual indica que o peptídeo está menos flexível, devido à interação com o plurônico F127.

4.3 Estudos dos aspectos conformacionais da interação da tritripticina com agregados moleculares de plurônico F127 por espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A técnica de dicroísmo circular (CD) fornece informações sobre as estruturas e conformações de peptídeos e proteínas detectando a atividade óptica de moléculas quirais originada pela interação de centros assimétricos com a luz circularmente polarizada. (FASMAN, 1996; MASON, 2007).

O dicroísmo circular tem como unidade a *mdeg*, tal unidade é convertida para elipticidade molar (θ), $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ utilizando o software disponível no próprio equipamento e esta conversão é realizada para que seja feita uma correta análise da amostra, levando em consideração a concentração molar do peptídeo, o número

de resíduos de aminoácidos (no caso da TRP3=13) e a distância do caminho óptico da cubeta utilizada no ensaio.

As alterações conformacionais e estruturais do PAM tritripticina foram investigadas na presença e ausência de aglomerados molecular de plurônico F127, por meio da espectroscopia de dicroísmo circular, monitorando-se as regiões do ultravioleta (180- 250nm). Na Figura 25 estão disponíveis os espectros eletrônicos de CD da tritripticina em concentrações crescentes de plurônico.

Os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos de fenilalanina, triptofano e tirosina e as interações dissulfeto, (MULKERRIN, 1996; WOODY, 2005).

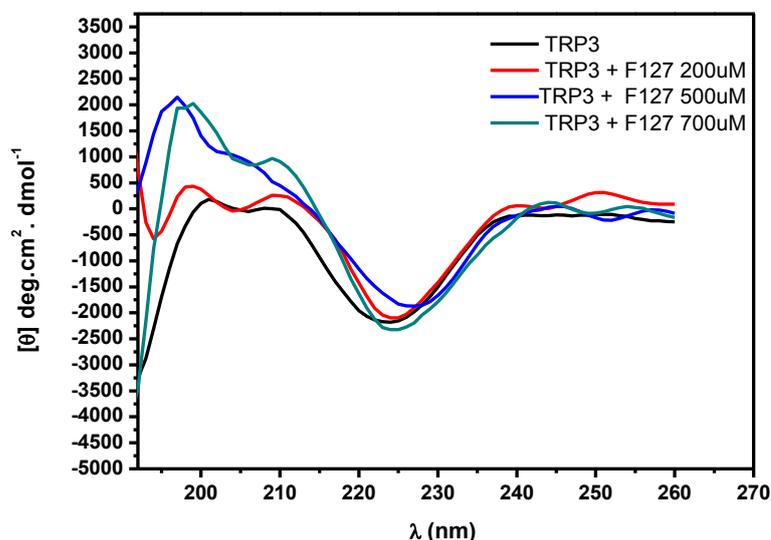


Figura 25: Espectros de dicroísmo circular de tritripticina em solução e na presença aglomerados molecular de plurônico F127.

A interpretação do espectro de CD da tritripticina é complicada devido a presença de múltiplas cadeias laterais aromáticas, o que impede uma análise detalhada da estrutura secundária. O espectro característico da tritripticina livre na solução mostra uma banda de elipticidade negativa em 185 nm, típico para uma estrutura aleatória. Já a cadeia lateral de triptofano contribui para o espectro de CD aproximadamente entre e 200 e 225 nm (WOODY, 1994; NAGPAL, 1999).

Ao observarmos a Figura 25 a qual mostra os espectros de CD da tritripticina na ausência e na presença do plurônico F127, percebemos a presença de uma banda negativa em 225 nm a qual é característica ao peptídeo tritripticina e está em consonância com os resultados obtidos em outros estudos (NAGPAL et al., 1999; SCHIBLI et al., 1999; ANDRUSHCHENKO et al., 2006; BOZELLI et al., 2012). Podemos observar também que, o aumento da concentração de plurônico F127 à solução de tritripticina, fez com que a banda negativa (~ 225 nm) sofresse um deslocamento para o vermelho e a banda negativa ~185 nm sofresse um aumento de intensidade significativo e um deslocamento para o azul o que sugere que o peptídeo sofre mudança conformacional ao interagir com a micela polimérica.

O cromóforo responsável pelo espectro de CD no PAM tritripticina é o aminoácido triptofano (W) o qual possui um grupo indol que apresenta quatro bandas no CD. As bandas B_a e B_b , correspondem a transições de maior energia, a banda B_a , acredita-se que corresponda uma das duas ou três transições fortes na região de 180-210 nm, no entanto, esta não foi demonstrada experimentalmente, já a banda B_b está centrada na região de 225 nm, e as bandas L_b e L_a , correspondem a transições de menor energia, as quais se sobrepõem na região de 280 nm (WOODY e DUNKER, 1996). Vários estudos teóricos e experimentais de peptídeos contendo resíduos de W evidenciaram a contribuição desse aminoácido, para o espectro de CD no UV distante de proteína e peptídeos (LADOKHIN et al., 1999; STRÖMSTEDT et al., 2009).

4.4 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) do Plurônico F127 em solução aquosa.

Nesta técnica, o equipamento mede a capacidade calorífica (ΔC_p) necessária para manter iguais as temperaturas das cubetas contendo a amostra e a referência (solvente), enquanto ocorre a variação da temperatura numa taxa constante de aquecimento ou resfriamento. ΔC_p reflete a variação na entalpia de processos energéticos internos das moléculas da amostra; esta variação é descrita no termograma DSC, ou curva de ΔC_p em função da temperatura (MASON, 1998).

Através da análise de ΔC_p podemos determinar a temperatura micelar crítica (CMT) e a entalpia da transição (ΔH) do plurônico F127 na ausência e na presença da tiritricina. Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa Origin[®] 7.0 fornecido pelo fabricante (Microcal).

O plurônico F127 é um polímero anfifílico formado por monômeros de polioxiétileno e polioxipropileno. Em solução aquosa diluída a frio (abaixo da CMT), as moléculas do plurônico estão como cadeias isoladas (unímeros); no entanto, quando a concentração ou a temperatura excede os valores críticos, a concentração micelar crítica (CMC), ou temperatura micelar crítica (CMT), as cadeias isoladas do plurônico se associam produzindo micelas poliméricas (HECHT,1995; MORTENSEN, 2001). Tal comportamento permite que fármacos sejam solubilizados no interior da micela polimérica. (KABANOV et al., 1992) ou, alternativamente, que o fármaco fique conjugado com o polímero formador das micelas (YOKAYAMA et al., 1998). Termogramas DSC representando a transição de monômeros para micelas de F127 em diferentes concentrações são mostrado na Figura 26.

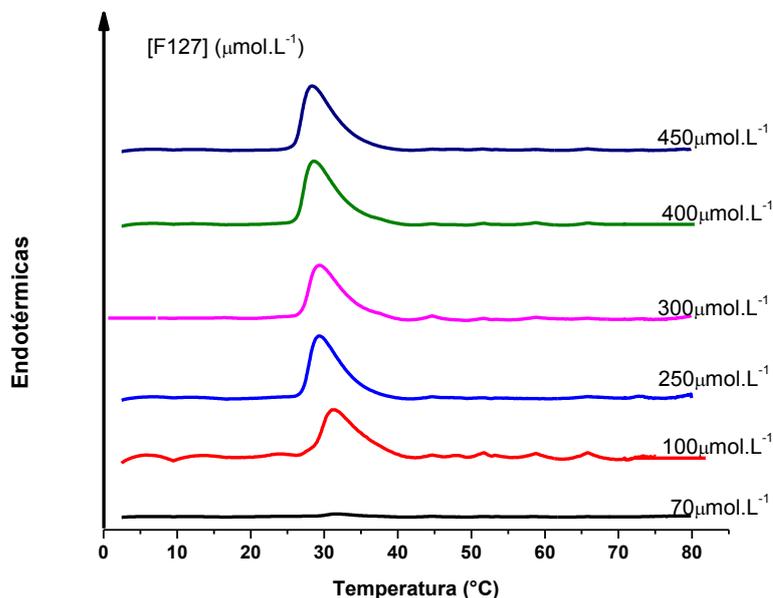


Figura 26: Termogramas DSC de aquecimento de F127 em diferentes concentrações.

As curvas DSC de F127 (Figura 26) mostram um único evento endotérmico, numa faixa de temperatura em torno de 31,5°C, com entalpia ΔH_m de aproximadamente 207 kJ/mol. Tal banda é característica da formação reversível de

micelas. Feitosa e colaboradores corroboraram esses resultados, ao reportarem que varreduras de aquecimento e resfriamento consecutivos têm perfis idênticos (invertidos ou espelhados) numa mesma concentração de F127, apresentando, respectivamente no aquecimento e resfriamento, um único pico endotérmico e exotérmico assimétrico centrado no valor da CMT. A ausência de histerese térmica é um indicativo que o processo de micelização/ desmicelização é reversível (FEITOSA e WINNIK, 2010). Na literatura há vários valores de CMC para o F127, obtidos através de métodos diferentes e para diferentes fabricantes e lote (BAKSHI et. al. 2006). Isso provavelmente se deve ao grau de pureza do produto sintetizado por diferentes fabricantes. Estudo com espectroscopia de fluorescência mostra que a CMC do F127 varia com a temperatura sendo que a 30 e 35 °C, a CMC é $2,23 \times 10^{-5}$ e 1.03×10^{-5} mol/kg, respectivamente (VASILESCU e BANDULA, 2011).

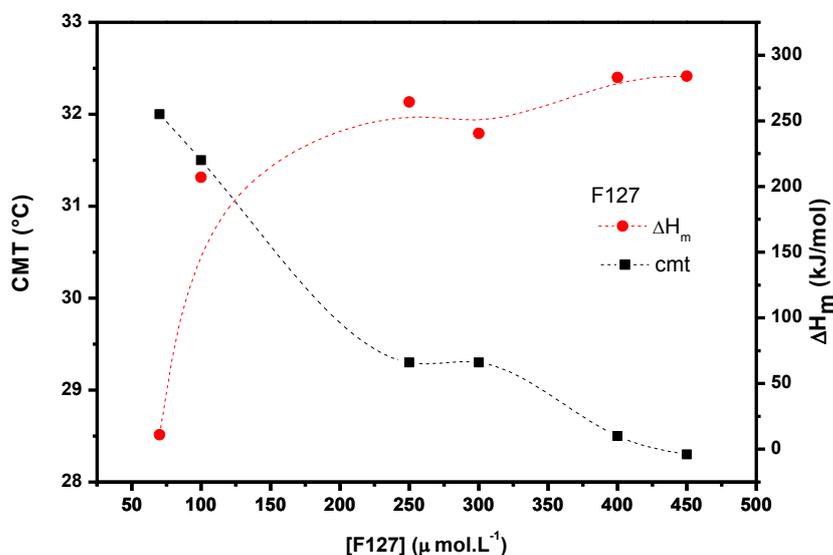


Figura 27: Variação da CMT e ΔH de F127 em função da concentração do copolímero, na ausência da tritripticina. Dados obtidos, da posição e área do pico da CMT na Figura 26.

A CMT, temperatura micelar crítica, corresponde ao ponto médio entre as temperaturas em que a transição começa e termina (LEE, 1977). Entretanto, para eventos térmicos com transições amplas, a CMT pode ser descrita como a temperatura em que o pico endotérmico atinge o valor máximo (MASON, 1998).

A CMT varia com a concentração de F127 conforme mostrado na Figura 27, onde podemos notar que ocorre um decréscimo acentuado na CMT com o aumento da concentração do plurônico, entre 250-300 μmolL^{-1} há um patamar indicando que a CMT é praticamente constante. Isso indica que com o aumento da concentração é necessário temperaturas menores para o processo de micelização de F127. Esse decréscimo da CMT com a concentração de F127 também foi evidenciado no estudo da interação do plurônico F127 com DODAB, realizado por Feitosa e colaboradores (FEITOSA e WINNIK, 2010).

Em relação ao ΔH_m de F127, nota-se um aumento, porém não acentuado da entalpia com o aumento da concentração, com exceção na região entre 250-300 μmolL^{-1} onde houve um leve decréscimo. Isso significa que aumentando a concentração de F127, maior quantidade de energia é envolvida na formação das micelas.

4.5 Estudo da interação da tritripticina com o plurônico F127 por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Visando sanar a problemática encontrada na administração de peptídeos e proteínas em relação à degradação enzimática e neutralização no organismo e favorecer a liberação prolongada dos fármacos resultando em maior atividade, vários estudos se concentram na utilização de veículos de entrega de fármacos (STEVENS, 1999). Os plurônicos são considerados os polímeros biocompatíveis mais investigados *in vivo* (PAN et al., 2003). A Figura 28 mostra termogramas DSC da interação do PAM tritripticina 50 μM com agregados moleculares de plurônico F127 em diferentes concentrações.

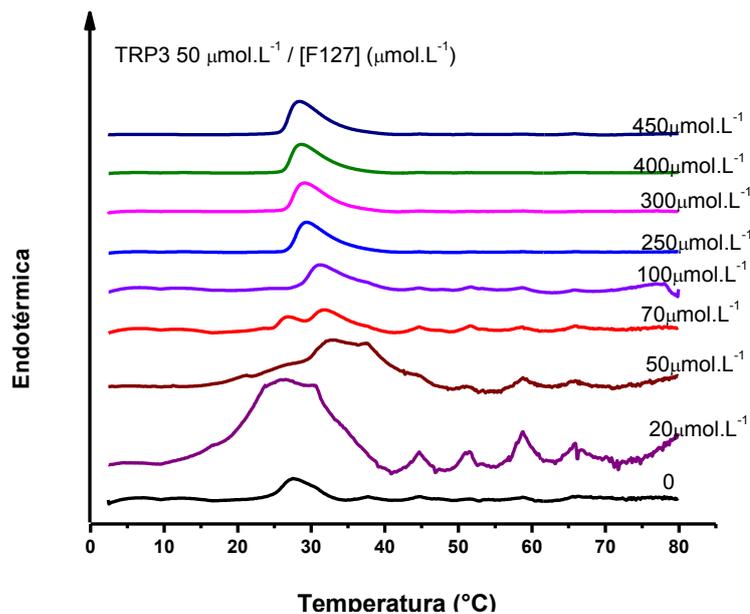


Figura 28: Curvas de DSC de aquecimento da interação de tritripticina $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com diferentes concentrações de Plurônico F127 em solução tampão PBC 5 mmol L^{-1} , pH 7,4.

A curva DSC do peptídeo antimicrobiano tritripticina $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência de plurônico F 127, na Figura 28, demonstra o primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura em torno de $27,5^\circ\text{C}$, com entalpia ΔH_m $198,2 \text{ kJ/mol}$. Tal pico é característico do processo de desnaturação do peptídeo TRP3. Nos termogramas da interação do PAM tritripticina $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com F127 podemos observar duas regiões distintas, uma abaixo de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a outra acima de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de F127. Em $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de F127, há um alargamento e deslocamento do pico para temperaturas menores, indicando que houve interação da tritripticina com o plurônico. Na concentração equivalente a 1:1 de F127:TRP3, a interação é percebida pelo deslocamento da banda para temperaturas maiores e um alargamento do pico, indicando superposição das bandas de F127 e do peptídeo. Na concentração de $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de plurônico, nota-se mais claramente a superposição de picos, um referente à interação entre a tritripticina e F127, formando um complexo de F127-TRP3, e outro caracterizando o pico do excesso de F127. Acima de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ quando a concentração de F127 é bem maior do que a da tritripticina, desaparece o pico referente à tritripticina e sobressai apenas o pico referente ao plurônico, sugerindo que a tritripticina interage em maior escala com o plurônico. Há também um estreitamento da banda evidenciando a interação da tritripticina com o plurônico e

o desaparecimento da banda referente à tritripticina. Nota-se também que o peptídeo não altera o valor da CMT de F127, não havendo, portanto deslocamento da banda.

A Figura 29 mostra o comportamento da CMT (a) e de ΔH (b) com a variação da concentração de F127, na presença e ausência da tritripticina. Os dados de cmt da Figura 29 foram obtidos da Figura 28.

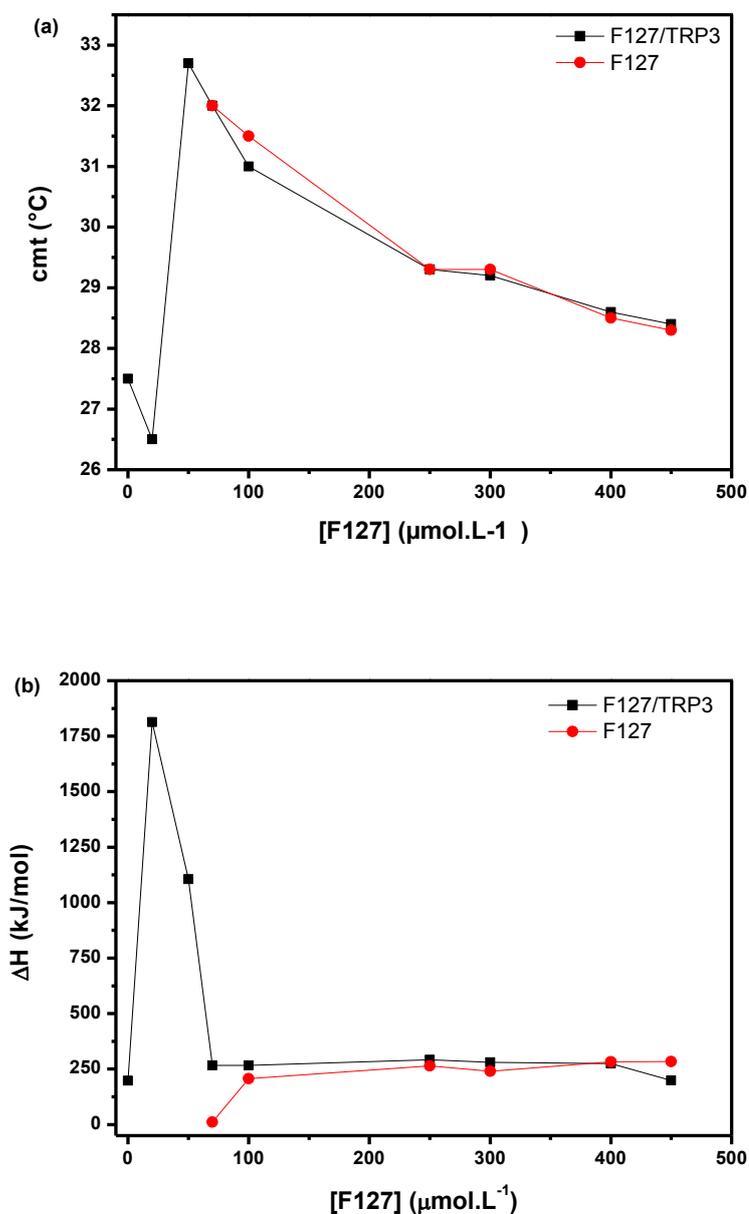


Figura 29: Variação da CMT (a) e ΔH (b) com a concentração de F127, na ausência e na presença do peptídeo, os dados de CMT da Figura 29 foram obtidos a partir das informações da Figura 28.

Sob o efeito de temperatura, peptídeos podem sofrer degradação. Esse processo é caracterizado por uma temperatura de transição de fase (CMT) e por uma entalpia de transição (ΔH). ΔH corresponde à medida de mudança na entalpia por molécula da transição e reflete a diferença de energia entre as fases do peptídeo não desnaturado e desnaturado.

A CMT depende da concentração do plurônico e tritripticina, conforme representado nas Figuras 28 e 29a.

A interação da tritripticina com os agregados moleculares de plurônico altera significativamente o termograma observado. Na concentração de (e acima de) 250 μmolL^{-1} de F127, a tritripticina interage fortemente com os aglomerados molecular do plurônico F127 abolindo completamente a sobreposição e o termograma se assemelha ao termograma de F127 puro (Figura 28), devido à incorporação do peptídeo os aglomerados molecular de plurônico F127. Nesta região podemos perceber que ΔH não varia e isso ocorre na mesma região de ΔH do plurônico puro, indicando interação.

4.6 Efeito da interação da tritripticina no tamanho hidrodinâmico e no potencial zeta dos aglomerados molecular de plurônico F127

Surfactantes hidrossolúveis formam micelas de tamanhos variados acima da concentração micela crítica (CMC) e temperatura micela críticas (CMT) (JÖNSSON et al., 1998). A auto-associação de substâncias anfífilas em meio aquoso é determinada por forças de interação de Van der Waals, efeito hidrofóbico, interação de hidrogênio e interações eletrostáticas (ISRAELACHVILI, 1992).

A estabilidade coloidal das micelas de F127 em presença e ausência da tritripticina, bem como a estabilidade coloidal das partículas de tritripticina, foi investigada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinar o diâmetro hidrodinâmico (D_H) e também através de medidas do potencial zeta (ζ).

O D_H médio das micelas aumentou com o aumento da concentração de F127, conforme mostrado na Figura 30a.

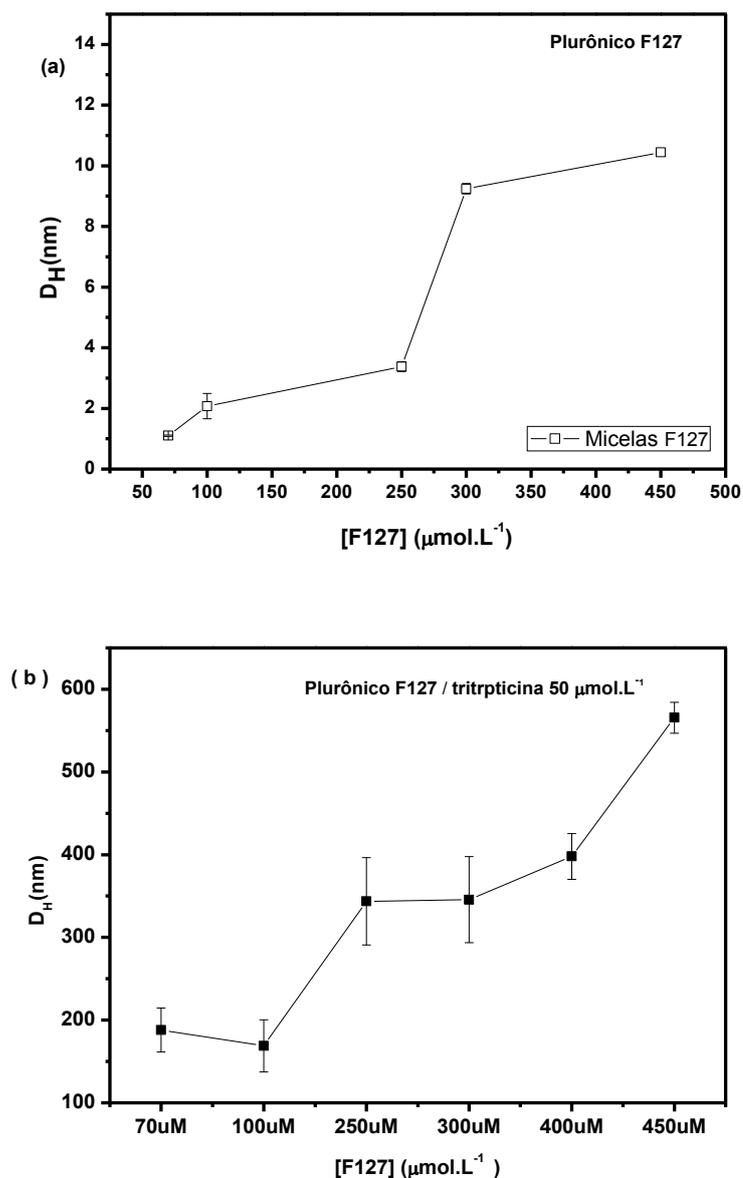


Figura 30: Diâmetro hidrodinâmico das micelas de F127 em função da concentração, (a) na ausência e (b) na presença da tritripticina 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 22°C.

O D_H médio, tanto do plurônico em solução, quanto da tritripticina na presença de F127, são mostrados, respectivamente nas Figuras 30a e 30b. Podemos perceber na Figura 30b que ao interagir a tritripticina com diferentes concentrações de plurônico houve um aumento significativo no diâmetro dos aglomerados molecular de plurônico F127, chegando à formação de complexos com D_H médio de

aproximadamente 550 nm na concentração de $450 \mu\text{molL}^{-1}$ de F127; isso sugere a interação do peptídeo com o plurônico.

Porém, observando a Figura 30a, notamos que D_H médio dos aglomerados molecular de plurônico também aumenta com a concentração de F127, chegando a aproximadamente 10 nm para $450 \mu\text{molL}^{-1}$; porém não há registro na literatura a respeito do tamanho do complexo formado por micelas de F127 + tritripticina. De acordo com a literatura, o raio hidrodinâmico das micelas formadas de F127 em solução aquosa, mantem-se constante a 10,2 nm, entre 35 e 45 °C (ATTWOOD, 1985). Assim, a interação do peptídeo tritripticina com a micela do plurônico F127 fica mais uma vez evidente.

4.7 Potencial zeta (ζ)

O potencial zeta (ζ) é um parâmetro importante para descrever partículas coloidais, pois seu valor indica estabilidade da dispersão e ajudam a explicar as possíveis interações com outras partículas. Suspensões com valores de ζ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV indicam maior estabilidade, enquanto aquelas cujo valor se situa acima de -30 mV ou abaixo de +30 mV são instáveis e podem flocular. Existem muitos fatores que afetam o potencial zeta, tal como o tipo e a concentração de partícula, o tipo de eletrólito, a adição de aditivos, como metais pesados e agentes tensoativos. (MARSALEK, 2012).

A tendência de ζ referente à interação da tritripticina $50 \mu\text{molL}^{-1}$ com diferentes concentração das micelas de F127, é mostrada na Figura 31.

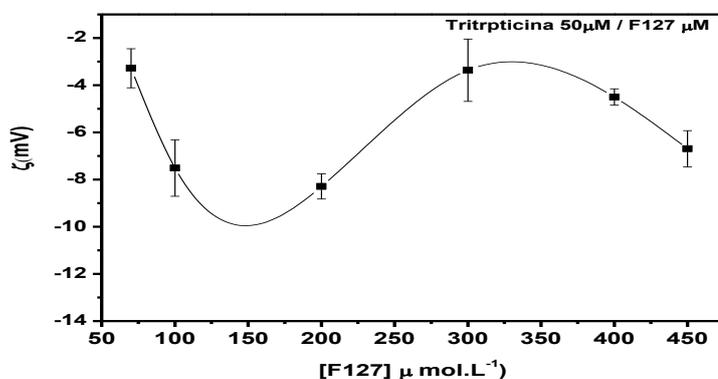


Figura 31: Potencial zeta em função da concentração de F127, na presença de TRP3 $50 \mu\text{M}$. temperatura igual a 22°C .

A Figura 31 mostra que as medidas de ζ estão em concordância com as medidas do diâmetro hidrodinâmicos (Figura 30), pois quanto maior o diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados menor será ζ , uma vez que ζ mede a capacidade de mobilidade das partículas e quanto maior é o diâmetro da partícula menor será a sua mobilidade.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a tritripticina é capaz de interagir com agregados moleculares de plurônico F127. Isso implica na possibilidade da utilização dessas micelas como veículo de entrega do PAM tritripticina.

5 Conclusão

Com a presente pesquisa conclui-se que há interação do peptídeo antimicrobiano tritripticina com agregados moleculares de Plurônico F127. Isso é notado tanto nos experimentos de fluorescência, pois houve diminuição da intensidade de fluorescência, como também nos experimentos de supressão de fluorescência e nos parâmetros calculados de K_{sv} e r . Os estudos de dicróismo circular também mostraram variações conformacionais da tritripticina na presença dos agregados moleculares de plurônico F127 sugerindo interação dos peptídeos com as micelas. Através dos experimentos de DSC notou-se que a incorporação da tritripticina nos agregados moleculares de plurônico altera significativamente o termograma do plurônico F127. Os experimentos de DLS mostraram um acentuado aumento no diâmetro hidrodinâmico do F127 ao interagir com o PAM tritripticina. Os resultados dos experimentos de potencial zeta estão em concordância com as medidas do diâmetro hidrodinâmico, evidenciando a interação do PAM TRP3 com o F127, esse experimento mostrou a diminuição da mobilidade do complexo tritripticina/ F127 .

6 Referências

ALAKHOV, V. et al. Pluronic Block copolymers and Pluronic Poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of magesrol acetate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 56: 1233- 12 41, 2004.

ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems for peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59: 478-490, 2007.

ANDRANDE, J. E. Medidas de Tamanho e Potencial Zeta de Nanopartículas Utilizando Espalhamento de Luz, Universidade Federal do Sergipe 2008.

ANDRUSHCHENKO, V. V.; VOLGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Solvent- dependente structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758: 1596 – 1608, 2006.

ANDRUSHCHENKO, V. V.; VOLGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides With model membranes studied by differential scanning calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1768: 2447-2458, 2007.

ANDRUSHCHENKO, V. V. et al. Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1778: 1004-1014, 2008.

ARIAS, M. et al. Hydroxi-tryptophan containing derivatives of tritriptin: modification of antimicrobial activity and membrane interactions, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1848: 277-288, 2015.

BAKSHI, M. S.; SACHAR, S. Influence of hydrophobicity on mixed micelles of pluronic F127 and P103 plus cationic surfactants mixtures. **Colloids Surfaces A**, 276, 146–154. 2006

BARRELEIRO, P. C. A. et al. Interaction of DNA with cationic vesicles: a calorimetric study. **Journal of Physical Chemistry B**, 104: 7795-7802, 2000.

BAGHERI, M.; BEYERMANN, M.; DATHE, M. Mode of action of cationic antimicrobial peptides defines the tethering position and the efficacy of biocidal surfaces. **Bioconjugate Chemistry**, 23: 66-74, 2012.

BALTROP, J. A.; COYLE, J. D. Principles of Photochemistry, John Wiley & Sons, 1978.

BERBERAN-SANTOS, M. N. Pioneering contributions of Jean and Francis Perrin to molecular luminescence. In *New trends in fluorescence spectroscopy: applications to chemical and life sciences*. **J-C Brochon. Springer**, 18: 7–33, 2001.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R.W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd Ed. New York, USA: Wiley VCH, 2000.

BOZELLI, J.C. Jr. et al. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrypticina to lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, 165: 365-373, 2012.

BRANCO, M.C.; SCHNEIDER, J.P. Self-assembling materials for therapeutic delivery **Acta Biomaterial**, 5: 817-831, 2009.

BROGDEN, K. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 3: 238-250, 2005.

BROMBERG, L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, 128: 99-112, 2008.

BUSCHMANN, M. D. et al. Chitosans for delivery of nucleic acids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65:1234-1270, 2013

BULLET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, 198:169-184, 2004.

BURSTEIN, E.A. *Intrinsic Protein Luminescence (Origins and Applications)*, VINITI, Moscow. 1977.

BUSHUEVA, T.L.; BUSEL E, P.; BURSTEIN E.A. Some Regularities of Dynamic Accessibility of Buried Fluorescence Residues to External Quenchers in Proteins', **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 204: 161–166, 1980.

Carey, F.; *Organic Chemistry*; 3th Ed. 7. McGrawHill, New York, 1996.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical Chemistry** Vol. 3, 1369 pp. 1980. (San Francisco, W. H. Freeman).

CHAN, D.I.; PRENNER, E.J.; VOGEL, H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758: 1184–1202, 2006.

COOPER, A.; NUTLEY, M. A.; WADOOD, A. Differential scanning microcalorimetry in solution. In: HARDING, E.; CHOWDHRY, B. Z. (Eds.) *Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford: Oxford University Press, 2000.

CHU, B. *Laser light scattering, Basic Principles and Practice*. San Diego: Academic Press.1991.

CIRIONI, O. et al. In vitro activities of tritripticin alone and in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50: 3923-3925, 2006.

DELGADO, A. V. et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, 309, 194-224, 2007.

DIBIASE, M.; RHODES, C. Formulation and evaluation of Epidermal Growth Factor in Pluronic-127 Gel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 22:823-831,1996.

DISHER, D.E.; EISENBERG,A. Polymer vesicles. **Science** , 297, 967- 973, 2002.

FARNAUD, S. et al. Interactions of Lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. **FEMS Microbiology Letters**, 233: 193-199, 2004.

FASMAN, G.D. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. New York, USA: Plenum Publishing Corp. 1996.

FEITOSA, E. Kinetic asymmetry in the gel- liquid crystalline state transitions of DDAB vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Colloids and Interface Science**,3: 70-74, 2010.

FEITOSA, S. E.; WINNIK, F. Interaction between Pluronic F127 and dioctadecylmethylammonium bromide (DODAB) vesicles studied by diferencial scanning calorimetry. **Langmuir**, 26:17852-17857, 2010.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science** 325: 1089-1093, 2009.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, 11: 37-51, 2011.

GENNARO, R.; SKERLAVAJ, B.; ROMEO, D. Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. **Infection and Immunity**, 57: 3142-3146, 1989.

GHISELLI, R. et al. The cathelicidin-derived tritripticin enhances the efficacy of ertapenem in experimental rat models of septic shock. **Journal Shock**, 26: 195-200, 2006.

GILBERT, J. et al. Drug Release from Pluronic F-127 Gels, **International Journal of Pharmaceutics**, 32, 223-228, 1986.

GONÇALVES, M. L. S. Métodos Intrumentais para Análise de Soluções - Análise quantitativa - 4ª Edição – Lisboa , 2001.

HALL, J. B. et al. Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine**, 2: 789-803, 2007

HAMLEY, W. Block Copolymers in Solution: Fundamentals and Applications. ISBN: 978-0-470-01557-5, 2005.

HAMMES, G.G. Spectroscopy for the Biological Sciences. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

HECHT, E.; HOFFMANN, H. kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 96: 181-197, 1995.

HEINECK, M. E et al. Evidences of amylose coil-to-helix transition in stored dilute solutions. **Polymer**, 49, 4386-4392, 2008.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. Principles of Colloid and Surface Chemistry.. Nova York: Marcel Dekker, 1997

INFANTE, V.V. et al. Effect of the antimicrobial peptide tritrypticin on the in vitro viability and growth of *Trichomonas vaginalis*. **Current Microbiology**, 62: 301-306, 2011.

IONASHIRO, M.G. Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial. Araraquara: Giz editorial 96p, 2004.

ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and surfasse force, Academic Press, London. 1992.

IZADPANAH, A.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 52: 381-390. 2005.

JAIN, N. K.; SHAH, B. K.; TANEJA, L. N. Nasal absorption of metoprolol tartrate, **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, 53: 16-19, 1991.

JENSSEN, H. ; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 19: 491-511, 2006.

JÖNSSON, B. et al. Surfactants and polymers in aqueous solution, John Wiley. 1998.

JUNIOR, S. V.C. Técnica de caracterização de polímeros. **Editora Artiber**, .17-261, 2004

KABANOV A.V. et al. A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene) – poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain, **Journal Controlled Release**, 22: 141–158,1992.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V. New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. **Current Pharmaceutical Design**, 10: 1355-63. 2004.

KAUTSKY, H. Quenching of Luminescence by oxygen. **Transactions Faraday Society**, 35, 216. 1939.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the investigation of protein Structure and Function Price Division of Biochemistry and Molecular Biology. **Protein and Peptide Science**,1: 349-384, 2000.

KELLY S. M., JESS T. J., PRICE N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimistry Biophysics Acta** 1751;119 –139, 2005.

KLEIN-SEETHARAMAN, J.et al. Long-range interactions within a nonnative protein, **Science**, 295: 1719–1722, 2002.

KOLLER, C., BURI, P., Propriétés et intérêt pharmaceutique des gels thermoréversibles à base de poloxamers et poloxamines, **S.T.P. Pharma**,3:115-124,1987.

KOURIE, J. I.; SHORTHOUSE, A. A. Properties of cytotoxic peptide Formed ion channels. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**, 278:1063-1087, 2000.

KOWALCZUK, A. et al. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. **Progress in Polymer Science**, 39: 43-86, 2014.

KRITTANAI, C. E JOHNSON, W. C. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. **Analytical Biochemistry**, 253:57-64,1997.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3 ed, Springer, 2006.

LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.

LAWYER, C. et al. Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. **Science publishing by scientists** 390, 95–98, 1996.

LEE, A. G. Lipid phase transitions and phase diagrams: I. Lipid phase transitions. **Biochimica et Biophysica Acta**, 472: 237-281,1977.

LEE, K.Y, YUK, S.H. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, 669-697, 2007

LI, H.; SUNG, K. C., Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery, **Journal of Control Release**, 69: 379-388, 2000.

LI, Y. et al., Plurônico F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery, **Materials Science and Engineering C**, 33: 2698-2707, 2013.

LIU, Y. et al., Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization. **Journal Control Release**, 117: 387-95, 2007.

LIU, B.; WILSON, E. The antimicrobial activity of CCL28 is dependent on C-terminal positively-charged amino acids, **European Journal of Immunology**, 40: 186–196, 2010.

LOHNER, K. Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies. **Horizon Scientific Press, Norfolk, England**. 2001.

LOHNER, K.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with 175 membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**,1462: 141-156, 1999.

LOW, P.S; HENNE, W.A. Doorneweerd DD. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. **Accounts of Chemical Research**, 41: 120-9, 2007.

MACIEL, H. M. Polimerização Fotoiniciada de Monômeros carregados, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2000.

MANDELL, D. J. et al. Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains, **Journal of the American Chemical Society**, 129: 820–827, 2007.

MARSALE, K. R. Zeta potential – Applications. 2 nd International Conference on Environment and Industrial Innovation IPCBEE vol. 35. IACSIT Press, Singapore. 2012.

MASON, W.R. A Practical Guide to Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2007.

MASON, J. T. Investigation of phase transitions in bilayer membranes. **Methods in Enzymology**, 295: 468-494,1998.

MCILWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**,5: 008656, 2013.

MELO, M. N.; FERRE, R. CASTANHO, M.A.R.B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nature Reviews Microbiology**, 7:245-250, 2009.

MELO, C. S. et al. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 33: 469-477, 2012.

MENDONÇA, C.M.S. et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, 115: 2277-2285, 2014.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide **Journal of the American Chemical Society**. 85: 2149-2154, 1963.

MONDON, K.; GURNY, R.; MOLLER, M. Colloidal Drug Delivery Systems- Recent Advances with Polymeric Micelles. **Chimia**, 62:832-840, 2008.

MORTENSEN, K. PEO- related block copolymer surfactants. **Colloids and Surfaces A**, 183: 277-292, 2001.

MULKERRIN, N. G. Spectroscopic methods for determining protein structure in solution. New York: Havel, p. 5-27,1996.

MYERS, D. Surfactant Science and Technology, 2. ed. New York: VCH Publishers. 1992.

NAGPAL, S. et al. Structure-function analysis of tritripticina, na antibacterial peptide of innate imune origin. **The Journal of Biological Chemistry**, 274: 296 – 304, 1999.

NAGPAL, S. et al. Plasticity in structure and interactions is critical for the action of indolicidin, an antibacterial peptide of innate immune origin. **Protein Science**, 11: 2158-2167, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger priciples of biochemistry. 5 ed New York: W.H. Freemam, 2008.

NGUYEN, L. T. et al. Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritripticina: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1808: 2297-2303, 2011.

NORDBERG, P.; MONNET, D. L.; CARS, O. Antibacterial drug resistance: options for concerned action, WHO, Department of Medicines Policy and Standards, 2005.

OYINLOYE, B.; ADENOWO, F.; GXABA, N.; KAPPO, A. The promise of antimicrobial peptides for treatment of human schistosomiasis. **Current Drug Targets**, 15: 852–859, 2014.

PADILLA, M.; CLARK, G. T.; MERRILL, R. L. Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review, **The Journal of the American Dental Association**,131: 184-195,2000.

PAN, D.; TURNER, J.L.; WOOLEY. K.L. Folic acid-conjugated nanostructured materials designed for cancer cell targeting. **Chemical Communications** 2400-1, 2003.

PELEGRINI , B. P. et al. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work . **Biochemistry Research International**. 250349 , 1-9. 2011.

PLANQUE, M.R. et al. Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions, **Biochemistry**, 42: 5341–5348, 2003.

POKORNY, A.; ALMEIDA P.F.F. Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysin: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides, **Biochemistry**, 44:9538–9544, 2005.

PUJANA, M. A. et al. “**Water dispersible pH-responsive chitosan nanogels modified with biocompatible crosslinking-agents**”. *Polymer*, v. 53, n. 15, p. 3107-3116. ISSN 0032-3861, 2012.

PURGERCAR, J. et al. Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine boné marrow. **FEBS Letters**, 336: 284-288, 1993.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses: a review. **Chemical Biology Drug Design**, 74: 101–120, 2009.

REED, J. S. *Principles of Ceramics Processing* 2.ed. Nova York: Jonh Wiley & Sons, 658 p.1995.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles, **Biochemistry**, 39: 15765–15774. 2000.

ROBLES, E. et al. Effects of the hydrophobization on chitosan-insulin nanoparticles obtained by Na alkylation reaction on chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, 129:822-834, 2013.

RYU, J. M. et al. Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, **Journal of Control Release**, 59: 163-172, 1999.

SALAY, L. C. et al. Headgroup specificity for the interaction of the antimicrobial peptide tritrypticin with phospholipid Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 100: 95-102, 2012.

SALAY, L.C. et al. Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritrypticina in planar lipid bilayers. **FEBS Letters** 565: 171-175, 2004.

SANTOS, K. D. O. et al. Synthesis and Catalytic properties of silver Nanoparticle-linear Polyethylene Imine Colloidal Systems. **The Journal of Physical Chemistry C**, 116: 4594-4604, 2012.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26:726-737, 2003.

SCHIBLI, D. J. et al. Structure- function analysis of tritrypticin analogues: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle bound NMR structures. **Biophysical Journal**, 91: 4413-4426, 2006.

SCHIBLI, D. J.; HWANG P.M.; VOGEL H.J. Structure of the antimicrobial peptide tritrypticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold, **Biochemistry**, 38: 16749–16755, 1999.

SCHIBLI, D.J. et al. Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions, **Biochemistry and Cell Biology**, 80: 667–677, 2002.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S.V.P.; DE PAULA, E. Surface active drugs - self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1508: 210-234, 2000.

SELSTED, M.E. et al. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry**, 267: 4292–4295, 1992.

SEZGIN, Z.; YUKSEL, N.; BAYKARA, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 64: 261–268, 2006.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides **Biopolymers**, 66:236-248, 2002.

SHI, C. et al. Improved delivery of the natural anticancer drug tetrandrine. **International Journal of Pharmaceutics**, 479:41-51,2015.

SINGH et al. Micelles, mixed micelles, and applications of polyoxypropylene (PPO)-polyoxyethylene (PEO)-polyoxypropylene (PPO) triblock polymers **International Journal of Industrial Chemistry**, 4: 2-18, 2013.

SILVEIRA, N. P.; GIACOMELLI, C.G. Espalhamento de luz aplicado à caracterização de polímeros e nanopartículas. In: (Ed.). Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia. Porto Alegre: UFRGS, v.1, 2008.

SOUZA, S. P.M.C. Determinação do teor de cálcio através da termogravimetria em medicamentos utilizados no tratamento da osteoporose: um estudo comparativo. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

SPELLBERG, B. et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, 38: 1279–1286, 2004.

SREERAMA N.; WOODY R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, 383: 318–351. 2004.

STEVENS, M. P., Polymer chemistry: an introduction, 3. ed., New York: Oxford University Press. 1999.

STOKES, G. C. On the Change of Refrangibility of Light. **Philosophical Transactions of Royal Society of London**, 142: 463-562, 1852.

STRÖMSTEDT, A. A. et al Oligotryptophan-tagged antimicrobial peptides and the role of cationic sequence. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1788: 1916-1923. 2009.

TEIXEIRA, M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 59: 491-500, 2005.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M.J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, 51: 149-177. 2012.

TORCHILIN, V. P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. **Pharmaceutical Research**, 24:1-16, 2007.

ULRICH, A. S. et al. Ultrastructural characterization of peptide-induced membrane fusion and peptide self-assembly in the lipid bilayer. **Biophysical Journal**, 77: 829-84, 1999.

VALEUR, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications; Wiley- VCH Verlag GmbH. 2001.

WALTHO, J. P. et al. Peptide models of protein folding initiation sites. 1. Secondary structure formation by peptides corresponding to the G-and H-helices of myoglobin **Biochemistry**, 32:6337- 6347, 1993.

WANG, G.; LI, X. ; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, 37: 933-937,2009.

WOODS, A.S.; FERRE, S. Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction, **Journal of Proteome Research**, 4:1397–1402, 2005.

WOODY, R.W. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. **European Biophysics Journal**, 23: 253-262, 1994.

WOODY, R. W. The exciton model and the circular dichroism of polypeptides. **Monatshefte fuer Chemie**, 136: 347-366, 2005.

WOODY, R. W. DUNKER, A. K. Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism. In Proteins. in: Circular dischroism and the conformational analysis of biomolecules. New York, p. 109-157. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Strategies for global surveillance of antimicrobial resistance. WHO/HSE/PED/2013.10358,

WORLD HEALTH ORGANIZATION Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. WHO/HSE/PED/AIP/2015.1

WU, M. et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with palmar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. **Biochemistry**, 38: 7235-7242, 1999.

YANG, S. T. et al. Different modes in antibiotic action of tritrypticins analogs, cathelicidin-derived Trp-rich and Pro/Arg-rich peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758: 1580-1586, 2006.

YANG, S.T. et al. Conformation-dependent antibiotic activity of tritrypticin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296: 1044– 1050, 2002.

YANG, S.T.; KIM, J.I.; SHIN, S.Y. Effect of dimerization of a beta- turn antimicrobial peptide, PST 13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. **Biotechnology Letter**, 31: 233-237, 2009.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55, 2003.

YEON, S.; CHUL, J.; MOO, Y. Poly(ethylene oxide)-poly(ethylene oxide)/ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: Thermo-responsive drug release behaviors, **Journal of Controlled Release**, 65: 345-358, 2000.

YOKOYAMA, M. Block copolymers as drug carriers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 9: 213-48, 1992.

YOKOYAMA, M. et al. Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size, **Journal of Controlled Release**, 55: 219– 229, 1998.

ZANETTI, M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. **Current Issues Molecular Biology**, 7: 179-196, 2005.

ZETASIZER NANO SERIE User Manual. England: Malvern instruments. 2004.

ZANETTI, M.; GENNARO, R.; ROMEO, D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Letters**, 374: 1-5, 1995.

ZHANG, J. et al. A Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Study of Quenching Reactions of Anthracene and 1,2-Benzanthracene by Carbon Tetrabromide and Bromoethane in Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of the American Chemical Society**, 119: 9980- 9991, 1997.

ZHAO, H. **Mode of action of antimicrobial peptides.** Academic Dissertation Helsinki Biophysics & Biomembrane Group - Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland. 2003.

ZHU, W. L. et al. Effects of Pro - Peptoid residue substitution on cell selectivity and mechanism of antibacterial action of tritryptic- amide antimicrobial peptide. **Biochemistry**, 45: 13007-13017, 2006.