

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)

Dissertação de Mestrado

Prospecção de segmentos proteicos membrano-ativos dependentes de pH encriptados no proteoma humano

João Gabriel Teixeira Lara Resende

Orientador: Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília, DF

2025

“Alguns afirmam ter visto asas quando a espada era erguida ao alto,
asas de determinação feroz que nunca conheceram a derrota”

AGRADECIMENTO

Inicialmente, devo começar agradecendo aos meus pais, Pedro e Déborah, por me proporcionarem toda a base necessária (escolar e familiar) para que eu chegasse até aqui. Não há coisa melhor do que ouvir “que orgulho de você, meu filho”, e eu continuarei lutando para dar a vocês todo o orgulho, e lhes proporcionar a melhor vida que possam ter, no que for ao meu alcance. Não menos importante, agradecer ao meu irmão João Vitor por todo o apoio durante meu crescimento, desenvolvimento e agora, nessa fase tão peculiar de nossas vidas. Por todos os altos e baixos que nossa família passou, no fim damos as mãos para enfrentar qualquer dificuldade e sabemos que podemos contar uns com os outros sempre.

Agradecer também aos meus avós, Eliana e Nelson, por mesmo de longe sempre me apoiarem e genuinamente se interessarem pelas coisas que faço. Aos meus falecidos avós Gilberto e Marisa, obrigado por serem tão bons comigo quando criança, suas memórias estão guardadas em meu coração. Espero que estejam orgulhosos daí de cima. A todos os meus tios, tias, primos e primas que são muitos para serem nomeados, meu mais sincero obrigado.

Aos meus amigos mais próximos, os “meninos e a Letícia” como me refiro a vocês para os outros. Letícia, Ninho, Vitor, Saud, Vini, Erik, Igor e Pedro Luca, não tenho palavras para dizer o quanto sou grato a vocês. Incontáveis horas de conversas, risadas, conselhos, falação de besteira, ou apenas de ouvidos às minhas reclamações, choros e lamentações. Todos esses momentos são lembrados e guardados com muito carinho. Um agradecimento especial ao Ninho, meu amigo de mais longa data, você é um irmão para mim, obrigado por tudo. A amizade de vocês é algo muito caro a mim, e quero tê-los ao meu lado pelo resto da vida.

À minha “panelinha” da época de escola, o “Picles e extensão”, meus mais sinceros agradecimentos. Mesmo nos vendo pouco, vocês ainda se mantêm tão presentes na minha vida, com as conversas sempre no o mesmo tom de diversão e carinho. É gratificante ver todos nós crescendo, seguindo caminhos tão diferentes e tendo tanto a contar quando nos encontramos.

A todos os amigos e amigas que conheci durante a graduação, em especial o Tiago, Beck e Matheus, pessoas maravilhosas que tenho o prazer de continuar dividindo muitas vivências e histórias até hoje, muito obrigado. Com certeza, contribuíram para que minha graduação e mestrado fossem mais leves e divertidos.

Aos meninos do Cabal, esse jogo que me deu e me tirou tanto, especialmente tempo e foco das coisas importantes, mas me deu amigos para a vida. Zeni, Luvas, Pharsa, Aszy, Noof e Pleka, diante de tantas brigas e risadas, a companhia de vocês sempre será algo que sentirei falta nos momentos áureos da

Adrenalina. Mesmo a guilda não existindo mais, ainda me apoiam sempre em todos os aspectos da minha vida.

Aos meus amigos da Biblioteca Nacional: Débora Mesquita, Débora Cristina, Débora Áurea, Flávio, Ian, China, Pipoca e Gabriel, mesmo nos conhecendo há tão pouco tempo, o convívio quase que diário nos aproximou muito. Vocês acompanharam de perto essa minha ideia maluca de fazer um mestrado e estudar para concursos ao mesmo tempo, sempre torcendo por mim. Obrigado por todo o apoio e carinho, as maratonas de estudo foram muito mais fáceis tendo vocês para poder sentar e conversar na hora do nosso "recreio".

Aos meus amigos e companheiros de laboratório do LSAB e LITMO, obrigado por todas as ajudas, dicas, risadas e conversas. Agradecimentos especiais ao João Bueno, Fernanda, Bruno, Alan, Tiago, Miguel, Rafael, Adolfo, Wendel, Samuel, Andrea, professor Ângelo, Adriana, Ana Gabriela, Amanda e Lucas, dividir com vocês a bancada e a salinha de estudos é um privilégio na minha formação. Peço perdão caso alguém não tenha sido citado nominalmente, minha memória falha, mas o carinho é igualmente distribuído. Cada um têm uma parte nesse trabalho.

Um agradecimento especial ao professor Dr. Guilherme Dotto, que além de orientador, posso chamar de amigo. Obrigado por sempre acreditar em mim, por depositar em minha pessoa a confiança de tocar projetos tão importantes, e por continuar me apoiando mesmo extrapolando prazos e ocasionalmente fazendo besteiras. Você é uma inspiração para mim não só como profissional, mas como pessoa. Sua ternura e paciência com os outros são ímpares, e eu sou muito grato por me permitir trabalhar contigo desde a graduação. Claro, não posso deixar de agradecer também as caronas e conversas sobre música e ciência.

Um caloroso obrigado a todos que me auxiliaram durante esse trabalho, em especial à Wanessa, Bruno, Miguel e todos do NuPMIA pela ajuda nas purificações e quantificações; à Dra. Izadora e professora Dra. Sônia Freitas e todos do Laboratório de Biofísica Molecular pelo auxílio e paciência para ensinar a técnica de dicroísmo circular, assim como confiar em mim o manuseio do equipamento; Dra. Karin Riske, Sinval e Dr. Alioscka da Universidade Federal de São Paulo pela parceria, disposição e auxílio na aquisição de dados de dicroísmo circular; Tais, Guilherme e professor Dr. Ramada do Laboratório de Análise de Biomoléculas pelo auxílio nos ensaios de MIC, e à Larissa do Laboratório de Toxicologia por sempre se prontificar a me ajudar com o SpeedVac.

Agradecer ao Instituto de Química e à Central Analítica, por todo o suporte e estrutura oferecidos para que minha pesquisa fosse realizada, assim como à Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio e financiamento para realização do meu mestrado.

Agradecer especialmente à professora Dra. Mariana por participar da banca avaliadora da minha qualificação, e à professora Dra. Aline e professores Dr. Gabriel e Dr. Eduardo por aceitarem participar da minha banca de defesa. Poder contar com a contribuições dos senhores e senhoras ao meu trabalho é um privilégio.

Agradecer à pessoa que esteve comigo durante uma boa parte da minha graduação e mestrado. Seu apoio, carinho e companheirismo durante esses anos não serão subestimados.

Por fim, e não menos importante, agradecer a mim mesmo por sempre persistir e seguir em frente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

ÍNDICE

ÍNDICE i
LISTA DE ABREVIAÇÕES iii
LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE TABELAS ix
RESUMO x
ABSTRACT xi
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Peptídeos membrano-ativos 1
1.1.1. CPPs 3
1.1.2. Amiloides 3
1.1.3. AMPs 5
1.2. IAPs: estratégia de busca de peptídeos membrano-ativos dentro de proteomas 9
1.2.1. HsIAPs: busca por peptídeos membrano-ativos no proteoma humano 11
1.3. Peptídeos catiônicos e anfifílicos: propriedades e aplicações 14
1.4. Peptídeos membrano-ativos aniônicos 18
1.4.1. Peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs) 18
1.4.2. Peptídeos aniônicos sensíveis ao pH: características e aplicações 22
2. OBJETIVOS 35
2.1. Objetivos gerais 35
2.2. Objetivos específicos 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.1. Obtenção de fragmentos de proteínas negativamente carregados 36
3.2. Síntese, purificação e quantificação dos peptídeos 36
3.2.1. Síntese de peptídeos em fase sólida 36
3.2.2. Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 38
3.2.3. Identificação dos peptídeos por espectrometria de massa 39
3.2.4. Quantificação por espectrofotometria ultravioleta-visível 40
3.3. Ensaios de interação de peptídeo com vesículas por dicroísmo circular 41
3.3.1. Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) 41
3.3.2. Construção de curvas de calibração e quantificação das LUVs por espectrofotometria UV-Vis 41
3.3.3. Dicroísmo circular 42

3.4. Estudos de atividade antimicrobiana: ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) ... 44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ... 46
4.1. Filtragem dos peptídeos ... 46
4.2. Primeira geração de HsIDPs: ... 49
4.2.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa ... 50
4.2.2. Dicroísmo circular ... 53
4.3. Segunda geração de HsIDPs ... 61
4.3.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa ... 64
4.3.2. Dicroísmo circular ... 68
4.4. Terceira geração de HsIDPs ... 74
4.4.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa ... 76
4.4.2. Dicroísmo circular ... 81
4.5. Ensaio de concentração mínima inibitória (MIC) ... 89
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS ... 90
6. REFERÊNCIAS ... 92
MATERIAL SUPLEMENTAR ... 108

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AAMP – Peptídeo antimicrobiano aniônico (anionic antimicrobial peptide)

AC – Adenilato ciclase

ACN – Acetonitrila

AMP – Peptídeo antimicrobiano (antimicrobial peptide)

ANTS – Ácido 1-aminonaftaleno-3,6,8-trisulfônico

APD3 – Base de dados de peptídeos antimicrobianos 3 (antimicrobial peptide database 3)

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CPP – Peptídeo penetrador de célula (cell-penetrating peptide)

DCM – diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DMF – N,N-dimetilformamida

DMPC – Dimiristoil fosfatidilcolina

DMPG – Dimiristoil fosfatidilglicerol

DMPS – Dimiristoil fosfatidilserina

DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DPX – Brometo de *p*-xileno-bis-piridínio

IAP – Peptídeos antimicrobianos intragênicos (intragenic antimicrobian peptides)

IDA – Aquisição dependente de informação (information dependente acquisition)

IDP – Peptídeos de entrega intragênicos (intragenic delivery peptides)

LC-MS – Espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida

LUV – Vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles)

MDR – Bactéria resiste a múltiplas drogas (multidrug-resistant bacteria)

MES – Ácido (2-(*N*-morfolino)etanosulfônico

MIC – Concentração inibitória mínima (minimal inhibitory concentration)

MLV – Vesícula multilamelar (multilamellar vesicles)

PBS – Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)

pHLIP – Peptídeo de inserção em pH baixo (pH-low insertion peptide)

PI – Ponto isoelétrico

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfatidilcolina

POPE – 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfatidiletanolamina

POPS – 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfatidilserina

SPPS – Síntese de peptídeos em fase sólida (solid-phase peptide synthesis)

TFA – Ácido trifluoroacético

TIS – Triisopropilsilano

UV-Vis – Espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível

TABELA DE AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: mapa de Edmundson demonstrando a estrutura em hélice do peptídeo Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS), ilustrando seu caráter anfifílico.

Figura 2: esquema ilustrando os principais processos de formação de fibrilas amiloides.

Figura 3: distribuição de peptídeos antimicrobianos por classificação de atividade.

Figura 4: ação do IAP de *G. max* gb|ABM17058.1|(213–231) frente à ferrugem asiática.

Figura 5: estrutura ilustrando o motivo com resíduos de aminoácidos do Hs10.

Figura 6: estrutura tridimensional das proteínas com HsIAPs.

Figura 7: mapa de Edmundson ilustrando a estruturação em α-hélice da magainina-2, melitina e LL-37.

Figura 8: modelos de ação de peptídeos membrano-ativos catiônicos e anfifílicos.

Figura 9: peptídeos membrano-ativos adsorvidos a uma bicamada fosfolipídica.

Figura 10: estrutura da daptomicina (R = n-decanoil), lipopeptídeo cíclico aniônico.

Figura 11: formação de complexos do peptídeo DCD-1L com Zn^{2+}, derivado da dermicidina.

Figura 12: estrutura transmembranar da hélice C da bacteriodopsina com duas sequências flanqueadoras, posteriormente batizado de wt-pHLIP

Figura 13: esquema representando os estados do pHLIP.

Figura 14: inserção de corante dansil conjugado ao C-terminal do pHLIP para o meio intracelular de forma pH dependente.

Figura 15: localização das cadeias laterais ácidas do wt-pHLIP em relação à bicamada fosfolipídica.

Figura 16: titulação de wt-pHLIP e análogos por fluorescência de Trp.

Figura 17: estruturação do pHLIP em diferentes composições de lipídeos.

Figura 18: efeito da composição da vesícula sobre o pK_{ins} do wt-pHLIP e de seu análogo P20G.

Figura 19: coordenação mediada por Ca^{2+} entre os grupamentos ácidos das cadeias laterais aniônicas do pHLIP e da fosfatidilserina.

Figura 20: espectros de dicroísmo circular de pHLIP em pH 8,0 para estudos de agregação.

Figura 21: método utilizado para purificação do peptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna de fase reversa.

Figura 22: perfis de absorção em experimento de dicroísmo circular de estruturas secundárias "puras" que podem ser adotadas por proteínas e peptídeos.

Figura 23: comparações de histogramas de propriedades físico-químicas.

Figura 24: histograma das classes de proteínas precursoras de IDPs.

Figura 25: estrutura tridimensional da AC9 complexada com subunidade α da proteína Gs (Gαs) em ciano com destaque em azul a estrutura RVLNELIGDFDELLSK correspondente ao HsIDP1.

Figura 26: cromatograma do HsIDP1 monitorado a 216 nm.

Figura 27: espectro de massa de dupla carga representando $[M+2H]^{2+}$ = 930,5179 Da e sua série isotópica, com um erro de massa de 2,69 ppm calculado a partir da massa teórica exata.

Figura 28: espectro de fragmentação (MS/MS).

Figura 29: espectros de dicroísmo circular do HsIDP1 DMPC, DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 30: espectro de dicroísmo circular do HsIDP1 em presença de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em valores de pH 7,4, 6,0 e 5,0.

Figura 31: espectros de dicroísmo circular de HsIDP1 em DMPC/DMPG 2:1 (m/m) com concentrações de vesícula de 0-1280 μM e diferentes valores de pH.

Figura 32: espectros de dicroísmo circular em pH 5,0, 6,0 e 7,4 de HsIDP1 em tampão, com DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 33: estruturas moleculares dos resíduos de aminoácidos carregados aspartato e glutamato, e de suas respectivas formas protonadas ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E).

Figura 34: estruturas tridimensionais e mapas de Edmundson dos peptídeos HsIDP2, HsIDP3 e HsIDP4.

Figura 35: cromatogramas dos HsIDPs de segunda geração, medidos em 216 nm de HsIDP2, HsIDP3 e HsIDP4.

Figura 36: espectros de massa dos HsIDPs de segunda geração.

Figura 37: espectro de fragmentação (MSMS) do HsIDP2.

Figura 38: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 614,6372 Da do HsIDP3.

Figura 39: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 670,3402 Da do HsIDP4.

Figura 40: espectro de dicroísmo circular do HsIDP2 na presença de vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 41: espectros de dicroísmo circular do HsIDP3 em tampão e na presença de vesículas compostas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 42: comparação entre as estruturas secundárias folha-β, hélice poliprolina II ou PPII e α-hélice.

Figura 43: espectros de dicroísmo circular do HsIDP4 na presença de tampão, vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 44: estruturas tridimensionais e mapas de Edmundson dos peptídeos HsIDP5 e HsIDP6.

Figura 45: esquema demonstrando o mapa de Edmundson do HsIDP1 e de seus análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2.

Figura 46: cromatogramas dos peptídeos de terceira geração, apresentando o HsIDP5, HsIDP6, HsIDP1.1 e HsIDP1.2.

Figura 47: espectros de massa dos peptídeos da terceira geração, seguidos de suas séries isotópicas.

Figura 48: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 896,9995 Da do HsIDP5.

Figura 49: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 1008,0550 Da do HsIDP6.

Figura 50:

Figura 51: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 620,3594 Da do HsIDP1.2.

Figura 52: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP5 em tampão e com vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 53: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP6 em tampão e com vesículas d DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 54: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP1.1 em tampão e com vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

Figura 55: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP1.2 em tampão e com vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: dados de jan/2024 sobre peptídeos com atividade antimicrobiana de origem natural.

Tabela 2: peptídeos membrano-ativos exemplificados, com suas sequências, carga líquida e tipo de atividade frente a membranas.

Tabela 3: AAMPs derivados de *X. laevis*, suas sequências de aminoácidos, organismos que possuem atividade contra e referências.

Tabela 4: gradientes de concentração da fase móvel para purificação dos peptídeos por CLAE.

Tabela 5: peptídeos encriptados aniônicos obtidos através do software *Kamal*, após filtragem com parâmetros previamente mencionados, com suas cargas, ponto isoelétrico e proteína origem.

Tabela 6: peptídeos escolhidos para a segunda geração de HsIDPs, com suas sequências, cargas, pontos isoelétricos, hidrofobicidade e momento hidrofóbico.

Tabela 7: peptídeos escolhidos para a terceira geração de HsIDPs, com suas sequências, cargas, pontos isoelétricos e hidrofobicidade.

RESUMO

Peptídeos membrano-ativos são classificados em três grandes famílias: peptídeos penetradores de células (CPPs), amiloides e peptídeos antimicrobianos (AMPs). Embora muitos desses peptídeos apresentem cargas positivas, as famílias de peptídeos membrano-ativos com cargas negativas despertam interesse especial. Um exemplo notável é o pHLIP, conhecido por sua capacidade de atuar seletivamente em ambientes ácidos, como os encontrados em tumores. Inspirados por esses estudos, buscou-se identificar peptídeos sensíveis ao pH no proteoma humano, utilizando o software Kamal para filtrar sequências com características aniônicas e anfifílicas, capazes de se estruturar em α-hélice. Dessa forma, foram desenvolvidos os peptídeos intragênicos aniônicos de entrega (HsIDPs), em alusão aos HsIAPs, previamente estudados pelo grupo de pesquisa do laboratório. Esses peptídeos foram investigados quanto às suas interações com membranas por meio de ensaios de dicroísmo circular, utilizando vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m), em diferentes valores de pH. O peptídeo HsIDP1, o primeiro a ser sintetizado, demonstrou atividade dependente do pH, adquirindo estrutura secundária apenas em ambiente ácido e na presença de vesículas aniônicas. Com o objetivo de aprofundar a compreensão dos efeitos das propriedades físico-químicas na atividade desses peptídeos, duas gerações adicionais de HsIDPs foram sintetizadas, incluindo cinco novas sequências e dois análogos do HsIDP1. Os estudos com essas novas moléculas revelaram que a sensibilidade ao pH e a seletividade pela composição da membrana dependem de um delicado equilíbrio entre as características físico-químicas dos peptídeos. Dentre eles, o HsIDP1 e seus análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2 destacaram-se como promissores, exibindo formação de estrutura secundária de maneira dependente do pH e de forma diferencial em vesículas de DMPC/DMPG. Esses peptídeos serão submetidos a ensaios com células tumorais para avaliação de sua atividade in vitro. Por fim, os resultados obtidos demonstram que o proteoma humano é uma fonte viável de peptídeos sensíveis ao pH e seletivos a membranas aniônicas.

Palavras-chave: peptídeos aniônicos membrano-ativos; dicroísmo circular; Peptídeos Intragênicos de Entrega; dependência de pH.

ABSTRACT

Membrane-active peptides are classified into three major families: cell-penetrating peptides (CPPs), amyloids, and antimicrobial peptides (AMPs). Although many of these peptides exhibit positive charges, membrane-active peptide families with negative charges are of particular interest. A notable example is pHLIP, known for its ability to act selectively in acidic environments, such as those found in tumors. Inspired by these studies, we sought to identify pH-sensitive peptides in the human proteome using the Kamal software to filter sequences with anionic and amphiphilic characteristics capable of forming α-helical structures. From this approach, anionic intragenic delivery peptides (HsIDPs) were developed, a nomenclature that references HsIAPs, previously studied by the laboratory's research group. These peptides were investigated for their interactions with membranes through circular dichroism assays using DMPC and DMPC/DMPG 2:1 (m/m), at different pH values. HsIDP1, the first peptide to be synthesized, demonstrated pH-dependent activity, acquiring secondary structure only in acidic conditions and in the presence of anionic vesicles. To further understand the effects of physicochemical properties on the activity of these peptides, two additional generations of HsIDPs were synthesized, including five new sequences and two analogs of HsIDP1. Studies with these new molecules revealed that pH sensitivity and selectivity for membrane composition depend on a delicate balance between the physicochemical characteristics of the peptides. Among them, HsIDP1 and its analogs HsIDP1.1 and HsIDP1.2 stood out as promising, exhibiting pH-dependent secondary structure formation and differential behavior in DMPC/DMPG vesicles. These peptides will be subjected to assays with tumor cells to evaluate their in vitro activity. In conclusion, the results demonstrate that the human proteome is a viable source of pH-sensitive peptides selective for anionic membranes.

Keywords: membrane-active anionic peptides; circular dichroism; intragenic delivery peptides; pH dependence.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos são cadeias formadas por unidades monoméricas chamadas aminoácidos, conectadas através de ligações amídicas conhecidas como ligações peptídicas, caracterizadas pela união entre um grupo amina e um grupo carboxila. Eles podem ser encontrados em uma ampla variedade de organismos e desempenham diversas funções biológicas, incluindo, mas não se limitando, atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, sinalizadora (hormonal) e outras relacionadas à função imunológica (FORBES; KRISHNAMURTHY, 2024).

A vasta gama de estruturas primárias possíveis combinada com a diversidade de polaridade e carga dos aminoácidos confere aos peptídeos uma variedade de atividades biológicas. Muitas dessas atividades são determinadas por sua estrutura secundária, hidrofobicidade e distribuição de cargas. Algumas dessas moléculas podem apresentar múltiplas atividades, como no caso das encontradas dentro de proteínas presentes no leite bovino, variando desde ações imuno e citomodulatórias, opioide, inibidores de enzima conversora de angiotensina e ligantes de minerais (MEISEL, 2004).

Vale notar que as características físico-químicas de um peptídeo nem sempre serão associadas a um único tipo de atividade, mas frequentemente influenciam seu comportamento, como é o caso dos peptídeos membrano-ativos.

1.1. Peptídeos membrano-ativos

Peptídeos com capacidade de atuar frente a membranas plasmáticas são denominados de peptídeos membrano-ativos (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013). Existem três grandes famílias dentro desse grupo: os peptídeos penetradores de células (CPPs), os amiloides e os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013). Apesar de todos interagirem com membranas celulares, suas atividades diferem significativamente, variando entre perturbação da membrana, atravessá-la por completo ou residir em seu interior, fusionando com os fosfolipídeos que a constituem (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018). Ademais, alguns desses peptídeos são capazes de agir seletivamente em membranas negativamente carregadas, como a de procariotos.

Alguns dos atrativos por trás do estudo de peptídeos membrano-ativos estão na tentativa de melhor compreensão e descoberta de tratamentos de doenças neurodegenerativas (DOBSON; KNOWLES; VENDRUSCOLO, 2020), cânceres (NOROUZI; MIRMOHAMMADI; HOUSHDAR TEHRANI, 2022), melhoria na eficiência

de diversos tratamentos a base de fármacos (AGRAWAL et al., 2016) e combate de organismos resistentes a antibióticos (HUAN et al., 2020).

Conforme mais exemplares peptídicos foram sendo estudados, alguns motivos comuns passaram a ser notados e muito ponderou-se quanto a relação entre tais motivos e as atividades apresentadas. Peptídeos membrano-ativos são frequentemente anfifílicos, relativamente curtos (<50 aminoácidos), e desestruturados quando em solução, porém adquirem uma estrutura secundária quando em presença de membranas lipídicas. Existem algumas exceções, como nos casos de poliargininas e peptídeos cíclicos capazes de penetrar células (KABELKA; VÁCHA, 2021; LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013; MAGZOUB; GRÄSLUND, 2004).

A característica de anfifilicidade é, provavelmente, uma das principais para que haja a interação entre o peptídeo e a membrana. Isso se dá por permitir que a porção hidrofílica se mantenha em contato com o solvente e as cabeças polares que abrigam os fosfatos carregados dos fosfolipídeos, enquanto a face hidrofóbica encontra-se "enterrada" no interior da membrana, buscando interação com as cadeias lipídicas apolares (HUANG, 2006). Em nosso grupo de pesquisa, peptídeos membrano-ativos anfifílicos catiônicos como o Hs02 (Figura 1) são explorados com finalidade de entender melhor suas propriedades frente às membranas celulares de procariotos e eucariotos, assim como modulação de vias inflamatórias a partir de interações com lipopolissacarídeos (BRAND et al., 2019).

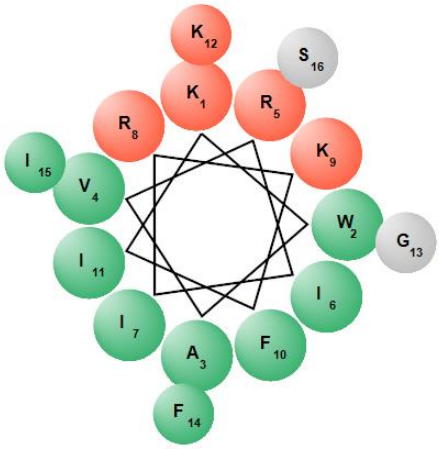


Figura 1: mapa de Edmundson demonstrando a estrutura em hélice do peptídeo Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS), ilustrando seu caráter anfifílico. Estruturas em círculos representam aminoácidos identificados por códigos de uma letra. Aminoácidos em verde: apolares. Em vermelho: polares carregados positivamente. Em cinza: polares não carregados (BRAND et al., 2019).

1.1.1. CPPs

Atualmente, classificam-se como CPPs os peptídeos capazes de penetrar a membrana plasmática e alcançar o meio intracelular com alta eficiência e pouca citotoxicidade associada (MAGZOUB; GRÄSLUND, 2004). Tal atividade permite o transporte e internalização celular de moléculas conjugadas como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, moléculas hidrofílicas e nanopartículas que, caso contrário, seriam incapazes de ultrapassar a membrana celular. Contudo, ultimamente tem se atribuído o mesmo título aos peptídeos que conseguem apenas atravessar a membrana, sem necessariamente apresentarem capacidade de carreamento de moléculas conjugadas (HENRIQUES; MELO; CASTANHO, 2007).

Peptídeos penetradores possuem como características comuns curta sequência (não mais que 35 aminoácidos), sendo solúveis em água e em geral catiônicos, apesar de, recentemente, terem sido sintetizados peptídeos penetradores com cargas negativas, podendo ser ou não anfifílicos (KALAFATOVIC; GIRALT, 2017; MAGZOUB; GRÄSLUND, 2004). Os primeiros representantes dessa classe a serem descobertos foram os peptídeos TAT (GRKKRRQRRRPQ) e penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK), ambos derivados de fragmentos de proteínas nativas e extensivamente estudados até hoje, servindo também como uma base para a racionalização de novas sequências em busca de melhores capacidades de penetração, eficiência de escape de endossomos, resistência a proteólise e especificidade de alvos (KALAFATOVIC; GIRALT, 2017).

Os mecanismos de translocação de membranas pelos CPPs podem variar de meios endocitóticos dependentes de energia a translocação direta independente de energia. O mecanismo está sujeito não só a fatores físico-químicos do peptídeo como quantidade de cargas e número de resíduos de amino ácidos, mas também do tipo de carregamento que está sendo translocado, da composição lipídica da membrana, força iônica do meio e temperatura (KABELKA; VÁCHA, 2021; KAUFFMAN et al., 2015; NEVES-COELHO et al., 2017).

1.1.2. Amiloides

Amiloides são agregados fibrilosos de folhas-β derivados de proteínas naturais do organismo, conhecidas como proteínas amiloidogênicas, originalmente solúveis em água (BUTTERFIELD; LASHUEL, 2010). Doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II e esclerose lateral amiotrófica compartilham da presença dessas fibrilas nos tecidos afetados (NGUYEN et al., 2021). O processo de formação dos amiloides inicia-se com a concepção de oligômeros de folhas-β

das proteínas (fase lenta), formação de protofibrilas flexíveis e curtas, com posterior amadurecimento, alongamento e consolidação da fibrila de estrutura insolúvel (fase rápida), ficando essa em equilíbrio com os monômeros ainda em solução (MEISL et al., 2018; REISS et al., 2018).

Estudos mostram que proteínas amiloidogênicas iniciam o processo de formação das fibrilas através de dois modos: nucleação primária e secundária (Figura 2b). A nucleação primária é dirigida por interações com membranas fosfolipídicas, ao agirem como uma espécie de catalisador permitindo que a conformação necessária para interação inicial dos monômeros de peptídeos aconteça com mais frequência do que quando livres em solução (Figura 2a). A nucleação secundária necessita da existência prévia de fibrilas maduras e alongadas, que podem se fragmentar e fornecer uma "semente" para outros monômeros ou oligômeros desordenados crescerem em fibrilas rígidas, pulando a fase lenta de formação de protofibrilas e oligômeros não ordenados (Figura 2c) (BUTTERFIELD; LASHUEL, 2010; NGUYEN et al., 2021; ZEINEDDINE; YERBURY, 2015).

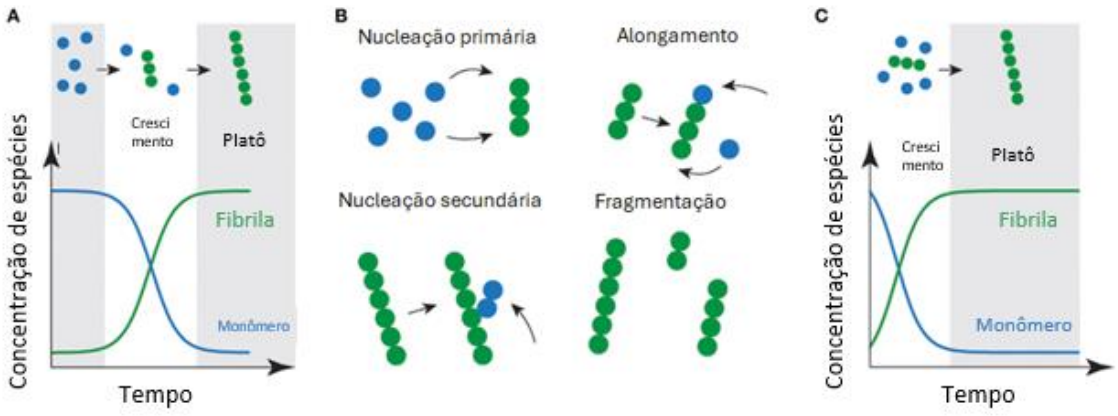


Figura 2: esquema ilustrando os principais processos de formação de fibrilas amiloides. (a) formação de fibrilas a partir de nucleação primária, a qual é iniciada pela agregação de monômeros de fragmentos amiloidogênicos, constituindo a fase lenta, para então formação de oligômeros ordenados e amadurecimento em fibrilas. (b) comparação entre os tipos de nucleação. (c) formação de fibrilas por nucleação secundária, a partir de fragmentos de estruturas previamente formadas, servindo como um "modelo" de estruturação. Adaptado de (ZEINEDDINE; YERBURY, 2015)

Galvagnion et al. (2015) ao estudarem a α-sinucleína – proteína de 14 kDa capaz de agregar e formar fibrilas, associada ao aparecimento da doença de Parkinson – demonstram que a nucleação e formação dos oligômeros só é iniciada após um valor crítico da razão das concentrações de lipídeo e proteína, uma vez

que em valores mais altos ([vesículas] > [proteína]), toda a α-sinucleína presente em solução está associada com a membrana e adota majoritariamente a estrutura de α-hélice. Outros estudos mostram que esse comportamento não é exclusivo da α-sinucleína, mas também de outros peptídeos capazes de formar estruturas amiloides como amiloide-β (BOKVIST et al., 2004) e IAPP (*islet amyloid polypeptide*) (WILLIAMSON; LORIA; MIRANKER, 2009). Antagonicamente, em valores menores que a razão crítica, a presença de moléculas em solução facilita a formação das fibrilas por nucleação primária (GALVAGNION et al., 2015). É importante notar que a capacidade de formar estas estruturas não é característica única de uma classe específica de proteínas como as envolvidas nas doenças anteriormente citadas, mas sim um motivo comum de uma série de peptídeos quando em situações adequadas para tal, sendo a penetratina um dos exemplos (DOBSON; KNOWLES; VENDRUSCOLO, 2020; MAGZOUB; GÖRAN ERIKSSON; GRÄSLUND, 2002). Condições como a razão das concentrações de vesículas e lipídeos, densidade de cargas negativas na membrana e força iônica do meio afetam a capacidade de agregação de peptídeos (GALVAGNION et al., 2015; MAGZOUB; GÖRAN ERIKSSON; GRÄSLUND, 2002).

Trabalhos acerca da toxicidade da amiloide-β (Aβ) – fragmento da proteína precursora de amiloide (APP) presente em membranas de neurônios, estando associado com o desenvolvimento da doença de Alzheimer – indicam que a severidade da doença (decadência cognitiva e morte neural) está atrelada à ação de oligômeros solúveis, e não às unidades monoméricas ou fibrilas maduras (REISS et al., 2018). A ação tóxica está relacionada à interação e capacidade de inserção em membranas plasmáticas, com uma das consequências a viabilização da formação de poros capazes de desestabilizar o equilíbrio neuronal de Ca^{2+}, ao permitir o fluxo desse e outros íons de maneira desenfreada e impedindo o correto funcionamento da célula (BUTTERFIELD; LASHUEL, 2010; SEPÚLVEDA et al., 2014). Além disso, causam desestabilização e afinamento da membrana, além de provocar estresse oxidativo por diferentes mecanismos (GUNN et al., 2016).

1.1.3. AMPs

O surgimento de organismos resistentes a antibióticos está se tornando um problema cada vez mais preocupante para as principais agências de saúde em todo o mundo (CESARO et al., 2022). Estima-se que, nas próximas décadas, as mortes causadas por bactérias resistentes a antibióticos estejam entre as principais causas de óbito (MAZURKIEWICZ-PISAREK; BARAN; CIACH, 2023). O uso indiscriminado de antibióticos na medicina, agricultura e pecuária tem contribuído para o surgimento de variantes de bactérias resistentes aos medicamentos mais

utilizados (HUAN et al., 2020). Bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDRs – multidrug-resistant bacteria) desenvolveram mecanismos que lhes permitem escapar da ação dos antibióticos clássicos. Estes mecanismos incluem a desinibição de enzimas envolvidas na desativação dos antibióticos, a presença de bombas de efluxo que removem os fármacos do meio intracelular e a alteração dos sítios clássicos de reconhecimento (DAVIES; DAVIES, 2010; LI et al., 2021; WALSH, 2000). A partir desse cenário, AMPs surgem como uma das promessas para o combate de MDRs, uma vez que sua atividade envolve a permeação e desequilíbrio de membranas, dificultando aquisição de resistência, diferentemente de antibióticos químicos convencionais (MA et al., 2020). Com isto, são a família com maior número de estudos dentre peptídeos membrano-ativos (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018).

Peptídeos antimicrobianos podem ser classificados de acordo com sua origem, atividade e estrutura adotada. Existe também um grupo específico composto por peptídeos ricos em um aminoácido específico (HUAN et al., 2020). A Tabela 1 apresenta peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados dentro dos 6 reinos da vida, conforme disposto na Base de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (APD3 – Antimicrobial Peptides Database 3, disponível em https://aps.unmc.edu), com dados coletados até janeiro de 2024 (WANG; LI; WANG, 2016). Esses peptídeos, dentro de cada organismo onde são encontrados, fazem parte do sistema imune inato atuando como primeira linha de defesa contra infecções causadas por agentes exógenos (BARDAN; NIZET; GALLO, 2005). Estima-se que o primeiro peptídeo com atividade antimicrobiana de origem natural tenha sido descoberto em 1939 por René Dubois: a Gramicidina. Antibiótico de origem procariótica, foi isolada a partir de *Bacillus brevis* e demonstrou atividade contra a maioria das bactérias Gram-positivas testadas na época (EPPS, 2006; MAZURKIEWICZ-PISAREK; BARAN; CIACH, 2023).

Tabela 1: dados de jan/2024 sobre peptídeos com atividade antimicrobiana de origem natural (disponível em https://aps.unmc.edu).

AMPs de origem natural			
Tipo celular	**Reino**	**Quantidade**	**Total**
Procariotos	Archaea	5	3138
	Monera	383	
Eucariotos	Animalia	2463	
	Plantae	250	
	Fungi	29	
	Protista	8	

Dentre mamíferos, defensinas e catelicidinas são famílias de AMPs que recebem grande destaque. Inicialmente, defensinas foram identificadas a partir de extratos de leucócitos polimorfonucleares de coelhos e porquinhos-da-índia, e logo chamaram atenção por apresentarem abrangente atividade contra micro-organismos (ZEYA; SPITZNAGEL, 1963). Posteriormente, passaram a ser encontradas em diversos vertebrados, apresentando estruturas secundárias semiconservadas que resultaram na divisão em 3 famílias: α, β e θ-defensinas, em que apenas as duas primeiras são encontradas no organismo humano, enquanto a última é exclusiva de macacos Rhesus (ADYNS; PROOST; STRUYF, 2023; GANZ, 2003). Com isto, estima-se que há um precursor comum do gene dessas defensinas, por apresentarem-se em uma série de vertebrados com estrutura de gene similar, apesar de em invertebrados e plantas existirem sequências com estruturas e atividades semelhantes, que acabaram recebendo o mesmo nome (GANZ, 2003).

As catelicidinas derivam de uma pré-pró-proteína que possui uma porção N-terminal altamente conservada conhecida como catelina, devido à sua sequência ser idêntica à de uma protease suína com o mesmo nome. A porção C-terminal, variável entre diferentes organismos, contém a fração com atividade antimicrobiana (WANG et al., 2019). Em humanos, há apenas um gene que codifica uma catelicidina, produzindo o peptídeo LL-37. Este peptídeo, expresso em uma variedade de tecidos, possui uma estrutura helicoidal e caráter anfifílico. O LL-37 demonstra atividade contra fungos, bactérias resistentes, biofilmes e vírus, além de atuar como sinalizador de dano celular e tecidual, destacando a gama de possíveis atividades de AMPs (DÜRR; SUDHEENDRA; RAMAMOORTHY, 2006; KOŚCIUCZUK et al., 2012; VANDAMME et al., 2012).

Segundo a APD3, dos peptídeos encontrados em animais, 1079 são derivados de anfíbios, tornando-os uma importante fonte para a descoberta de novas moléculas e realização de estudos sobre os mecanismos de ação contra bactérias. Anfíbios mantêm uma produção e secreção constante de peptídeos bioativos em suas peles mesmo em estado de repouso e fora de perigo iminente, em concentração suficientemente capaz de inibir o crescimento de zoósporos de alguns micro-organismos (RAMSEY et al., 2010). Isso ocorre porque o ambiente em que vivem e a necessidade constante de manter suas peles hidratadas os expõem continuamente a perigos provenientes de agentes exógenos, condições que podem ter sido definitivas para o desenvolvimento do complexo arsenal de moléculas bioativas que esses animais possuem (ROLLINS-SMITH, 2023). Os extratos da pele ventral de *Xenopus laevis* foram a fonte dos primeiros AMPs descobertos em anfíbios, pertencentes à família das magaininas, devido à sua semelhança estrutural. A magainina-II (Mag2), um peptídeo de 23 aminoácidos que adota uma estrutura helicoidal ao interagir com membranas (BECHINGER; ZASLOFF; OPELLA,

1993), destacou-se especialmente por sua atividade inibitória contra uma ampla variedade de bactérias (ZASLOFF, 1987).

A racionalização de novas sequências ou a modificação de AMPs conhecidos com notória atividade e baixa citotoxicidade têm sido estratégias amplamente utilizadas. Dessa forma, surgiram grupos de miméticos, híbridos e congêneres de AMPs, além de AMPs estabilizados, conjugados e imobilizados (BROGDEN; BROGDEN, 2011). Peptídeos como magainina-II (HAYASHI et al., 2022), gomesina (HENRIQUES et al., 2017) e melitina (GUHA et al., 2021) são alguns dos exemplos de peptídeos que ocorrem naturalmente e que podem ser aplicados como modelos para modificações.

A classificação de AMPs quanto à atividade vai além de atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Um total de 18 categorias são disponibilizadas pelo APD3, podendo ser resumidas em antiviral, anti-HIV, antibacteriana, antifúngico, antiparasita e anticâncer (Figura 3) (HUAN et al., 2020). Peptídeos antibacterianos representam mais de 60% de todos os AMPs, provavelmente devido ao maior interesse da comunidade científica em explorar alternativas para o tratamento de infecções bacterianas. É comum que peptídeos membrano-ativos apresentem mais de um tipo de atividade, permitindo que um mesmo peptídeo possa estar incluso em mais de uma categoria.

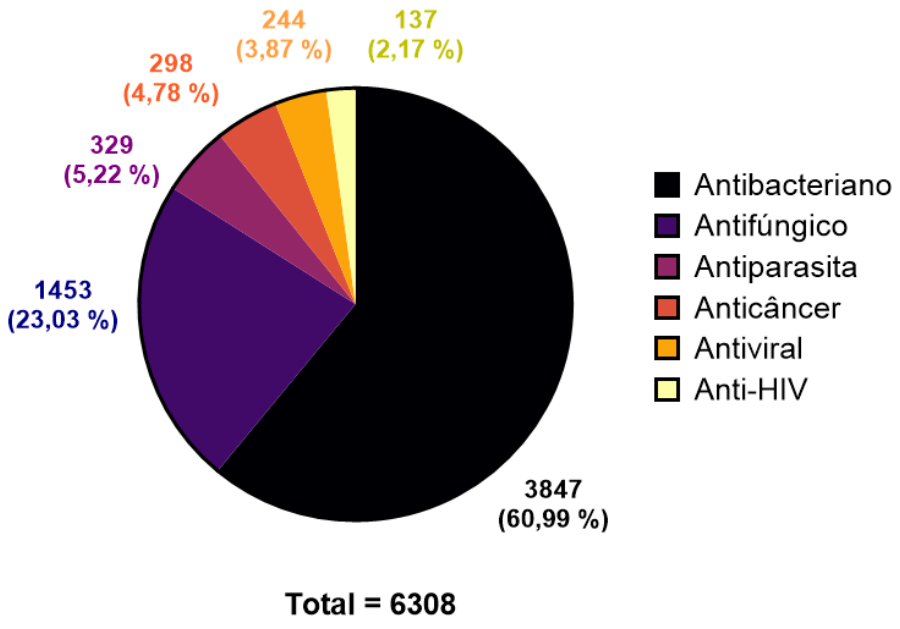


Figura 3: distribuição de peptídeos antimicrobianos por classificação de atividade. Dados compilados até jan/2024 e retirados do APD3 (disponível em: https://aps.unmc.edu)

Dentre as atividades apresentadas, destaca-se a atividade anticâncer de alguns peptídeos antimicrobianos. Estes peptídeos podem apresentar essa atividade devido à similaridade das cargas nas membranas plasmáticas de bactérias e células cancerosas (BARRETO-SANTAMARÍA; PATARROYO; CURTIDOR, 2019; TORNESELLO et al., 2020). As membranas plasmáticas de bactérias são ricas em fosfatidilglicerol (PG), um fosfolipídeo aniônico, enquanto as células cancerosas possuem membranas ricas em fosfatidilserina (PS), que também é de caráter aniônico (TORNESELLO et al., 2020). Por outro lado, as membranas das células eucarióticas saudáveis são assimétricas em termos de distribuição de fosfolipídeos. Na face externa, há predominância de fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM), ambos de caráter zwitteriônico, enquanto na face interna (ou citoplasmática) predominam principalmente fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (PE), de caráter aniônico e zwitteriônico, respectivamente (NAGATA et al., 2016). A perda da assimetria natural da bicamada da célula ocorre pelo seu desregulamento, expondo moléculas de PS para o meio externo, fenômeno causado por hipóxia e reoxigenação (contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio), citocinas (TNF-α e IL-1 principalmente), trombina e acidez do meio (RAN; DOWNES; THORPE, 2002).

Quanto às possíveis estruturas adotadas, os peptídeos podem se apresentar como α-hélices, folhas-β (duas ou mais ligações dissulfeto), grampo β (uma ligação dissulfeto), cíclicos (ligação dissulfeto nas extremidades, sem C- ou N-terminal) ou em forma linear estendida. A estrutura adotada é determinada pela sequência de aminoácidos presentes. Por exemplo, as estruturas de folhas e grampos β dependem da existência de ligações dissulfeto a partir de cisteínas (BOPARAI; SHARMA, 2019). Além disso, a formação de α-hélices pode ser influenciada por aminoácidos estabilizadores (como Ala e pares iônicos a distâncias adequadas) e desestabilizadores (como Pro e Gly) (NELSON; COX; HOSKINS, 2022).

1.2. IAPs: estratégia de busca de peptídeos membrano-ativos dentro de proteomas

Enquanto alguns dos peptídeos participantes do sistema de defesa do organismo são secretados já em sua forma ativa, outros são encontrados dentro de precursores maiores, permanecendo em sua forma latente. Um exemplo é a catelicidina LL-37, já mencionada anteriormente, que está contida dentro de uma pré-pró-proteína. Peptídeos com tais características são nomeados de peptídeos encriptados (ou *cryptides*), por estarem integrados dentro de sequências proteicas, podendo ter atividade biológica *in vivo* diferente ou relacionada à proteína parental (IAVARONE et al., 2018). Para serem liberados, necessitam de um estímulo prévio

que gere uma cascata de sinalização permitindo a quebra da cadeia precursora por hidrólise, ação proteolítica de micro-organismos ou ação enzimática (KASETTY et al., 2011; LEMES et al., 2016; LIEPKE et al., 2003). Peptídeos encriptados podem surgir de diversas fontes, como alimentos ricos em proteína provenientes de plantas e animais, juntamente com insetos, anfíbios e vida marinha (LEMES et al., 2016; RAMADA et al., 2017).

Iavarone et al., classificaram os peptídeos encriptados em três diferentes classes: I) detectados *in vivo* com função diferente de seu precursor, II) detectados *in vivo* com atividade relacionada, mas não idêntica à de seu precursor e III) gerados *in vitro* por digestão enzimática de proteínas que podem ou não existir *in vivo* (IAVARONE et al., 2018). Uma nova perspectiva na busca por peptídeos encriptados começou a ser explorada por Brand et al., ao pesquisar sequências com provável atividade antimicrobiana dentro de proteomas inteiros de organismos, considerando proteínas maiores que não tinham relação alguma com a atividade frente a agentes exógenos (BRAND et al., 2012). Isso trouxe uma mudança na abordagem de busca por peptídeos encriptados, passando a considerar não apenas a existência desses peptídeos após uma proteólise enzimática, mas também o potencial de fragmentos internos de proteínas de diversas fontes serem membrano-ativos (COSTA et al., 2024). A lógica se fundamenta em aproveitar a vasta biblioteca de proteomas dos organismos para identificar sequências supostamente membranoativas. Com isso, há de se falar em uma quarta classe: peptídeos bioativos que, em sua maioria, não existem em meio biológico como cadeias polipeptídicas separadas de suas proteínas precursoras (COSTA et al., 2024).

Utilizando características físico-químicas comuns de AMPs naturais, os pesquisadores alimentaram esses parâmetros em conjunto com sequências de proteínas disponíveis em bases de dados públicos para obter fragmentos proteicos com presumida atividade antimicrobiana, calculada por meio de algoritmos computacionais utilizando o *software* Kamal (BRAND et al., 2012, 2019; RAMADA et al., 2017). Por serem provenientes do proteomas, são conhecidos como peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs – intragenic antimicrobial peptides).

O IAP gb|ABM17058.1|(213–231), fragmento da enzima D-mio-inositol 3-fosfato-sintetase é um dos pioneiros desse grupo de peptídeos, com forte atividade inibitória para *Phakopsora pachyrhizi*, o fungo causador da ferrugem asiática que assola a principal espécie de soja cultivada no Brasil (Figura 4) (BRAND et al., 2012; GODOY et al., 2016). Este achado marcou o início de um promissor caminho para a prospecção de AMPs empregando essa metodologia.



Figura 4: ação do IAP de *G. max* gb|ABM17058.1|(213–231) frente à ferrugem asiática. Mudas de *G. max* com um vetor que codifica o IAP (linhagens 72.14.5 e 72.14.9) e controle (wt/+) foram borrifadas com esporos de *P. pachyrhizi*.

Estudos subsequentes, como o de Ramada et al., encontraram IAPs em proteínas de *T. cacao*, *A. thaliana* e *G. raimondii*, com alguns deles apresentando atividade antimicrobiana em concentrações similares a DS01 (BRAND et al., 2002) e Asc-8 (CONLON et al., 2004), dois AMPs oriundos de anfíbios (RAMADA et al., 2017). Ao estudar a estrutura secundária dos IAPs na presença de vesículas unilamelares grandes (LUVs – large unilamellar vesicles) utilizando a técnica de dicroísmo circular, observou-se que alguns já se apresentavam como α-hélices em solução, com a adição de vesículas promovendo um maior avanço na estruturação. As vesículas eram compostas por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoil fosfatidilcolina/dimiristoil fosfatidilglicerol 2:1 (m/m) (DMPC:DMPG), servindo como modelos para mimetizar membranas celulares de eucariotos e procariotos, respectivamente. A estruturação em α-hélice está relacionada com a capacidade de perturbação da membrana apresentada por esses peptídeos (BRAND et al., 2018a).

1.2.1. HsIAPs: busca por peptídeos membrano-ativos no proteoma humano

Em trabalhos mais recentes, a busca por peptídeos encriptados passou a abranger também o proteoma humano, resultando na identificação dos HsIAPs (peptídeos intragênicos antimicrobianos de *Homo sapiens*). Seguindo a mesma abordagem de estudos anteriores, o proteoma humano foi filtrado utilizando uma série de características físico-químicas através do *software* Kamal, retornando sequências com características catiônicas e anfifílicas que, supostamente, se estruturariam em α-hélices ao adsorverem em membranas biológicas. Inicialmente, quatro sequências foram escolhidas para avaliação (BRAND et al.,

2019). Dentre elas, o Hs02 (Figura 1) obteve maior destaque ao apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como leveduras, inibindo o crescimento desses organismos em concentrações na ordem de 1 a 10 μM. A atividade hemolítica foi observada em concentrações de 10 a 100 vezes maiores do que as usadas nos testes inibitórios. Além disso, o peptídeo também demonstrou atividade moduladora de mediadores de inflamação causada por lipopolissacarídeos (BRAND et al., 2019).

Em uma tentativa de entender alguns padrões, como a possível super-representação de determinadas classes de proteínas como fonte de potenciais HsIAPs, foi observado que proteínas transmembranares, proteínas periféricas à membrana celular e proteínas envolvidas no processo de fusão de lipossomos apresentavam uma maior quantidade de potenciais IAPs com estrutura α-helicoidal (COSTA et al., 2024). Peptídeos de ambas as fontes foram sintetizados, apresentando similaridade na atividade antibacteriana e anticâncer. Isto sugere que, embora haja uma super-representação de IAPs oriundos de proteínas transmembranares, a origem dos peptídeos não implica necessariamente em um maior potencial para as atividades testadas (COSTA et al., 2024).

Um outro grupo, ao estudar fragmentos oriundos de estruturas proteicas maiores, encontraram atividade antibacteriana e promoção da redução no volume de biofilmes. Esses AMPs, derivados da Apolipoproteína B humana, também demonstraram sinergismo com antibióticos clássicos que interagem com a membrana plasmática das bactérias, assim como mostraram uma atuação aditiva com antibióticos que inibem a síntese proteica. Ademais, a terapia combinada reduziu substancialmente a concentração mínima inibitória tanto do antibiótico quanto do peptídeo, além de diminuir o tempo necessário para o peptídeo matar a bactéria, de 1 a 3 horas para apenas 10 minutos (CESARO et al., 2022).

Atividade antimicrobiana não é exclusiva de peptídeos estruturados em α-hélices. Um exemplo clássico são as defensinas, que se diferenciam em α, β e θ-defensinas com base nas posições das ligações dissulfeto, o que altera a conformação de folha-β adotada (ADYNS; PROOST; STRUYF, 2023). Com isso, a estratégia de prospecção de IAPs foi adaptada por Santos et al. para o estudo de peptídeos intragênicos catiônicos curtos com potencial atividade antimicrobiana, estruturados como folha-β. O padrão ocorre através de repetições de aminoácido hidrofílicos (h) e hidrofóbicos (H), adotando uma sequência semelhante a HhHhHh (Figura 5) (SANTOS et al., 2023a). Cinco IAPs foram sintetizados, dos quais três apresentaram atividade antimicrobiana. Um deles, batizado de Hs10 (KFDLKVTIK-NH_2) e proveniente do componente complementar da proteína humana C3 (Figura 6b), mostrou-se seletivo para bactérias Gram-negativas devido à sua estruturação na presença de lipopolissacarídeos (SANTOS et al., 2023a).

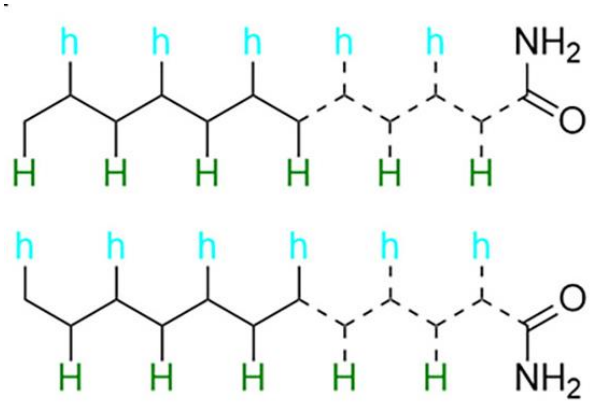


Figura 5: estrutura ilustrando o motivo com resíduos de aminoácidos hidrofílicos (h) e hidrofóbicos (H) utilizado como um dos critérios de busca para a prospecção de IAPs estruturados em folha-β (SANTOS et al., 2023a).

Destacam-se, na Figura 6, o conceito introduzido por Costa et al., que menciona uma quarta categoria de peptídeo encriptado: aquele que não existe de forma separada de sua proteína precursora, sendo parte de uma cadeia proteica maior e não passando propriamente por processos enzimáticos para a liberação do fragmento encriptado (COSTA et al., 2024).

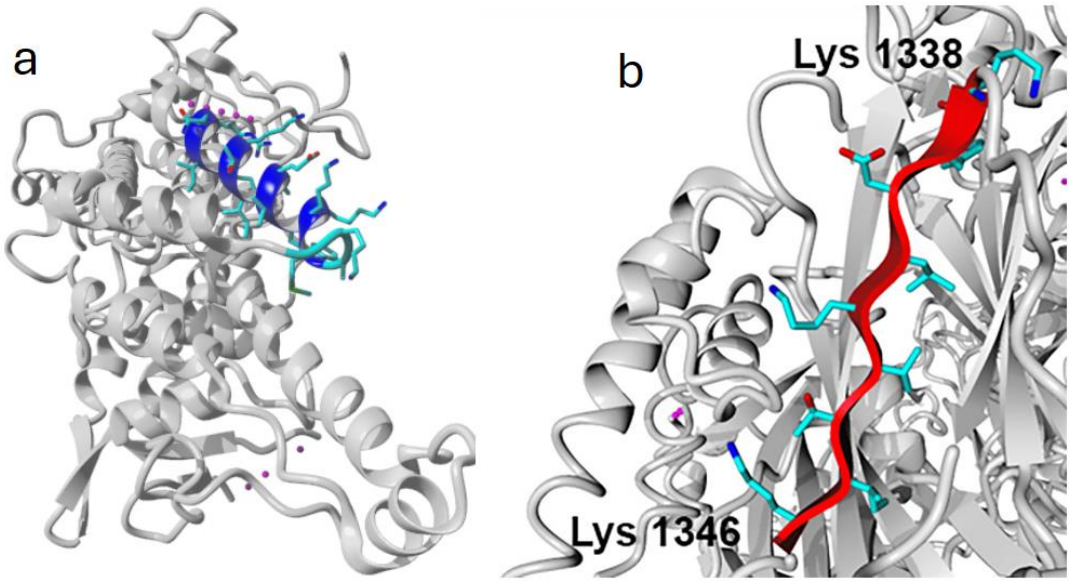


Figura 6: (a) estrutura tridimensional da proteína SOS1, com a sequência GKAMKKWVESITKIIQ (Hs17) destacada em azul, evidenciando a estrutura helicoidal adotada pelo fragmento na proteína parental (COSTA et al., 2024). (b) estrutura tridimensional do componente complementar da proteína humana C3, com a sequência KFDLKVTIK destacada em vermelho (SANTOS et al., 2023a).

1.3. Peptídeos catiônicos e anfifílicos: propriedades e aplicações

Os CPPs, amiloides e AMPs são classes pertencentes à família dos peptídeos membrano-ativos, e geralmente se apresentam como anfifílicos e com carga líquida positiva variando entre +2 e +13 (Figura 7) (BOPARAI; SHARMA, 2019; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; LI et al., 2021; WIMLEY, 2010a). Entre todos os peptídeos apresentados nesse trabalho até o momento (Tabela 2), essas características são comuns para suas atividades frente a membranas biológicas (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013; SANI; SEPAROVIC, 2016). As faces hidrofóbicas de moléculas anfifílicas e catiônicas são responsáveis pela interação com a porção apolar das membranas, sugerindo que a atividade dessas moléculas está diretamente ligada ao caráter anfifílico adquirido quando estruturadas, mas não necessariamente à estrutura secundária específica que adotam (WIMLEY, 2010b). Contudo, o excesso de hidrofobicidade em AMPs catiônicos demonstrou aumentar a interação com membranas zwitteriônicas, elevando a atividade hemolítica, por permitir que o peptídeo se aprofunde mais na porção apolar da membrana (CHEN et al., 2007). Paralelamente, essa característica resultou na diminuição da atividade antimicrobiana, devido à agregação de peptídeos ao interagirem com membranas bacterianas, provocando a transição de α-hélice para folha-β (YIN et al., 2012).

Tabela 2: peptídeos membrano-ativos exemplificados, com suas sequências, carga líquida e tipo de atividade frente a membranas. Esquema de cores seguindo o padrão Zappo.

NOME	SEQUÊNCIA	CARGA LÍQUIDA	ATIVIDADE
TAT	GRKKRRQRRRPQ	+8	CPP
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	+7	CPP
Magainina-II	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	+3	AMP
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	+5	AMP
Hs02	KWAVRIIRKFIKGFIS	+5	AMP
Hs10	KFDLKVTIK	+2	AMP
DS01	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALGAL	+3	AMP
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	+6	AMP

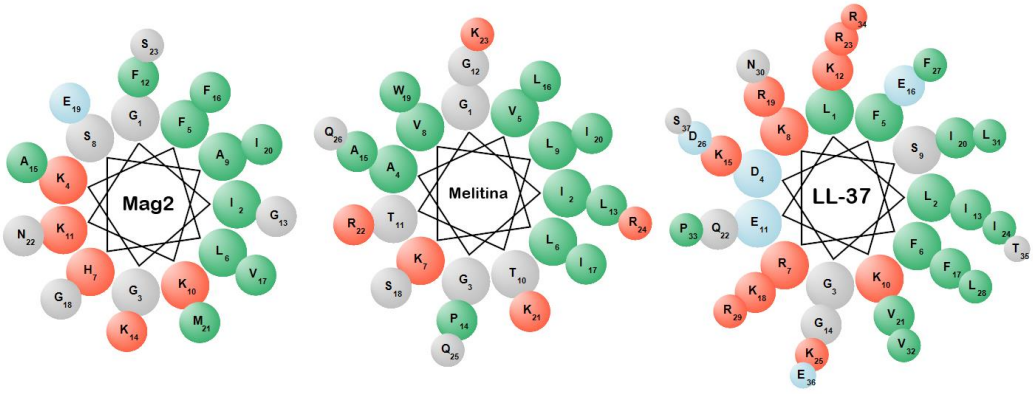


Figura 7: mapa de Edmundson ilustrando a estruturação em α-hélice da magainina-2, melitina e LL-37. Estruturas em círculos representam aminoácidos identificados por códigos de uma letra. Aminoácidos em verde: apolares; vermelhos: polares carregados positivamente; azuis: carregados negativamente; cinzas: polares não carregados.

Estima-se que essas características sejam cruciais para a seletividade em relação a membranas negativamente carregadas no caso de AMPs (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018; KABELKA; VÁCHA, 2021). No entanto, uma carga líquida positiva mais alta não necessariamente resulta em maior atividade antimicrobiana (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Estudos com a magainina-II mostraram que um aumento na carga de +2 melhorou a atividade antibacteriana. No entanto, aumentos de +3 ou +4, mantendo valores de hidrofobicidade, elevaram a atividade hemolítica do peptídeo. Em contrapartida, ao diminuir a hidrofobicidade do análogo com cargas adicionais de +3, houve uma diminuição substancial da hemólise. (DATHE et al., 2001). Esses resultados indicam que existe um equilíbrio entre a carga e hidrofobicidade, em que algum parâmetro a mais ou a menos pode afetar a atividade do peptídeo frente a membranas biológicas.

Peptídeos podem, em alguns casos, apresentar estrutura secundária quando suspensos em solução. No entanto, a presença de membranas celulares fosfolipídicas promove essa estruturação de maneira mais eficaz. Esse efeito está diretamente relacionado à capacidade de perturbação da membrana: quanto mais estruturado o peptídeo, maior sua capacidade de interferir na membrana (BRAND et al., 2018a; SANI; SEPAROVIC, 2016).

Enquanto alguns apenas perpassam a membrana sem necessariamente alterar seu equilíbrio (como CPPs), outros interagem com a mesma e interferem em sua estruturação padrão, afetando suas propriedades protetivas da célula contra o meio externo e permitindo a passagem descontrolada de soluto para dentro ou de material celular para fora (KABELKA; VÁCHA, 2021). Esse é o mecanismo mais comum de AMPs, embora alguns estudos tenham concluído que em

concentrações sub-líticas esses peptídeos podem servir como sinalizadores em diversas vias bacterianas (YIM; WANG; DAVIES, 2007).

O modo de ação de peptídeos membrano-ativos pode ser por morte direta ou modulação do sistema imunológico (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). No entanto, este trabalho focará nas interações com membranas. A interferência dos peptídeos na estrutura da membrana pode ser dividida em dois tipos de mecanismos: dependentes ou independentes da formação de poros (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; SANI; SEPAROVIC, 2016).

Algumas das formações de poros existentes e extensamente explicadas na literatura são os poros tipo barril e poro toroidal. No modelo de poro tipo barril, há interação lateral entre peptídeos, formando uma estrutura compacta semelhante a um canal iônico, com mínima perturbação da estrutura da membrana (Figura 8a) (KABELKA; VÁCHA, 2021; TUERKOVA et al., 2020). Nesse modelo, a face hidrofóbica do peptídeo se mantém em contato com a porção apolar da membrana, enquanto a face hidrofílica forma a parte interior do canal (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018). Em contraste, no modelo de poro toroidal, não ocorre interação entre as cadeias peptídicas (Figura 8b); em vez disso, há uma alteração na estrutura da membrana, fazendo com que os fosfolipídios se curvem continuamente através do poro, mantendo as cabeças polares em constante contato com o peptídeo (SENGUPTA et al., 2008; XIAO et al., 2015).

O modelo de dissolução da membrana, um dos modelos independentes da formação de poros, ocorre pelo chamado modelo carpete. Nessa representação, os peptídeos aderem à membrana de forma paralela ao seu plano, cobrindo a camada externa (Figura 8c). Essas interações com a membrana desestabilizam sua estrutura e, ao alcançar uma concentração crítica, os peptídeos podem formar micelas que desintegram a bicamada, gerando uma série de microporos na estrutura (HUAN et al., 2020; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; ZHANG et al., 2021).

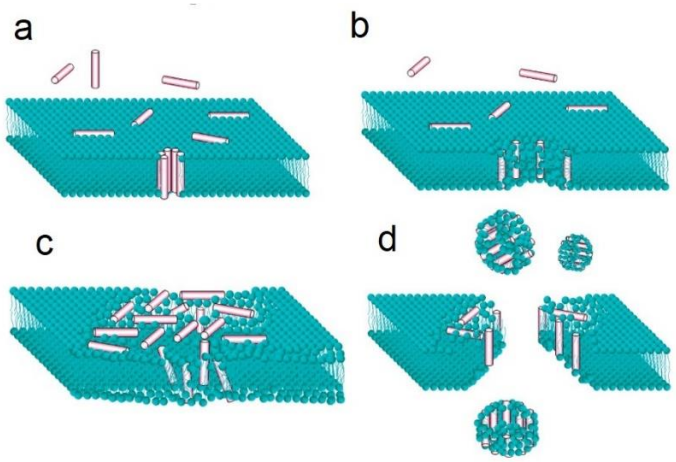


Figura 8: modelos de ação de peptídeos membrano-ativos catiônicos e anfifílicos baseados em (a) formação de poro tipo barril, (b) poro toroidal, (c) modelo tipo carpete e (d) dissolução da bicamada por formação de micelas. Peptídeos catiônicos, anfifílicos e helicoidais representados como cilindros avermelhados. Fosfolipídios em verde (WIMLEY, 2010b).

Os modelos independentes de formação de poro envolvem a agregação e fusão de vesículas, formação de monocamadas, movimentação de fosfolipídeos (flip-flop) e afinamento da membrana (WIMLEY, 2010). O último ocorre por permeabilização do peptídeo causando o afinamento da bicamada por gerar um espaço vazio e obrigar as cadeias lipídicas a ocupá-lo (Figura 9) (GRAGE et al., 2016)

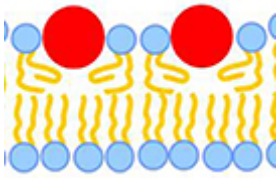


Figura 9: peptídeos membrano-ativos (em vermelho) adsorvidos a uma bicamada fosfolipídica, causando desestabilização e afinamento por obrigar as porções lipídicas a ocuparem o espaço vazio (GRAGE et al., 2016).

O processo de translocação do peptídeo através da membrana é influenciado pela própria composição da membrana. Além das cargas presentes nos fosfatos, as características das cadeias acila influenciam a curvatura intrínseca da membrana, afetando a energia necessária para que a translocação ocorra. Dados computacionais e experimentais indicam que membranas com curvatura positiva (lipídios com formato cônico invertido) facilitam a translocação, enquanto membranas com curvatura negativa (formato cônico) dificultam o processo,

quando comparadas com membranas de curvatura zero (Tabela 3) (KABELKA; VÁCHA, 2021). Esse efeito ocorre devido ao empacotamento menos rígido em bicamadas com curvatura positiva, que gera menor estresse lateral na interface polar/apolar (LEBER et al., 2018).

1.4. Peptídeos membrano-ativos aniônicos

1.4.1. Peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs)

Em muitos trabalhos, é amplamente reportado que peptídeos membrano-ativos possuem em comum a presença de cargas positivas, sendo necessárias para que tenham atividade devido à complementaridade de cargas com membranas de carga negativa. No entanto, uma pergunta intrigante surge: o que acontece quando se volta a atenção para o outro lado do espectro? Como se comportam peptídeos aniônicos e anfifílicos frente a membranas celulares de diferentes tipos de organismos?

Estudos têm mostrado que peptídeos aniônicos podem interagir de maneira distinta com as membranas celulares quando comparados aos seus equivalentes catiônicos. A interação de peptídeos aniônicos com membranas depende de diversos fatores, como a composição lipídica da membrana, modificações pós-traducionais, a presença de íons metálicos, e a concentração do peptídeo (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Membranas celulares possuem variações significativas em sua composição lipídica, o que pode influenciar sua interação com peptídeos.

Alguns peptídeos aniônicos podem apresentar atividade antimicrobiana. Uma família bem estabelecida de peptídeos aniônicos antimicrobianos (AAMPs – anionic antimicrobial peptides) são os lipopeptídeos de origem procariótica. Consistem em estruturas ácidas e cíclicas formadas por 10 aminoácidos que contêm uma "cauda" de 2 a 3 resíduos, com um ácido graxo covalentemente ligado (STRIEKER; MARAHIEL, 2009). A daptomicina (Figura 10), um lipopeptídeo ácido cíclico extraído de *Streptomyces roseosporus*, demonstra possuir atividade contra uma gama de bactérias Gram-positivas e outras resistentes a antibióticos convencionais, tendo sido recentemente aprovada para o tratamento de infecções complicadas de pele (BALTZ, 2009; HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2011). Alguns desses lipopeptídeos exibem ação antimicrobiana apenas na presença Ca^{2+} (STRIEKER; MARAHIEL, 2009).

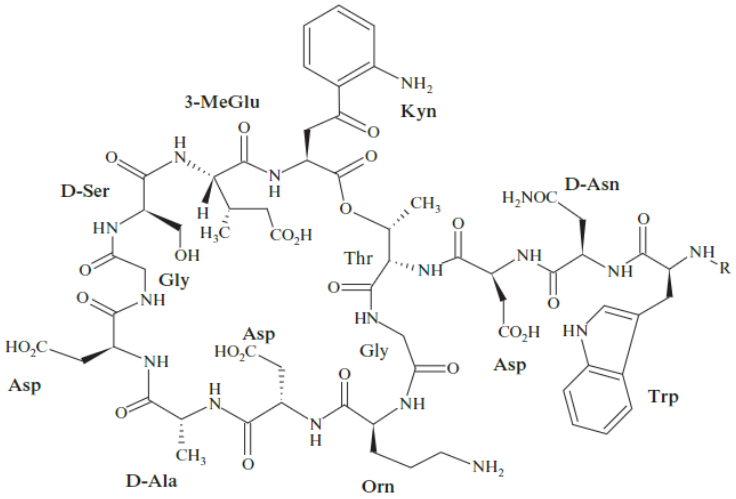


Figura 10: estrutura da daptomicina (R = n-decanoil), lipopeptídeo cíclico aniônico. Em sua estrutura existem alguns aminoácidos não naturais, como ornitina (Orn), D-alanina (D-Ala), D-asparagina (D-Asn), D-serina (D-Ser), 3-metilglutamato (3-MeGlu) e ácido quinurênico (Kyn) (BALTZ, 2009).

É comumente aceito que, em eucariotos, os peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs) atuem em conjunto com seus equivalentes catiônicos como uma linha de defesa contra micro-organismos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2011). Podem ser divididos em dois grandes grupos: ciclotídeos (estruturas similares a defensinas, com folhas-β estabilizadas por Cys) e AAMPs encriptados em proteínas maiores (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2011).

AAMPs provenientes de fontes eucarióticas foram identificados em vertebrados, invertebrados e plantas, com destaque para os anfíbios (DENNISON et al., 2018; HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2011). *Xenopus laevis* foi o primeiro organismo secretor de AMPs aniônicos e catiônicos a ser descoberto, com três AAMPs, todos com alto conteúdo do resíduo de aminoácido Asp (Tabela 3). Estes peptídeos apresentaram atividade ampla contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos, sendo que um deles (PYL – ADADDDDDK) possui atividade dependente da presença de Zn^{2+} no meio (ALMARWANI et al., 2020; BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997). O peptídeo XLAsp-P2 demonstrou ter atividade aditiva com antibióticos químicos contra *S. aureus* RN4200 (cepa resistente a cloranfenicol) e cepas de *E. coli* (ZHANG et al., 2017).

Tabela 3: AAMPs derivados de *X. laevis*, suas sequências de aminoácidos, organismos que possuem atividade contra e referências. Esquema de cores seguindo o padrão Zappo.

AAMP	Sequência	Atividade	Referência
PYL	ADADDDDDK	Gram-positiva, Gram-negativa (mediada por Zn^{2+})	(BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997)
XLAsp-P1	DEDDD	Gram-positiva, Gram-negativa	(LI et al., 2016)
XLAsp-P2	DEDLDE	Gram-positiva, Gram-negativa, fungos, *S. aureus* RN4200	(ZHANG et al., 2017)

Outro peptídeo membranoativo aniônico promissor e extensamente estudado é a maximina-H5 (ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL-NH_2), proveniente de *B. maxima*, anfíbio natural da região sudoeste da China (DENNISON et al., 2018). Este peptídeo apresentou atividade antibacteriana (DENNISON et al., 2016), anticâncer (DENNISON; HARRIS; PHOENIX, 2017) e ação antinociceptiva como neuropeptídeo (LIU et al., 2011). Contudo, a atividade antibacteriana da maximina-H5 se limita apenas a *Staphylococcus aureus* com valores de MIC de 90 μM (DENNISON et al., 2016). Ao interagir com *Escherichia coli*, a alta concentração de moléculas de fosfatidiletanolamina (PE) na membrana inibiu a ação da maximina-H5, devido à sua alta afinidade por esses lipídios, impedindo que demonstrasse atividade membranolítica significativa (DENNISON et al., 2013).

Ensaios com gradiente de pH de 6 a 8 realizados por Dennison et al. mostraram que, na presença de vesículas miméticas da membrana plasmática de *S. aureus*, a maximina-H5 apresentou um aumento na porcentagem de estrutura α-hélice de 48% em pH 8,0 para 58% em pH 6,0, tornando-se o primeiro AAMP a mostrar melhora na atividade antibacteriana em função do pH (DENNISON et al., 2016). A atividade de superfície aumentou com a diminuição do pH, sugerindo que em meio ácido ocorre estabilização da estrutura de "α-hélice dobradiça", facilitada pela presença de uma glicina no interior de seu esqueleto, permitindo interação com a membrana de *S. aureus* pelo modelo carpete e gerando defeitos não específicos (DENNISON et al., 2016, 2018).

A dependência da presença de Zn^{2+} para adquirir ou potencializar a atividade antimicrobiana é uma característica comum de AAMPs. Peptídeos aniônicos encriptados encontrados em extratos de líquido broncoalveolar, surfactantes pulmonares e células epiteliais do trato respiratório de ovelhas e humanos também dependem da presença do cátion metálico para exercerem atividade frente a

membranas. Todos apresentam um motivo similar aos AAMPs extraídos de *X. laevis*, com grande repetição de resíduos de Asp (BROGDEN et al., 1996, 1999; BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997; FALES-WILLIAMS et al., 2002; HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2011). Analogamente, ciclotídeos também se coordenam com cátions divalentes (SHENKAREV et al., 2008). Estudos indicam que o papel do metal é formar pontes entre os grupamentos ácidos, criando estruturas peptídicas complexas, e também entre as cargas negativas da membrana, facilitando a interação peptídeo-membrana (Figura 11) (ALMARWANI et al., 2020; BECUCCI et al., 2014; BRANGO-VANEGAS et al., 2024).

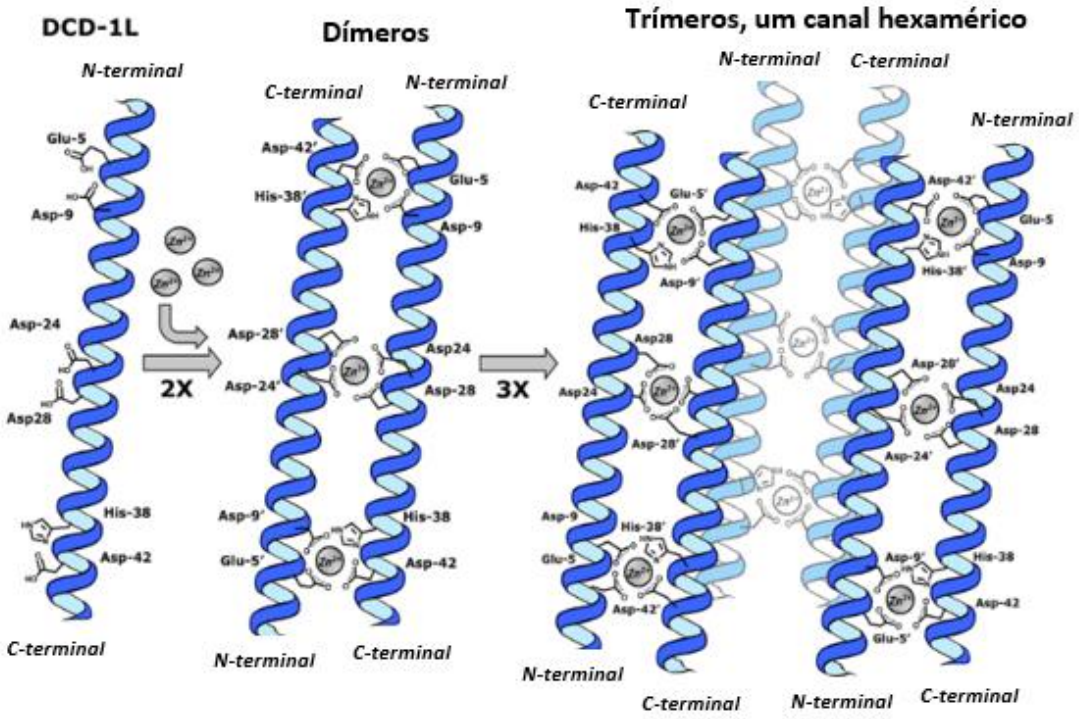


Figura 11: formação de complexos do peptídeo DCD-1L com Zn^{2+}, derivado da dermicidina. Os átomos de Zn^{2+} agem como ponte salina entre resíduos de Asp, facilitando a interação do peptídeo com membranas procarióticas. A junção de trímeros permite a formação de um canal hexamérico, composto por seis monômeros do peptídeo, resultando na formação de poros similares aos poros tipos barril típicos de AMPs catiônicos (BRANGO-VANEGAS et al., 2024).

Assim como os peptídeos catiônicos, AAMPs podem apresentar atividade contra células cancerosas devido à similaridade de cargas entre as membranas bacterianas e tumorais. A maximina-H5 foi um dos poucos AAMPs testado para atividade antitumoral (DENNISON; HARRIS; PHOENIX, 2017). Ela demonstrou atividade citotóxica contra a linha de células cancerosas de glioblastoma T98G, com IC_{50} de 125 µM para o peptídeo com C-terminal amidado. Além disso, ao avaliar

a citotoxicidade frente a células saudáveis, a maximina-H5 apresentou apenas 10% de diminuição da viabilidade em concentrações de até 180 μM, mostrando atividade tóxica considerável apenas contra células tumorais (DENNISON; HARRIS; PHOENIX, 2017). A presença de amina em ambas extremidades é chave para a atividade, pois o C-terminal amidado estabiliza a estrutura de α-hélice por meio de uma ligação de hidrogênio adicional, mantendo a anfifilicidade necessária para a interação membranolítica contra células cancerosas. (DENNISON et al., 2005; DENNISON; HARRIS; PHOENIX, 2017).

1.4.2. Peptídeos aniônicos sensíveis ao pH: características e aplicações

No organismo, é possível encontrar membranas plasmáticas em ambientes ácidos em duas ocasiões: dentro de endossomos e na periferia de tecidos doentes. A acidez extracelular é comum em condições como câncer, inflamação, artrite, derrame e isquemia (RESHETNYAK et al., 2020). Devido ao seu metabolismo acelerado, células cancerosas produzem uma alta quantidade de dióxido de carbono, gerando hipóxia como resultado da glicólise constante para obtenção de energia (ANDREEV; ENGELMAN; RESHETNYAK, 2009; SWIETACH, 2019). As altas concentrações de dióxido de carbono levam à expressão de anidrases carbônicas, elevando consideravelmente a acidez por meio da conversão de CO_2 em bicarbonato e prótons (POTTER; HARRIS, 2003). Além disso, a acidez citoplasmática é prejudicial para a célula, o que provoca um fluxo de cátions contra o gradiente de concentração para o meio extracelular, gerando um potencial eletrostático através da membrana, contribuindo ainda mais para a acidez nas adjacências da bicamada (DAMAGHI; WOJTKOWIAK; GILLIES, 2013; RESHETNYAK et al., 2020). O pH de ambientes tumorais é reportado de variar entre 6,1 a 6,9, em comparação ao valor de 7,4 para tecidos saudáveis (ANDERSON et al., 2016). A diminuição do pH é dependente da agressividade do tumor, pois taxas maiores de metástase causam maior acidificação das adjacências imediatas da membrana (ANDERSON et al., 2016).

Outro ambiente onde se encontram membranas em meio ácido é o dos endossomas: vesículas formadas a partir da membrana plasmática envolvidas no transporte de materiais internalizados pela célula para degradação (LALAN; BAGCHI; MISRA, 2011). A hemaglutinina (HA) do vírus influenza é um exemplo de proteína que se aproveita do meio ácido endossomal, sendo determinante para o processo de infecção do hospedeiro. O vírus se liga à membrana e é endocitado, o que resulta na passagem para um meio acidificado. Essa mudança de pH leva à estruturação da HA em uma α-hélice anfifílica, permitindo que a proteína fusione a membrana do vírus com a do endossomo, inserindo a carga viral e iniciando a replicação (STEGMANN, 2000).

A característica de diminuição de pH nos microambientes biológicos citados pode ser explorada por peptídeos contendo grupos tituláveis com diferentes valores de pKa. Aminoácidos como His, Lys e Arg apresentam características básicas com valores de pKa de 6,0, 10,53 e 12,48 respectivamente, enquanto aminoácidos como Asp e Glu apresentam características ácidas com valores de pKa de 3,65 e 4,25 respectivamente (NELSON; COX; HOSKINS, 2022). Utilizando o princípio de titulação de resíduos de aminoácidos em pH baixo, Subbarao et al. racionalizaram e sintetizaram uma sequência que pudesse agir de forma semelhante a HA, criando o GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) (SUBBARAO et al., 1987). Em pH neutro, os resíduos de Glu do peptídeo permanecem desprotonados, causando repulsão e impedindo a estruturação. Porém, ao atingir pH 5, as cargas negativas são neutralizadas e o peptídeo assume a estrutura de α-hélice, permitindo a interação com membranas devido ao seu caráter anfifílico (GOORMAGHTIGH et al., 1991; LI; NICOL; SZOKA, 2004).

Seguindo o padrão dos peptídeos aniônicos membrano-ativos, o GALA mostrou uma maior estruturação na presença de cátions divalentes em pH 7,5. Com a adição de 100 mM de Ca^{2+}, houve um aumento na estruturação do peptídeo em α-hélice, passando de 7% para 41%, apresentando resultados semelhantes com 15 mM de Mg^{2+} e Zn^{2+} (LI; NICOL; SZOKA, 2004; SUBBARAO et al., 1987). Em contrapartida, em pH 5,0, a adição de cátions divalentes teve pouco efeito sobre o percentual de hélice, indicando que os resíduos de Glu já estavam neutralizados e impedindo que o metal agisse como ponte salina.

Estudos de interação com vesículas miméticas de eucariotos realizados com GALA mostraram que a dependência de pH também influencia na estruturação do peptídeo em bicamadas, bem como sua capacidade de desestabilizá-las. Observou-se uma maior estruturação em membrana em pH ácido do que em pH neutro. Além disso, a elevação do pH de 5,0 para 7,5 durante a associação do peptídeo com a membrana resultou no mesmo desfecho que quando realizado diretamente em pH neutro, evidenciando a capacidade do peptídeo de se dissociar da membrana de forma reversível (PÁRENTE et al., 1990). Ensaios de extravasamento de ANTS/DPX com LUVs de PC também resultaram em ganho de estruturação e atividade membranolítica com a diminuição do pH, resultando na externalização dos compostos de marcação através de uma via "tudo ou nada", ou seja, ou 100% dos marcadores eram extravasados ou 0% (LI; NICOL; SZOKA, 2004; PARENTE; NIR; SZOKA JR, 1990).

Com o entendimento de que o GALA é sensível ao pH e possui atividade frente a membranas modelo zwitteriônicas, sua capacidade para servir como um veículo de entrega de plasmídeos de DNA e oligonucleotídeos foi avaliada. GALA, ligado covalentemente a DNA complexado com um dendrímero (polímero poliamidoamina catiônico), resultou em um aumento na expressão do gene pretendido (HAENSLER; SZOKA, 1993). Uma vez endocitados, esses complexos encontram-se em um ambiente acidificado (pH 5~6) e, de forma semelhante a

hemaglutinina (HA) do vírus influenza, o GALA se estrutura em α-hélices e fusiona com a membrana plasmática do endossomo, liberando o material genético no citoplasma da célula alvo (LI; NICOL; SZOKA, 2004)(LI; NICOL; SZOKA, 2004).

Outra família de peptídeos amplamente estudados são os pHLIP (*pH-low insertion peptide* - peptídeo de inserção em pH baixo, https://phlipinc.com), composta por peptídeos membrano-ativos aniônicos com média de 28 a 40 resíduos de aminoácidos de comprimento (SILVA et al., 2023). O primeiro representante (referido como *wt*-pHLIP), com a estrutura primária GGEQNPIYWARYADWLPTTPLLLLDLALLVDADEGT, é proveniente da porção transmembranar mais duas sequências flanqueadoras da hélice C da bacteriorodopsina (Figura 12) (HUNT et al., 1997). Em pH neutro, o pHLIP não apresenta estrutura definida, mantendo-se desordenado, mas com a acidificação do meio adota uma estrutura de α-hélice, permitindo sua inserção em membranas celulares de modo pH-dependente (RESHETNYAK et al., 2006).

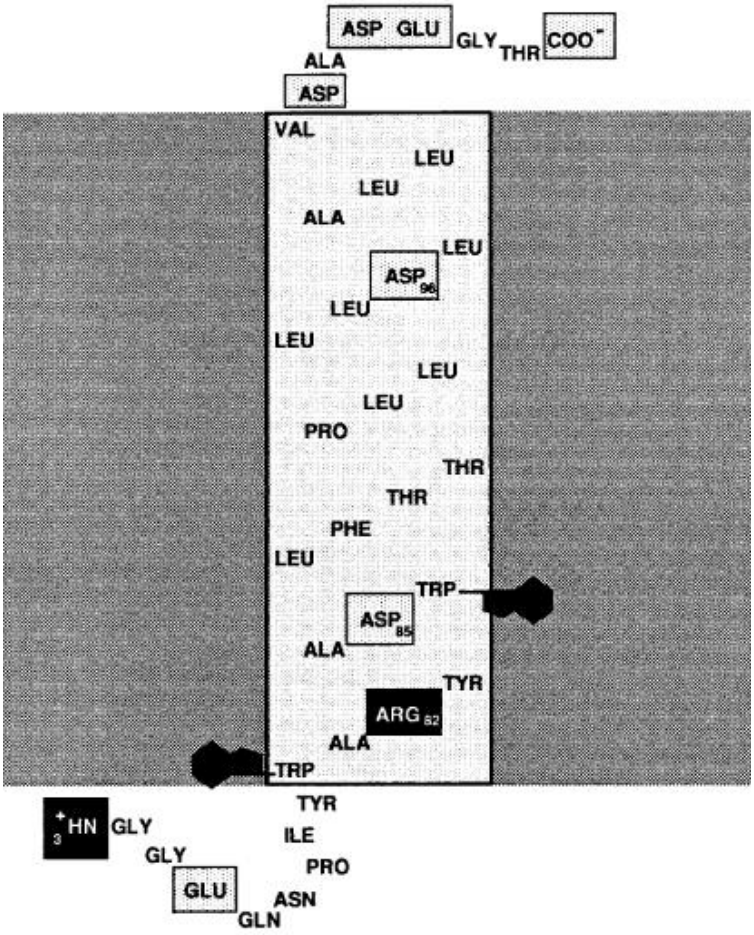


Figura 12: estrutura transmembranar da hélice C da bacteriodopsina com duas sequências flanqueadoras, posteriormente batizado de wt-pHLIP. Estão destacados na sequência os aminoácidos polares carregados Asp, Glu e Arg, assim como as cadeias laterais indólicas dos Trp (HUNT et al., 1997).

O pHLIP pode ser caracterizado em três estados relativos à estrutura adotada no meio (Figura 13). Em pH neutro, o peptídeo é monomérico em concentrações abaixo de 7 μM e solúvel em água, sem estrutura secundária definida (estado I). Na presença de bicamadas fosfolipídicas, ele adsorve à superfície ainda desestruturado (estado II). Com a diminuição do pH, parte de seu esqueleto se estrutura como α-hélice e se insere na membrana (estado III), liberando energia (de 1,6 a 1,8 kcal/mol) durante o processo de translocação da bicamada e tornando-o energeticamente favorável, o que aumenta em 10 a 20 vezes sua afinidade por membranas quando em pH 5,0 comparado a pH 8,0. (RESHETNYAK et al., 2006, 2007, 2008). A inserção do pHLIP ocorre de forma unidirecional: o N-terminal permanece exposto ao ambiente extracelular, enquanto apenas o C-terminal transloca para a porção intracelular (ANDREEV; ENGELMAN; RESHETNYAK, 2009). Na maioria dos análogos de pHLIP, o C-terminal é uma sequência penetradora de membranas transiente com um grande número de grupos aniônicos (VILA-VIÇOSA et al., 2018). Portanto, ao inserirem-se no citoplasma, encontram um ambiente alcalinizado em comparação ao exterior, desprotonando as cadeias laterais ácidas e ancorando o peptídeo à membrana de forma rígida (WYATT et al., 2018).

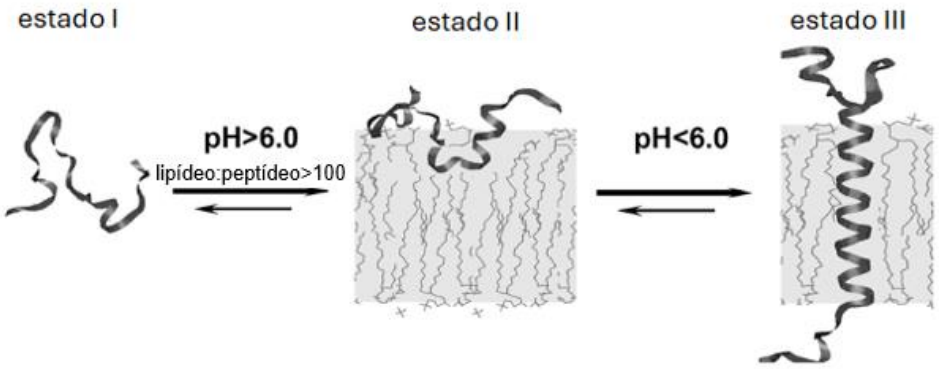


Figura 13: esquema representando os estados do pHLIP desestruturado quando livre em solução (estado I) e adsorvido em membrana (estado II) em pH 6,0, e por fim inserindo-se na bicamada ao estruturar-se como α-hélice sob acidificação do meio (estado III). Figura adaptada de (RESHETNYAK et al., 2007).

Diferentemente de outras α-hélices anfifílicas extensivamente demonstradas neste trabalho, o pHLIP não causa perturbações estruturais nas membranas. Isso se deve ao fato de se estruturar concomitantemente com sua inserção, não assumindo uma estrutura helicoidal enquanto está adsorvido à superfície das células. Dessa forma, evita a agregação, a formação de poros e outras formas de desestabilização (RESHETNYAK et al., 2007, 2008; ZOONENS; RESHETNYAK; ENGELMAN, 2008).

Analogamente ao GALA, a dependência de pH do pHLIP é determinada pela titulação de resíduos de aminoácidos negativamente carregados em ambiente fisiológico. As características físico-químicas e a interação do peptídeo com membranas tornam-no um candidato promissor para o direcionamento de tecidos em ambientes ácidos, especialmente células tumorais. A inserção unidirecional do pHLIP permite duas formas distintas de ação do peptídeo em ambientes de baixo pH: a conjugação de agentes fluorescentes no N-terminal através de ligações estáveis para o imageamento de tumores, e a entrega de compostos (fármacos, nanopartículas) para o meio intracelular por meio de conjugação no C-terminal a partir de ligações dissulfeto, prontamente reduzidas no citoplasma (Figura 14) (ANDREEV; ENGELMAN; RESHETNYAK, 2009; RESHETNYAK et al., 2006).

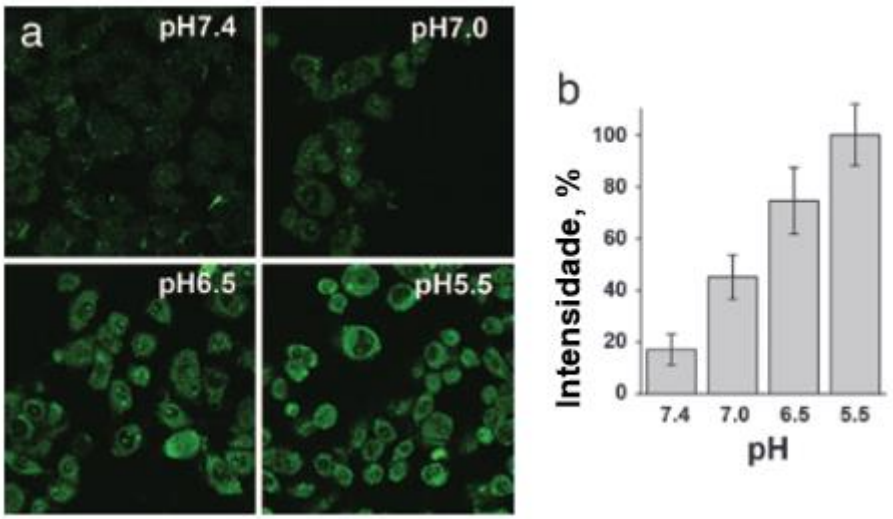


Figura 14: inserção de corante dansil conjugado ao C-terminal do pHLIP para o meio intracelular de forma pH dependente. (a) Ensaio de fluorescência de células cancerosas humanas (HeLa) incubadas por 15 minutos com pHLIP-S-S-dansil a 7 μM em valores de pH de 7,4, 7,0, 6,5 e 5,5 e posteriormente lavadas com PBS pH 7,4. (b) Intensidades de fluorescência medidas, utilizando o valor em pH 5,5 como 100% para comparação, demonstrando uma tendência de decrescimento com o aumento do pH (RESHETNYAK et al., 2006).

A conjugação de compostos como faloidina (AN et al., 2010), doxorrubicina (SONG et al., 2016), inibidor de diacilglicerol O-transferase (enzima responsável pelo armazenamento de ácidos graxos na célula tumoral) (DESKEUVRE et al., 2024) e caliqueamicina (DUPONT et al., 2024) no C-terminal do pHLIP resulta na liberação desses compostos apenas no ambiente citoplasmático, devido à redução das ligações dissulfeto que os prendem ao peptídeo. A sensibilidade do pHLIP ao baixo pH do ambiente tumoral permite a entrega desses agentes terapêuticos altamente citotóxicos sem efeitos colaterais em células saudáveis, demonstrando o potencial

do peptídeo como uma estratégia de tratamento contra o câncer (DESKEUVRE et al., 2024; DUPONT et al., 2024).

Estudos indicam que a sensibilidade do pHLIP a ambientes ácidos é devido às protonações dos aspartatos negativamente carregados presentes na porção que se insere na membrana (Figura 15). Os resíduos de aspartato presentes nas posições 14 e 25 são chave para a estruturação da molécula, uma vez que a substituição desses aminoácidos por Asn ou Lys resultou na perda da dependência de pH para a estruturação (ANDREEV et al., 2007). Ao tempo que os resíduos de Asp têm suas cargas neutralizadas, uma rápida inserção da porção C-terminal para o meio intracelular ocorre em seguida, pois a protonação de um aminoácido negativamente carregado diminui sua polaridade, portanto diminui a penalidade energética gerada pela sua presença em um meio altamente apolar como a porção interna de uma bicamada fosfolipídica (VILA-VIÇOSA et al., 2018).

Consequentemente, o pK de inserção (pK_{ins}) do peptídeo está diretamente relacionado com o pKa dos resíduos de Asp presentes na porção transmembranar da molécula, composta pelos aminoácidos entre a 10ª e 30ª posição (SILVA et al., 2023). Destaca-se o efeito do Asp14, por estar apenas parcialmente inserido no núcleo da bicamada e ter um maior contato com o solvente, sendo o principal ator para a desestabilização do peptídeo no estado III em valores de pH mais alto (Figura 15) (VILA-VIÇOSA et al., 2018). De fato, o valor de pK_{ins} do *wt*-pHLIP é de 6,0, mesmo valor esperado para Asp em um ambiente de fronteira entre a membrana e o solvente, quando o peptídeo está no estado II, adsorvido em sua forma desestruturada (MUSIAL-SIWEK et al., 2010; VILA-VIÇOSA et al., 2018). Destarte, estimou-se a possibilidade de modulação do pK_{ins} do peptídeo através de uma série de possíveis modificações envolvendo o Asp14.

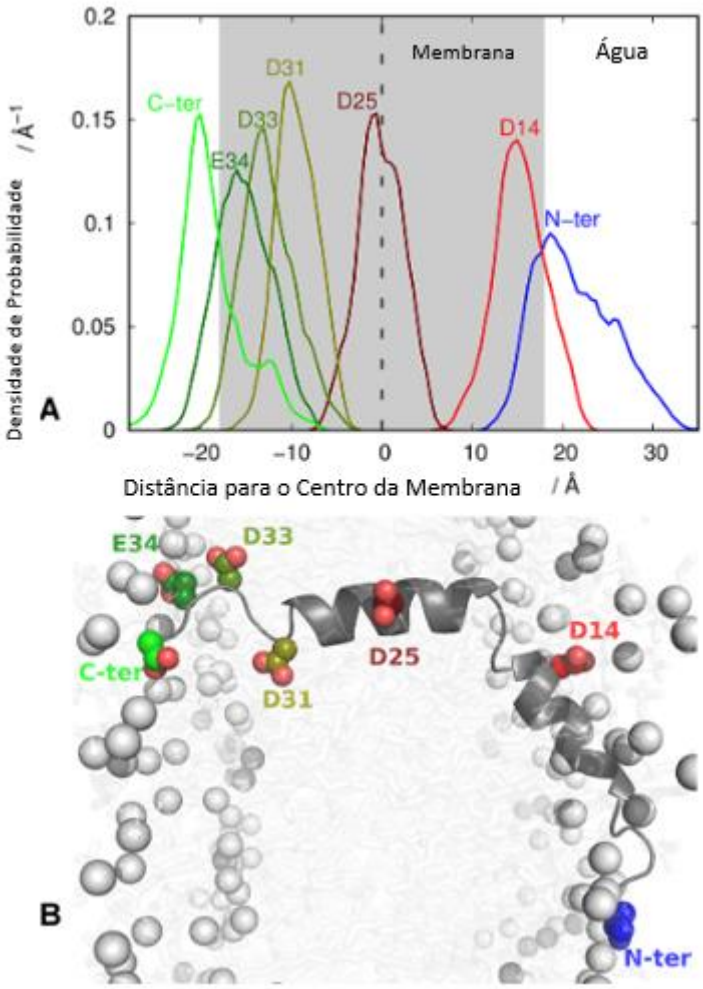


Figura 15: localização das cadeias laterais ácidas do wt-pHLIP em relação à bicamada fosfolipídica. (a) Mapa de probabilidade de densidade da localização dos aminoácidos negativamente carregados, com a membrana representada pela seção em cinza e seu centro destacada por uma linha tracejada. (b) Estrutura secundária do pHLIP em cinza escuro inserido em membrana. Porção lipídica em cinza claro translúcido, porção com fosfatos representada em esferas. Os aminoácidos negativamente carregados estão destacados, com átomos de oxigênio em vermelho (VILA-VIÇOSA et al., 2018).

Estudos com mutações nos Asp14 e Asp25 foram conduzidos por Musial-Siwek et al. para investigar a hipótese da possível atividade modulatória de inserção conferida a esses aminoácidos. Substituições de Asp por Glu através da criação dos análogos D14E e D25E indicaram alteração no valor do pKa_{ins} de aproximadamente +0,5 unidades, valor similar à diferença de pKa entre esses aminoácidos (Figura 16) (MUSIAL-SIWEK et al., 2010). Analogamente, substituições por Ala nas mesmas posições mostrou perda da dependência de pH, apresentando estruturação em α-hélice na presença de vesículas zwitteriônicas mesmo em pH 8,0 (MUSIAL-SIWEK et al., 2010).

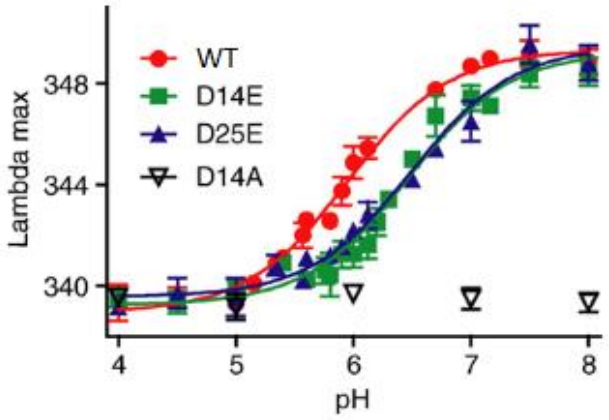


Figura 16: titulação de wt-pHLIP (WT) e análogos com substituições de Asp por Glu nas posições 14 (D14E) e 25 (D25E) e Asp por Ala na posição 14 (D14A) através de experimento de fluorescência de Trp. Observa-se variações no pK_{ins} (ponto médio da sigmoide) de aproximadamente 0,5 unidades na substituição de aminoácidos polares negativamente carregados, indicados pela diminuição do comprimento de onda de emissão do Trp com a diminuição do pH. No análogo D14A não há mudança no perfil de emissão com a variação de pH, pois encontra-se estruturado mesmo em pH 8,0 (MUSIAL-SIWEK et al., 2010).

Por outro lado, o grau de exposição do Asp14 em relação ao solvente quando o peptídeo está inserido na membrana também é capaz de modular o pK_{ins}. Quando o Asp é movido para mais perto da porção N-terminal da sequência (Asp14 → Asp13) ocorre diminuição do pKa, enquanto isso quando movido para mais perto da porção C-terminal (Asp14 → Asp15) resulta no aumento do pKa (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013). A mudança de posição desse aminoácido na sequência, movimentando-o na direção N- ou C-terminal, altera seu microambiente proximal. Ao ser movido para Asp15, encontra-se mais profundamente inserido no ambiente hidrofóbico da bicamada, aumentando seu pKa, pois o próton da carboxila está menos disponível para o meio hidrofílico necessitando de um maior potencial para removê-lo (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013; MEHLER et al., 2002). Um outro teste foi feito movendo o Asp14 em direção ao N-terminal, duas posições "acima" da original para Asp12. Todavia, ensaios de fluorescência de Trp indicaram aumento do pK_{ins} em comparação com o análogo com Asp13, de forma oposta ao esperado. Esse comportamento pode ser atribuído à saída desse aminoácido da porção efetivamente inserida na membrana, segundo simulações, habitando a adjacência imediata e não sendo mais crucial para a estruturação e inserção do peptídeo, apesar de ainda apresentar atividade pH-dependente (MUSIAL-SIWEK et al., 2010).

Por fim, ao realizar o mesmo experimento com Asp25, notou-se um comportamento inesperado em relação ao apresentado por Asp14. Ensaios de fluorescência de Trp e dicroísmo circular indicaram maior estruturação helicoidal nos estados I e II em ambos análogos com Asp24 e Asp26, indicando que

fenômenos de agregação podem estar envolvidos e possivelmente são modulados pela presença de Asp na posição 25 (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013).

Um estudo com alteração da estrutura primária do pHLIP foi realizado por Vasquez-Montes et al., focando no papel da prolina na inserção do peptídeo. Para isso, foi criado o análogo P20G, no qual a Pro20 foi substituída por Gly. Devido à restrição angular causada pela estrutura da prolina, a presença desse aminoácido é conhecida por desestabilizar α-hélices (NELSON; COX; HOSKINS, 2022). Nas simulações da estrutura transmembranar do pHLIP, observa-se a presença de uma torção, dividindo o peptídeo em duas hélices (Figura 15b). A substituição da prolina por glicina (Pro20 → Gly20) resultou no aumento da inserção e do percentual de estruturação em hélice do peptídeo (VASQUEZ-MONTES et al., 2018). Em ensaios com vesículas de diferentes composições lipídicas, observou-se uma alteração de até uma unidade de pH entre o pK_{ins} do wt-pHLIP e do análogo P20G (Figura 18) (VASQUEZ-MONTES et al., 2018).

Outro fator capaz de afetar a interação do pHLIP com membranas é sua composição lipídica. Estudos com LUVs compostas por grupos aniônicos como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e cardiolipina demonstraram inibir a adsorção profunda do peptídeo à membrana em pH neutro (estado II), provavelmente por interações eletrostáticas desfavoráveis com a membrana negativamente carregada (KYRYCHENKO et al., 2015; VASQUEZ-MONTES et al., 2018). De fato, o estado II é observado apenas em ensaios com LUVs compostas por fosfatidilcolina (KYRYCHENKO et al., 2015). Enquanto isso, em ensaios com outras composições de membrana, Vasquez-Montes et al. encontraram que a partição do peptídeo à membrana ocorre de uma maneira mais rasa, sem a inserção de suas cadeias laterais, resultando em nenhuma diferença perceptível nos espectros de fluorescência de Trp entre o estado I e II, uma vez que esses aminoácidos não estão inseridos na membrana como ocorre com vesículas de POPC em pH neutro (Figura 17) (VASQUEZ-MONTES et al., 2018). Entretanto, ensaios com vesículas com fosfatidiletanolamina em sua composição, que não possui carga líquida negativa, também mostraram que o peptídeo não adsorve profundamente na membrana, mostrando que a repulsão eletrostática não é o único fator envolvido (VASQUEZ-MONTES et al., 2018).

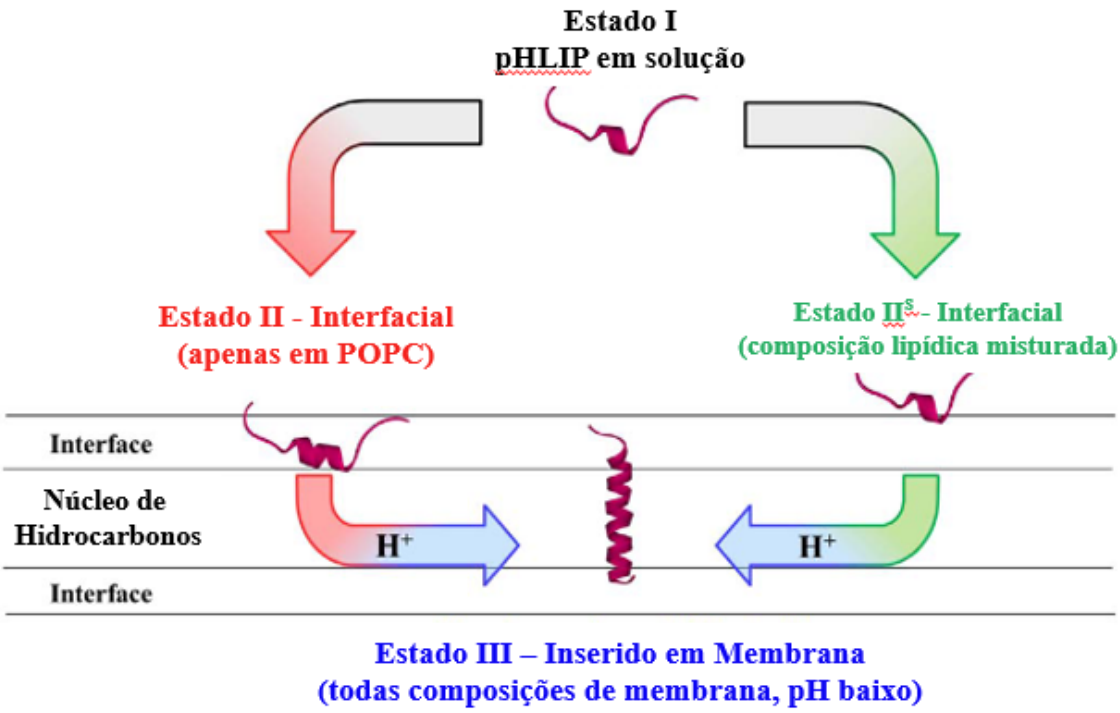


Figura 17: estruturação do pHLIP em diferentes composições de lipídeos. O primeiro modelo de três estados apresentado por Reshetnyak et al. ocorre apenas para LUVs compostas apenas por POPC, enquanto para vesículas com composições mistas, um estado II "raso" melhor representa o tipo de interação do peptídeo com membranas *in vivo*. Em ambos os modelos, o peptídeo se estrutura após acidificação no meio, apresentando-se inserido na membrana (estado III) (VASQUEZ-MONTES et al., 2018).

De outra forma, a composição lipídica da membrana também é capaz de alterar o pK_{ins} do pHLIP. Ensaios realizados por Vasquez-Montes et al. resultaram em valores de pK_{ins} de 6,1 em POPC (Figura 18a), 5,7 em POPC/POPE 3:1 (m/m) (Figura 18b) e 5,4 em POPC/POPS 3:1 (m/m) (Figura 18c) para o wt-pHLIP, concluindo que ambientes mais ácidos são necessários para a inserção do peptídeo em membranas com composições mistas de fosfolipídeos (VASQUEZ-MONTES et al., 2018). Os mesmos ensaios foram realizados com o análogo P20G e os resultados obtidos foram similares (Figura 18). Todavia, a presença de cátions divalentes reverte esse efeito, promovendo a estruturação e inserção em membranas por estabilizarem a estrutura helicoidal e agirem como ponte salina entre os resíduos ácidos do peptídeo e os grupos negativamente carregados da superfície celular (Figura 19) (VASQUEZ-MONTES et al., 2019, 2022a, 2022b).

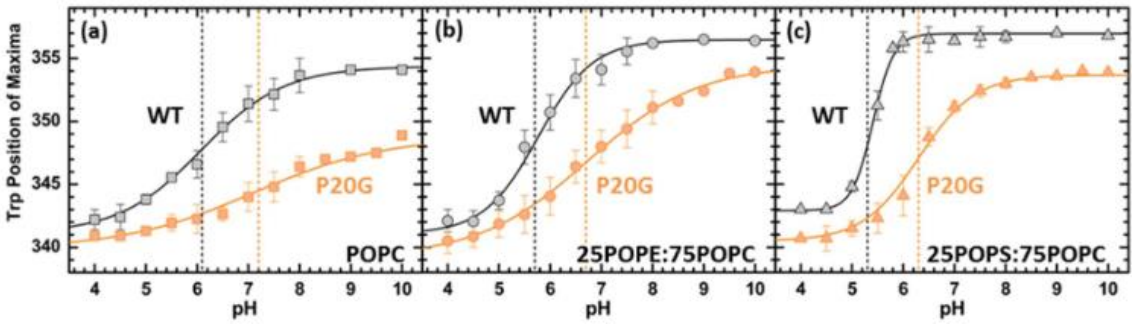


Figura 18: efeito da composição da vesícula sobre o pK_{ins} do wt-pHLIP (cinza) e de seu análogo P20G (laranja). Ensaios com (a) POPC, (b) POPC/POPE 3:1 (m/m) e (c) POPC/POPS 3:1 (m/m) demonstram a variação do pH necessário para que o peptídeo se insira na bicamada fosfolipídica (VASQUEZ-MONTES et al., 2018)

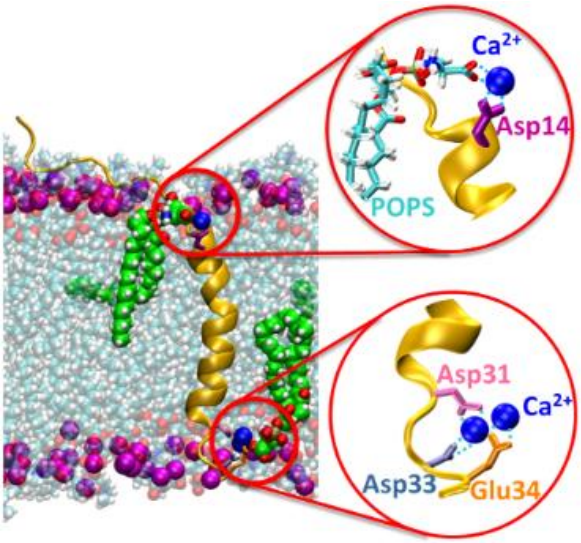


Figura 19: coordenação mediada por Ca^{2+} entre os grupamentos ácidos das cadeias laterais aniônicas do pHLIP e da fosfatidilserina, resultando na diminuição da repulsão eletrostática causada pela aproximação desses grupos (VASQUEZ-MONTES et al., 2022a).

Ao mencionar sobre os estados adquiridos do pHLIP em solução, um detalhe importante é a sua existência como monômero em concentrações abaixo de 7 µM. A tendência de agregação do peptídeo é algo acompanhado por alguns estudos e atribuída a alta hidrofobicidade da molécula. É modulada por temperatura, força iônica e pH principalmente, pois meio ácido aumenta sua hidrofobicidade ao protonar os resíduos negativamente carregados (RAO et al., 2018; RESHETNYAK et al., 2007). A formação de estruturas oligoméricas pode ser benéfica em alguns casos como de alguns AAMPs que agregam na presença de cátions divalentes, potencializando suas atividades membranolíticas (ALMARWANI et al., 2020). Entretanto, devido à natureza do pHLIP e ao que é proposto para o peptídeo, a oligomerização pode interferir na interação com vesículas e membranas em ensaios *in vitro*, além de ser indesejada em situações *in vivo* por

diminuir a quantidade de monômeros ativos capazes de alcançar e agir sobre o sítio de interesse (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013; RAO et al., 2018).

A agregação do pHLIP pode ser acompanhada por meio da técnica de dicroísmo circular, com espectros adquiridos em concentrações crescentes de peptídeo em solução. Reshetnyak et al. averiguaram a agregação do peptídeo em concentrações variantes de 15 a 180 mg/mL (aproximadamente 3,5 a 42 mM) em tampão fosfato 10 mM e pH 8,0, concluindo que devido à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos, a agregação do peptídeo ocasiona no empilhamento das cadeias aromáticas. Com isso, provoca interações entre as nuvens eletrônicas e confere ao complexo uma absorção característica a 232 nm, conhecido como *éxciton* (Figura 20a) (RESHETNYAK et al., 2007). Entretanto, nesse mesmo trabalho foi reportado que a agregação do pHLIP se desfaz ao diminuir sua concentração, em que ao alcançar valores menores que 30 µg/mL (7µM) ao menos 94% das moléculas de peptídeo presentes no meio estão em sua forma monomérica (RESHETNYAK et al., 2007).

Analisando o estudo realizado por Reshetnyak et al. citado anteriormente, observa-se que foram adotadas concentrações excessivamente maiores do que as trabalhadas em demais ensaios com bicamadas fosfolipídicas. Dessa forma, Rao et al. realizaram pesquisas utilizando concentrações de 3 e 12 µM, sendo referidas como pHLIP monomérico e agregado, respectivamente. Experimentos feitos com fluorescência e dicroísmo circular revelaram que mesmo em baixas concentrações como 12 µM, o peptídeo encontra-se agregado em pH 8,0. Este apresentou maior percentual de estruturação em α-hélice nesta concentração de 12 µM do que de 3 µM, indicado pela presença de bandas negativas dicroicas a 222 e 208 nm, típicas dessa estrutura secundária (Figura 20b) (DODERO; QUIROLO; SEQUEIRA, 2011; RAO et al., 2018).

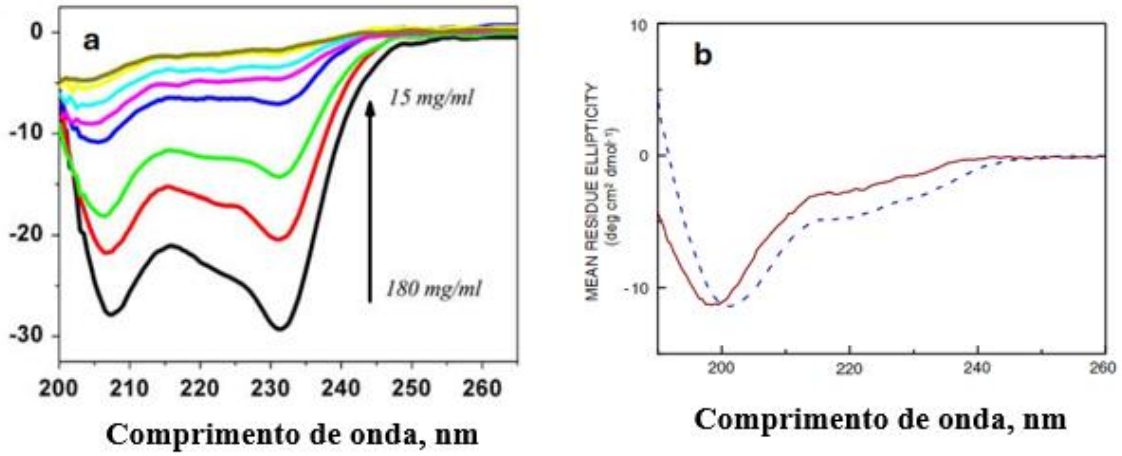


Figura 20: espectros de dicroísmo circular longe da região ultravioleta (Far-UV-CD) do peptídeo pHLIP em pH 8,0 (a) nas concentrações entre 15 e 180 mg/mL, evidenciando a presença de banda negativa crescente em 232 nm, proveniente do empilhamento de estruturas aromáticas devido a formação de agregados (RESHETNYAK et al., 2007). Em (b) espectros do peptídeo nas concentrações de 3 μM (linha contínua vermelha) e 12 μM (linha tracejada azul), evidenciando a estruturação em α-hélice na maior concentração indicados pelas bandas negativas em 222 e 208 nm, características dessa estrutura secundária (RAO et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O trabalho visa prospectar do proteoma humano fragmentos internos de proteínas com características aniônicas e anfifílicas e explorar suas aplicações. Além disso, visa compreender a interação de alguns destes peptídeos frente a membranas de composição diversa, assim como as condições de estruturação em diferentes cenários de vesículas fosfolipídicas e pH.

2.2. Objetivos específicos

1. Prospecção do proteoma humano de segmentos internos de proteínas com carga líquida negativa e caráter anfifílico.
2. Síntese de peptídeos aniônicos encriptados por SPPS.
3. Caracterização por espectrometria de massa;
4. Avaliar e estruturação do peptídeo por dicroísmo circular, com a presença de vesículas fosfolipídicas de DMPC, DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em diferentes valores de pH.
5. Avaliação de atividade antimicrobiana e hemolítica.
6. Estudar quais características físico-químicas dos peptídeos estão mais relacionadas à sensibilidade a pH, assim como seletividade frente a composição de membrana.
7. Buscar por sequências capazes de agir de forma pH-dependente, dentro de um intervalo de pH específico para possíveis aplicações *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de fragmentos de proteínas negativamente carregados

O proteoma humano referência, composto por 20598 proteínas, obtido pelo site do EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/reference_proteomes/), foi submetido ao software Kamal (disponível em http://www.cenargen.embrapa.br/kamal/) para a filtragem de peptídeos aniônicos, anfifílicos e helicoidais com sequência variando entre 16 e 24 aminoácidos. Os parâmetros utilizados para filtragem foram similares a outros trabalhos desenvolvidos pelo laboratório, porém com a diferença de serem selecionados apenas fragmentos com carga líquida negativa. Portanto, os parâmetros foram: Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val e Trp eram permitidos na porção apolar, enquanto Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr e Tyr eram permitidos na porção polar. Os ângulos polares considerados foram de 128º, 160º e 192º, e a carga líquida total ≤ -2.

3.2. Síntese, purificação e quantificação dos peptídeos

3.2.1. Síntese de peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos selecionados foi realizada seguindo o método de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS) utilizando como base a metodologia proposta por Chan e White (CHAN; WHITE, 2000). Por tratar-se de um método simples, direto, de fácil automação e realizado todo dentro de um mesmo meio reacional, é amplamente utilizado como procedimento de síntese química de peptídeos (HANSEN; ODDO, 2015).

Para garantir uma síntese completa e com presença mínima de produtos secundários indesejados, todos os reagentes são utilizados em excesso, descartando a necessidade de etapas de purificação após cada acoplamento de um novo aminoácido. Contudo, gera uma maior quantidade de resíduos.

A primeira etapa para a síntese de um peptídeo é a escolha da resina. A resina de poliestireno é um suporte para a ancoragem da cadeia polipeptídica através de um *linker* e, ao interagir com um solvente orgânico, incha e aumenta sua superfície de contato (HANSEN; ODDO, 2015). Os principais tipos de *linker* utilizados são de Wang (WANG, 1973) e Rink (RINK, 1987), gerando um peptídeo com C-terminal ácido e amidado, respectivamente.

Foram utilizados 0,15 mmol da resina *Rink amide* (100-200 mesh, Novabiochem, Merck), a fim de ter como produto final peptídeos com o C-terminal amidado. Para garantir o "inchaço", a resina é submersa em diclorometano (DCM) por 30 minutos sob agitação. Em seguida, para a derrubada dos grupos protetores Fmoc e desproteção da resina, utilizou-se solução de 20% 4-metilpiperidina em N,N-dimetilformamida (DMF) através de dois ciclos de 15 minutos sob agitação de 200 rpm.

O método utilizado para verificar o sucesso da desproteção foi descrito por Kaiser et al., e baseia-se na reação da ninhidrina, resultando na formação de moléculas capazes de absorver radiação na faixa visível, apresentando coloração visível a olho nu (KAISER et al., 1970). Resumidamente, quando ocorre a desproteção, a ninhidrina reage com aminas primárias, formando o composto conhecido como azul de Ruhemann. No caso específico em que o último aminoácido da sequência é uma prolina, que possui uma amina secundária, o composto formado pela reação com a ninhidrina apresentará uma coloração marrom-amarelada. O teste de Kaiser é utilizado para confirmar tanto a desproteção (remoção dos grupos protetores dos N-terminais dos aminoácidos) quanto o acoplamento. Isso ocorre porque um aminoácido recém-acoplado ainda terá os grupos protetores, impedindo que a ninhidrina acesse uma amina livre, resultando na ausência de coloração no teste.

Após a confirmação da desproteção da resina, a síntese do peptídeo pode ser iniciada seguindo o sentido do C-terminal para o N-terminal. A metodologia de acoplamento empregada faz uso dos reagentes diisopropilcarbodiimida (DIC) como ativador e sequestrador de próton da carboxila do aminoácido a ser acoplado e o etil(2Z)-2-ciano-2-hidroxiiminoacetato (Oxyma®) como preventor de epimerização de aminoácidos durante a saída da O-acil-isoureia (SUBIRÓS-FUNOSAS et al., 2009). Para dar início ao protocolo de acoplamento, pesou-se 4 equivalentes (0,6 mmol) do peptídeo inicial, DIC, Oxyma® e 2 mL de DMF. A mistura foi então deixada sob agitação em 200 rpm por 90 minutos, para então posteriormente ser feita a lavagem para retirada dos reagentes em excesso, aplicando três ciclos de lavagens com 3 a 4 mL de DMF seguido por DCM e, por fim, confirmação do acoplamento por teste de Kaiser. Havendo a confirmação, prossegue-se para a desproteção de forma análoga a feita com a resina para o acoplamento de um novo aminoácido, até o término da sequência do peptídeo.

Uma vez finalizados os acoplamentos de todos os aminoácidos, torna-se necessário desacoplamento do peptídeo a resina e de todos os grupos protetores de cadeias laterais. Esse procedimento é realizado através de uma clivagem ácida, empregando ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) e água nas proporções 95:2,5:2,5 com volume final de 10 mL e deixados sobre agitação por 90

minutos a 200 rpm. Após o tempo reacional, o TFA foi evaporado sob fluxo de argônio até que não houvesse notória redução do volume de solução, seguido de adição de éter diisopropílico gelado para precipitar o peptídeo. Posteriormente, a mistura foi levada a filtração à vácuo utilizando um funil com placa sinterizada e papel de filtragem, sendo submetida a lavagens com água e acetonitrila 50:50. Ambas as frações aquosa e etérea foram coletadas. Apesar de a maior parte do peptídeo estar presente no extrato aquoso, o extrato orgânico é coletado por poder possuir quantidades, mesmo que ínfimas, de peptídeo presentes que podem ser purificadas e aproveitadas. Finalmente, todas as frações coletadas foram armazenada em congelador para procederem para a retirada do solvente e purificação. Os extratos aquosos tiveram a fração de acetonitrila seca sob vácuo utilizando equipamento Centrivap em colaboração com o Laboratório de Toxicologia, e a fração de água foi seca através de liofilização colaboração com o Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA), ambos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3.2.2. Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os peptídeos foram submetidos a purificação através de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Shimadzu em colaboração com o NuPMIA. A coluna empregada para a separação cromatográfica foi uma preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 2,12 mm, 10 µm, 300 Å) fabricada pela Phenomenex, utilizando um sistema binário de bombeamento e detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A). Usou-se o *software* de análise e processamento de dados LabSolutions versão 9.52 para acompanhamento da aquisição do cromatograma.

A injeção no cromatógrafo foi feita manualmente, com volume de 1 mL de peptídeo solubilizado em água com concentração final de 20 mg/mL. Quando os peptídeos a serem purificados possuíam menor solubilidade, a concentração final utilizada era de 10mg/mL. Em todos os casos, as soluções necessitaram ser levemente alcalinizada com 50 µL de NaOH 1 mol/L, para melhorar a solubilidade dos peptídeos em meio aquoso através da desprotonação dos aminoácidos de cadeia lateral ácida. O cromatograma seguiu com fluxo constante de 10 mL/min (para peptídeos de concentração 20 mg/mL) e 2,5 mL/min (para peptídeos de concentração 10 mg/mL) de fase móvel composta por água + 0,1 % TFA (solvente A) e acetonitrila (ACN) + 0,1 % TFA (solvente B), com variação da composição total através de um crescente gradiente de concentração do solvente B, conforme a Tabela 4 e como mostra a Figura 21:

Tabela 4: gradientes de concentração da fase móvel para purificação dos peptídeos por CLAE.

Intervalo	% solvente B (ACN)
0 – 5 min	5
5 – 50 min	5 - 95
50 – 55 min	95
55 – 56 min	95 – 5
56 – 60 min	5

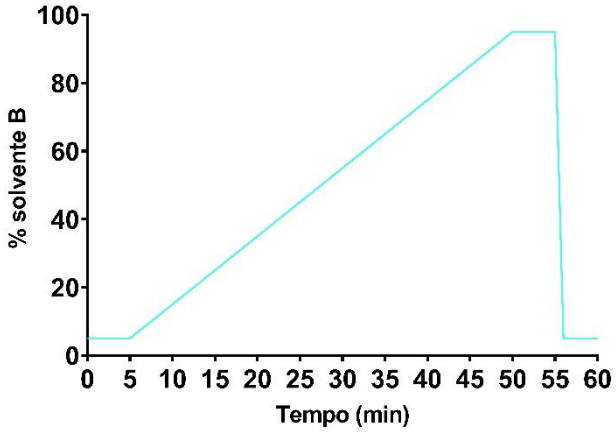


Figura 21: método utilizado para purificação do peptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna de fase reversa. Apresentado em termos de % solvente B (ACN) vs tempo de corrida em minutos.

Os comprimentos de onda de 216 e 280 nm foram monitorados, referentes à absorção da ligação peptídica e de cadeias laterais dos aminoácidos Trp, Tyr e, em menor grau, Cys, respectivamente. Apesar de possuir cadeia lateral aromática, a Phe absorve em comprimentos de onda menores (240 – 265 nm), não contribuindo substancialmente para identificação utilizando o último (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

A fração de interesse foi coletada manualmente e liofilizada, para seguir para identificação por espectrometria de massa.

3.2.3. Identificação dos peptídeos por espectrometria de massa

A confirmação da síntese do peptídeo foi realizada através de espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo líquido (LC-MS) e análise de fragmentos gerados (LC-MS/MS), para elucidação da composição da molécula

através da comparação entre a massa molecular teórica e a obtida experimentalmente. O estudo foi realizado com um espectrômetro de alta resolução do tipo TripleTOF 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ – UnB). O instrumento é equipado com fonte de ionização por electrospray (EsI – *Electrospray Ionization*), separador de íons do tipo triplo quadrupolo, módulo de colisão e produção de fragmentos por dissociação por colisão com gás inerte, analisador de massas tempo de voo (TOF – *time of flight*) e acoplado a um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) para injeção automática da solução do analito em vazão constante de 0,3 mL/min. Os ensaios foram executados com o espectrômetro ajustado ao modo positivo e utilizando o modo de aquisição IDA (*Information Dependent Acquisition*), que seleciona automaticamente os íons a serem fragmentados baseado em parâmetros previamente definidos.

Para a análise, uma ponta de espátula contendo os peptídeos liofilizados foram solubilizados em 1000 µL de metanol com 0,1 % ácido fórmico. Os espectros de massa obtidos foram analisados e processados pelo *software* PeakView v2.1, enquanto os espectros de fragmentação (MS/MS) foram processados utilizando a ferramenta online *Interactive peptide spectral annotator* (BRADEMAN et al., 2019).

3.2.4. Quantificação por espectrofotometria ultravioleta-visível

Os peptídeos solubilizados foram quantificados aproveitando-se das propriedades de absorção de comprimentos de onda da faixa do ultravioleta-visível (UV-Vis). Para os peptídeos selecionados que possuem triptofano em sua composição, a quantificação foi feita utilizando a absorção no comprimento de onda de 280 nm. Para as sequências que não possuem tal aminoácido, os comprimentos utilizados foram de 205, 215 e 225 nm, responsáveis pela excitação dos elétrons π da ligação peptídica, através de uma relação que utiliza as três absorbâncias medidas (SCOPES, 1974; WADDEL, 1956):

$$[\text{peptídeo}]\left(\frac{\mu g}{mL}\right) = \frac{((A_{205} \cdot 31) + ((A_{215} - A_{225}) \cdot 144)) \cdot Fd}{2} \quad (1)$$

Em que Fd = fator de diluição.

O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1280, em parceria com o NuPMIA. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de

1 cm. Antes de todas as medidas, descontou-se o branco utilizando solução de igual composição a que o peptídeo purificado foi ressolubilizado.

3.3. Ensaios de interação de peptídeo com vesículas por dicroísmo circular

3.3.1. Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m)

A preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) seguiu a metodologia descrita por Brand (BRAND; BLOCH, 2007), sendo necessários 20 mg de fosfolipídeos a depender da composição final desejada. Dessa forma, pesou-se 20 mg de DMPC e 20 mg DMPC/DMPG (13,3 mg e 6,6 mg respectivamente). Os fosfolipídeos liofilizados (Avanti Polar Lipids, CA, EUA) foram inicialmente solubilizados em 2 mL de clorofórmio, com volume completado para 20 mL em um balão de fundo redondo. Em seguida, o solvente foi evaporado sob vácuo através de um rotaevaporador, sob banho de água a 40 ºC por aproximadamente 35 minutos, a fim de alcançar um filme translúcido e uniforme no fundo do balão. Para evaporar ainda mais o solvente, os fosfolipídeos foram deixados sob vácuo por mais 150 minutos, com o balão envolto em papel alumínio. Em seguida, após ter o solvente volatilizado, os fosfolipídeos secos foram ressolubilizados em 2 mL de solução tampão fosfato (PBS 12,12 mM fosfato de sódio dibásico, 7,88 mM fosfato de sódio monobásico, 150 mM NaCl, pH 7,4 ajustado com NaOH e HCl) e submetidos a um processo de extrusão, consistindo na passagem forçada utilizando uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro por 19 vezes, modificando as vesículas multilamelares (MLVs) em unilamelares, que foram armazenadas em temperatura ambiente e sem contato com luz.

3.3.2. Construção de curvas de calibração e quantificação das LUVs por espectrofotometria UV-Vis

A quantificação de LUVs utiliza-se da complexação de oxigênios dos grupos fosfato com átomos de ferro, sendo capazes de absorver em um comprimento de onda específico e, a partir da lei de Lambert-Beer, estimar a concentração de vesículas com o uso de uma curva de calibração. Como fonte de ferro, utilizou-se solução de ferrotiocianato de amônio ($Fe(SCN)_3$ – 27g de $FeCl_3.6H_2O$ e 30g de NH_4SCN em 1 L de água).

Primeiramente, faz-se necessária a construção da curva de calibração. Para isso, preparou-se uma solução com a vesícula a 150 mg/mL com a composição desejada (DMPC ou DMPC/DMPG) em clorofórmio. Outras concentrações necessárias para a criação da curva são de 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, as quais foram obtidas a partir de diluição seriada derivada da primeira solução preparada. Em seguida, misturou-se 1000 µL da solução de vesícula com 500 µL da solução de $Fe(SCN)_3$, seguido de agitação vigorosa com emprego de um vórtex para garantir o maior contato entre as duas fases. Em seguida, retirou-se uma alíquota da fase orgânica para que fosse realizada a leitura em comprimento de onda de 488 nm utilizando um espectrofotômetro.

A quantificação das vesículas preparadas foi realizada utilizando as curvas de calibração para cálculo das concentrações. Inicialmente, retirou-se uma alíquota de 10 µL da solução de vesículas e colocadas sob aquecimento para evaporação do solvente. Em seguida, foram ressolubilizadas em 1000 µL de clorofórmio e adicionou-se 500 µL da solução de $Fe(SCN)_3$, posteriormente a mistura foi homogeinizada vigorosamente por meio de vórtex e a fase orgânica coletada, para medir a absorção por espectrofotometria.

3.3.3. Dicroísmo circular

A utilização da técnica de dicroísmo circular para a elucidação da estrutura secundária de proteínas baseia-se na capacidade de uma molécula assimétrica interagir com luz circularmente polarizada. Um dos grandes benefícios dessa técnica é permitir o uso de pequenas quantidades de amostra, não ser destrutiva e possibilitar o acompanhamento de efeitos como variações de temperatura, força iônica do meio e pH (DODERO; QUIROLO; SEQUEIRA, 2011). A luz circularmente polarizada pode ser decomposta em dois vetores que giram para a direita e para a esquerda, com diferenças de fase de π/2 (GREENFIELD, 2007). A interação com uma proteína resulta na absorção diferencial desses componentes, tornando a luz transmitida elipticamente polarizada. Cada tipo de estrutura secundária de uma proteína possui uma absorção específica, que é uma característica típica como assinatura, permitindo identificar como a proteína se comporta em solução em relação à estrutura adotada. (GREENFIELD, 2007).

Peptídeos e proteínas podem absorver luz circularmente polarizada nas faixas de UV-distante (170-250 nm) por meio da ligação amídica ou UV-próximo (250-300 nm) por meio das cadeias laterais aromáticas (DODERO; QUIROLO; SEQUEIRA, 2011). A absorção de luz nessas faixas de comprimento de onda são responsáveis por transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (WHITMORE; WALLACE, 2008). Para o presente trabalho, apenas as faixas de UV-distante foram utilizadas. As absorções características de cada estrutura secundária são dispostas na Figura 22:

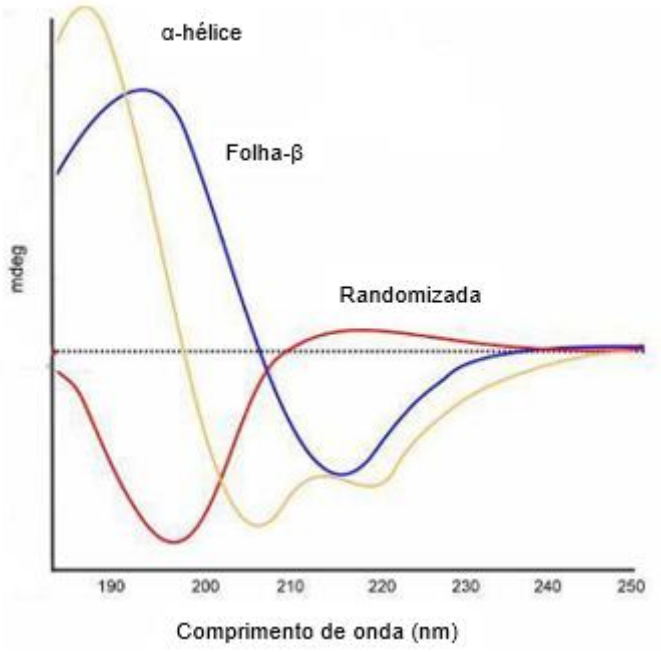


Figura 22: espectros de dicroísmo circular na região "Far-UV" de diferentes proteínas e peptídeos com três tipos de estruturas secundárias (DODERO; QUIROLO; SEQUEIRA, 2011).

Nota-se que proteínas com α-hélices apresentam duas bandas negativas em 222 e 208 nm e uma positiva em 193 nm. Folhas-β antiparalelas apresentam uma banda negativa em 218 nm e uma positiva em 195, enquanto estruturas desordenadas apresentam apenas uma banda negativa próxima de 200 nm (GREENFIELD, 2007).

O estudo das estruturas secundárias adotadas pelos peptídeos foi realizado com a técnica de dicroísmo circular, utilizando o espectropolarímetro J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura Peltier e bomba d'água. Este estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biofísica Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, UnB. Os experimentos foram realizados variando condições de pH e composição das vesículas, e em alguns casos suas concentrações, com temperatura fixada em 37 ºC. Tampões de acetato de sódio (20 mM, 150 mM NaCl, pH 5,0), MES (ácido (2-(*N*-morfolino)etanosulfônico) (20 mM, 150 mM NaCl, pH 6,0) e PBS foram utilizados no experimento, com o peptídeo e LUVs em concentração constante de 2 mol % (25,6 μM de peptídeo e 1280 μM de vesícula). A faixa de comprimentos de onda utilizada foi de 200 a 260 nm, com intervalos de 0,2 nm, velocidade de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 0,5 segundos, largura da banda de 0,85 nm e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II.

Os espectros foram obtidos a partir da média de 5 leituras consecutivas e da subtração dos valores do sinal dicroico do espectro do tampão utilizado como

branco. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ([θ]) (deg.cm^2.dmol^{-1}) baseado na massa molecular média calculada por resíduo de 115 Da, segundo a equação 2:

$$[\theta] = \frac{115 \cdot \alpha}{10 \cdot C \cdot l} \quad (2)$$

onde, α é o sinal dicroico em mdeg, C é a concentração da amostra (mg/mL) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

O cálculo de percentual de estruturação em α-hélice foi feito a partir dos espectros ajustados com o programa online *BeStSel*, por meio de um algoritmo que aplica uma combinação linear de um conjunto de oito estruturas base, considerando diferentes conformações de α-hélices e folhas-β (MICSONAI et al., 2015).

3.4. Estudos de atividade antimicrobiana: ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)

O potencial de atividade frente a micro-organismos foi elucidado a partir de testes de suscetibilidade contra cepas selecionadas, em colaboração com o Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB). Para o experimento, o peptídeo foi incubado juntamente com *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. baumanii* e *S. epidermis*, obtidos a partir da biblioteca de micro-organismos da UCB. Foi realizado ensaio de microdiluição em caldo conforme o protocolo M07-A10 do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). Inicialmente, bactérias foram mantidas em -80 ºC até o uso. 10 µL do estoque de cada cepa suspensa em meio Mueller-Hinton (MH) caldo sendo realizado em placas de 96 poços de fundo chato, em volume final de 100 µL. A concentração do peptídeo variou de 128 a 1 µM através de diluição seriada, enquanto para a gentamicina – antibiótico empregado para controle – variou de 20 a 0,039 µM. A concentração final de células bacterianas por poço foi de 5 × 10^5 células/mL. Para controle positivo, utilizou-se apenas 100 µL de meio MH no poço estéril, enquanto para controle negativo, poços contendo apenas meio MH e bactérias na mesma concentração descrita.

As placas foram incubadas em estufa a 37 ºC por 24 horas, e o ensaio foi efetuado em duplicata técnica e triplicata biológica. Após o período de incubação, as placas foram submetidas a leitura visual comparando a turbidez do meio, em que meio turvo indica o crescimento bacteriano e límpido indica a inibição do mesmo.

Para analisar o efeito de cátions divalentes na atividade antimicrobiana do peptídeo, foi realizado um ensaio com meio cátion ajustado. O ensaio consiste no mesmo meio base utilizado para os ensaios padrões, com metodologia descrita anteriormente, ocorrendo apenas a adição de 0,5 mM Ca^{2+}, 0,4 mM Mg^{+2} e 20 µM Zn^{2+}.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Filtragem dos peptídeos

O proteoma humano, contendo 20598 proteínas, foi utilizado como referência e submetido ao *software* Kamal para a filtragem de peptídeos com carga líquida ≤ -2, caráter anfifílico ao estruturarem-se em α-hélice e com valores de momento hidrofóbico, hidrofobicidade média e índice de agregação apresentados na seção 3.1. A partir deste procedimento, foram obtidos 2697 fragmentos únicos com carga líquida negativa e características físico-químicas desejadas, com alguns exemplos demonstrados na tabela 5. A esse grupo foi dado o nome de *Intragenic Delivery Peptides,* do português Peptídeos Intragênicos de Entrega, de *Homo sapiens* (HsIDPs), em alusão aos HsIAPs, complementares catiônicos já estudados por grupos do laboratório (BRAND et al., 2019; SANTOS et al., 2023b). Dentre os ângulos polares avaliados de 128, 160 e 192º, a maioria dos peptídeos encontrados portavam a angulação polar de 192º, porque dessa forma a face hidrofílica é mais ampla, e por ser mais permissiva, admite um maior número de sequências peptídicas.

Tabela 5: peptídeos encriptados aniônicos e anfifílicos obtidos através do software *Kamal*, após filtragem com parâmetros previamente mencionados, com suas cargas, ponto isoelétrico e proteína origem, em conjunto com seu respectivo código UniProt. Esquema de cores seguindo o padrão Zappo.

Sequência	Carga	Ponto isoelétrico	Proteína de origem
RVLNELIGDFDELLSK	-2	4,313	Adenilato ciclase tipo 9 | O60503
RLLNEIIADFDELMEK	-3	4,177	Adenilato ciclase tipo 1 | Q08828
RLLNEIIADFDEIISE	-4	3,835	Adenilato ciclase tipo 6 | O43306
HALTLLSEVLAHLLDMV	-2	5,147	Proteína DOP1A | Q5JWR5
EHAIYVWDHFIAQAAA	-2	5,147	Regulador Cotranscripcional ARB2A | Q8WUF8
GDLFHRLWHIMNEILD	-2	5,216	Dedicador 4 de proteína de citocinese | Q8N1I0
LEVLEDIIGFALALFM	-3	3,575	Complexo 3 de proteína superkiller | Q6PGP7
LNVIEEVIRMMLEIINS	-2	4,259	Dimeclina | Q7RTS9

É possível fazer uma comparação de alguns parâmetros dos potenciais IDPs com IAPs estudados em trabalhos prévios do grupo (BRAND et al., 2019; COSTA et

al., 2024). Os IAPs utilizam propriedades físico-químicas de AMPs catiônicos e anfifílicos como base para parâmetros de busca do proteoma. Dessa forma, levantou-se a hipótese se peptídeos com as mesmas características físico-químicas, porém com cargas negativas, apresentariam atividades biológicas comuns entre si, similarmente ao que ocorre com IAPs. Com isso, o esforço inicial desse trabalho foi de buscar peptídeos com o mesmo motivo, porém com carga líquida negativa. Consequentemente, os parâmetros baseados em hidrofobicidade (hidrofobicidade média e momento hidrofóbico) obtidos para HsIDPs são estatisticamente iguais àqueles dos HsIAPs, uma vez que foram utilizadas as mesmas regras para aminoácidos componentes da face hidrofóbica durante a filtragem (Figura 23a,b). Como esperado, o valor médio de ponto isoelétrico (pI) das sequências obtidas são diferentes entre IDPs e IAPs. O pI médio foi de 3,97 ± 0,42 para IDPs e 10,59 ± 0,93 para IAPs, $p<0.0001$, teste t não-pareado (Figura 23c). Os valores de pI dos HsIDPs filtrados variam de 3,151 até 5,735, em que os peptídeos com diferentes valores estão elencados na Tabela 5.

O perfil de agregação de IDPs e IAPs também se mostrou diferente ($p<0.0001$, teste t não-pareado). A agregação é calculada através do índice Na4vSS pelo algoritmo Aggrescan, que considera a propensão de agregação dos 20 aminoácidos naturais em ensaios *in vivo* utilizando a Aβ como referência (CONCHILLO-SOLÉ et al., 2007; PRABAKARAN et al., 2021). Valores negativos do índice Na4vSS indicam menor tendência de interação entre monômeros do peptídeo (CONCHILLO-SOLÉ et al., 2007). Os valores médios obtidos foram -0,26 ± 19,65 para IDPs e 9,84 ± 23,59 para IAPs, apontando que os peptídeos aniônicos possuem menor tendência de agregação em comparação a seus análogos catiônicos (Figura 23d).

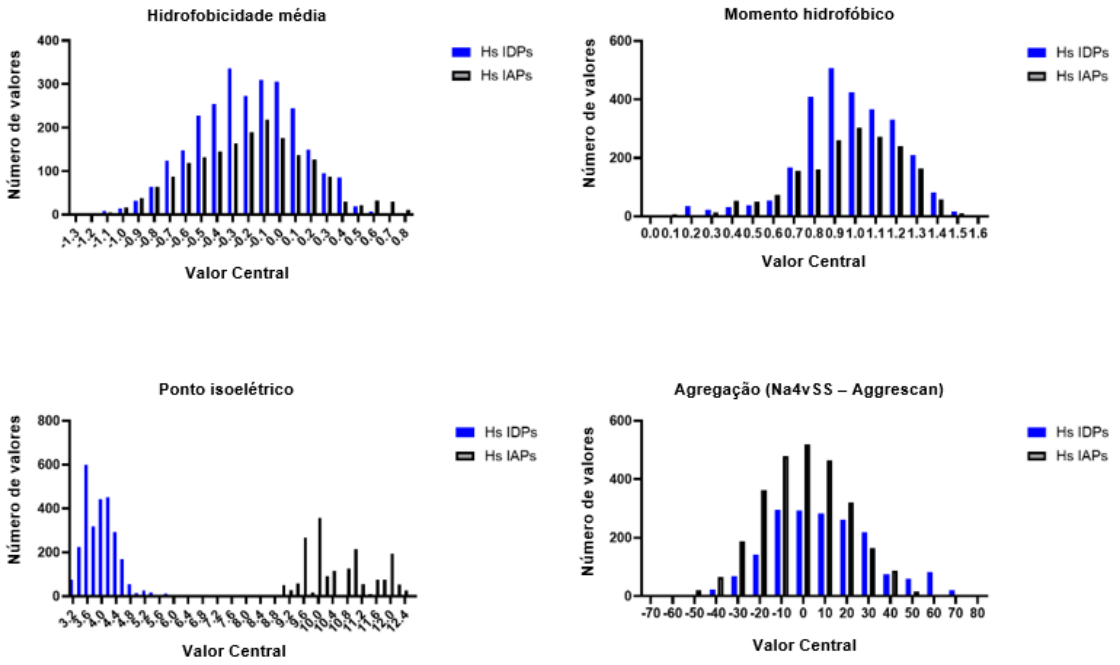


Figura 23: comparações de histogramas de (a) hidrofobicidade média, (b) momento hidrofóbico, (c) ponto isoelétrico e (d) agregação utilizados para a filtragem de HsIDPs (azul) e HsIAPs (preto).

Conforme reportado por Costa et al., os potenciais HsIAPs estão significativamente representados em segmentos de proteínas transmembranares e periféricas de membrana no proteoma humano (COSTA et al., 2024). Logo, surgiu a hipótese de uma possível super-representação de sequências aniônicas e anfifílicas em alguma classe proteica. Para investigar isso, as proteínas que eram fonte de pelo menos um HsIDP foram analisadas no site Panther. Um total de 653 proteínas foram identificadas como precursoras de IDPs e submetidas à PantherDB para teste de enriquecimento seletivo em comparação ao genoma humano total, utilizando o teste exato de Fisher com correção para a taxa de descobertas falsas. Os resultados mostraram uma super-representação de algumas classes de proteínas, especialmente as adenilato ciclases. Ao comparar o percentual de segmentos proteicos da classe adenilato ciclase no proteoma humano com o percentual de IDPs dessa classe entre as 653 proteínas precursoras, observou-se um enriquecimento de 25 vezes em relação ao esperado (Figura 24).

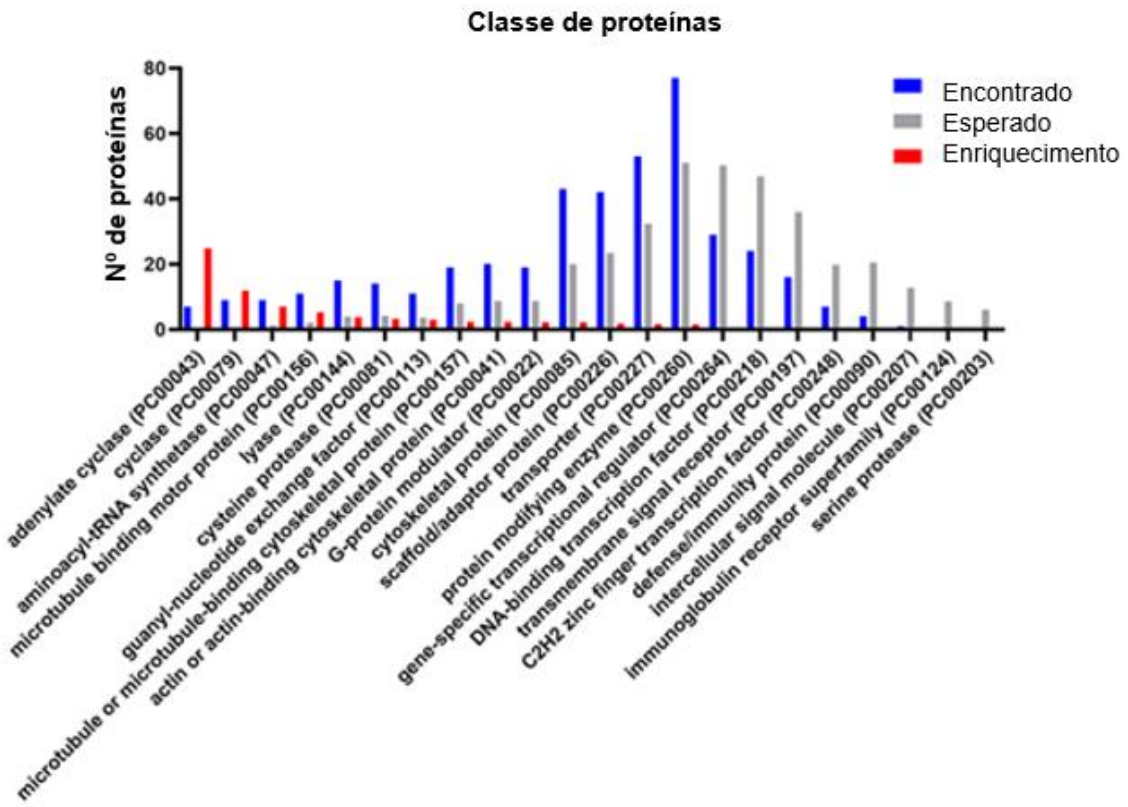


Figura 24: histograma das classes de proteínas precursoras de IDPs. Em azul está o número de proteínas encontradas que encaixam nos critérios de filtragem, enquanto em cinza está o número esperado baseado no percentual relativo da classe de proteínas em frente a todo o genoma humano. Em vermelho, o enriquecimento (multiplicado) entre o encontrado e o esperado, com destaques nas famílias das adenilato ciclase, ciclase e aminoacil-tRNA sintetase.

4.2. Primeira geração de HsIDPs:

Dentre os IDPs apresentados na Tabela 5, o de sequência RVLNELIGDFDELLSK, proveniente de adenilato ciclase 9 (O60503.4, resíduos de 1083 a 1098) (Figura 25) foi escolhido como prova de conceito para ser sintetizado e seguir com testes de atividades biológicas e estruturação frente a vesículas, sendo batizado de HsIDP1. Esse fragmento corresponde a uma hélice anfifílica negativamente carregada, com a porção hidrofóbica projetada para o interior da proteína e a porção hidrofílica, composta com aminoácidos carregados Arg1, Glu5, Asp9, Asp11, Glu12 e Lys16, projetada para a face exterior (Figura 25b). Dessa forma, apresenta característica anfifílica ao estruturar-se em α-hélice, com os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos separados em diferentes faces (Figura 25c).

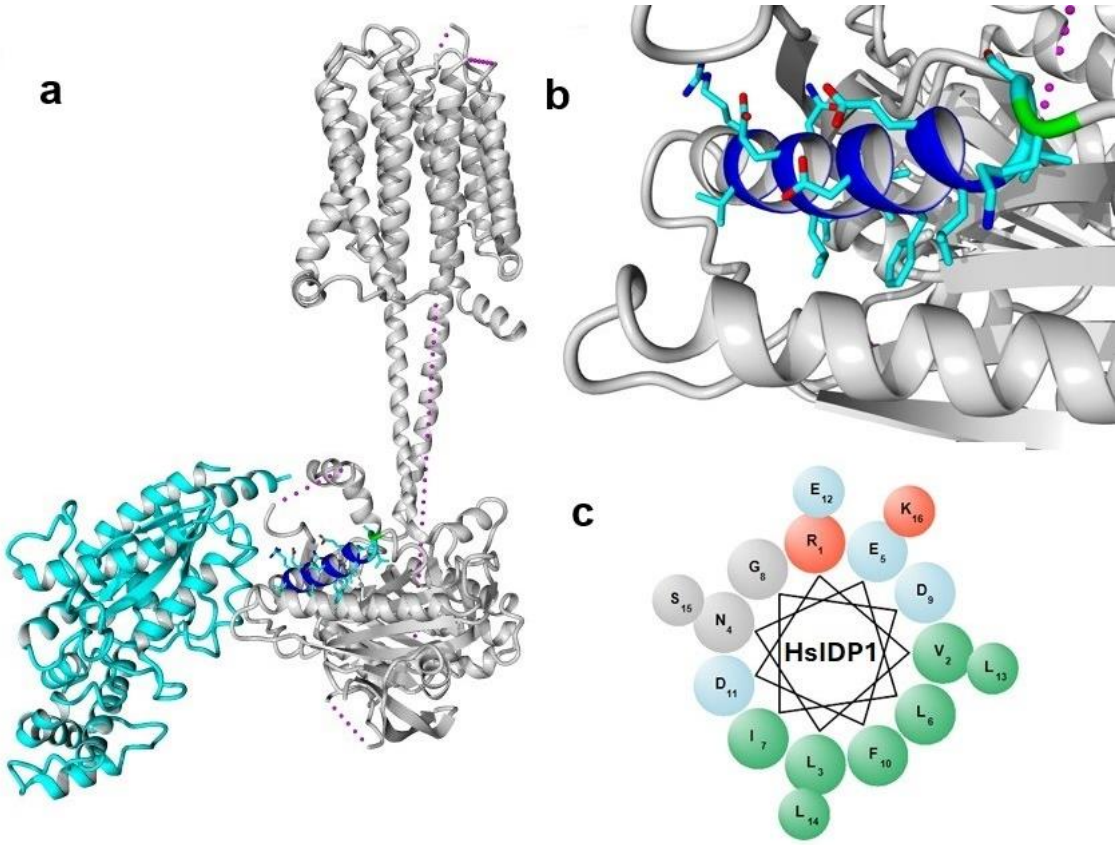


Figura 25: (a) estrutura tridimensional da AC9 complexada com subunidade α da proteína Gs (Gαs) em ciano. (b) Destaca-se em azul a estrutura RVLNELIGDFDELLSK correspondente ao HsIDP1. (c) Mapa de Edmundson representando o caráter anfifílico do peptídeo ao estruturar-se em α-hélice, com aminoácidos retratados por esferas e identificados por seus códigos de uma letra. Em verde aminoácidos apolares, em cinza polares não carregados, em vermelho carregados positivamente e em azul, negativamente.

4.2.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa

Escolhido o HsIDP1, prosseguiu-se para sua síntese seguindo a metodologia de Síntese de Peptídeos por Fase Sólida. O peptídeo foi sintetizado utilizando resina Rink sem contratempos. A fração aquosa obtida da clivagem foi levada a purificação através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando uma coluna preparativa de fase reversa. Para o procedimento, o peptídeo foi solubilizado em água para uma concentração de 20 mg/mL, sendo necessária a adição de um pequeno volume de NaOH para desprotonação das cadeias laterais ácidas, melhorando sua solubilidade. Foram realizadas um total de 5 corridas cromatográficas, sendo as três primeiras realizadas com concentrações de 20 mg/mL e a duas últimas (coletas provenientes da fase etérea da clivagem) com 17,5 mg/mL, totalizando 95 mg de peptídeo e impurezas para purificação. Contudo,

houve perda dos peptídeos purificados provenientes das duas primeiras corridas por erro procedimental.

Todos os cromatogramas obtidos apresentaram um pico majoritário contendo o peptídeo de interesse com tempo de retenção de t = 31,35 min, com a fase móvel composta por 52,7% de ACN, sendo esse o pico coletado (Figura 26).

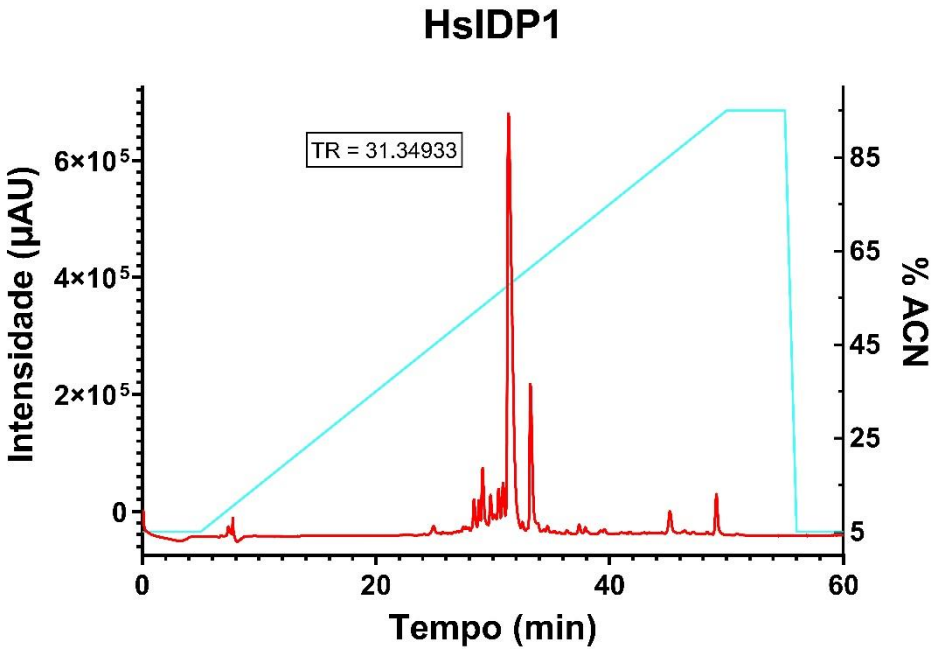


Figura 26: cromatograma do HsIDP1 monitorado a 216 nm em vermelho. O pico principal coletado, referente ao peptídeo de interesse possui tempo de retenção t = 31,35 min. Gradiente de concentração do solvente B (ACN) em função do tempo em azul-claro.

Os espectros de massa das frações eluídas da cromatografia do HsIDP1 foram adquiridos em um EsI Q-ToF (Triple Tof 5600+) para a confirmação da síntese da sequência RVLNELIGDFDELLSK-NH_2, com massa teórica $[M+H]^+$ = 1860,0230 Da. Todavia, o HsIDP1 foi identificado com a presença de dupla e tripla carga, com massas teóricas $[M+2H]^{2+}$ = 930,5154 Da e $[M+3H]^{3+}$ = 620,6795 Da, respectivamente.

Para a molécula com duas cargas, a massa medida foi m/z = 930,5179 Da, gerando um erro de 2,69 ppm (Figura 27), enquanto para a molécula com três cargas a massa medida foi 620,6802, gerando erro de 1,13 ppm (dado não mostrado). Esses dados indicam o sucesso da síntese do peptídeo.

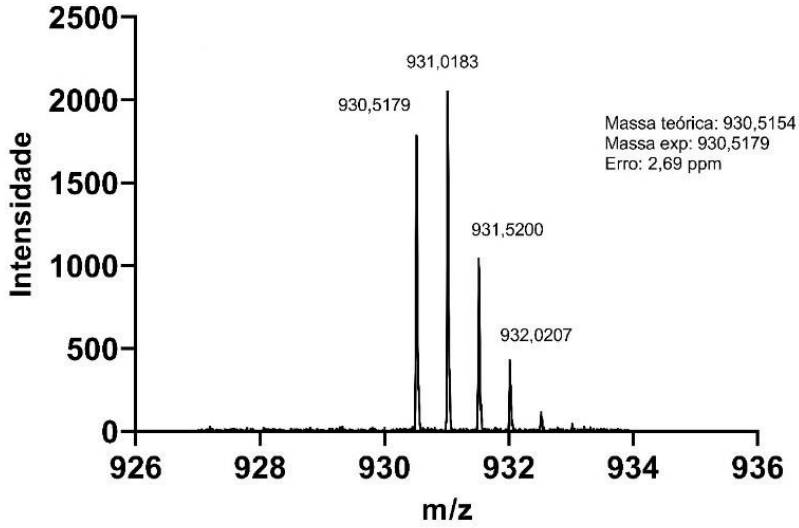


Figura 27: espectro de massa de dupla carga representando $[M+2H]^{2+}$ = 930,5179 Da e sua série isotópica, com um erro de massa de 2,69 ppm calculado a partir da massa teórica exata.

O espectro de fragmentação do peptídeo foi adquirido tendo como íon precursor a tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 620,6790 Da. O íon a ser fragmentado foi selecionado automaticamente conforme pré-configuração do modo IDA (*Information dependent acquisition*) e apresentou fragmentos das séries a, b, x e y majoritariamente (Figura 28) com os erros de massa em ppm de cada fragmento disposto no quadro abaixo. Os dados obtidos foram processados pela ferramenta online *Interactive Peptide Spectral Anotator* (BRADEMAN et al., 2019).

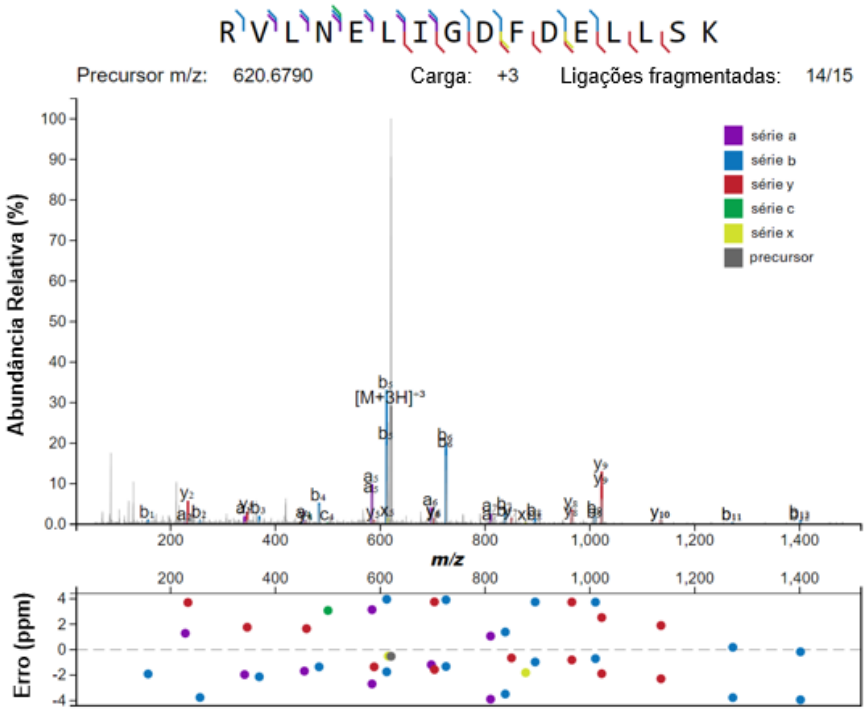


Figura 28: espectro de fragmentação (MS/MS) obtido e modo IDA do íon tripla carga $[M+3H]^{3+}$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b), vermelho (série y), verde (série c) e amarelo (série x).

4.2.2. Dicroísmo circular

O estudo da estruturação do HsIDP1 e interação com fosfolipídios foi realizado com membranas modelo a partir de vesículas de diferentes composições. Foram realizados estudos com LUVs de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m), respectivamente, para elucidar os efeitos da composição de fosfolipídios na estruturação do peptídeo. O propósito era compreender se há alguma seletividade dependente da composição da membrana, característica de peptídeos membrano-ativos, como os HsIAPs, permitindo que a atividade biológica ocorra de forma seletiva (BRAND et al., 2019; COSTA et al., 2024; SANTOS et al., 2023). Analogamente, foram realizados estudos com alteração do pH do meio para avaliar se o HsIDP1 apresenta atividade pH-dependente, similar a peptídeos aniônicos membrano-ativos descritos na introdução (LI; NICOL; SZOKA, 2004; ZOONENS; RESHETNYAK; ENGELMAN, 2008).

Inicialmente, a concentração de peptídeo foi mantida constante em 40 µM e a temperatura da cubeta em 25 ºC. A fim de padronizar as condições experimentais e garantir a reprodutibilidade dos resultados, o peptídeo foi adicionado ao frasco reacional contendo as vesículas cerca de 3 a 4 minutos antes da análise. Tomou-se o cuidado quanto ao tempo de interação do peptídeo com as vesículas pois, em

estudos com diferentes análogos do pHLIP, o tempo de inserção dos peptídeos variou de 4 a 60 segundos (SILVA et al., 2023).

Primeiramente, estudou-se a afinidade do peptídeo em pH neutro com membranas zwitteriônicas e aniônicas, compostas por DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m), respectivamente, em concentração de 1280 μM (Figura 29a). Nota-se que em pH neutro, o HsIDP1 não apresentou estrutura secundária definida em tampão, mantendo-se dessa forma após a adição de vesículas, uma vez que os sinais dicroicos negativos característicos de uma α-hélice a 222 e 208 nm não estão presentes. Diferentemente dos HsIAPs, que são capazes de formar α-hélice nesses valores de pH, o HsIDP1 mantém-se com estrutura deesordenada (BRAND et al., 2019). Entretanto, não se pode afastar a hipótese de que o HsIDP1 possa se manter apenas adsorvido à superfície da membrana, analogamente a peptídeos similares (RESHETNYAK et al., 2007). De acordo com a literatura, a presença de grupos aniônicos carregados impede a translocação de peptídeos pela membrana, pelo alto custo energético necessário para manter átomos carregados no meio interfacial altamente apolar (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013). Similarmente, as cargas negativas desestabilizam a estruturação do peptídeo em hélice por repulsão eletrostática. Os mesmos ensaios foram repetidos com concentrações variadas de vesícula no meio, de 0 a 1280 uM (Figura 29b,c), para averiguar se haveria algum efeito na interação peptídeo-vesícula, porém nenhum resultado diferente foi observado e o HsIDP1 manteve-se na condição inicial.

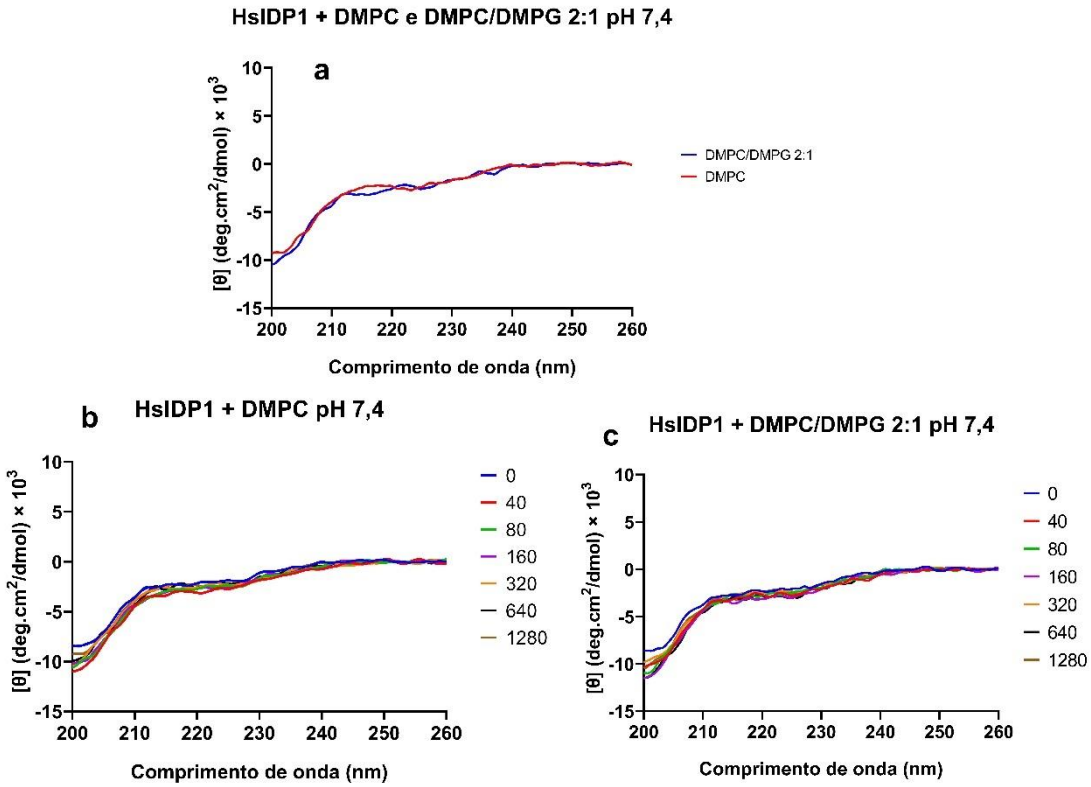


Figura 29: espectros de dicroísmo circular em pH 7,4 de HsIDP1 (a) com DMPC (em vermelho) e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (em azul), apresentando sinal negativo a partir de 210 nm, característico de estruturas desordenadas. Em (b) e (c) ensaios realizados com DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m), respectivamente, com concentração de vesículas de 0 (azul), 40 (vermelho), 80 (verde-claro), 160 (lilás), 320 (laranja), 640 (preto) e 1280 μM (marrom), sem alteração da estrutura adotada pelo peptídeo nas diferentes concentrações da vesícula.

A partir dos dados obtidos, observa-se que em pH neutro não há qualquer estruturação do peptídeo. Dessa forma, prosseguiu-se para testes com vesículas em valores de pH de 5,0 e 6,0. A diminuição do pH foi executada para permitir que os grupamentos ácidos sejam protonados, mitigando a penalidade de cargas negativas existentes durante a translocação do peptídeo pela membrana. Os ensaios foram realizados com as mesmas composições de vesículas, porém com concentração fixa em 1280 μM. (Figura 30).

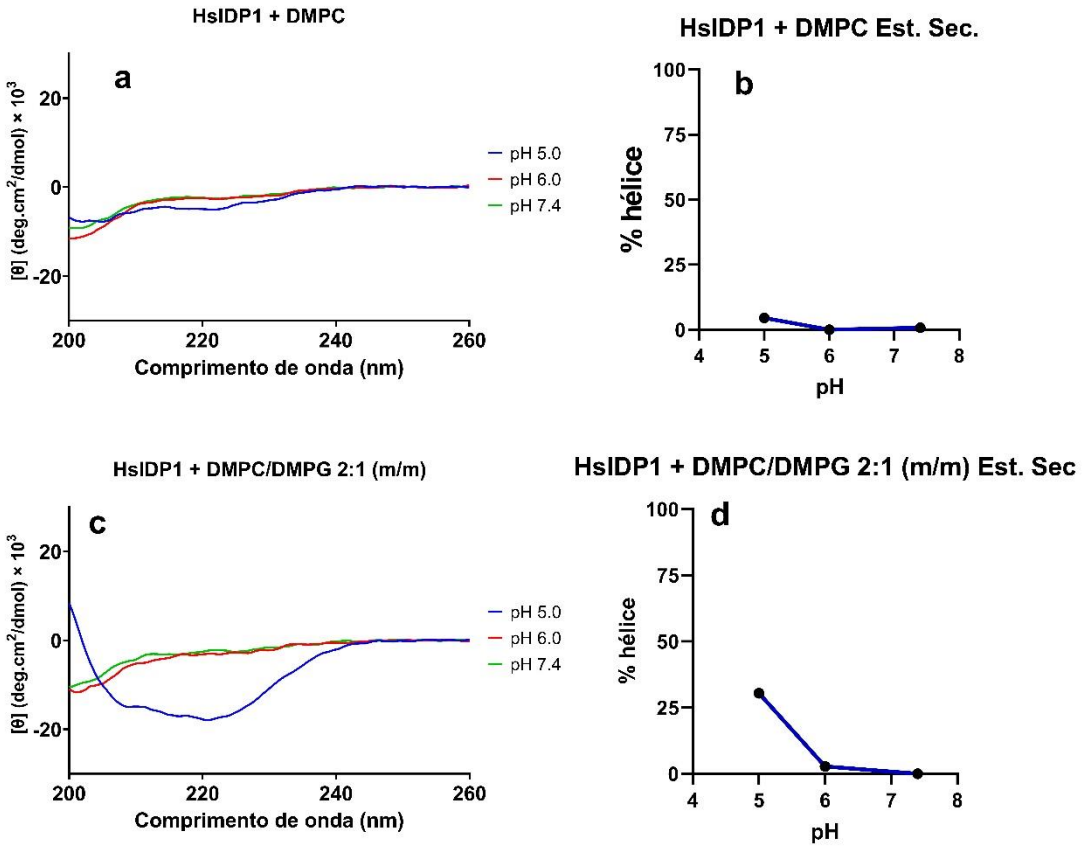


Figura 30: espectro de dicroísmo circular do HsIDP1 em presença de (a) DMPC e (b) DMPC/DMPG 2:1 (m/m) a 1280 µM em valores de pH 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Em (b) e (d), em azul, percentual de estruturação em α-hélice calculados pelo *software BeStSel*.

A diminuição do pH para 5,0 resultou na estruturação em α-hélice do HsIDP1, em especial na presença de vesículas de DMPC/DMPG (Figura 30c), evidenciado pelos valores apresentados calculados pelo *software BeStSel* (Figura 30d). Conforme mencionado por Brand et al., a estruturação de um peptídeo está diretamente ligada à sua capacidade de interação com a membrana plasmática, devido à natureza anfifílica do ambiente da membrana (BRAND et al., 2018).

Os resultados com o aumento do percentual de estruturação podem sugerir que o ponto isoelétrico (pH em que a carga líquida total do peptídeo é nula) do HsIDP1 pode estar próximo de 5,0 e que, para esse peptídeo, o pI e o pK_{ins} (valor de pKa crítico para que o peptídeo se estruture e se insira na membrana) podem estar proximamente relacionados. Utilizando a calculadora de ponto isoelétrico de peptídeos, disponibilizada por Bachem (disponível em https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/, acessado em jun/2024), o valor estimado foi de 4,67. Este valor corrobora com o observado no experimento realizado com pH 5,0 (Figura 30c), uma vez que apenas nessa

condição o peptídeo foi capaz de adquirir estrutura secundária. Entretanto, tomando o valor teórico como verdadeiro, a molécula pode ainda ter carga líquida negativa, por essa estar em um ambiente de pH acima de seu ponto isoelétrico. Apesar disso, não há ainda confirmação de que o HsIDP1 efetivamente se insere na membrana, ou apenas adquire estrutura enquanto adsorvido à mesma, abrindo o caminho para que novos ensaios sejam realizados posteriormente.

Os ensaios realizados com pH 6,0 apresentaram dados similares aos obtidos para pH 7,4 (Figura 30a,c), indicando que há desestabilização da estrutura helicoidal pela presença de cargas negativas, causando repulsão eletrostática. Esse dado corrobora, mais uma vez, com o valor calculado do ponto isoelétrico, ao demonstrar diminuição da estrutura helicoidal do peptídeo com a diminuição da acidez do meio (Figura 30b,d).

Para estudar a influência da concentração das vesículas na estruturação do peptídeo, os ensaios utilizando-as na composição DMPC/DMPG 2:1 (m/m) foram repetidos, porém com concentração variando de 0 a 1280 µM (Figura 31).

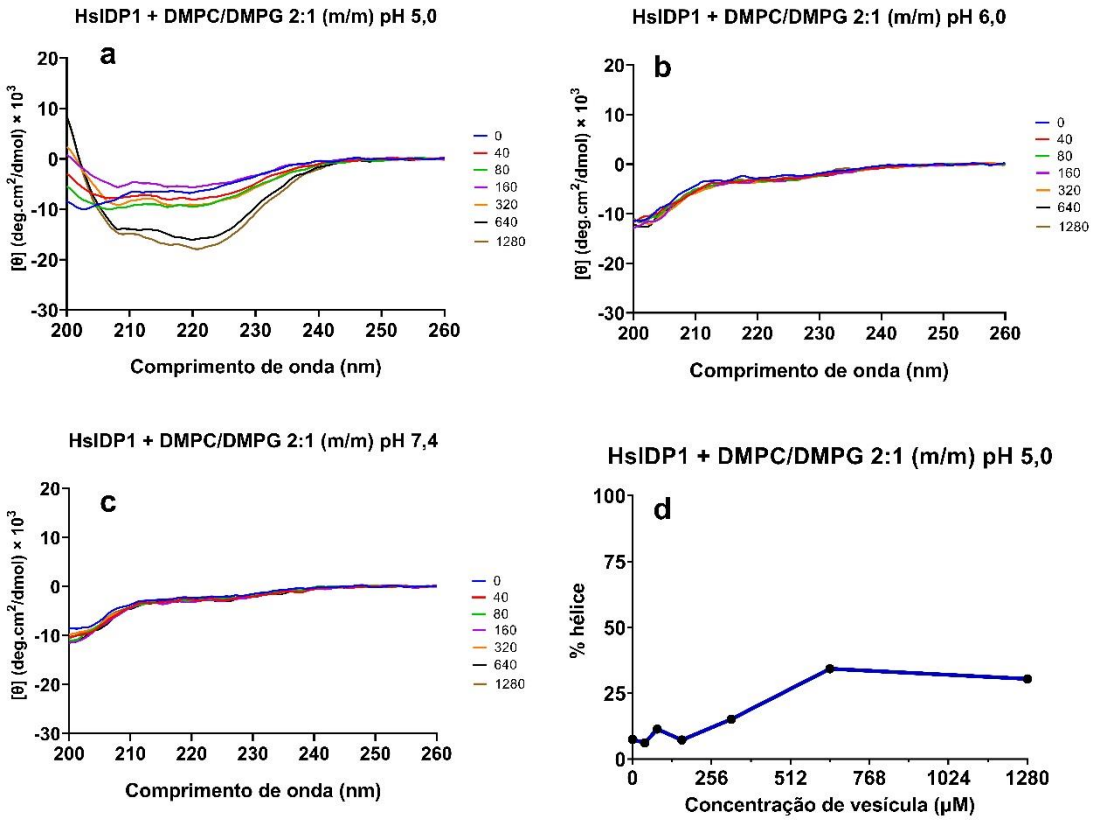


Figura 31: espectros de dicroísmo circular de HsIDP1 em DMPC/DMPG 2:1 (m/m) com concentrações de vesícula de 0-1280 µM e diferentes valores de pH, juntamente com % de hélice calculadas utilizando o *software BeStSel*. (a) pH 5,0, (b) pH 6,0, (c) pH 7,4 e (d) percentual de hélice do HsIDP1 em pH 5,0.

Observa-se que o aumento gradual na concentração das vesículas resulta em aumento também da estruturação do peptídeo quando em pH 5,0 (Figura 31a). A partir dos resultados acima, nota-se que as concentrações de 640 e 1280 μM são saturantes, indicando que todos os monômeros do peptídeo estão estruturados, conforme explicitado pelo platô gerado no gráfico de percentual calculado de estruturação do mesmo em α-hélice, a partir de 640 μM de vesícula (Figura 31d). Com esse resultado, todos os ensaios seguintes foram feitos com concentração fixa de vesículas em 1280 μM, com o intuito de saturar as membranas com peptídeos.

Os resultados aqui apresentados para o HsIDP1 permitem inferir que o peptídeo apresenta seletividade para membranas plasmáticas negativamente carregadas, um diferencial entre os peptídeos aniônicos pH-dependentes apresentados na literatura até o momento. Essa seletividade pode, em testes *in vivo*, colaborar para que o único alvo dos HsIDPs sejam células com caráter aniônico em sua membrana, caso particular de células tumorais, por exporem o conteúdo do folheto interno da membrana, rico em fosfatidilserina (BALASUBRAMANIAN; SCHROIT, 2003). Entretanto, mais experimentos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Membranas fosfolipídicas são estruturas complexas que possuem diferentes estados, de forma análoga aos estados principais da matéria. Dois dos principais estados são a fase gel e líquido-cristalino, em que a difusão e empacotamento dos fosfolipídeos se comportam de formas distintas entre as duas fases. Para vesículas de DMPC/DMPG, a literatura descreve que em temperaturas de 25 ºC ocorre um alargamento do estado de transição entre as fases dos fosfolipídeos. Consequentemente, perde-se o controle sobre o tipo de interação desejada entre o peptídeo e a vesícula, visto que não há forma de predizer em qual estado a bicamada se encontra, e nem se existe algum fenômeno de concentração de fosfolipídeos e, por fim, de cargas (RISKE; AMARAL; LAMY-FREUND, 2001). Dessa forma, para mitigar o erro referente à incerteza da fase em que a bicamada se encontra e para melhor representar condições encontradas no corpo humano, passou-se a utilizar como temperatura da cubeta para realização dos ensaios 37 ºC, temperatura na qual predomina a fase líquido-cristalino.

Outro parâmetro que foi alterado para os experimentos seguintes foi a concentração do peptídeo. Em outros ensaios realizados com o HsIDP1 e não demonstrados aqui nesse trabalho, o mesmo apresentou tendências de agregação, formando estruturas visíveis a olho nu e espectro com indicação de alta presença de estruturação como folha-β. Considerando esses resultados e, a partir de dados do pHLIP sobre agregação, usou-se como nova concentração para novos ensaios 25,6 μM, de forma a alcançar 2 mol % de relação de concentração peptídeo/vesícula.

Com ambos os parâmetros temperatura e concentração do peptídeo alterados, os ensaios com as vesículas compostas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) foram refeitos, com valores de pH 5,0, 6,0 e 7,4 (Figura 32).

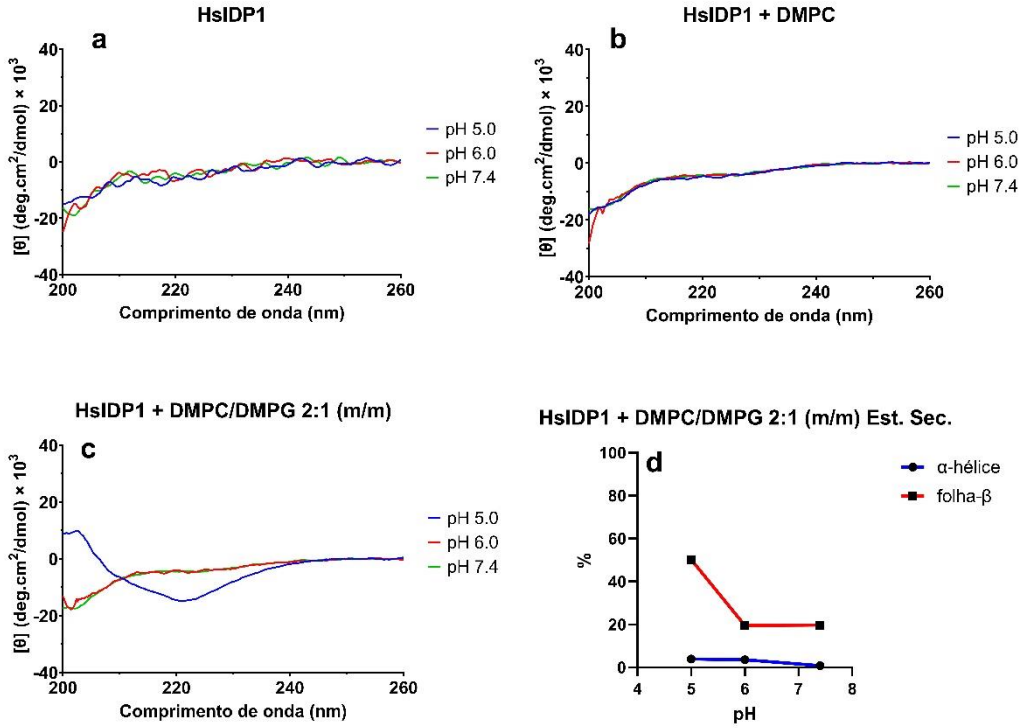


Figura 32: espectros de dicroísmo circular em pH 5,0 (azul), 6,0 (vermelho) e 7,4 (verde) de HsIDP1 em tampão (a) com DMPC (b) e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (c). Nos ensaios realizados com presença de vesículas, a concentração foi mantida em 1280 µM. Em (a) e (b) nota-se espectro característico de estrutura randomizada, enquanto em (c) observa-se estruturação em pH 5,0. Em (d) foi realizada quantificação das estruturas secundárias preditas pelo software *BeStSel*.

A partir da análise dos espectros é possível observar que o HsIDP1 manteve-se seletivo à membranas carregadas negativamente, porém apresentando um espectro característico de estruturação em folha-β (Figura 32c,d). O comportamento apresentado de folha-β pode ser atribuído à diminuição do pH, causando a protonação das carboxilas dos aspartatos e glutamatos transformando-os em ácido aspártico e glutâmico (Figura 33). Portanto, a partir da redução das forças repulsivas entre cargas iguais, pode ter iniciado um processo de agregação similar ao que ocorre com peptídeos amiloidogênicos. Entretanto, outros ensaios são necessários para confirmar a formação de fibrilas, e não apenas o peptídeo estruturado como folha- β em unidades monoméricas e inserido na membrana. Enquanto isso, manteve-se majoritariamente como estrutura randômica quando em tampão e na presença de vesículas de DMPC.

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos que descrevem peptídeos membrano-ativos estruturados em folha-β, como o Hs10, mencionado anteriormente neste estudo, que demonstra atividade inibitória contra micro-organismos (SANTOS et al., 2023b). Além disso, existem peptídeos penetradores capazes de atravessar membranas enquanto mantêm a conformação em folha-β. Um exemplo é a Penetratina, cuja estrutura é induzida pela presença de fosfolipídeos aniônicos (EIRÍKSDÓTTIR et al., 2010; MAGZOUB; GÖRAN ERIKSSON; GRÄSLUND, 2002). Diante disso, observa-se que a estruturação do HsIDP1 em folha-β, exclusivamente na presença de vesículas de DMPC/DMPG em pH acidificado, sugere que o peptídeo pode manter seu efeito desejado de inserção seletiva em ambientes com pH abaixo do fisiológico.

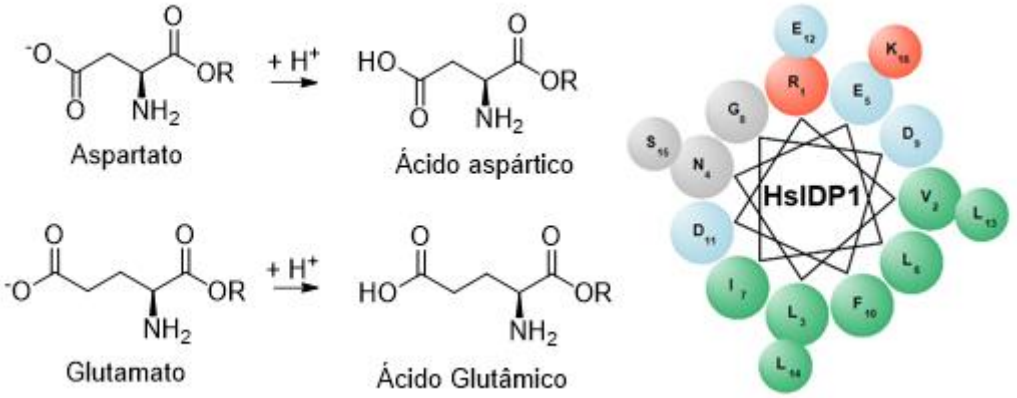


Figura 33: estruturas moleculares dos resíduos de aminoácidos carregados aspartato e glutamato, e de suas respectivas formas protonadas ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E). Os grupos R se referem ao restante da cadeia peptídica.

A partir dos resultados obtidos para o HsIDP1, é possível traçar um paralelo com os peptídeos da família do pHLIP. Esses adquirem estrutura e translocam mesmo em vesículas compostas unicamente por POPC, de caráter zwitteriônico (VASQUEZ-MONTES et al., 2018; ZOONENS; RESHETNYAK; ENGELMAN, 2008). Estudos demonstraram que a composição lipídica é capaz de afetar as propriedades de inserção do pHLIP, mas apenas alteram o pK_{ins}, demonstrando que os peptídeos dessa família não apresentam seletividade e podem perpassar membranas tanto de eucariotos quanto procariotos, em condições adequadas de pH do meio (KYRYCHENKO et al., 2015; VASQUEZ-MONTES et al., 2018; ZOONENS; RESHETNYAK; ENGELMAN, 2008). Dessa forma, o HsIDP1 já é capaz de se diferenciar dos principais peptídeos pH-dependentes descritos na literatura, por adquirir estrutura secundária preferencialmente na presença de vesículas aniônicas.

Analisando os resultados dos ensaios de dicroísmo circular, assim como o valor de pI calculado, nota-se uma grande diferença entre o pI do HsIDP1 para o

pK_{ins} do wt-pHLIP, cujo valor reportado é de aproximadamente 6,0 (MUSIAL-SIWEK et al., 2010). Em contrapartida, o pH do meio extracelular imediato de membranas tumorais é reportado de variar entre 6,1 e 6,9 (ANDERSON et al., 2016)(ANDERSON et al., 2016). Logo, para alcançar a possibilidade de atuação frente a células tumorais, o pK_{ins} abaixo de 5,0 observado para o HsIDP1 não é suficiente, por estar abaixo do necessário para estruturação em meio *in vivo*. Existem, na literatura, diversos trabalhos que se prontificaram a modular o pK_{ins} do pHLIP por mudança no posicionamento de resíduos chave (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013), mutações em aminoácidos específicos que podem desestabilizar a estrutura helicoidal (VASQUEZ-MONTES et al., 2018) ou adição de aminoácidos básicos que possam alterar o microambiente de resíduos chave (SILVA et al., 2023). Similarmente, comprovou-se que a composição da membrana também é capaz de alterar o pH que promove a inserção do peptídeo, pela presença de grupos aniônicos ou de grupos capazes de formar redes de ligações de hidrogênio (KYRYCHENKO et al., 2015; VASQUEZ-MONTES et al., 2022a). Entretanto, ao filtrar o proteoma humano por peptídeos aniônicos e anfifílicos que se estruturem em α-hélice, um total de 2697 possibilidades foram apresentadas. Dessa forma, tomou-se a decisão de explorar outros HsIDPs, porém com valores maiores de ponto isoelétrico para, assim, buscar um que tenha sensibilidade à acidificação do meio, assim como seletividade para membranas negativamente carregadas.

4.3. Segunda geração de HsIDPs

Em busca de peptídeos que fossem capazes de se estruturar em valores mais altos de pH do que o HsIDP1, iniciou-se uma procura nos resultados disponibilizados pelo *software* Kamal por novas sequências com um maior valor de ponto isoelétrico. Dessa forma, dentre as 2697 moléculas, considerou-se para essa etapa apenas aquelas que tivessem o seu pI > 5,0, resultando em um número de 56 possíveis candidatos para síntese e avaliação.

Foram selecionados três candidatos e a eles foram dados os nomes de HsIDP2, HsIDP3 e HsIDP4. Para além do ponto isoelétrico, outro fator contribuinte para a escolha das novas sequências foram os seus valores de hidrofobicidade média e de momento hidrofóbico. Em uma tentativa de melhor compreender como essa característica físico-química pode influenciar na sensibilidade ao pH e seletividade de composição de membrana, os peptídeos escolhidos possuem um valor maior, médio e menor de hidrofobicidade média (Tabela 6)

Tabela 6: peptídeos escolhidos para a segunda geração de HsIDPs, com suas sequências, cargas, pontos isoelétricos, hidrofobicidade e momento hidrofóbico. Esquema de cores seguindo o padrão Zappo.

PEPTÍDEO	SEQUÊNCIA	CARGA	pI	HIDROFOBICIDADE	MOMENTO HIDROFÓBICO
HsIDP2	HALTLLSEVLAHLLDMV	-2	5,147	0,359	0,975
HsIDP3	EHAIYVWDHFIAQAAA	-2	5,147	0,026	0,628
HsIDP4	GDLFHRLWHIMNEILD	-2	5,216	-0,149	1,346

Assim como a primeira geração, os peptídeos aqui demonstrados são intragênicos, provenientes do proteoma humano e apresentam estrutura de α-hélice anfifílica quando em sua proteína parental (Figura 34). O HsIDP2 é derivado da proteína DOP1A (Q5JWR5) (Figura 34a), HsIDP3 da reguladora transcripcional ARB2A (Q8WUF8) (Figura 34d), e o HsIDP4 do dedicador 4 da proteína de citocinese (Q8N1I0) (Figura 34e).

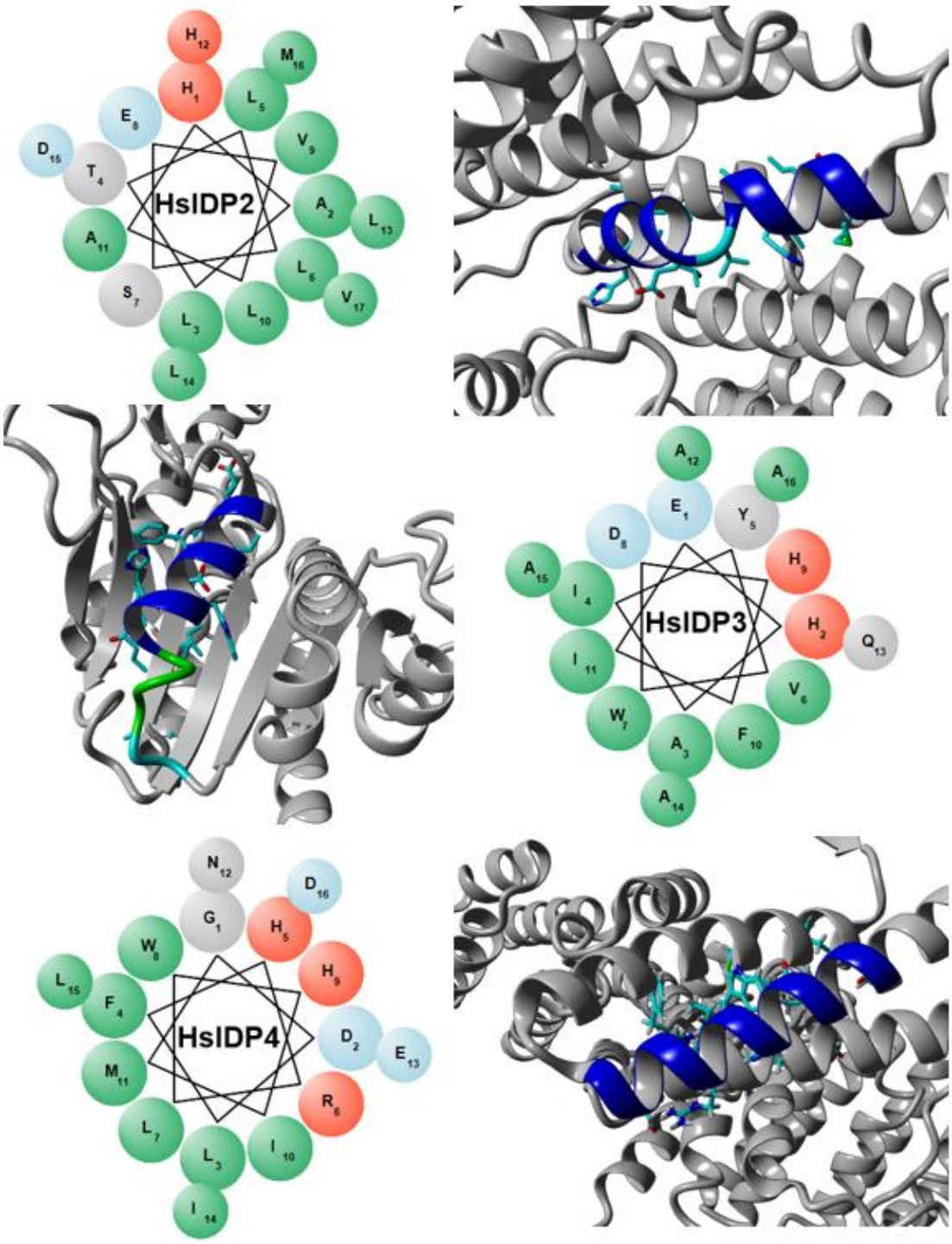


Figura 34: estrutura tridimensional da DOP1A com a estrutura HALTLLSEVLAHLLDMV correspondente ao HsIDP2, da reguladora transcripcional ARB2A com a estrutura EHAIYVWDHFIAQAAA correspondente ao HsIDP3 e do dedicador 4 da proteína de citocinese com a estrutura GDLFHRLWHIMNEILD correspondente ao HsIDP4. Ao lado das estruturas das proteínas, estão demonstrados os mapas de Edmundson.

4.3.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa

Os peptídeos foram sintetizados de forma análoga à primeira geração, através da metodologia de SPPS, utilizando resina de Rink para gerar um C-terminal amidado. Ao término da síntese, seguiram para a purificação, sendo ressuspendidos em solução levemente basificada com NaOH, para auxiliar na solubilidade, com concentração final de 20 mg/mL. Os peptídeos solubilizados foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com coluna de fase reversa e fluxo de 10 mL/min. Os cromatogramas gerados apresentaram sinais referentes aos peptídeos de alta intensidade e boa separação (Figura 35). Para todos os casos, as absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. Porém, apenas o HsIDP2 não absorve nesse comprimento de onda por não possuir resíduo de triptofano em sua sequência, dessa forma o dado não é apresentado.

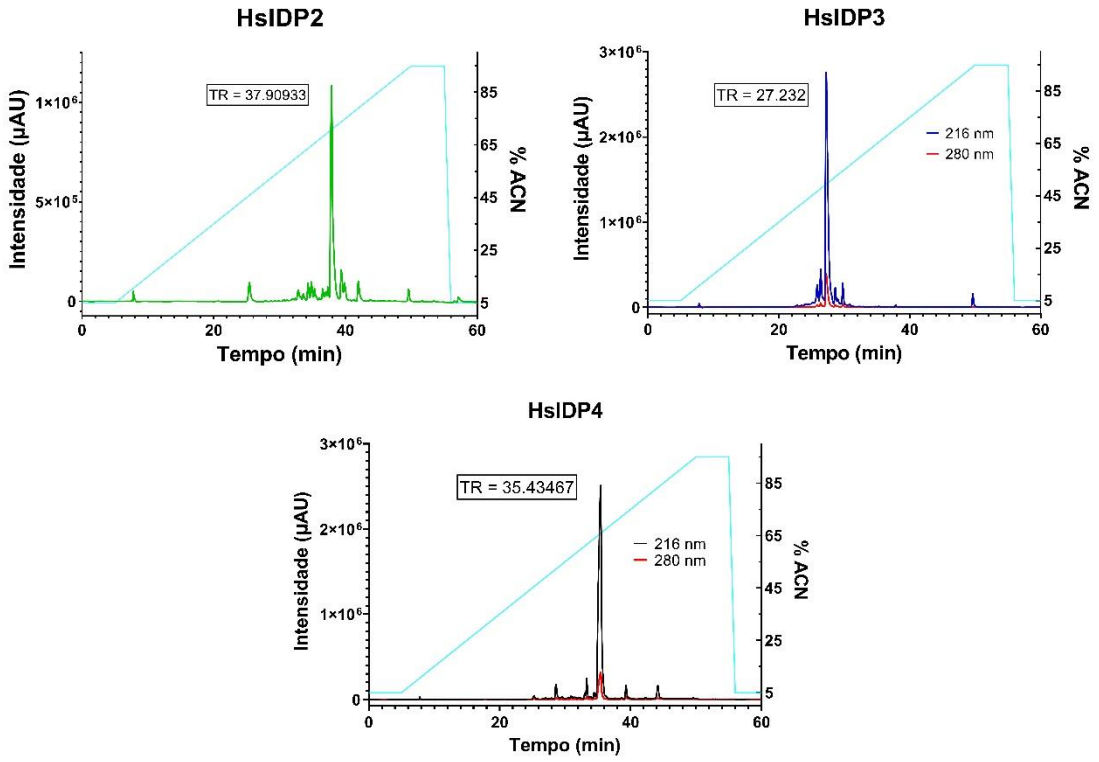


Figura 35: cromatogramas dos HsIDPs de segunda geração, medidos em 216 nm de: HsIDP2 (verde) com tempo de retenção TR = 37,90 minutos; HsIDP3 (azul) com TR = 27,23 minutos e HsIDP4 (preto) com TR = 35,44 minutos. Absorbância medida em 280 nm encontram-se em vermelho nos cromatogramas do HsIDP3 e HsIDP4.

Os tempos de retenção observados foram de 37,90 minutos para o HsIDP2, 27,23 minutos para o HsIDP3 e 35,44 minutos para o HsIDP4, resultando em um percentual de acetonitrila de aproximadamente 70%, 49% e 65%, respectivamente. Com as frações de interesse coletadas, representando os peptídeos purificados, seguiu-se para caracterização por espectrometria de massa, em mesmo equipamento citado na seção 4.2 (Figura 36).

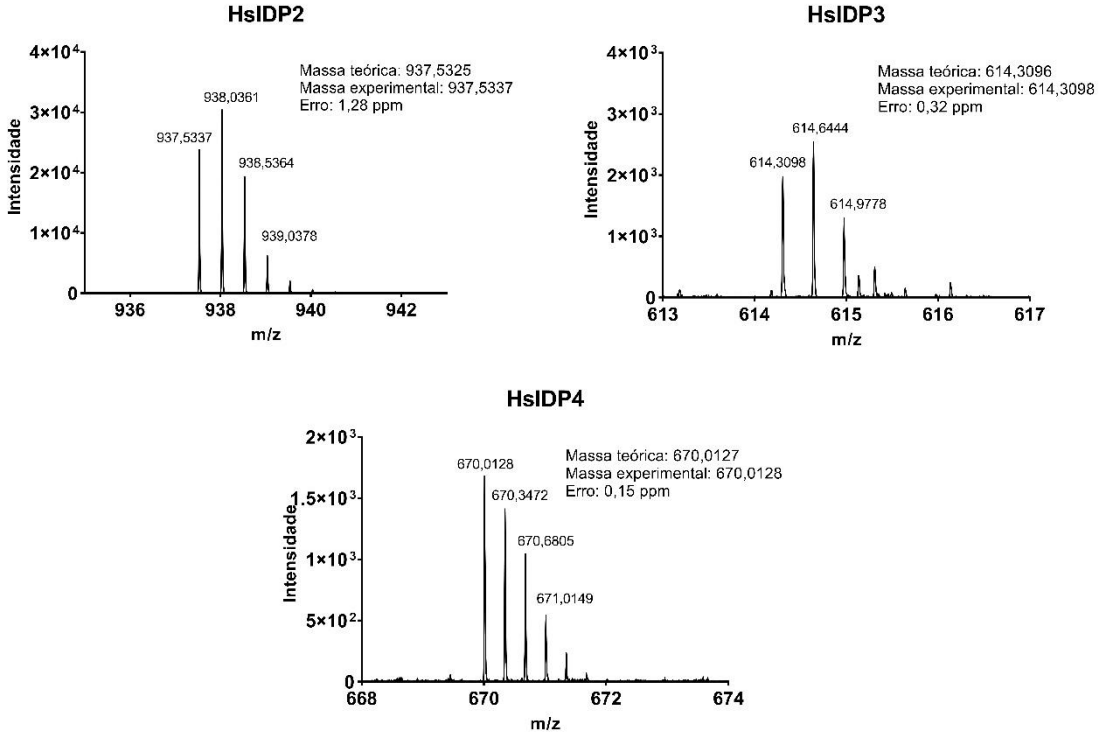


Figura 36: espectros de massa dos HsIDPs de segunda geração, representando para o HsIDP2 o íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 937,5337 Da, HsIDP3 o íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 614,3098 Da e HsIDP4 o íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 670,0128 Da.

O HsIDP2, de sequência HALTLLSEVLAHLLDMV-NH_2, foi identificado como dupla carga, seguido de sua série isotópica, com massa experimental de $[M+2H]^{2+}$ = 937,5337 Da. Comparando com sua massa teórica de $[M+2H]^{2+}$ = 937,5325 Da, resulta em um erro de massa de 1,28 ppm. Já o HsIDP3, de sequência EHAIYVWDHFIAQAAA-NH_2, foi identificado na presença de tripla carga, juntamente com o HsIDP4 de sequência GDLFHRLWHIMNEILD-NH_2, ambos em presença de sua série isotópica. Suas massas experimentais observadas foram de $[M+3H]^{3+}$ = 614,3098 Da e $[M+3H]^{3+}$ = 670,0126 Da, respectivamente. Comparando com as massas teóricas calculadas de $[M+3H]^{3+}$ = 614,3096 Da e $[M+3H]^{3+}$ = 670,0127 Da, resultam em um erro de massa de 0,32 e 0,15 ppm, respectivamente.

A partir dos espectros de fragmentação, é possível confirmar a sucesso da síntese do peptídeo com a sequência correta. Observa-se fragmentos das séries de fragmentação a,b e y. Os peptídeos foram fragmentados a partir das moléculas de dupla carga para o HsIDP2 (Figura 37), e tripla carga para os HsIDP3 (Figura 38) e HsIDP4 (Figura 39) e analisados a partir do *software online Interactive peptide spectral annotator* (BRADEMAN et al., 2019).

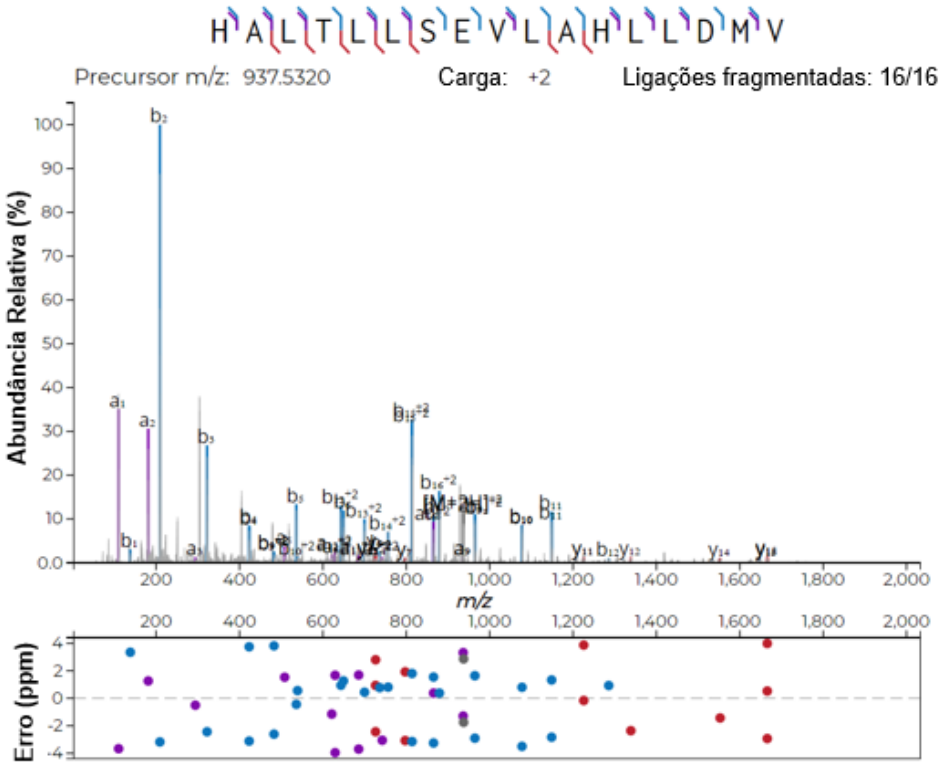


Figura 37: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 937,5320 Da do HsIDP2. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

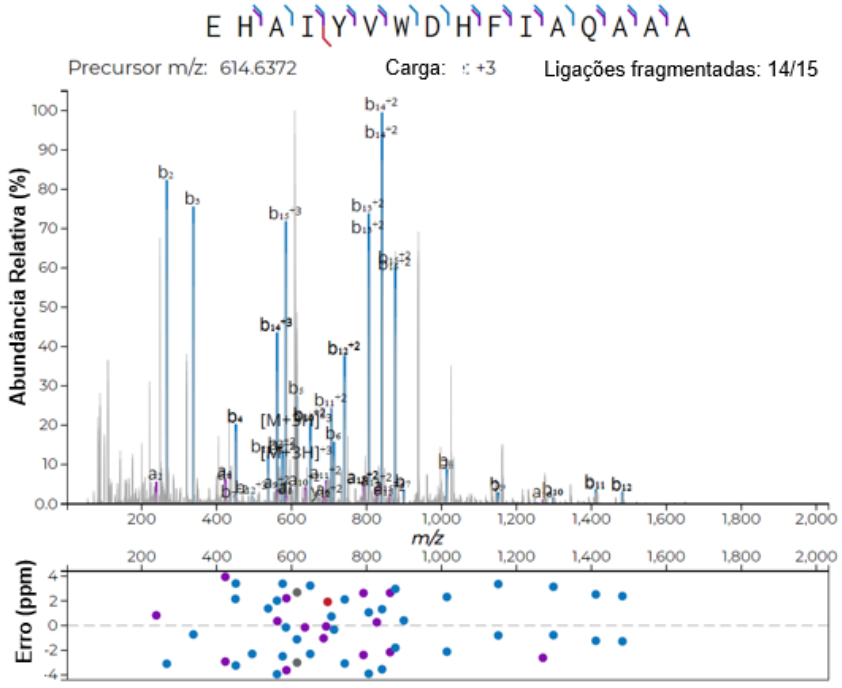


Figura 38: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 614,6372 Da do HsIDP3. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

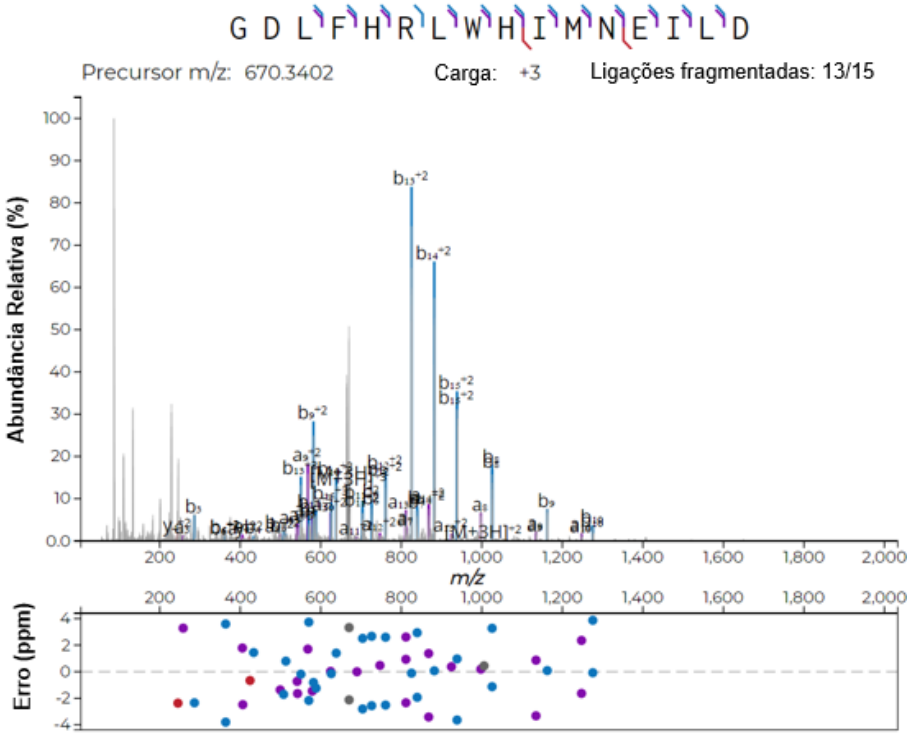


Figura 39: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 670,3402 Da do HsIDP4. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

4.3.2. Dicroísmo circular

Seguiu-se para ensaios de dicroísmo circular, a fim de investigar se a seleção de moléculas com maior valor de ponto isoelétrico causou efeito esperado. Para tal fim, optou-se por reduzir o número de ensaios, realizando apenas os com vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) com concentração constante de 1280 µM. Seguindo o padrão dos ensaios com o HsIDP1, a concentração dos peptídeos foi mantido em 25,6 µM, assim como a temperatura da cubeta em 37 ºC.

Primeiramente, iniciou-se os ensaios com o HsIDP2. O peptídeo não apresentou estruturação, mesmo com a diminuição do pH (Figura 40e). Entretanto, ao adicionar vesículas de DMPC, os espectros apresentaram bandas características de estrutura de α-hélice, mesmo quando em pH fisiológico (7,4) (Figura 40a). Segundo cálculos preditivos de estrutura secundária, a diminuição para pH 5,0 causou uma pequena diminuição do percentual de α-hélice do peptídeo (Figura 40b). Entretanto, ao analisar os dados experimentais obtidos, observa-se que os espectros para os pHs 5,0 e 7,4 são praticamente sobreponíveis, demonstrando que há pouca diferença no percentual de α-hélice (Figura 40a).

A capacidade de estruturação do peptídeo em pH fisiológico pode ser explicada pelos valores positivos de hidrofobicidade média e alta anfifilicidade, uma vez que ao adquirir a estrutura helicoidal, apresenta seu caráter anfifílico e é capaz de se adsorver à superfície da membrana, mesmo com a presença de cargas negativas, por atrair-se fortemente à porção interna altamente apolar da bicamada.

Similarmente, a adição de vesículas negativamente carregadas mostra que o peptídeo também é capaz de se estruturar, e apresenta um comportamento similar ao observado para as vesículas zwitteriônicas, com diminuição da estruturação helicoidal em conjunto com a acidificação do meio (Figura 40c,d). Contudo, nota-se ao comparar os dois gráficos de estruturação secundária, que o HsIDP2 apresenta um grau de seletividade frente a bicamadas ricas em cargas negativas, visto que resultou em maior percentual helicoidal calculado nessa condição (Figura 40f).

Apesar de manter certo grau de seletividade, o resultado obtido para o HsIDP2 mal pode ser comparado com o HsIDP1, uma vez que esse só era capaz de estruturar-se como hélice na presença de vesículas aniônicas, enquanto na presença de zwitteriônicas mantinha-se como estrutura desordenada. Nota-se, também, a partir dos dados calculados, que o HsIDP2 sofre aparente penalização com a acidificação do meio, dificultando a manutenção da α-hélice. Sugere-se que esse acontecimento possa estar ligado com a protonação dos aminoácidos carregados. Por possuir dois resíduos de histidina (H), esses aminoácidos, em pH 5,0, apresentam-se protonados, com carga líquida positiva. Entretanto, os aminoácidos D e E perdem as cargas negativas, dessa forma perdendo a

complementariedade de cargas que estabiliza a conformação helicoidal da molécula, visto que estavam a distâncias ótimas para interação eletrostática.

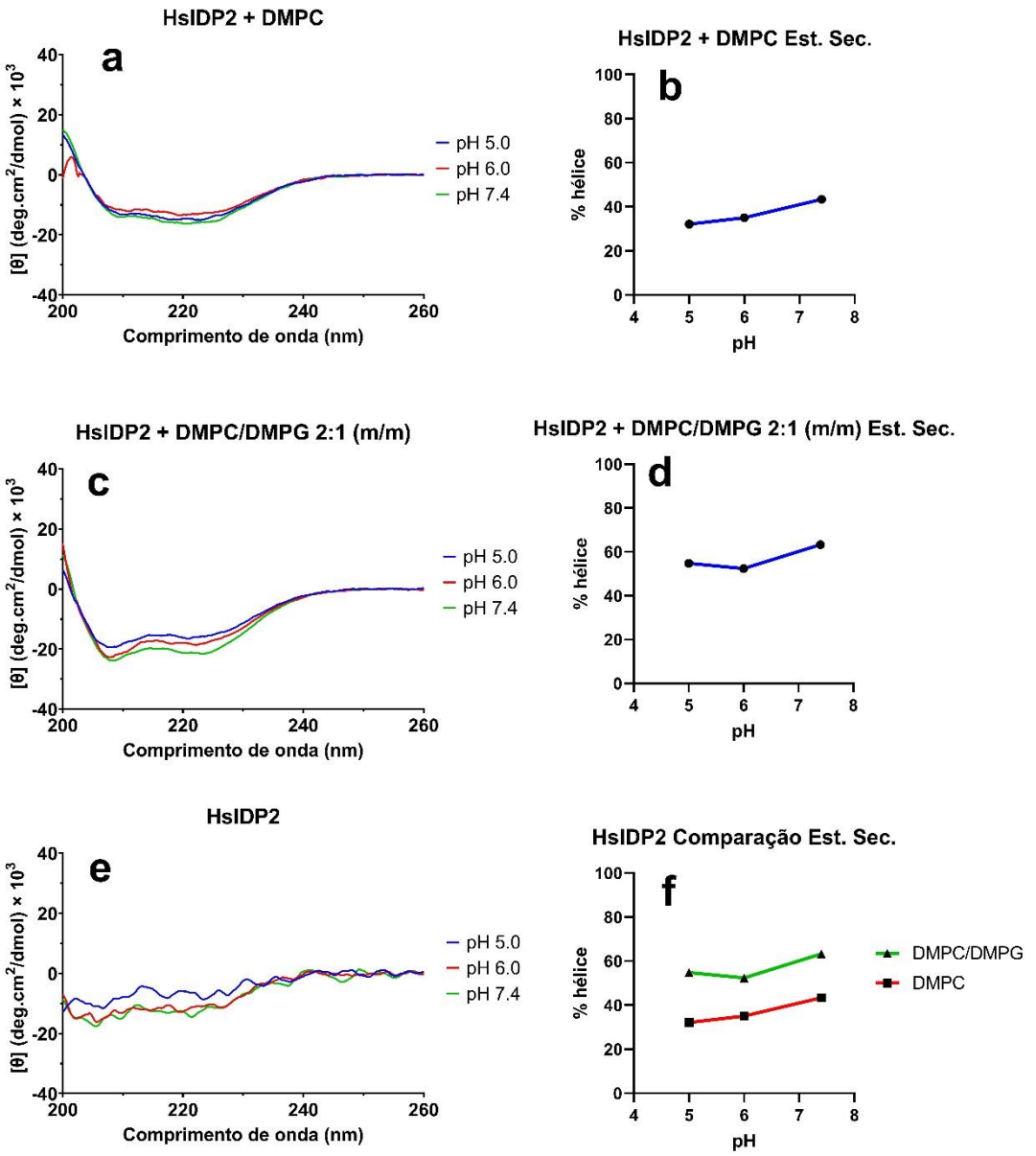


Figura 40: espectro de dicroísmo circular do HsIDP2 na presença de vesículas de DMPC (a) e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (c) e apenas em tampão (e), em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Em (b) e (d) estão apresentados, em azul, os percentuais de α-hélice do peptídeo calculados pelo *BeStSel*, estando comparados em um mesmo gráfico em (f).

Dado que a alta hidrofobicidade do HsIDP2 pode ter sido determinante para a aquisição de estrutura do peptídeo em pH 7,4, seguiu-se os ensaios com o

HsIDP3, o qual possui menor hidrofobicidade média, assim como o menor momento hidrofóbico dentre os peptídeos da segunda geração.

À primeira vista, nota-se que o HsIDP3 mantém comportamento similar a seus pares, por não possuir uma estrutura secundária definida em tampão, em nenhum valor de pH (Figura 41c). Entretanto, demonstra-se como pioneiro dentre a família de HsIDPs que não se mostrou capaz de estruturar-se em α-hélice na presença de vesículas de nenhuma das composições testadas e em nenhum valor de pH (Figura 41a,b). Ao submeter os dados no *software BeStSel*, os tipos de estruturas secundárias retornadas pelo programa são uma mistura de estrutura randômica com fita-β (dado não mostrado).

Apesar de ser considerado um aminoácido estabilizador de α-hélice, principalmente pela grande liberdade conformacional de sua cadeia lateral pequena, a alanina é conhecida por, em peptídeos poli-alanina, tender a adquirir uma estrutura conhecida como "hélice de poliprolina II", ou PPII (TOAL; SCHWEITZER-STENNER, 2014; TUMANYAN et al., 2023). Trata-se de uma hélice canhota, com maior distância entre as repetições de aminoácidos e mais enrijecida (Figura 42). Apesar do nome, a estrutura secundária da PPII não é exclusiva de prolinas, sendo bastante presente em proteínas consideradas como "desestruturadas" ou de "estrutura randomizada" (ADZHUBEI; STERNBERG; MAKAROV, 2013). Ao analisar a estrutura primária do HsIDP3, nota-se quatro resíduos de alanina próximos na porção C-terminal (EHAIYVWDHFIAQAAA-NH_2), podendo eles estarem contribuindo para a estrutura de PPII e dificultando a formação de uma α-hélice. Ademais, a presença de aminoácidos como o W, Y e F, possuidores de cadeia lateral volumosa, são outro fator que pode contribuir para o comportamento observado do peptídeo, não apresentando qualquer semelhança a uma estruturação helicoidal, como visto no HsIDP1 e HsIDP2.

Finalmente, o baixo momento hidrofóbico do HsIDP3 pode contribuir para a incapacidade de estruturação do mesmo na presença de vesículas. Uma vez que o momento hidrofóbico é regido pela periodização dos aminoácidos mais apolares, em um peptídeo como o HsIDP3 que apresenta os resíduos mais dispersos dentro da face hidrofóbica, não há uma concentração de um "momento apolar" e, consequentemente, dificulta a promoção da formação de uma α-hélice anfifílica no momento que o peptídeo interage com a membrana.

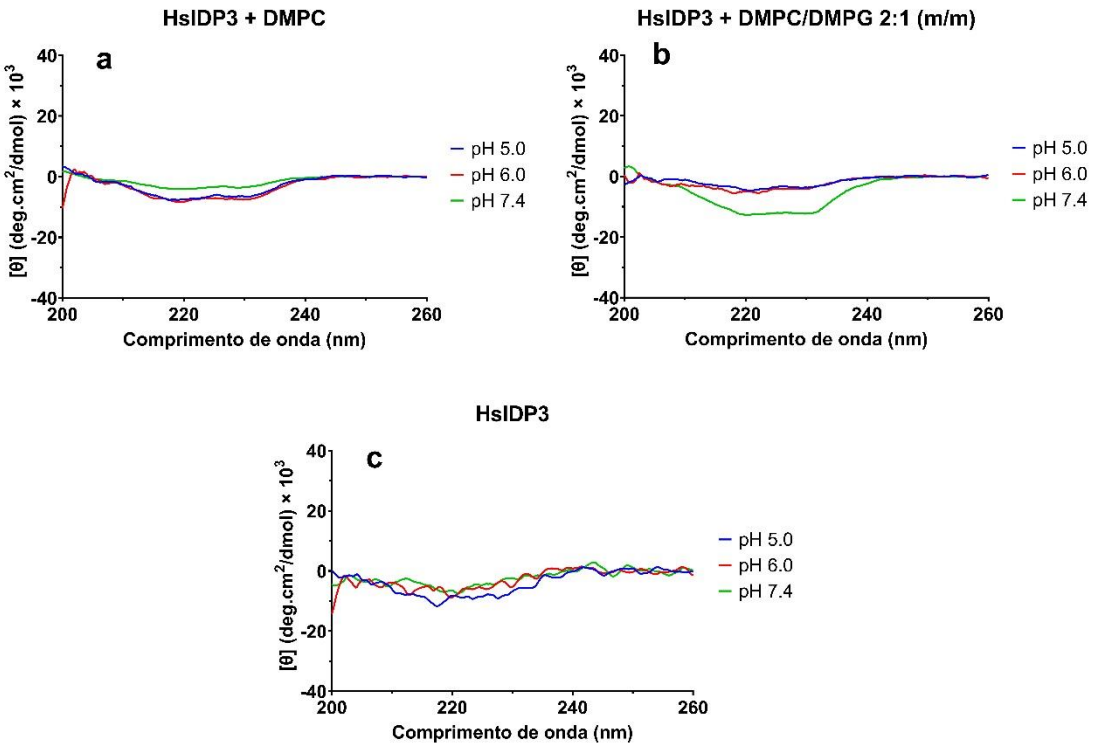


Figura 41: espectros de dicroísmo circular do HsIDP3 em tampão (c) e na presença de vesículas compostas de DMPC (a) e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (b), em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul).

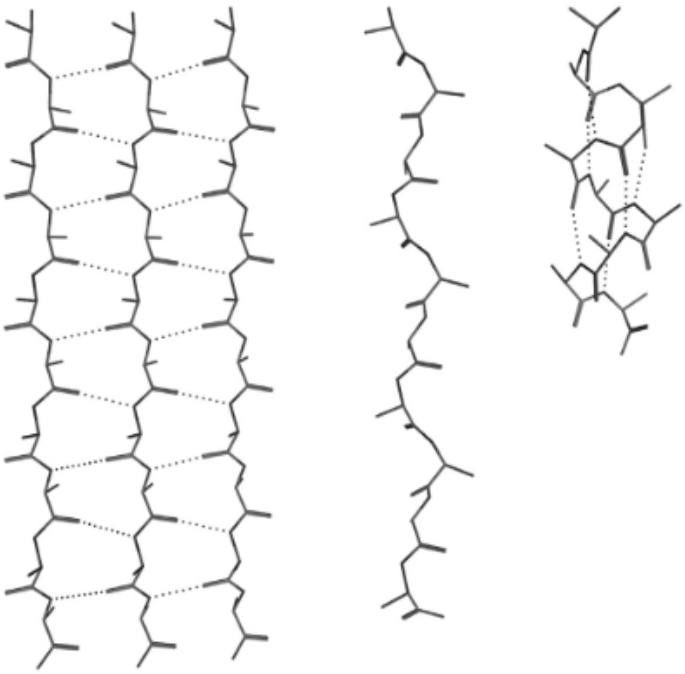


Figura 42: comparação entre as estruturas secundárias folha-β (esquerda), hélice poliprolina II ou PPII (centro) e α-hélice (direita) (ADZHUBEI; STERNBERG; MAKAROV, 2013).

Por fim, prosseguiram-se para as análises do último peptídeo da segunda geração, o HsIDP4.

Dentre essa geração, o HsIDP4 é o peptídeo com menor hidrofobicidade média e maior momento hidrofóbico. Além disso, possui o maior valor de ponto isoelétrico devido à presença de uma R (aminoácido positivamente carregado) na porção central da cadeia. Inicialmente nota-se que mesmo sem a presença de vesículas, o peptídeo se encontra majoritariamente desestruturado, porém com uma tendência de estruturação helicoidal (Figura 43e), diferente dos outros HsIDPs até o momento. Ao adicionar vesículas ao meio, adquire-se estrutura com ambas as composições de bicamada, evidenciando uma perda na seletividade frente à carga da membrana (Figura 43a,c), assim como uma perda na sensibilidade à diminuição do pH, posto que há pouca variação no percentual de estruturação helicoidal do peptídeo, podendo ser a diferença vista para os valores de pH um possível erro do algoritmo utilizado para cálculo.

Em termos de capacidade de estruturação, o HsIDP2 e HsIDP4 demonstraram atividades semelhantes, apresentando considerável parte de suas sequências em forma helicoidal na presença de ambas as vesículas testadas. Ademais, também não demonstraram sensibilidade significativa à acidificação do meio, visto que as diferenças entre os cálculos de percentual de hélice resultam em variações de poucas unidades.

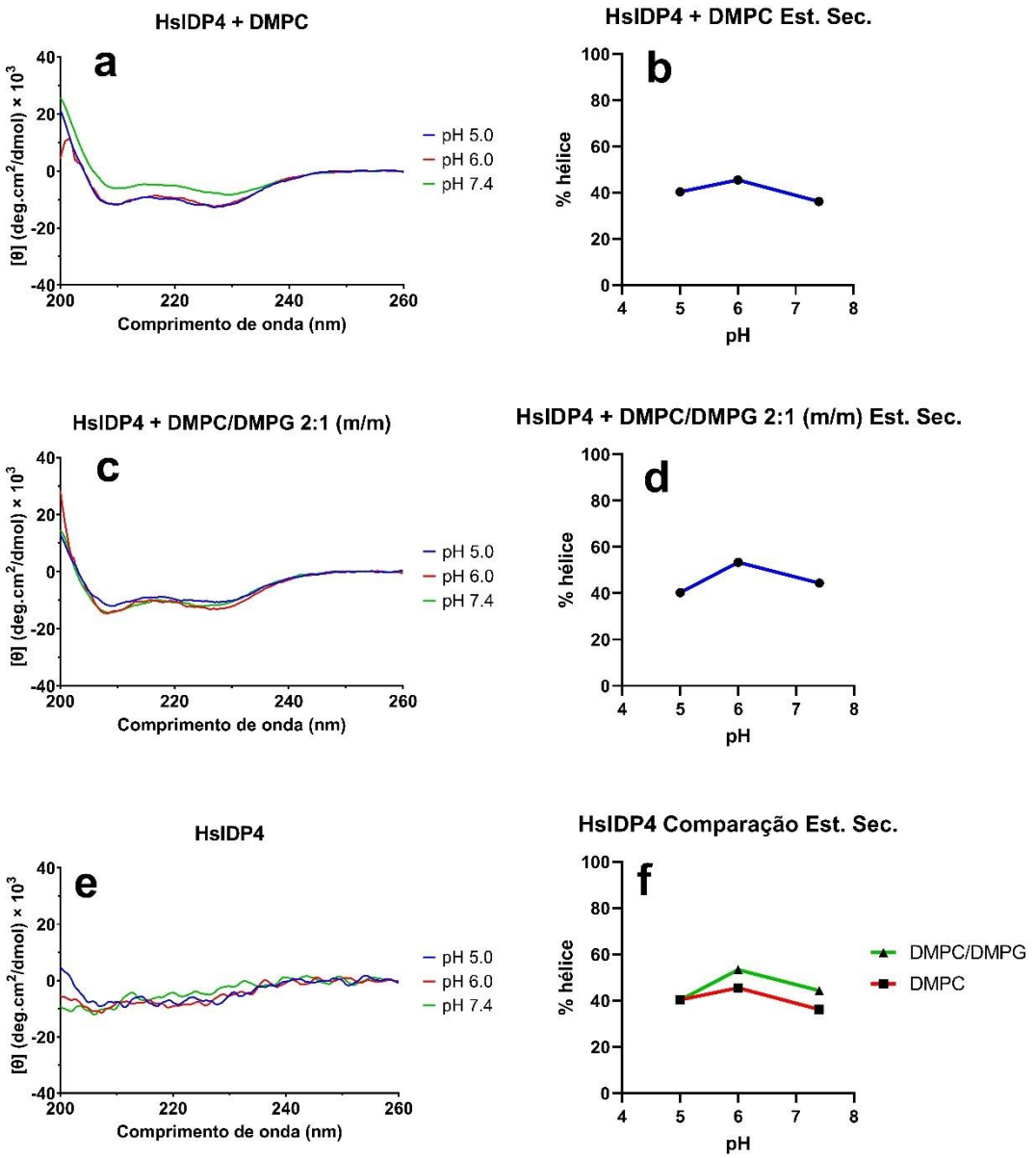


Figura 43: espectros de dicroísmo circular do HsIDP4 na presença de tampão (e), vesículas de DMPC (a) e DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (c) em valores de pH 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Em (b) e (d) estão apresentados, em azul, o percentual de estruturação em α-hélice calculado através do *software BeStSel* e em (f), a comparação dos percentuais adquiridos na presença de cada vesícula.

Os resultados obtidos para a segunda geração de HsIDPs demonstram que o ponto isoelétrico não é a única característica físico-química a ser observada para alcançar o comportamento desejado. Características como hidrofobicidade, aminoácidos componentes e suas posições, assim como outras variáveis, também são capazes de interferir no perfil de estruturação de um possível HsIDP. Apesar de não ter adquirido estrutura secundária desejada, o HsIDP3 demonstrou como a composição da estrutura primária pode afetar a atividade de um peptídeo.

Contudo, os HsIDP2 e HsIDP4, apesar de serem capazes de alcançar a α-hélice, perderam alguma das características marcantes do HsIDP1, seja a seletividade frente a presença de cargas na membrana, seja a sensibilidade ao pH capaz de diferenciar entre a aquisição de uma estrutura secundária definida ou uma randomizada. A partir dos dados adquiridos para os peptídeos até o momento, decidiu-se em sintetizar a terceira geração dos HsIDPs, explorando dois novos peptídeos e criando dois análogos do HsIDP1.

4.4. Terceira geração de HsIDPs

Para essa etapa do trabalho, decidiu-se alterar o ponto isoelétrico e, por consequência o pK_{ins}, de outra forma. A alteração do pI de um peptídeo pode ser realizada de formas distintas: modificando sua sequência, colocando ou tirando aminoácido hidrofóbicos ou hidrofílicos carregados para manipular o ponto de carga líquida zero, ou alterando o microambiente proximal de um aminoácido. Dentro de um meio transmembranar, o ambiente imediato de um aminoácido (ácido aspártico, por exemplo) é capaz de alterar seu valor de pKa. Quanto maior o grau de enterramento na membrana de um aminoácido carregado, maior será a alteração de seu pKa (FENDOS; BARRERA; ENGELMAN, 2013). Isso ocorre pois, para uma espécie ácida que está em um ambiente cercado por moléculas altamente apolares (caso das cadeias carbônicas de fosfolipídeos), seu próton estará menos disponível para realizar a troca com o solvente. Dessa forma, para que ocorra a desprotonação, é necessário que o pH do meio seja maior, ou seja, aumenta o valor de pKa do ácido.

A partir dessa lógica, a busca por novas sequências seguiu considerando peptídeos anfifílicos estruturados em α-hélice com menor ângulo polar, ou seja, maior face hidrofóbica. Dessa forma, espera-se que o peptídeo tenha maior enterramento na membrana, causando inserção de parte da face polar da estrutura helicoidal na bicamada, alterando o microambiente proximal dos aminoácidos de fronteira entre as faces. Para isso, utilizou-se como filtro peptídeos com ângulo polar de 128º dentre os 2697 possíveis HsIDPs elencados pelo *software* Kamal.

Fazendo uso da mesma lógica, retornou-se para o HsIDP1 para, de forma análoga, alterar seu ângulo polar. Originalmente, o peptídeo possui o ângulo polar de 192º. Ao alterar um aminoácido polar de fronteira por um apolar, diminui-se o ângulo polar para 160º, aumentando o grau de enterramento da face polar do peptídeo na membrana.

Dessa forma, foram selecionados dois novos peptídeos, assim como dois análogos do HsIDP1. As duas novas sequências foram nomeadas de HsIDP5 e HsIDP6, enquanto os análogos seriam o HsIDP1.1 e HsIDP1.2 (Tabela 7).

Tabela 7: peptídeos escolhidos para a terceira geração de HsIDPs, com suas sequências, cargas, pontos isoelétricos e hidrofobicidade. Esquema de cores seguindo o padrão Zappo.

PEPTÍDEO	SEQUÊNCIA	CARGA	pI	HIDROFOBICIDADE	MOMENTO HIDROFÓBICO
HsIDP5	LEVLEDIIGFALALFM	-3	3,575	0,596	0,787
HsIDP6	LNVIEEVIRMMLEIINS	-2	4,259	0,129	1,165
HsIDP1.1	RVLNELIGIFDELLSK	-1	4,683	-0,174	1,224
HsIDP1.2	RVLNELIGDFIELLSK	-1	4,683	-0,174	1,330

O HsIDP5 é proveniente do complexo 3 de proteína *superkiller* (Q6PGP7) (Figura 44a), enquanto o HsIDP6 é derivado da dimeclina (Q7RTS9) (Figura 44d). Os análogos do HsIDP1 foram racionalizados alterando um ácido glutâmico de cada fronteira entre as faces hidrofílica e hidrofóbica, resultando na diminuição do ângulo polar do peptídeo (Figura 45).

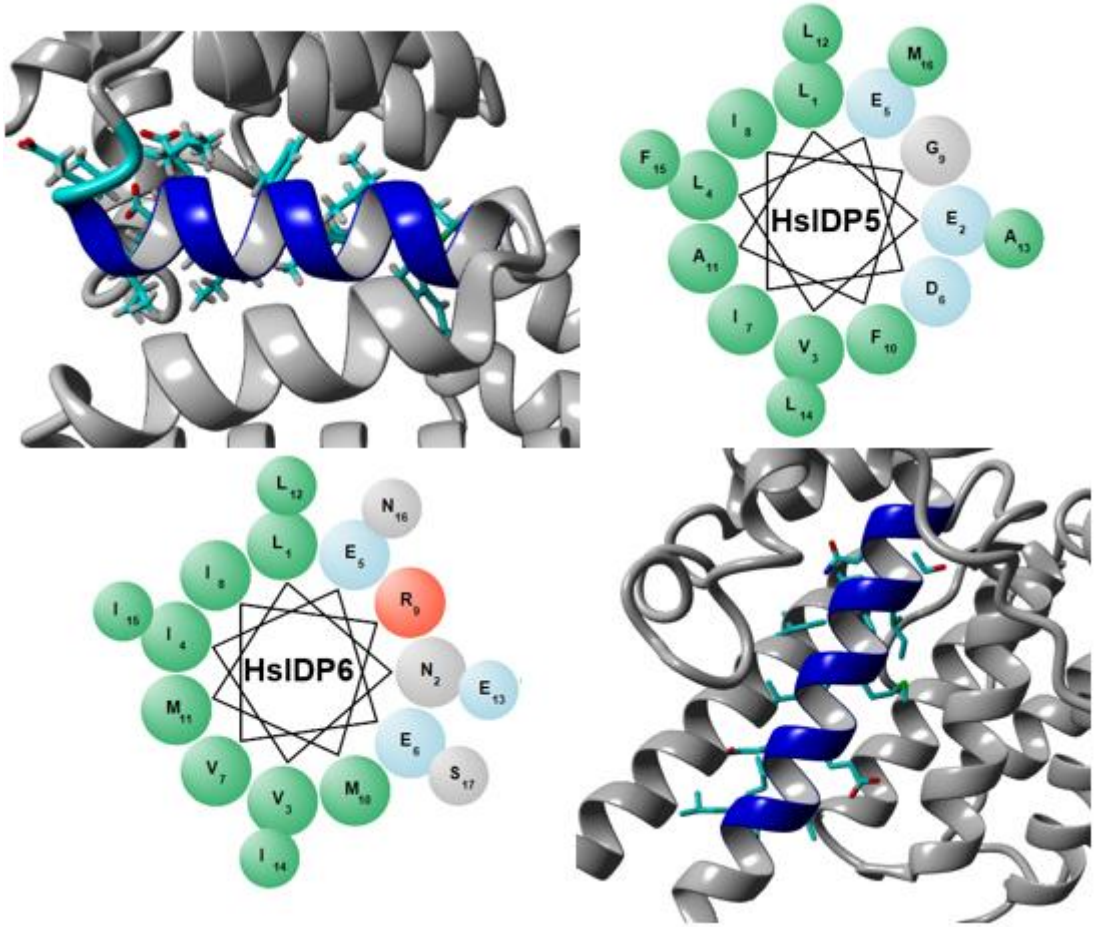


Figura 44: estrutura tridimensional do complexo 3 da proteína *Superkiller* com a estrutura LEVLEDIIGFALALFM correspondente ao HsIDP5 e da dimeclina com a estrutura LNVIEEVIRMMLEIINS correspondente ao HsIDP6. Ao lado das estruturas das proteínas, estão demonstrados os mapas de Edmundson.

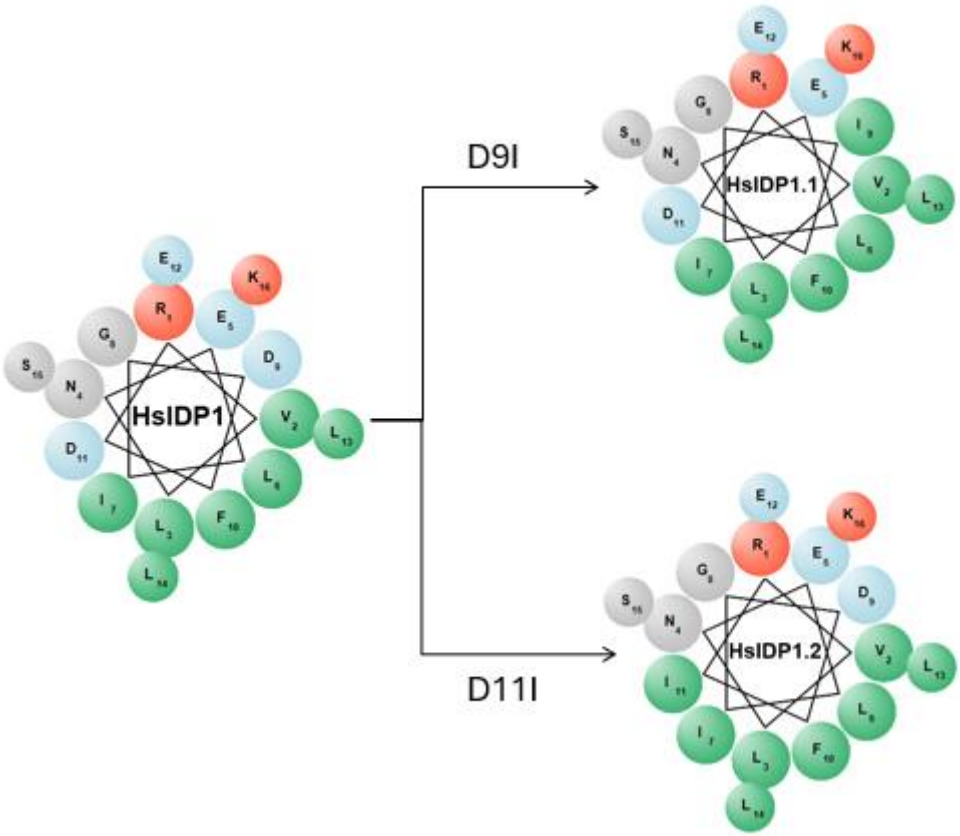


Figura 45: esquema demonstrando o mapa de Edmundson do HsIDP1 e de seus análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2. As alterações realizadas nos análogos estão demonstradas, sendo a alteração do D na posição 9 para I no HsIDP1.1, e do D na posição 11 para I no HsIDP1.2. Nas projeções, aminoácidos em verde são hidrofóbicos, em cinza hidrofílicos não carregados, em azul claro carregados negativamente e em vermelho carregados positivamente.

4.4.1. Síntese, purificação e caracterização por espectrometria de massa

A síntese dos peptídeos da terceira geração ocorreu de forma análoga às passadas, utilizando a técnica de SPPS. A purificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência, porém para os HsIDP5 e HsIDP6, percebeu-se a necessidade de diminuir a concentração da solução de peptídeo injetada para 10 mg/mL. Dessa forma, a coluna utilizada para o procedimento passou a ser uma semi-preparativa de fase reversa Vydac 218TP510, com fluxo de fase móvel de 2,5 mL/min. A purificação dos HsIDP1.1 e HsIDP1.2 ocorreram com a mesma metodologia do HsIDP1.

Os cromatogramas resultantes da purificação dos HsIDP5 e HsIDP6 apresentam picos referentes aos peptídeos levemente alargados. Entretanto, não dificultou a coleta dos compostos purificados. Os cromatogramas dos análogos apresentaram-se similares ao do HsIDP1, com leves alterações nos tempos de

retenção, por se tratarem de moléculas com hidrofobicidades diferentes (Figura 46). Para todos os peptídeos da terceira geração, apenas a absorbância no comprimento de onda de 216 nm foi analisada, visto que nenhum deles possui aminoácidos que absorvem apreciavelmente em 280 nm.

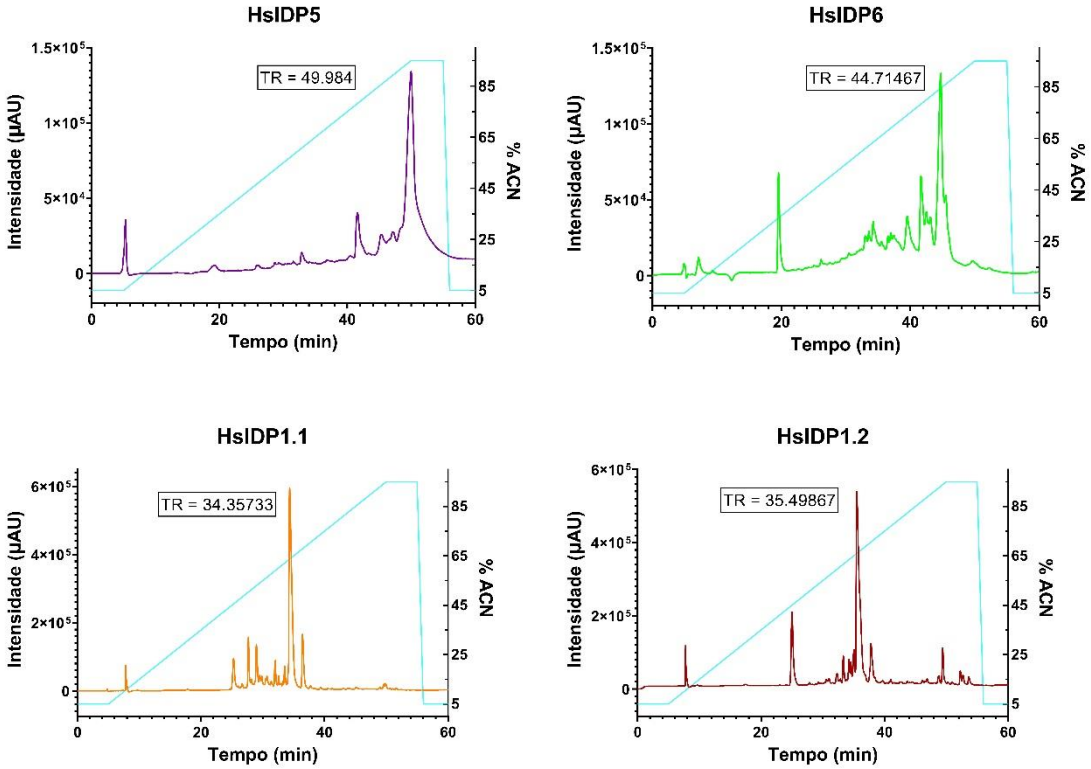


Figura 46: cromatogramas dos peptídeos de terceira geração, apresentando o HsIDP5 (roxo) com tempo de retenção de 49,98 minutos, HsIDP6 (verde claro) com 44,71 minutos, HsIDP1.1 (laranja) com 34,36 minutos e HsIDP1.2 (vinho) com 35,50 minutos.

Os tempos de retenção observados para o HsIDP5, HsIDP6, HsIDP1.1 e HsIDP1.2 foram de 49,98, 44,71, 34,36 e 35,50 minutos, respectivamente. Em termos de composição da fase móvel, os sinais representantes dos peptídeos ocorreram com aproximadamente 95%, 84%, 64% e 66% de acetonitrila, respectivamente. Coletados os peptídeos purificados, seguiu-se para suas caracterizações por espectrometria de massa, para confirmar o sucesso da síntese na sequência de aminoácidos proposta (Figura 47).

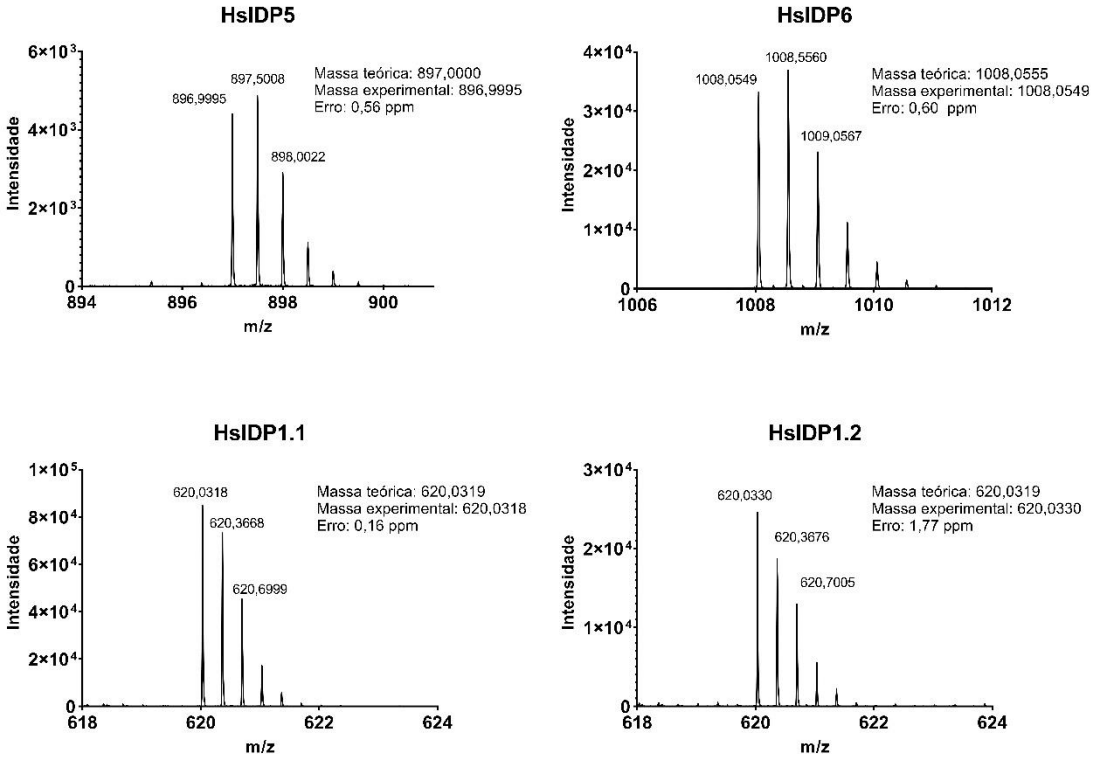


Figura 47: espectros de massa dos peptídeos da terceira geração, seguidos de suas séries isotópicas. Para o HsIDP5, foi identificado seu íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 896,9995 Da. Para o HsIDP6, seu íon também de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 1008,0549 Da. Os HsIDP1.1 e HsIDP1.2 possuem mesma massa, ambos íons identificados como tripla carga, com $[M+3H]^{3+}$ = 620,0318 Da e $[M+3H]^{3+}$ = 620,0330 Da, respectivamente.

Os peptídeos HsIDP5 e HsIDP6, de sequências LEVLEDIIGFALALFM-NH_2 e LNVIEEVIRMMLEIINS-NH_2 foram identificados em suas formas com dupla carga, seguidos de suas séries isotópicas, com massas $[M+2H]^{2+}$ = 896,9995 Da e $[M+2H]^{2+}$ = 1008,0549 Da, que ao comparar com as massas teóricas, geram erros de massa de 0,56 e 0,60 ppm, respectivamente. Os análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2, de sequências RVLNELIGIFDELLSK-NH_2 e RVLNELIGDFIELLSK-NH_2 foram identificados como íons de tripla carga, acompanhados por suas séries isotópicas, com massas experimentais $[M+3H]^{3+}$ = 620,0318 Da e $[M+3H]^{3+}$= 620,0330 Da, gerando erros de massa de 0,16 e 1,77 ppm, respectivamente.

Para confirmar que a molécula foi sintetizada corretamente, os espectros de fragmentação dos peptídeos foram obtidos, selecionados automaticamente pelo equipamento que operava no modo IDA. Os espectros de MSMS gerados foram analisados pelo programa *interactive peptide spectral annotator* (BRADEMAN et al., 2019) (Figura 48, 49, 50, 51).

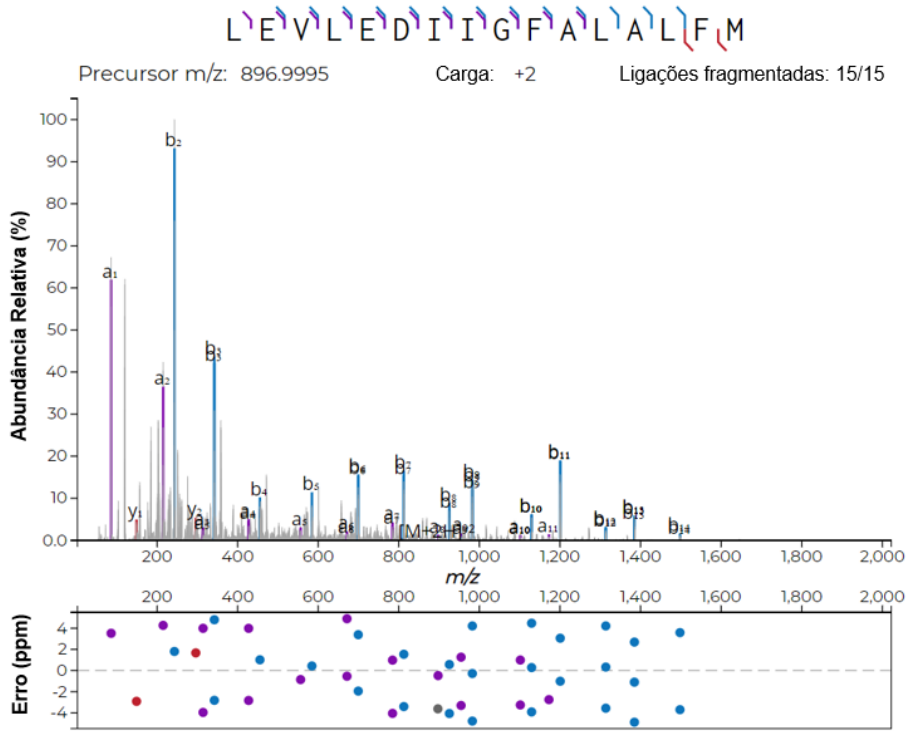


Figura 48: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 896,9995 Da do HsIDP5. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

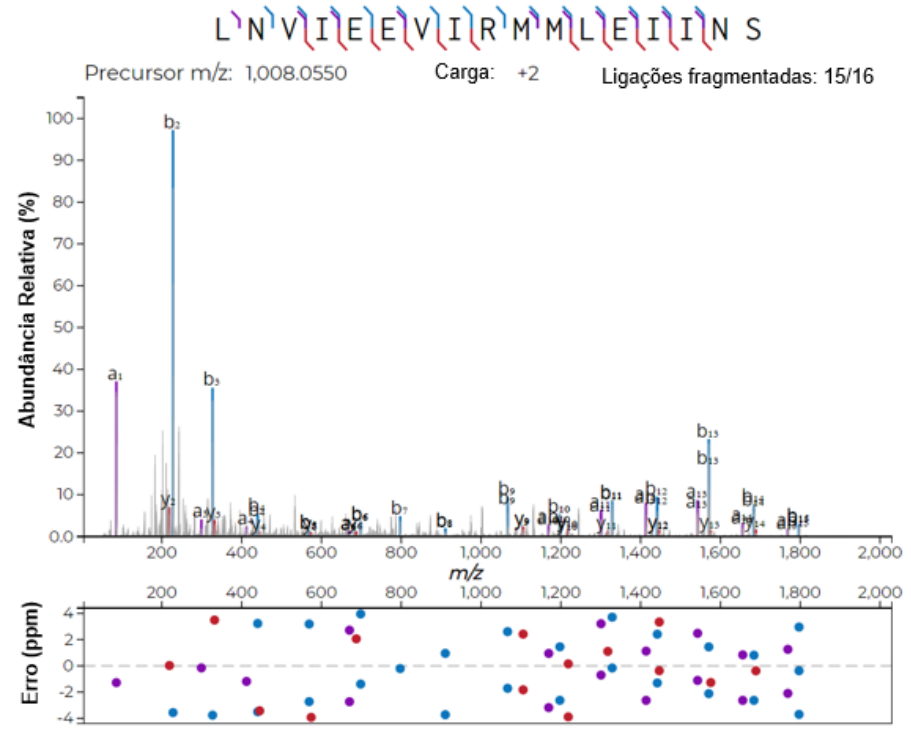


Figura 49: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de dupla carga $[M+2H]^{2+}$ = 1008,0550 Da do HsIDP6. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

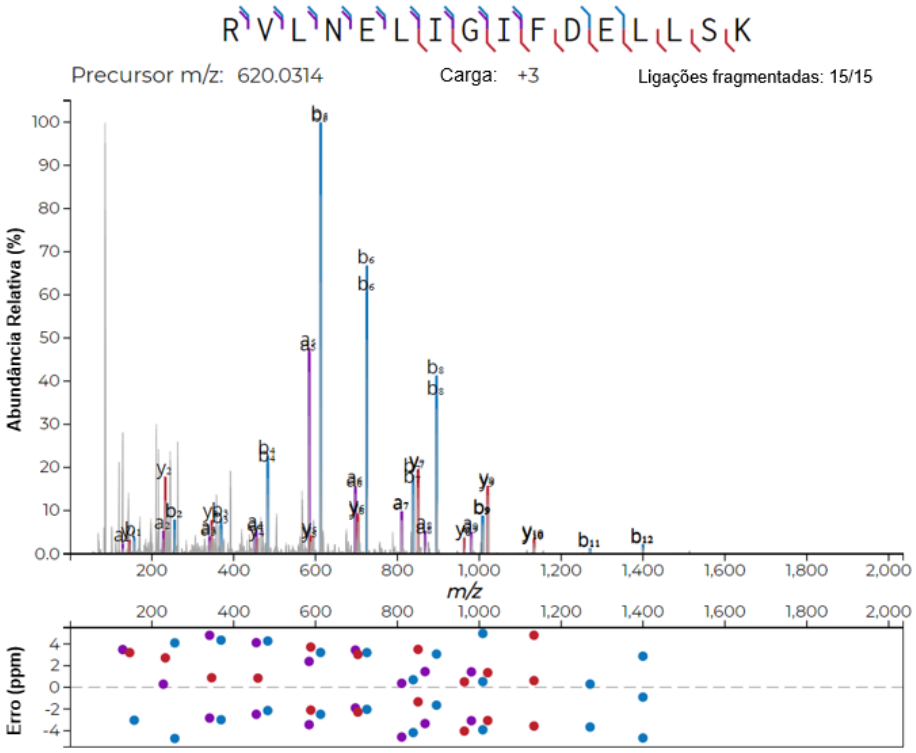


Figura 50: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 620,0314 Da do HsIDP1.1. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

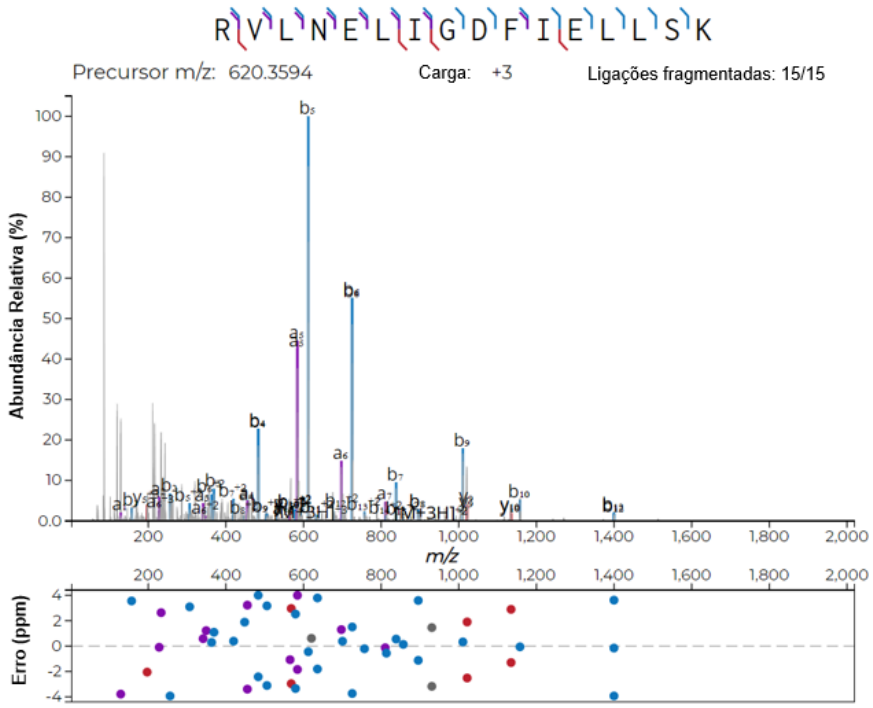


Figura 51: espectro de fragmentação (MSMS) obtido em modo IDA do íon de tripla carga $[M+3H]^{3+}$ = 620,3594 Da do HsIDP1.2. Íons das séries a (roxo), b (azul) e y (vermelho) estão elencados, com seus erros demonstrados no quadro abaixo do espectro.

Uma vez confirmadas as sínteses com sucesso, seguiu-se para os ensaios de dicroísmo circular em condições análogas às realizadas com os peptídeos da segunda geração, com o intuito de conferir se as mudanças pretendidas no ângulo polar das novas moléculas são capazes de apresentar o efeito pretendido, de estruturar-se apenas em pH acidificado (em comparação com o valor fisiológico) e seletividade à carga presente na interface das vesículas.

4.4.2. Dicroísmo circular

Iniciaram-se os ensaios de dicroísmo circular com o HsIDP5. Em tampão, o peptídeo demonstrando uma tendência de estruturação secundária na forma de fita-β (Figura 52e). Ao adicionar vesículas ao meio, nota-se que parte de sua sequência adquire estrutura helicoidal (Figura 52a,c). Calculando o percentual de hélice adquirido, é perceptível que o HsIDP5 não é seletivo frente à composição dos fosfolipídeos, visto que demonstrou comportamentos equivalentes para as vesículas de DMPC e DMPC/DMPG (Figura 52b,d). De forma similar, apresentou pouca ou nenhuma sensibilidade ao pH, em que as variações apresentadas nos cálculos de estrutura helicoidal ao acidificar o meio podem ser atribuídas à lógica do algoritmo de cálculo do *BeStSel*, visto que ao observar os espectros de dicroísmo circular, as diferenças entre as curvas para uma mesma vesícula são meramente perceptíveis.

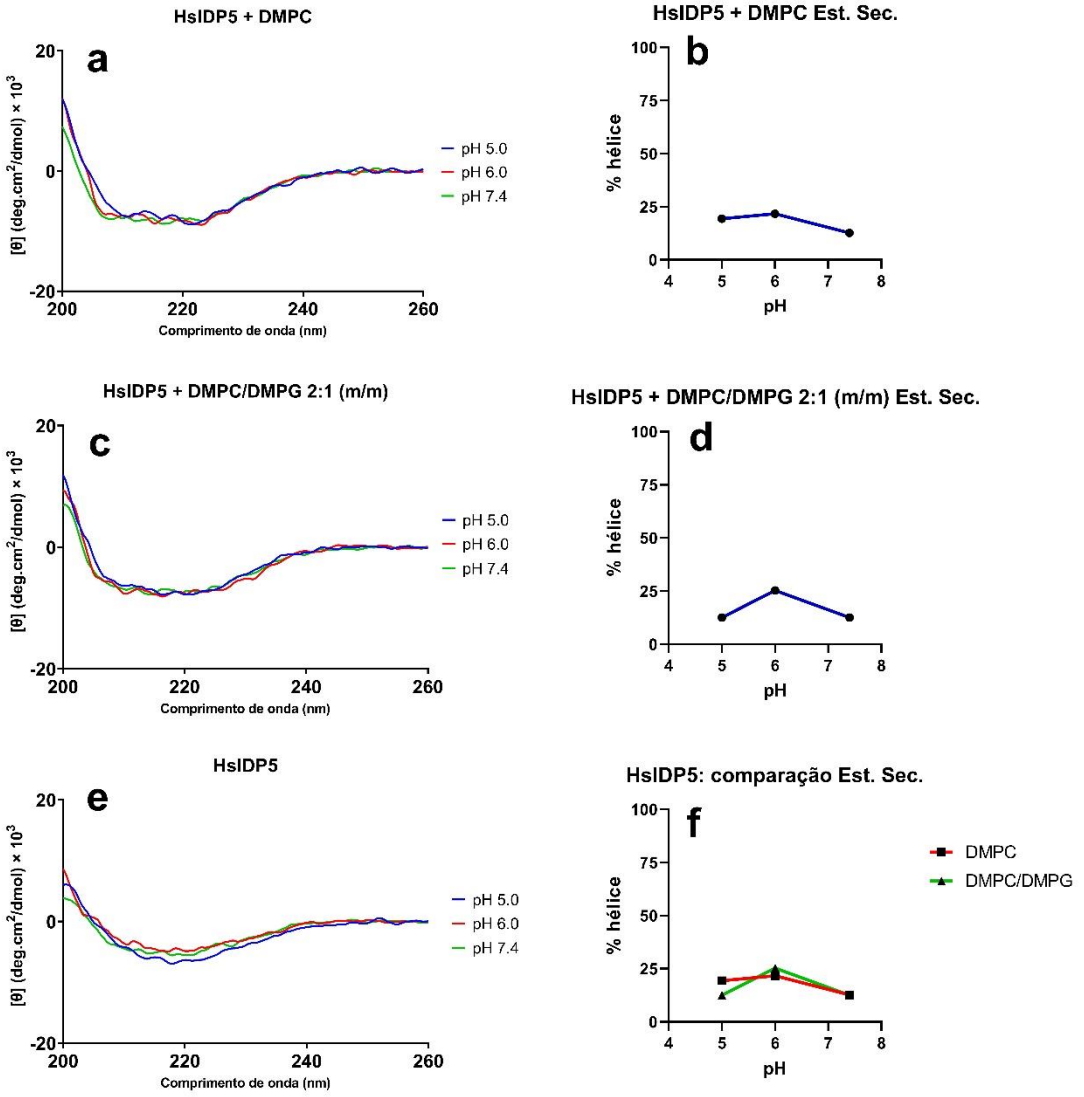


Figura 52: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP5 em (e) tampão e com vesículas de (a) DMPC e (c) DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Percentual de estrutura helicoidal calculadas na presença de (b) DMPC e (d) DMPC/DMPG 2:1 (m/m), assim como comparação entre ambos (f).

Esta alteração no espectro dicroico, característica da conversão de hélice para estruturas betas, pode ter ocorrido pelo aumento da face hidrofóbica do peptídeo. Essas estruturas aparentam ser parcialmente revertidas quando em presença de vesículas de fosfolipídeos, dado que há uma perceptível alteração no caráter dos espectros.

Em busca de verificar se a tendência de estruturação como fita-β em tampão é encontrada para os outros peptídeos dessa geração de moléculas, seguiu-se para os experimentos com o HsIDP6, que também possui um ângulo polar reduzido. Diferentemente do HsIDP5, o HsIDP6 é capaz de estruturar-se em α-hélice apenas em tampão. Entretanto, ao diminuir o pH para 5,0, observa-se um deslocamento

das bandas dicroicas típicas de α-hélice, em 222 e 208 nm, para maiores comprimentos de onda e a diminuição abrupta do percentual de hélice (Figura 53a).

Ao adicionar vesículas no meio, o peptídeo apresentou mais de 80% de sua sequência na forma de α-hélice (Figura 53c,d,e,f). Esse comportamento é observado para ambas as composições de vesícula.

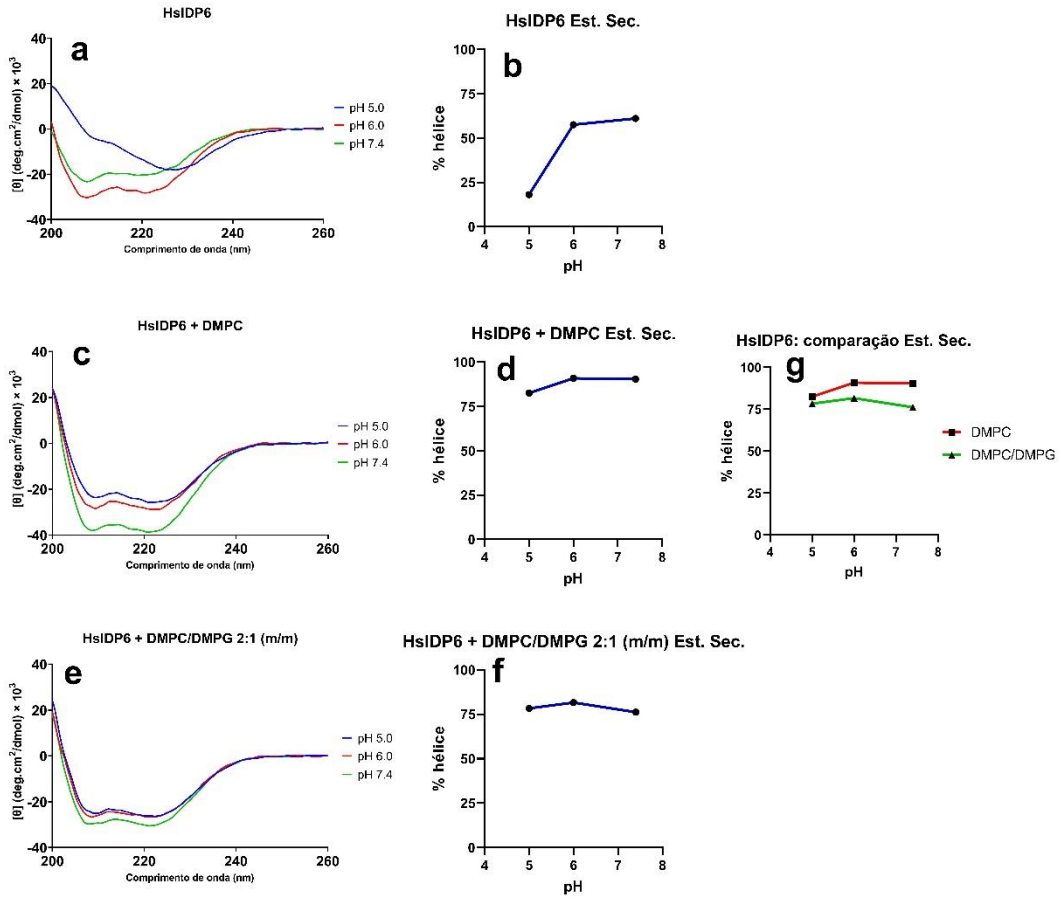


Figura 53: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP6 em (a) tampão e com vesículas de (c) DMPC e (e) DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Percentual de estrutura helicoidal calculadas em tampão (b), na presença de (d) DMPC e (f) DMPC/DMPG 2:1 (m/m), assim como comparação entre ambos (g).

Interpretando os dados, infere-se que em tampão, ao diminuir o pH do meio para 5,0, um processo de agregação pode ter sido iniciado devido à diminuição acentuada de estrutura helicoidal. Esse fenômeno é explicado pela protonação dos resíduos ácidos pertencentes à molécula, diminuindo substancialmente a polaridade do peptídeo. Visto que a face hidrofóbica do peptídeo é ampla, torna-se facilitada a interação entre os monômeros.

A adição das vesículas de ambas as composições proporcionou ainda mais estruturação ao peptídeo. Quando o pH do meio é acidificado em meio contendo vesículas, ocorre uma leve diminuição do percentual de hélice, mas, opostamente ao que ocorre em tampão, a interação com os fosfolipídeos impede a agregação do peptídeo, mantendo-o majoritariamente como uma α-hélice, indicando afinidade pela bicamada.

Por fim, nota-se que o efeito do pH no HsIDP6 é o oposto ao esperado. A acidificação do meio decorre em menor estruturação do peptídeo, podendo resultar em formação de agregados quando na ausência de membranas. Similarmente, o peptídeo não se apresentou significativamente seletivo a nenhuma composição de membrana. Segundo os resultados aqui apresentados, a condição ótima de interação do HsIDP6 é com vesículas compostas por DMPC e em valores de pH fisiológico.

Visto que ambas as moléculas novas desta geração não resultaram na atividade desejada, passou-se para o desenho racional e síntese de análogos do peptídeo de primeira geração, o HsIDP1. Com o intuito de aumentar o grau de enterramento de aminoácidos negativamente carregados, a face polar do peptídeo foi diminuída em comparação com o seu precursor. Seguiu-se, então, para os ensaios com os dois análogos: HsIDP1.1 e HsIDP1.2 para verificar os efeitos decorrentes da alteração da hidrofobicidade do peptídeo.

Inicialmente testou-se o primeiro análogo, HsIDP1.1, que possui uma substituição do ácido aspártico na posição 9 por uma isoleucina. À primeira vista observa-se uma grande mudança estrutural em comparação com seu precursor indicada pelo alto teor de formação de fita-β em pH 5,0 (Figura 54a). Essa tendência mantém-se em todas as condições: em tampão, na presença de vesículas de DMPC e de DMPC/DMPG 2:1 (m/m) (Figura 54c,e)

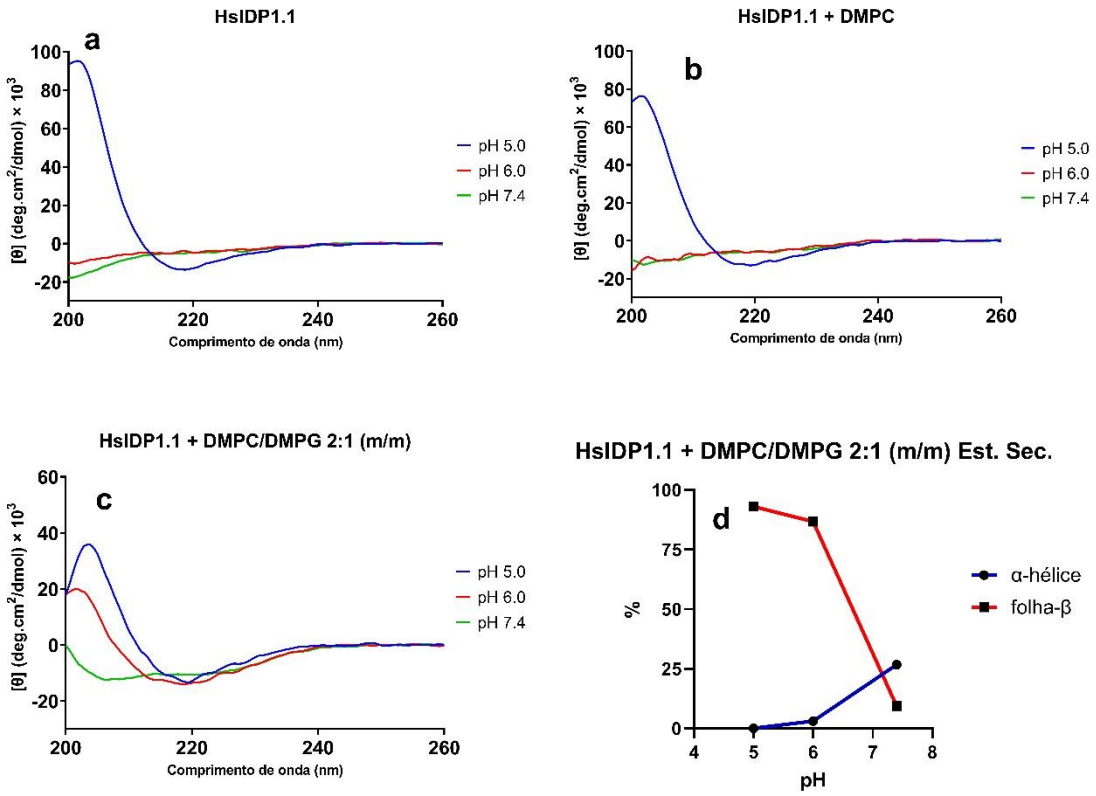


Figura 54: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP1.1 em (a) tampão e com vesículas de (b) DMPC e (c) DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Percentual de estrutura secundária calculadas na presença de (d) DMPC/DMPG 2:1 (m/m), com α-hélice em azul e fita-β em vermelho.

Percebe-se que a alteração de um aminoácido polar por um apolar foi o suficiente para desencadear um efeito abrupto de modificação da estrutura secundária do peptídeo. Isso é um indicativo de que o HsIDP1, precursor do peptídeo acima, já tem uma tendência de agregação, conforme constatado em experimentos anteriores, que resultou na necessidade de diminuir a concentração do peptídeo utilizada nos ensaios. Ao calcular as estruturas secundárias, observa-se que em pH fisiológico o peptídeo perde a estrutura de fita-β, em especial na presença de vesículas compostas por DMPC/DMPG 2:1 (m/m). Observa-se que, na presença dessas vesículas, durante a transição de pH 7,4 para 6,0, ocorre uma mudança abrupta na estrutura secundária do peptídeo, que assume a conformação de folha-β. Esse comportamento é semelhante ao verificado em seu precursor, HsIDP1, porém de forma mais acentuada. Conforme mencionado anteriormente, a adoção de uma estrutura secundária em folha-β na presença de membranas, em vez de α-hélice, pode estar associada à capacidade do peptídeo de se inserir, uma vez que existem exemplos de moléculas membrano-ativas e peptídeos penetradores que dependem dessa conformação para exercer sua função (Figura 54d) (EIRÍKSDÓTTIR et al., 2010).

Por fim, foram realizados ensaios com o outro análogo, o HsIDP1.2, para avaliar se o comportamento de formação de fita-β observado no HsIDP1.1 se repetiria. No entanto, observou-se que tal comportamento não é compartilhado entre os dois peptídeos, uma vez que o espectro característico de fita-β não foi detectado. Em tampão, o HsIDP1.2 apresenta-se predominantemente desestruturado (Figura 55e). Entretanto, na presença de vesículas, o peptídeo assume uma conformação de α-hélice já em pH fisiológico.

Notavelmente, em vesículas de DMPC, o HsIDP1.2 mostrou um aumento significativo na porcentagem de α-hélice, passando de 27,6% para 63,5% quando o pH foi reduzido de 7,4 para 6,0 (Figura 55a,b). Um comportamento semelhante foi observado na presença de vesículas de DMPC/DMPG, onde o peptídeo também demonstrou sensibilidade ao pH, com valores de estruturação secundária comparáveis entre os dois tipos de vesículas (Figura 55c,d).

Esses resultados indicam que o HsIDP1.2 apresenta uma sensibilidade considerável ao pH. Além disso, na presença de membranas aniônicas, a penalidade imposta pelas cargas negativas em pH fisiológico parece ser parcialmente mitigada, uma vez que o peptídeo já exibe aproximadamente 50% de sua sequência estruturada em α-hélice nessas condições (Figura 55d,f). Isso sugere que a interação com membranas aniônicas facilita a estruturação do peptídeo, mesmo em pH fisiológico, destacando a influência do ambiente fosfolipídico e do pH na conformação do HsIDP1.2.

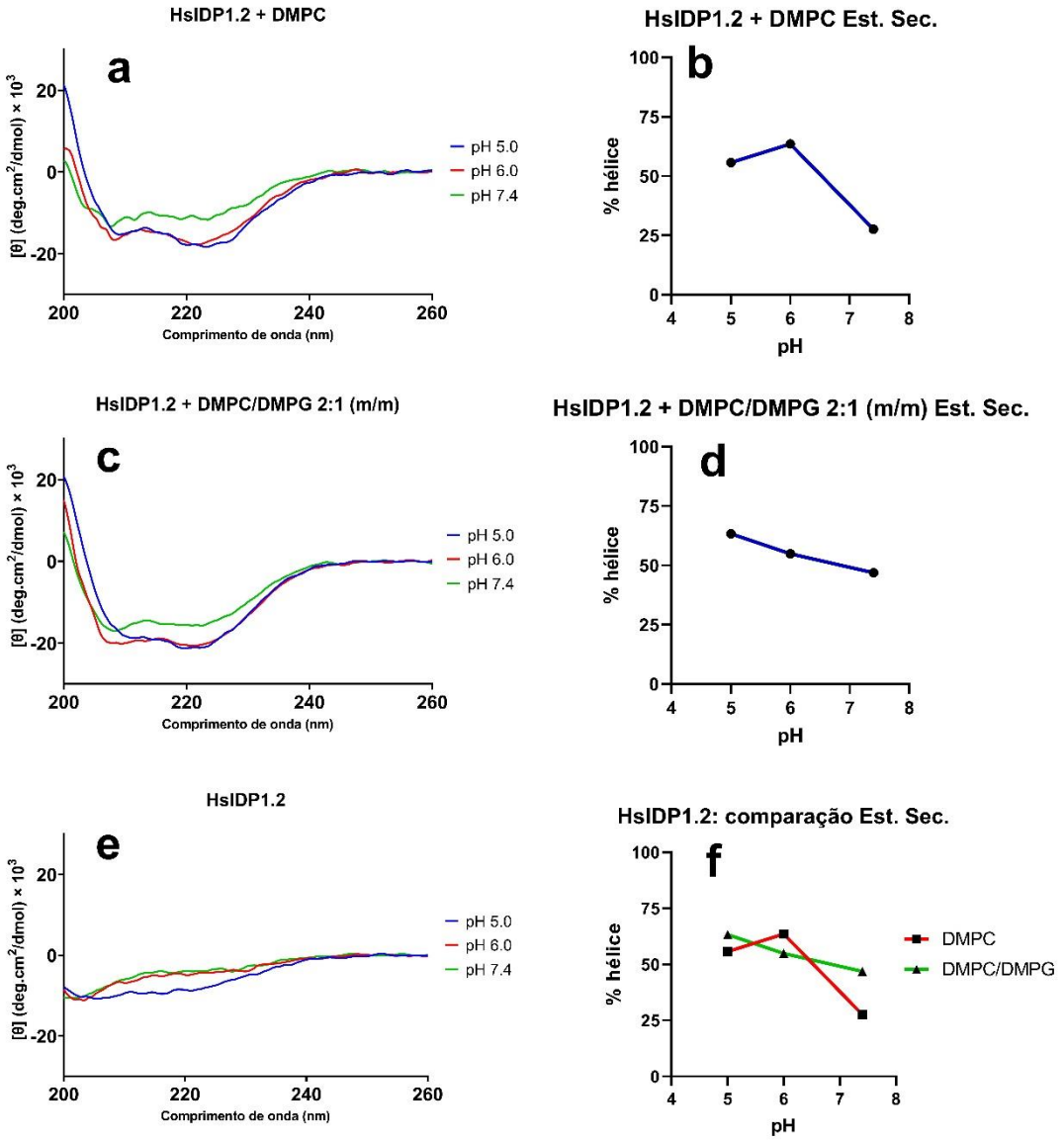


Figura 55: espectros de dicroísmo circular para o HsIDP1.2 em (e) tampão e com vesículas de (a) DMPC e (c) DMPC/DMPG 2:1 (m/m) em valores de pH de 7,4 (verde), 6,0 (vermelho) e 5,0 (azul). Percentual de estrutura secundária calculadas na presença de (b) DMPC e (d) DMPC/DMPG 2:1 (m/m), com α-hélice em azul e folha-β em vermelho, assim como comparação entre ambas em (f).

O comportamento apresentado para o HsIDP1.2 pode ser comparado com o do pHLIP, por não possuir considerável seletividade à composição da membrana uma vez que o valor de pH do meio iguala o de seu pK_{ins}, sendo capaz de adquirir estrutura secundária frente a vesículas miméticas de eucariotos e procariotos de forma similar (VASQUEZ-MONTES et al., 2018).

Ao comparar os resultados dos dois análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2 é possível notar comportamentos antagônicos em termos de tipos de estruturas

adotadas, tendo apenas um aminoácido de diferença entre suas sequências. Tal resultado pode contribuir para melhor compreender o que dirige a interação de um peptídeo com uma membrana e como a sensibilidade ao pH pode ser melhor controlada para atingir um ponto desejado. Entretanto, ao observar os cálculos da estrutura secundária do HsIDP1.2 (Figura 55f), observa-se que não há uma diferença contundente entre a interação com as vesículas de DMPC ou DMPC/DMPG, comportamento que foi melhor observado no outro análogo, o HsIDP1.1 (Figura 54).

Com exceção do HsIDP3, todos os peptídeos sintetizados para esse trabalho foram capazes de interagir com membrana, mantendo-se dessa forma como peptídeos membrano-ativos. A literatura sugere que um dos principais fatores para a atração inicial de peptídeos antimicrobianos é a complementaridade de cargas com a membrana aniônica de procariontes, o que explica sua seletividade (DATHE et al., 1997; LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013; SANI; SEPAROVIC, 2016). No entanto, os resultados apresentados neste estudo indicam que a interação peptídeo-membrana dos HsIDPs não depende exclusivamente de atração eletrostática. Isso porque todos os HsIDPs analisados possuem carga líquida negativa em pH fisiológico, e muitos deles foram capazes de interagir com vesículas predominantemente aniônicas nessa faixa de pH.

Assim, a atração eletrostática entre peptídeos e membranas parece estar mais relacionada à ação antimicrobiana propriamente dita, uma vez que pode facilitar a perturbação da estrutura da membrana, do que com a interação inicial em si. Essa hipótese será corroborada pelos ensaios de atividade inibitória de micro-organismos apresentados ao fim deste trabalho.

Ao tentar estudar os efeitos de propriedades como ponto isoelétrico, hidrofobicidade média e ângulo polar, uma variedade de resultados foram obtidos. Constituído como “peptídeo modelo”, o HsIDP1 foi o primeiro a ser sintetizado e o que apresentou a maior sensibilidade ao pH e seletividade a composição da membrana. Na busca de manejar o pK_{ins} do peptídeo, as segundas e terceiras gerações foram buscadas dentro da biblioteca disponibilizada pelo s*oftware* Kamal contendo peptídeos aniônicos intragênicos anfifílicos e helicoidais.

Durante os ensaios das novas gerações, a interação diferencial entre peptídeo e vesículas de DMPC e DMPC/DMPG foi observada para o HsIDP2 em todos os pHs testados, e para os análogos HsIDP1.1 e HsIDP1.2, principalmente em pH fisiológico. Já ao tratar de sensibilidade ao pH, apenas o HsIDP1.2 foi capaz de aumentar seu percentual de estruturação helicoidal com a acidificação do meio. Entretanto, apesar de o HsIDP1.1 e o HsIDP6 na ausência de vesículas também apresentarem sensibilidade ao pH, essa ocorre com a estruturação como fita-β, no caso do 1.1.

A procura por uma molécula com valor de pK_{ins} desejado se mostrou dependente de um equilíbrio fino e facilmente perturbado entre ter um valor de

hidrofobicidade média suficiente para interação com a membrana, mas não demasiada, que permita a formação de composições de agregados da biomolécula. Ademais, deve possuir carga negativa em pH fisiológico para que a interação com membranas plasmáticas seja dificultada. Tal atividade tanto não é trivial, que pouco se vê na literatura científica peptídeos que são capazes de se comportar de tal forma, tendo como exemplos conhecidos apenas o pHLIP e o GALA, extensamente citados na introdução deste trabalho.

Por fim, para estudar se os HsIDPs são capazes de inibir o crescimento de micro-organismos, a primeira e segunda geração de peptídeos foram testadas.

4.5. Ensaio de concentração mínima inibitória (MIC)

A capacidade de inibição do crescimento de micro-organismos pelo HsIDP1, HsIDP2, HsIDP3 e HsIDP4 foi avaliada. Para todos os organismos testados, incluindo *E. coli, S. aureus, C. albicans, A. baumanii* e *S. epidermidis*, os peptídeos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em concentração até 128 µM. Para o HsIDP1, foi verificado se sua atividade poderia ser dependente da presença de cátions bivalentes, como reportado para alguns AAMPs. Dessa forma, foram realizados ensaios em meio ajustado com cátions (ALMARWANI et al., 2020; BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997). Esses ensaios consistem na adição de Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}. Com o intuito de reproduzir as condições utilizadas por Brogden et al., a concentração de Zn^{2+} utilizada foi de 20 µM (BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997), enquanto a dos outros cátions foi mantida conforme metodologia já utilizada pelo laboratório. A adição dos cátions bivalentes não apresentou nenhum efeito frente a capacidade inibitória do HsIDP1.

Os resultados obtidos para as duas primeiras gerações dos HsIDPs demonstram que estes peptídeos, embora capazes de adsorver à membrana, como demonstrado nos ensaios de dicroísmo circular, não causam lise de células procarióticas. Tal interação é, provavelmente, similar à visualizada para os peptídeos da família do pHLIP, de estruturar-se e inserir-se na membrana, sem maiores perturbações na estrutura da mesma (ZOONENS; RESHETNYAK; ENGELMAN, 2008). Todos os ensaios de inibição foram realizados em pH neutro, então mesmo peptídeos capazes de se estruturar nesse pH, como HsIDP2 e HsIDP4, não foram antimicrobianos nas condições avaliadas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Peptídeos membrano-ativos aniônicos com atividade sensível ao pH vêm ganhando notoriedade devido ao potencial de agir seletivamente frente a células tumorais. A família de peptídeos sensíveis a alterações de pH mais estudada é a do pHLIP, composta por peptídeos aniônicos que se estruturam em α-hélice na presença de vesículas em meio acidificado. Estudos têm explorado suas propriedades em imageamento e entrega de fármacos no citosol de células tumorais, devido à sua habilidade de inserção rígida na membrana (ANDREEV; ENGELMAN; RESHETNYAK, 2009; DESKEUVRE et al., 2024; DUPONT et al., 2024).

Inspirados por casos como o do pHLIP e outros peptídeos aniônicos membrano-ativos, nosso grupo de pesquisa decidiu integrar metodologias já estabelecidas no laboratório e adotar uma nova perspectiva de investigação, voltando nossa atenção para sequências presentes no proteoma humano. O objetivo foi identificar possíveis peptídeos membrano-ativos sensíveis ao pH que estivessem "encriptados" em proteínas humanas. Para isso, iniciamos a busca no banco de dados Kamal, focando inicialmente em α-hélices anfifílicas aniônicas, a fim de avaliar seus comportamentos em interação com membranas biológicas.

Essa abordagem visa não apenas ampliar o entendimento sobre a diversidade funcional desses peptídeos, mas também identificar novos candidatos com potencial terapêutico, especialmente no contexto de terapias direcionadas a células tumorais.

Os ensaios realizados com as três gerações de HsIDPs demonstraram que o proteoma humano é, de fato, uma fonte viável de peptídeos sensíveis ao pH. Dentre os peptídeos sintetizados, apenas o HsIDP3 não foi capaz de adquirir estrutura secundária na presença de vesículas, provavelmente devido ao seu baixo momento hidrofóbico e à composição de aminoácidos em sua sequência. Por outro lado, peptídeos como HsIDP1, HsIDP1.1 e HsIDP1.2 exibiram sensibilidade à acidificação do meio, alterando sua conformação em resposta a mudanças de pH.

Ensaios de dicroísmo circular com gradiente de pH confirmaram que, ao acidificar o meio e ultrapassar o limiar necessário para cada peptídeo, os HsIDPs1, 1.1 e 1.2 são capazes de modificar sua estrutura secundária. Além disso, esses três peptídeos demonstraram seletividade por membranas negativamente carregadas. Na presença de vesículas de DMPC/DMPG 2:1 (m/m), o HsIDP1 estruturou-se apenas em pH 5,0, enquanto o HsIDP1.1 alternou entre α-hélice e folha-β ao mudar o pH de 7,4 para 6,0. O HsIDP1.2, por sua vez, mostrou um aumento significativo em seu percentual de hélice com a acidificação do meio, além de exibir sensibilidade ao pH na presença de vesículas zwitteriônicas, comportamento semelhante ao observado no pHLIP.

Esses resultados indicam que o proteoma humano não apenas contém sequências sensíveis ao pH, mas também é uma fonte de peptídeos seletivos à composição de membrana. Embora os HsIDPs2 a 6 não tenham apresentado o comportamento desejado, eles serviram como um estudo valioso para demonstrar como diferentes características físico-químicas, como ponto isoelétrico, posição de aminoácidos, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e ângulo polar, podem influenciar a atividade dos peptídeos. Em contraste com os HsIAPs, que são usados principalmente como antimicrobianos (BRAND et al., 2019), os HsIDPs mostraram-se mais desafiadores para atingir o equilíbrio ideal entre as propriedades necessárias para a atividade desejada. No entanto, os HsIDPs1, 1.1 e 1.2 emergiram como moléculas promissoras, pois apresentaram, de forma única, as características buscadas: interação com membranas dependente de pH e seletividade por vesículas aniônicas.

Com base nos resultados obtidos, tem-se como perspectivas avançar com testes adicionais envolvendo o HsIDP1 e seus análogos, sintetizando-os novamente e conjugando-os a marcadores fluorescentes. Essa abordagem permitirá visualizar se o comportamento observado *in vitro* será replicado em ensaios com células cancerosas, verificando se os peptídeos são capazes de transpor completamente a membrana ou se mantêm adsorvidos a ela, de forma sensível ao pH e seletiva à presença de cargas negativas. Esses estudos são essenciais para explorar o potencial terapêutico desses peptídeos no direcionamento de células tumorais, assim como observar se os modelos de estudos realizados são preditivos de atividade dos peptídeos em meios *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS

ADYNS, L.; PROOST, P.; STRUYF, S. **Role of Defensins in Tumor Biology**. **International Journal of Molecular Sciences**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2023.

ADZHUBEI, A. A.; STERNBERG, M. J. E.; MAKAROV, A. A. **Polyproline-II helix in proteins: Structure and function**. **Journal of Molecular Biology**Academic Press, , 26 jun. 2013.

AGRAWAL, P. et al. CPPsite 2.0: A repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1098–D1103, 2016.

ALMARWANI, B. et al. Interactions of an Anionic Antimicrobial Peptide with Zinc(II): Application to Bacterial Mimetic Membranes. **Langmuir**, v. 36, n. 48, p. 14554–14562, 8 dez. 2020.

AN, M. et al. pH-(low)-insertion-peptide (pHLIP) translocation of membrane impermeable phalloidin toxin inhibits cancer cell proliferation. **PNAS**, 2010.

ANDERSON, M. et al. Probe for the measurement of cell surface pH in vivo and ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 29, p. 8177–8181, 19 jul. 2016.

ANDREEV, O. A. et al. **Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0702439104>.

ANDREEV, O. A.; ENGELMAN, D. M.; RESHETNYAK, Y. K. **Targeting acidic diseased tissue: New technology based on use of the pH (Low) Insertion Peptide (pHLIP)**. [s.l: s.n.].

AVCI, F. G.; AKBULUT, B. S.; OZKIRIMLI, E. **Membrane active peptides and their biophysical characterization**. **Biomolecules**MDPI AG, , 1 set. 2018.

BALASUBRAMANIAN, K.; SCHROIT, A. J. **Aminophospholipid Asymmetry: A Matter of Life and Death**. **Annual Review of Physiology**, 2003.

BALTZ, R. H. **Chapter 20 Biosynthesis and Genetic Engineering of Lipopeptides in Streptomyces roseosporus**. **Methods in Enzymology**, 2009.

BARDAN, A.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, n. 4, p. 543–549, 2005.

BARRETO-SANTAMARÍA, A.; PATARROYO, M. E.; CURTIDOR, H. **Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same**. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**Taylor and Francis Ltd, , 18 ago. 2019.

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

BECUCCI, L. et al. Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: Influence of lipid charge, pH and Zn2+ on its interaction with a biomimetic membrane. **Soft Matter**, v. 10, n. 4, p. 616–626, 28 jan. 2014.

BOKVIST, M. et al. Two Types of Alzheimer's β-Amyloid (1-40) Peptide Membrane Interactions: Aggregation Preventing Transmembrane Anchoring Versus Accelerated Surface Fibril Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 4, p. 1039–1049, 23 jan. 2004.

BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, v. 27, n. 1, p. 4–16, 23 ago. 2019.

BRADEMAN, D. R. et al. Interactive peptide spectral annotator: A versatile web-based tool for proteomic applications. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 18, n. 8, p. S193–S201, 2019.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta: Anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332–49340, 20 dez. 2002.

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

BRAND, G. D. et al. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018a.

BRAND, G. D. et al. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018b.

BRAND, G. D. et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2019.

BRAND, G. D.; BLOCH, C. **Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos**. [s.l: s.n.].

BRANGO-VANEGAS, J. et al. **Capping motifs in antimicrobial peptides and their relevance for improved biological activities**. **Frontiers in Chemistry**Frontiers Media SA, , 2024.

BROGDEN, K. A. et al. **Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for Pasteurella haemolytica**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.pnas.org>.

BROGDEN, K. A. et al. **Differences in the Concentrations of Small, Anionic, Antimicrobial Peptides in Bronchoalveolar Lavage Fluid and in Respiratory Epithelia of Patients with and without Cystic FibrosisINFECTION AND IMMUNITY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/iai>.

BROGDEN, K. A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K. M. **Small, Anionic, and Charge-Neutralizing Propeptide Fragments of Zymogens Are Antimicrobial**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/aac>.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. **Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? International Journal of Antimicrobial Agents**Elsevier B.V., , 2011.

BUTTERFIELD, S. M.; LASHUEL, H. A. **Amyloidogenic protein-membrane interactions: Mechanistic insight from model systems**. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2 ago. 2010.

CESARO, A. et al. Synthetic Antibiotic Derived from Sequences Encrypted in a Protein from Human Plasma. **ACS Nano**, v. 16, n. 2, p. 1880–1895, 22 fev. 2022.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. [s.l: s.n.].

CHEN, Y. et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α-helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1398–1406, abr. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 2. ed. [s.l: s.n.]. v. 35

CONCHILLO-SOLÉ, O. et al. AGGRESCAN: A server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. **BMC Bioinformatics**, v. 8, 27 fev. 2007.

CONLON, J. M. et al. The ascaphins: A family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, Ascaphus truei. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 1, p. 170–175, 16 jul. 2004.

COSTA, I. S. D. et al. Occurrence and evolutionary conservation analysis of α-helical cationic amphiphilic segments in the human proteome. **The FEBS Journal**, p. 547–565, 2024.

DAMAGHI, M.; WOJTKOWIAK, J. W.; GILLIES, R. J. **pH sensing and regulation in cancer**. **Frontiers in Physiology**, 2013.

DATHE, M. et al. **Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptidesFEBS Letters**. [s.l: s.n.].

DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Letters**, p. 146–150, 2001.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 417–433, 2010.

DENNISON, S. R. et al. **Amphiphilic α-Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure/Function RelationshipsProtein and Peptide Letters**. [s.l: s.n.].

DENNISON, S. R. et al. A novel form of bacterial resistance to the action of eukaryotic host defense peptides, the use of a lipid receptor. **Biochemistry**, v. 52, n. 35, p. 6021–6029, 2 set. 2013.

DENNISON, S. R. et al. Low pH Enhances the Action of Maximin H5 against Staphylococcus aureus and Helps Mediate Lysylated Phosphatidylglycerol-Induced Resistance. **Biochemistry**, v. 55, n. 27, p. 3735–3751, 12 jul. 2016.

DENNISON, S. R. et al. **An atlas of anionic antimicrobial peptides from amphibiansCurrent Protein & Peptide Science**. [s.l: s.n.].

DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Investigations into the potential anticancer activity of Maximin H5. **Biochimie**, v. 137, p. 29–34, 1 jun. 2017.

DESKEUVRE, M. et al. A novel approach to pH-Responsive targeted cancer Therapy: Inhibition of FaDu cancer cell proliferation with a pH low insertion Peptide-Conjugated DGAT1 inhibitor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 657, 25 maio 2024.

DOBSON, C. M.; KNOWLES, T. P. J.; VENDRUSCOLO, M. The amyloid phenomenon and its significance in biology and medicine. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.

DODERO, V. I.; QUIROLO, Z. B.; SEQUEIRA, M. A. Biomolecular studies by circular dichroism. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 61–73, 1 jan. 2011.

DUPONT, M. et al. pHLIP targeted intracellular delivery of calicheamicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 654, 10 abr. 2024.

DÜRR, U. H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. **LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides**. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, set. 2006.

EIRÍKSDÓTTIR, E. et al. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 6, p. 1119–1128, 2010.

EPPS, H. L. VAN. René Dubois: Unearthing Antibiotics. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 30, n. 2, 2006.

FALES-WILLIAMS, A. J. et al. **Cellular Distribution of Anionic Antimicrobial Peptide in Normal Lung and during Acute Pulmonary InflammationVet Pathol**. [s.l: s.n.].

FENDOS, J.; BARRERA, F. N.; ENGELMAN, D. M. Aspartate embedding depth affects pHLIP's insertion p K a. **Biochemistry**, v. 52, n. 27, p. 4595–4604, 9 jul. 2013.

FORBES, J.; KRISHNAMURTHY, K. **Biochemistry, Peptide**. [s.l: s.n.].

GALVAGNION, C. et al. Lipid vesicles trigger α-synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 229–234, 2015.

GANZ, T. **Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity**. **Nature Reviews Immunology**, set. 2003.

GODOY, C. V. et al. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407–421, 1 maio 2016.

GOORMAGHTIGH, E. et al. Secondary structure and orientation of the amphipathic peptide GALA in lipid structures: An infrared-spectroscopic approach. **European Journal of Biochemistry**, v. 195, n. 2, p. 421–429, 1991.

GRAGE, S. L. et al. Membrane thinning and thickening induced by membrane-active amphipathic peptides. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. JUN, 24 jun. 2016.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, jan. 2007.

GUHA, S. et al. **Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide**. **Biochemical Pharmacology**Elsevier Inc., , 1 nov. 2021.

GUNN, A. P. et al. Amyloid- Peptide A-3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 12, p. 6134–6145, 18 mar. 2016.

HAENSLER, J.; SZOKA, F. C. **Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture*Bioconjugate Chem**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

HANSEN, P. R.; ODDO, A. Fmoc solid-phase peptide synthesis. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2015. v. 1348p. 33–50.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Curret Protein and Peptide Science**, v. 10, p. 585–606, 2009.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. **Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms and their Mechanisms of ActionCurrent Chemical Biology**. [s.l: s.n.].

HAYASHI, K. et al. The effects of magainin 2-derived and rationally designed antimicrobial peptides on Mycoplasma pneumoniae. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1 1, 1 jan. 2022.

HENRIQUES, S. T. et al. Redesigned Spider Peptide with Improved Antimicrobial and Anticancer Properties. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 9, p. 2324–2334, 15 set. 2017.

HENRIQUES, S. T.; MELO, M. N.; CASTANHO, M. A. R. B. **How to address CPP and AMP translocation? Methods to detect and quantify peptide internalization in vitro and in vivo (review)**. **Molecular Membrane Biology**Taylor and Francis Ltd., , 2007.

HUAN, Y. et al. **Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields**. **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., , 16 out. 2020.

HUANG, H. W. **Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity**. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, set. 2006.

HUNT, J. F. et al. **Spontaneous, pH-Dependent Membrane Insertion of a Transbilayer alpha-Helix**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

IAVARONE, F. et al. **Cryptides: latent peptides everywhere**. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**Taylor and Francis Ltd, , 4 maio 2018.

KABELKA, I.; VÁCHA, R. Advances in Molecular Understanding of α-Helical Membrane-Active Peptides. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, p. 2196–2204, 2021.

KAISER, E. et al. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KALAFATOVIC, D.; GIRALT, E. **Cell-penetrating peptides: Design strategies beyond primary structure and amphipathicity**. **Molecules**MDPI AG, , 1 nov. 2017.

KASETTY, G. et al. The C-terminal sequence of several human serine proteases encodes host defense functions. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 5, p. 471–482, ago. 2011.

KAUFFMAN, W. B. et al. **Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides**. **Trends in Biochemical Sciences**Elsevier Ltd, , 2015.

KOŚCIUCZUK, E. M. et al. **Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. Molecular biology reports**, 2012.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. **Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo**. **Biomolecules**MDPI AG, , 1 mar. 2018.

KYRYCHENKO, A. et al. Lipid headgroups modulate membrane insertion of pHLIP peptide. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 4, p. 791–794, 17 fev. 2015.

LALAN, M.; BAGCHI, T.; MISRA, A. The Cell. Em: MISRA, A. (Ed.). **Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 1–43.

LAST, N. B.; SCHLAMADINGER, D. E.; MIRANKER, A. D. **A common landscape for membraneactive peptides**. **Protein Science**, jul. 2013.

LEBER, R. et al. Synergism of Antimicrobial Frog Peptides Couples to Membrane Intrinsic Curvature Strain. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 8, p. 1945–1954, 24 abr. 2018.

LEMES, A. C. et al. **A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-richwaste**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 1 jun. 2016.

LI, S. et al. A novel short anionic antibacterial peptide isolated from the skin of Xenopus laevis with broad antibacterial activity and inhibitory activity against breast cancer cell. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 5, p. 473–482, 1 jul. 2016.

LI, W. et al. **Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs**. **Chemical Society Reviews**Royal Society of Chemistry, , 21 abr. 2021.

LI, W.; NICOL, F.; SZOKA, F. C. GALA: A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 7, p. 967–985, 23 abr. 2004.

LIEPKE, C. et al. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: A class of host defense peptides. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 791, n. 1–2, p. 345–356, 5 jul. 2003.

LIU, R. et al. There are abundant antimicrobial peptides in brains of two kinds of Bombina toads. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1806–1815, 1 abr. 2011.

MA, L. et al. Potent antibacterial activity of MSI-1 derived from the magainin 2 peptide against drug-resistant bacteria. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1373–1390, 2020.

MAGZOUB, M.; GÖRAN ERIKSSON, L. E.; GRÄSLUND, A. **Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.bba-direct.com>.

MAGZOUB, M.; GRÄSLUND, A. **Cell-penetrating peptides: Small from inception to application**. **Quarterly Reviews of Biophysics**, maio 2004.

MAZURKIEWICZ-PISAREK, A.; BARAN, J.; CIACH, T. **Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use**. **International Journal of Molecular Sciences**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 maio 2023.

MEHLER, E. L. et al. The role of hydrophobic microenvironments in modulating pKa shifts in proteins. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 48, n. 2, p. 283–292, 1 ago. 2002.

MEISEL, H. **Multifunctional peptides encrypted in milk proteins**. BioFactors. **Anais**...IOS Press, 2004.

MEISL, G. et al. Kinetic analysis of amyloid formation. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1779p. 181–196.

MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 16 jun. 2015.

MUSIAL-SIWEK, M. et al. Tuning the insertion properties of pHLIP. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 6, p. 1041–1046, jun. 2010.

NAGATA, S. et al. **Exposure of phosphatidylserine on the cell surface**. **Cell Death and Differentiation**Nature Publishing Group, , 1 jun. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; HOSKINS, A. A. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8. ed. [s.l: s.n.].

NEVES-COELHO, S. et al. A new noncanonical anionic peptide that translocates a cellular blood-brain barrier model. **Molecules**, v. 22, n. 10, 1 out. 2017.

NGUYEN, P. H. et al. **Amyloid oligomers: A joint experimental/computational perspective on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis**. **Chemical Reviews**American Chemical Society, , 24 fev. 2021.

NOROUZI, P.; MIRMOHAMMADI, M.; HOUSHDAR TEHRANI, M. H. **Anticancer peptides mechanisms, simple and complex**. **Chemico-Biological Interactions**Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2022.

PÁRENTE, R. A. et al. **Association of a pH-Sensitive Peptide with Membrane Vesicles: Role of Amino Acid Sequence1"Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. [s.l.] UTC, 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA JR, F. C. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. **Biochemistry**, 1990.

POTTER, C. P. S.; HARRIS, A. L. **Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer**. **British Journal of Cancer**, 7 jul. 2003.

PRABAKARAN, R. et al. **Evaluation of in silico tools for the prediction of protein and peptide aggregation on diverse datasets**. **Briefings in Bioinformatics**Oxford University Press, , 1 nov. 2021.

RAMADA, M. H. S. et al. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

RAMSEY, J. P. et al. Immune defenses against Batrachochytrium dendrobatidis, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, Xenopus laevis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3981–3992, set. 2010.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE, P. E. **Increased Exposure of Anionic Phospholipids on the Surface of Tumor Blood Vessels 1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/62/21/6132/2499441/ch2102006132.pdf>.

RAO, B. D. et al. Aggregation Behavior of pHLIP in Aqueous Solution at Low Concentrations: A Fluorescence Study. **Journal of Fluorescence**, v. 28, n. 4, p. 967–973, 1 jul. 2018.

REISS, A. B. et al. **Amyloid toxicity in Alzheimer's disease**. **Reviews in the Neurosciences**Walter de Gruyter GmbH, , 28 ago. 2018.

RESHETNYAK, Y. K. et al. **Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helixPNAS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0601463103>.

RESHETNYAK, Y. K. et al. A monomeric membrane peptide that lives in three worlds: In solution, attached to, and inserted across lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 7, p. 2363–2372, 2007.

RESHETNYAK, Y. K. et al. Energetics of peptide (pHLIP) binding to and folding across a lipid bilayer membrane. **PNAS**, v. 105, n. 40, p. 15340–15345, 2008.

RESHETNYAK, Y. K. et al. **Targeting Acidic Diseased Tissues by pH-Triggered Membrane-Associated Peptide Folding**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**Frontiers Media S.A., , 28 abr. 2020.

RINK, H. **Solid-Phase synthesis of protected peptide fragments using a tri-alkoxydiphenyl-methylester resinTetrahedron Letters**. [s.l: s.n.].

RISKE, K. A.; AMARAL, L. Q.; LAMY-FREUND, M. T. **Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies**. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2001. Disponível em: <www.bba-direct.com>

ROLLINS-SMITH, L. A. The importance of antimicrobial peptides (AMPs) in amphibian skin defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 142, 1 maio 2023.

SANI, M. A.; SEPAROVIC, F. How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 6, p. 1130–1138, 21 jun. 2016.

SANTOS, M. A. et al. Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1867, n. 1, 1 jan. 2023a.

SANTOS, M. A. et al. Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1867, n. 1, 1 jan. 2023b.

SCOPES, R. I. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, p. 277–282, 1974.

SENGUPTA, D. et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2308–2317, out. 2008.

SEPÚLVEDA, F. J. et al. Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid-β on hippocampal neurons in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 3, p. 472–481, mar. 2014.

SHENKAREV, Z. O. et al. Divalent cation coordination and mode of membrane interaction in cyclotides: NMR spatial structure of ternary complex Kalata B7/Mn2+/DPC micelle. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 5–6, p. 1246–1256, maio 2008.

SILVA, T. F. D. et al. Arginine Residues Modulate the Membrane Interactions of pHLIP Peptides. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 14, p. 4433–4446, 24 jul. 2023.

SONG, Q. et al. A smart tumor targeting peptide–drug conjugate, pHLIP-SS-DOX: synthesis and cellular uptake on MCF-7 and MCF-7/Adr cells. **Drug Delivery**, v. 23, n. 5, p. 1734–1746, 12 jun. 2016.

STEGMANN, T. Membrane fusion mechanisms: The influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. **Traffic**, v. 1, n. 8, p. 598–604, 2000.

STRIEKER, M.; MARAHIEL, M. A. **The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics**. **ChemBioChem**, 2 mar. 2009.

SUBBARAO, N. K. et al. **pH-Dependent Bilayer Destabilization by an Amphipathic Peptide**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

SUBIRÓS-FUNOSAS, R. et al. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 37, p. 9394–9403, 21 set. 2009.

SWIETACH, P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 38, n. 1–2, p. 5–15, 15 jun. 2019.

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

THERMO SCIENTIFIC. **A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration**. Disponível em: <www.thermoscientific.com/pierce.>.

TOAL, S.; SCHWEITZER-STENNER, R. **Local order in the unfolded state: conformational biases and nearest neighbor interactions**. **Biomolecules**, 2014.

TORNESELLO, A. L. et al. **Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities**. **Molecules**MDPI AG, , 1 jun. 2020.

TUERKOVA, A. et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. **eLife**, v. 9, 1 mar. 2020.

TUMANYAN, V. G. et al. Alanine: The Usual and the Unexpected. **Biophysics (Russian Federation)**, v. 68, n. 2, p. 153–156, 1 abr. 2023.

VANDAMME, D. et al. **A comprehensive summary of LL-37, the factoctum human cathelicidin peptide**. **Cellular Immunology**, nov. 2012.

VASQUEZ-MONTES, V. et al. Comparison of lipid-dependent bilayer insertion of pHLIP and its P20G variant. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860, n. 2, p. 534–543, 1 fev. 2018.

VASQUEZ-MONTES, V. et al. Divalent Cations and Lipid Composition Modulate Membrane Insertion and Cancer-Targeting Action of pHLIP. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 24, p. 5004–5018, 6 dez. 2019.

VASQUEZ-MONTES, V. et al. Ca2+-dependent interactions between lipids and the tumor-targeting peptide pHLIP. **Protein Science**, v. 31, n. 9, 1 set. 2022a.

VASQUEZ-MONTES, V. et al. Ca2+ and Mg2+ Influence the Thermodynamics of Peptide-Membrane Interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 21, 15 nov. 2022b.

VILA-VIÇOSA, D. et al. Membrane-Induced p Ka Shifts in wt-pHLIP and Its L16H Variant. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 6, p. 3289–3297, 12 jun. 2018.

WADDEL, W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. **The Journal of Laboratory and Clinic Medicine**, v. 48, n. 2, p. 311–314, 1956.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, 2000.

WANG, G. et al. Design of Antimicrobial Peptides: Progress Made with Human Cathelicidin LL-37. Em: **Antimicrobial Peptides**. [s.l: s.n.]. p. 215–240.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. **University of Nebraska Medical Center. Antimicrobial Peptide Database. Disponível em online: https://aps.unmc.edu/ (acessado em 07/06/2024)**.

WANG, S. S. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, p. 1329–1333, 1973.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, maio 2008.

WILLIAMSON, J. A.; LORIA, J. P.; MIRANKER, A. D. Helix Stabilization Precedes Aqueous and Bilayer-Catalyzed Fiber Formation in Islet Amyloid Polypeptide. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 2, p. 383–396, 23 out. 2009.

WIMLEY, W. C. **Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model**. **ACS Chemical Biology**, 15 out. 2010a.

WIMLEY, W. C. **Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model**. **ACS Chemical Biology**, 15 out. 2010b.

WYATT, L. C. et al. Peptides of pHLIP family for targeted intracellular and extracellular delivery of cargo molecules to tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 12, p. E2811–E2818, 20 mar. 2018.

XIAO, H. et al. **The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine**. **Journal of Animal Science and Biotechnology**BioMed Central Ltd., , 2015.

YIM, G.; WANG, H. H.; DAVIES, J. **Antibiotics as signalling molecules**. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**Royal Society, , 29 jul. 2007.

YIN, L. M. et al. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7738–7745, 2 mar. 2012.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor (vertebrate peptide antibiotics). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 5449–5453, 1987.

ZEINEDDINE, R.; YERBURY, J. J. **The role of macropinocytosis in the propagation of protein aggregation associated with neurodegenerative diseases**. **Frontiers in Physiology**Frontiers Media S.A., , 2015.

ZEYA, H. I.; SPITZNAGEL, J. K. Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification. **Science**, v. 142, n. 3595, 1963.

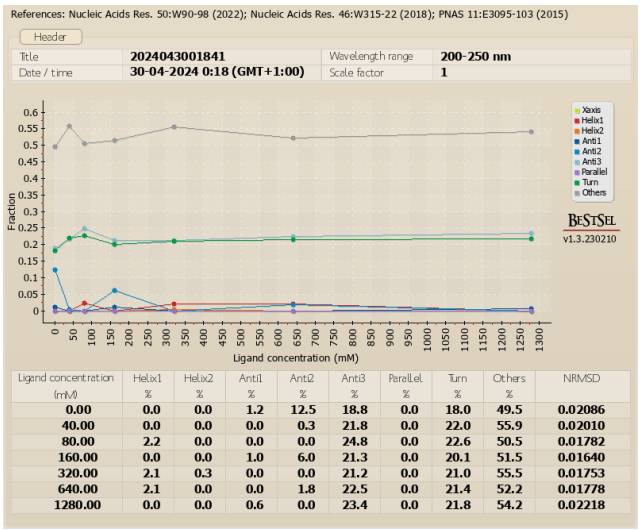
ZHANG, S. et al. Structure and formation mechanism of antimicrobial peptides temporin b-and l-induced tubular membrane protrusion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, 2 out. 2021.

ZHANG, Y. et al. Novel short antimicrobial peptide isolated from Xenopus laevis skin. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 5, p. 403–409, 1 maio 2017.

ZOONENS, M.; RESHETNYAK, Y. K.; ENGELMAN, D. M. Bilayer interactions of pHLIP, a peptide that can deliver drugs and target tumors. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 1, p. 225–235, 1 jul. 2008.

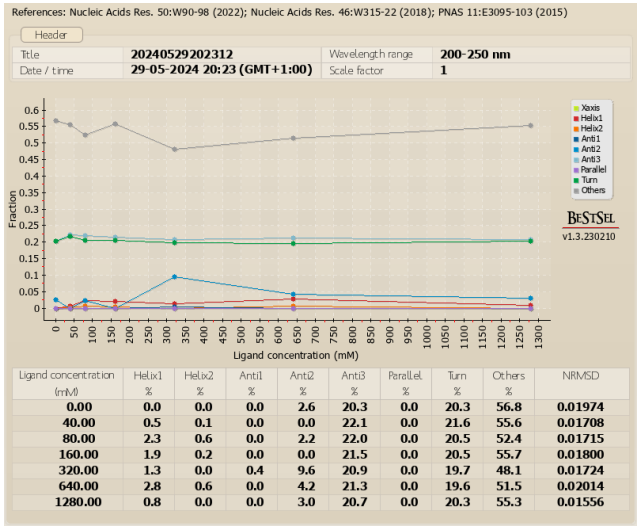
MATERIAL SUPLEMENTAR

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m) pH 7,4.



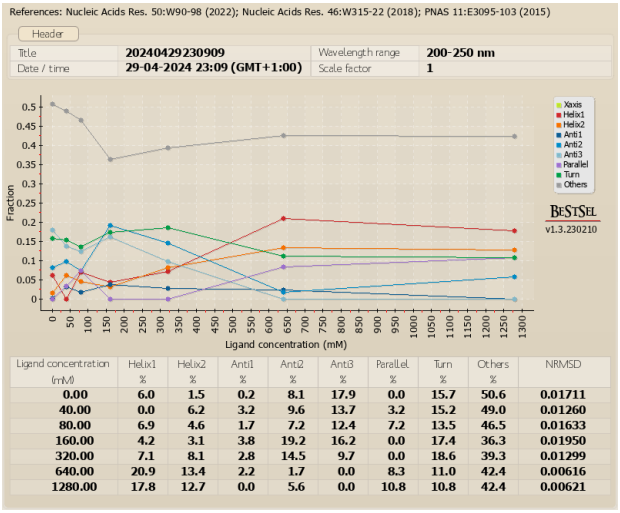
Ligand concentration (mM)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
0.00	0.0	0.0	1.2	12.5	18.8	0.0	18.0	49.5	0.02086
40.00	0.0	0.0	0.0	0.3	21.8	0.0	22.0	55.9	0.02010
80.00	2.2	0.0	0.0	0.0	24.8	0.0	22.6	50.5	0.01782
160.00	0.0	0.0	1.0	6.0	21.3	0.0	20.1	51.5	0.01640
320.00	2.1	0.3	0.0	0.0	21.2	0.0	21.0	55.5	0.01753
640.00	2.1	0.0	0.0	1.8	22.5	0.0	21.4	52.2	0.01778
1280.00	0.0	0.0	0.6	0.0	23.4	0.0	21.8	54.2	0.02218

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC pH 7,4.



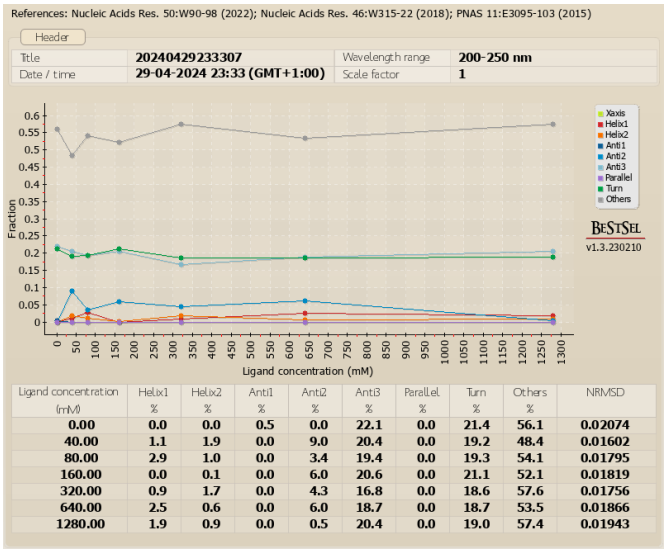
Ligand concentration (mM)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
0.00	0.0	0.0	0.0	2.6	20.3	0.0	20.3	56.8	0.01974
40.00	0.5	0.1	0.0	0.0	22.1	0.0	21.6	55.6	0.01708
80.00	2.3	0.6	0.0	2.2	22.0	0.0	20.5	52.4	0.01715
160.00	1.9	0.2	0.0	0.0	21.5	0.0	20.5	55.7	0.01800
320.00	1.3	0.0	0.4	9.6	20.9	0.0	19.7	48.1	0.01724
640.00	2.8	0.6	0.0	4.2	21.3	0.0	19.6	51.5	0.02014
1280.00	0.8	0.0	0.0	3.0	20.7	0.0	20.3	55.3	0.01556

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m) pH 5,0.



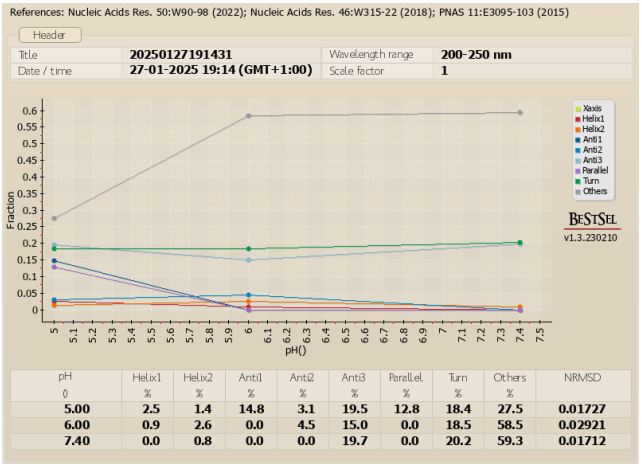
Ligand concentration (mM)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
0.00	6.0	1.5	0.2	8.1	17.9	0.0	15.7	50.6	0.01711
40.00	0.0	6.2	3.2	9.6	13.7	3.2	15.2	49.0	0.01260
80.00	6.9	4.6	1.7	7.2	12.4	7.2	13.5	46.5	0.01633
160.00	4.2	3.1	3.8	19.2	16.2	0.0	17.4	36.3	0.01950
320.00	7.1	8.1	2.8	14.5	9.7	0.0	18.6	39.3	0.01299
640.00	20.9	13.4	2.2	1.7	0.0	8.3	11.0	42.4	0.00616
1280.00	17.8	12.7	0.0	5.6	0.0	10.8	10.8	42.4	0.00621

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m) pH 6,0.



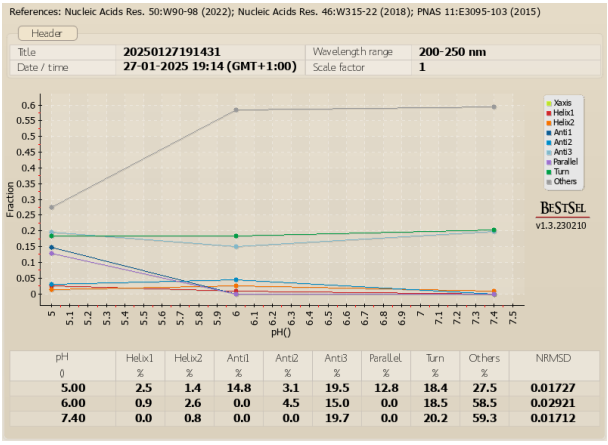
Ligand concentration (mM)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
0.00	0.0	0.0	0.5	0.0	22.1	0.0	21.4	56.1	0.02074
40.00	1.1	1.9	0.0	9.0	20.4	0.0	19.2	48.4	0.01602
80.00	2.9	1.0	0.0	3.4	19.4	0.0	19.3	54.1	0.01795
160.00	0.0	0.1	0.0	6.0	20.6	0.0	21.1	52.1	0.01819
320.00	0.9	1.7	0.0	4.3	16.8	0.0	18.6	57.6	0.01756
640.00	2.5	0.6	0.0	6.0	18.7	0.0	18.7	53.5	0.01866
1280.00	1.9	0.9	0.0	0.5	20.4	0.0	19.0	57.4	0.01943

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC 1280 µM todos pH.



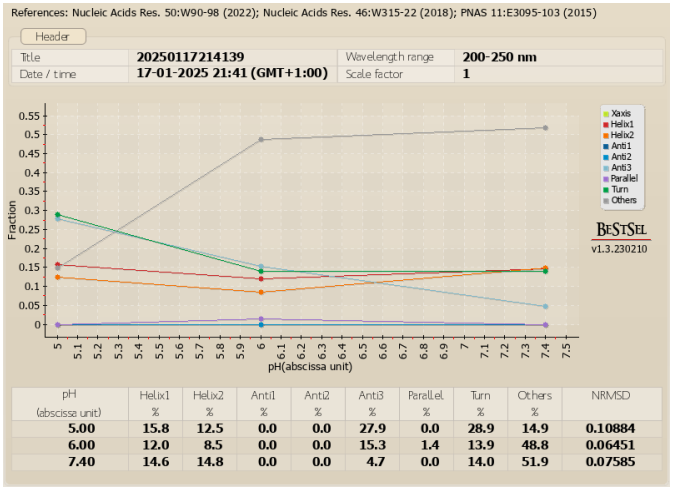
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	2.5	1.4	14.8	3.1	19.5	12.8	18.4	27.5	0.01727
6.00	0.9	2.6	0.0	4.5	15.0	0.0	18.5	58.5	0.02921
7.40	0.0	0.8	0.0	0.0	19.7	0.0	20.2	59.3	0.01712

Estruturas secundárias HsIDP1 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m) 1280 µM todos pH



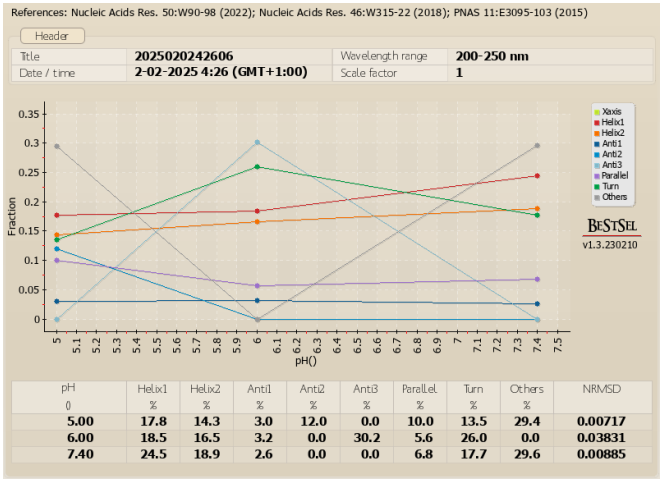
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	2.5	1.4	14.8	3.1	19.5	12.8	18.4	27.5	0.01727
6.00	0.9	2.6	0.0	4.5	15.0	0.0	18.5	58.5	0.02921
7.40	0.0	0.8	0.0	0.0	19.7	0.0	20.2	59.3	0.01712

Estruturas secundárias HsIDP2



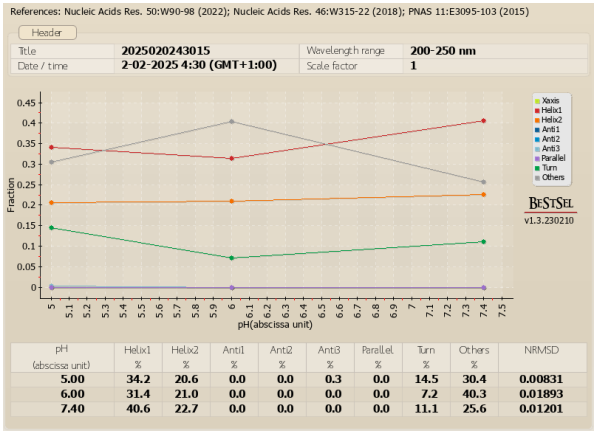
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	15.8	12.5	0.0	0.0	27.9	0.0	28.9	14.9	0.10884
6.00	12.0	8.5	0.0	0.0	15.3	1.4	13.9	48.8	0.06451
7.40	14.6	14.8	0.0	0.0	4.7	0.0	14.0	51.9	0.07585

Estruturas secundárias HsIDP2 + DMPC.



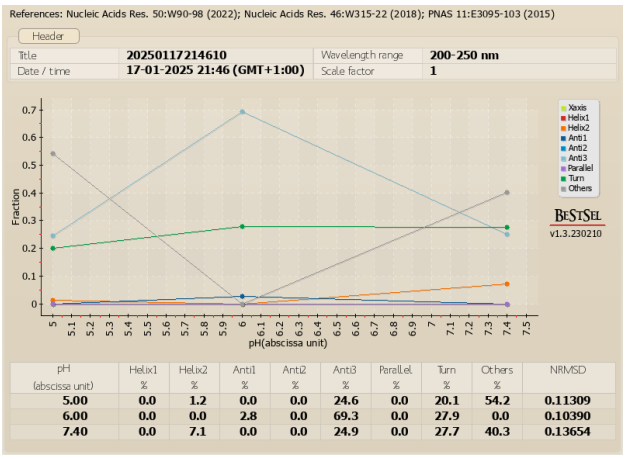
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	17.8	14.3	3.0	12.0	0.0	10.0	13.5	29.4	0.00717
6.00	18.5	16.5	3.2	0.0	30.2	5.6	26.0	0.0	0.03831
7.40	24.5	18.9	2.6	0.0	0.0	6.8	17.7	29.6	0.00885

Estruturas secundárias HsIDP2 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



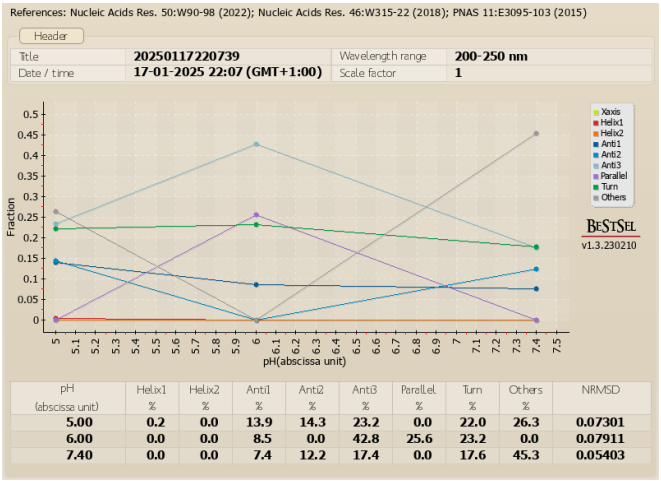
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	34.2	20.6	0.0	0.0	0.3	0.0	14.5	30.4	0.00831
6.00	31.4	21.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	40.3	0.01893
7.40	40.6	22.7	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	25.6	0.01201

Estruturas secundárias HsIDP3



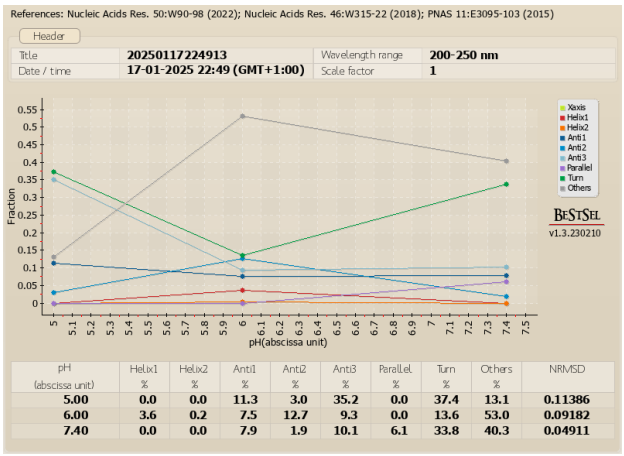
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	0.0	1.2	0.0	0.0	24.6	0.0	20.1	54.2	0.11309
6.00	0.0	0.0	2.8	0.0	69.3	0.0	27.9	0.0	0.10390
7.40	0.0	7.1	0.0	0.0	24.9	0.0	27.7	40.3	0.13654

Estruturas secundárias HsIDP3 + DMPC.



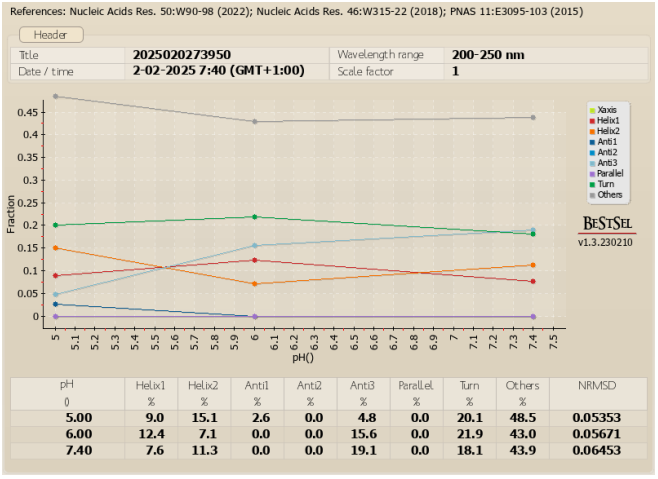
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	0.2	0.0	13.9	14.3	23.2	0.0	22.0	26.3	0.07301
6.00	0.0	0.0	8.5	0.0	42.8	25.6	23.2	0.0	0.07911
7.40	0.0	0.0	7.4	12.2	17.4	0.0	17.6	45.3	0.05403

Estruturas secundárias HsIDP3 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



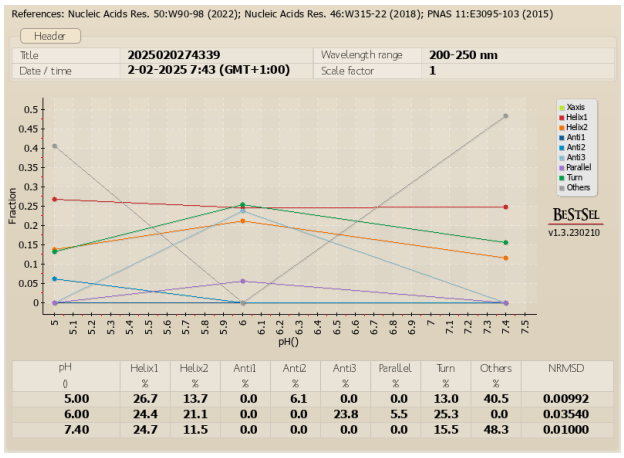
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	0.0	0.0	11.3	3.0	35.2	0.0	37.4	13.1	0.11386
6.00	3.6	0.2	7.5	12.7	9.3	0.0	13.6	53.0	0.09182
7.40	0.0	0.0	7.9	1.9	10.1	6.1	33.8	40.3	0.04911

Estruturas secundárias HsIDP4



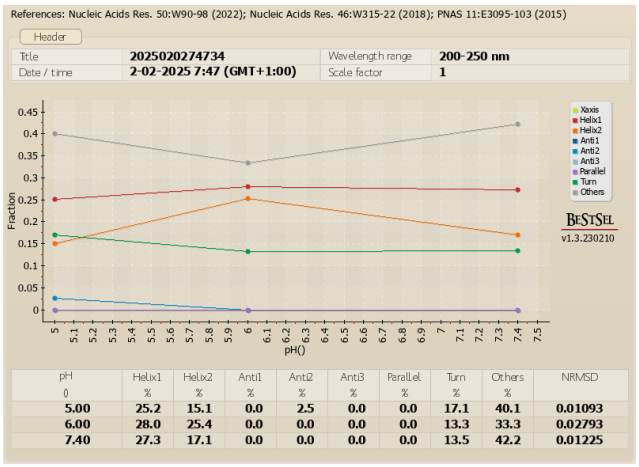
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	9.0	15.1	2.6	0.0	4.8	0.0	20.1	48.5	0.05353
6.00	12.4	7.1	0.0	0.0	15.6	0.0	21.9	43.0	0.05671
7.40	7.6	11.3	0.0	0.0	19.1	0.0	18.1	43.9	0.06453

Estruturas secundárias HsIDP4 + DMPC.



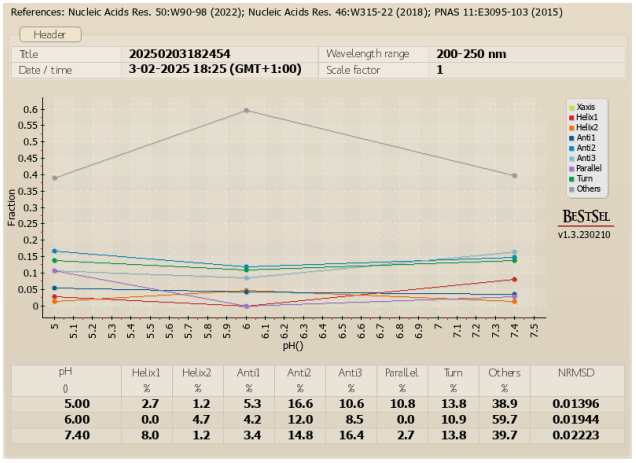
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	26.7	13.7	0.0	6.1	0.0	0.0	13.0	40.5	0.00992
6.00	24.4	21.1	0.0	0.0	23.8	5.5	25.3	0.0	0.03540
7.40	24.7	11.5	0.0	0.0	0.0	0.0	15.5	48.3	0.01000

Estruturas secundárias HsIDP4 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



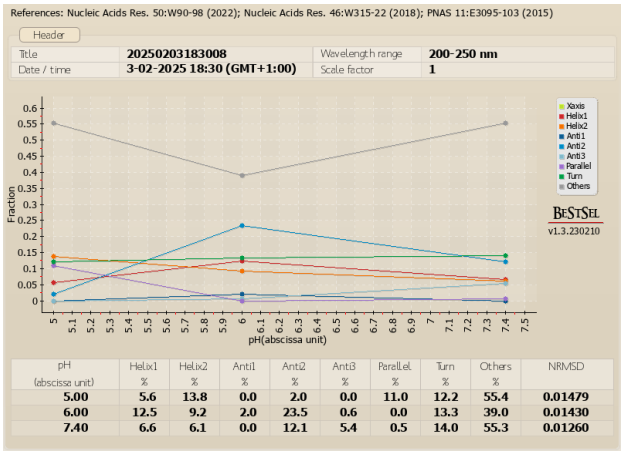
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	25.2	15.1	0.0	2.5	0.0	0.0	17.1	40.1	0.01093
6.00	28.0	25.4	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3	33.3	0.02793
7.40	27.3	17.1	0.0	0.0	0.0	0.0	13.5	42.2	0.01225

Estruturas secundárias HsIDP5



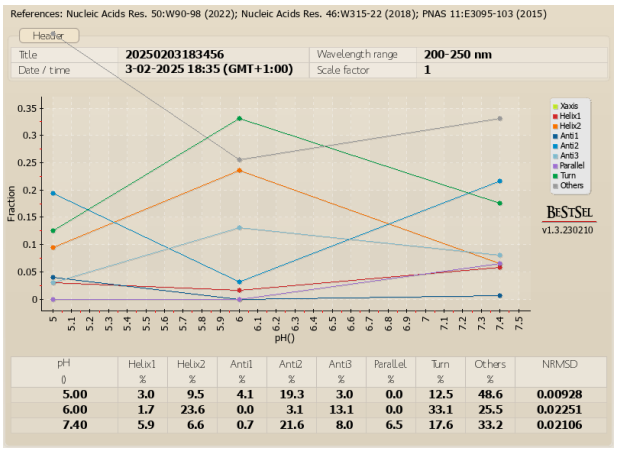
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	2.7	1.2	5.3	16.6	10.6	10.8	13.8	38.9	0.01396
6.00	0.0	4.7	4.2	12.0	8.5	0.0	10.9	59.7	0.01944
7.40	8.0	1.2	3.4	14.8	16.4	2.7	13.8	39.7	0.02223

Estruturas secundárias HsIDP5 + DMPC.



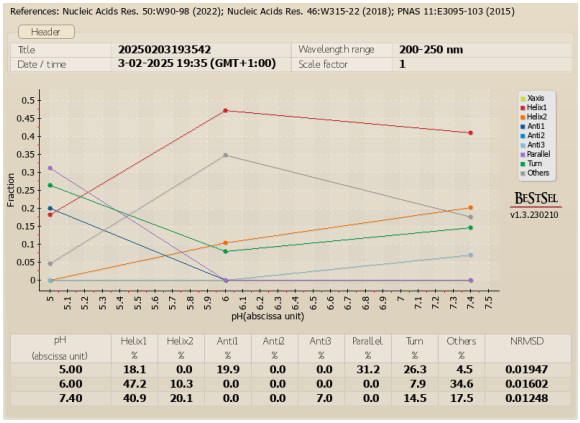
pH (abscissa unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	5.6	13.8	0.0	2.0	0.0	11.0	12.2	55.4	0.01479
6.00	12.5	9.2	2.0	23.5	0.6	0.0	13.3	39.0	0.01430
7.40	6.6	6.1	0.0	12.1	5.4	0.5	14.0	55.3	0.01260

Estruturas secundárias HsIDP5 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



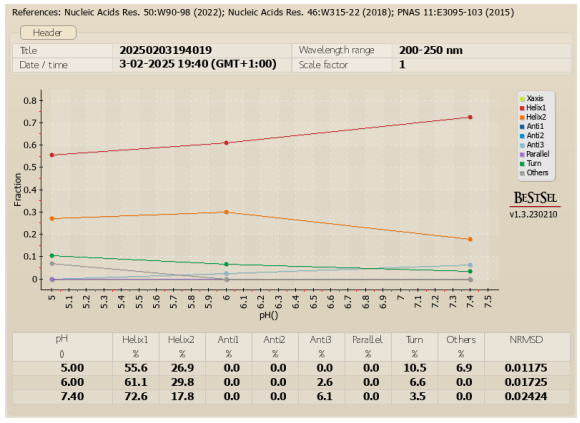
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	3.0	9.5	4.1	19.3	3.0	0.0	12.5	48.6	0.00928
6.00	1.7	23.6	0.0	3.1	13.1	0.0	33.1	25.5	0.02251
7.40	5.9	6.6	0.7	21.6	8.0	6.5	17.6	33.2	0.02106

Estruturas secundárias HsIDP6



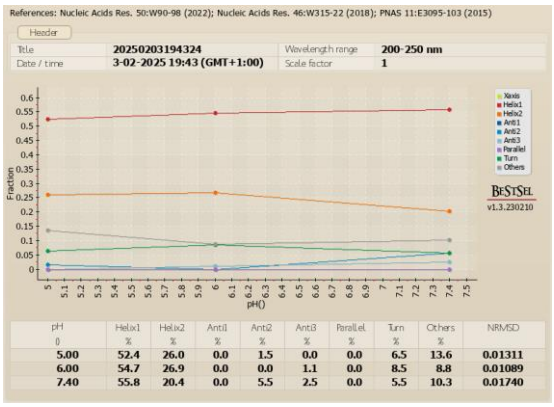
pH (abscisse unit)	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	18.1	0.0	19.9	0.0	0.0	31.2	26.3	4.5	0.01947
6.00	47.2	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0	7.9	34.6	0.01602
7.40	40.9	20.1	0.0	0.0	7.0	0.0	14.5	17.5	0.01248

Estruturas secundárias HsIDP6 + DMPC.



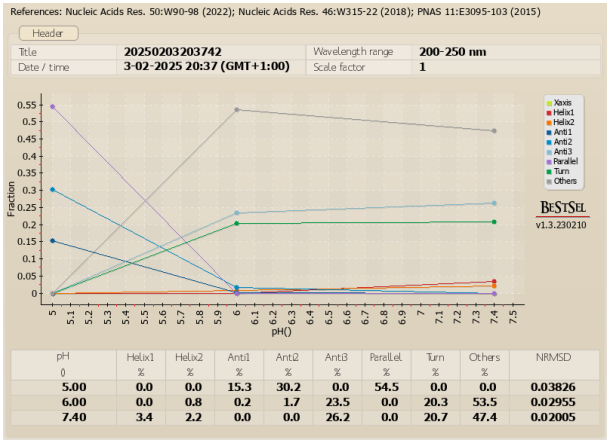
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	55.6	26.9	0.0	0.0	0.0	0.0	10.5	6.9	0.01175
6.00	61.1	29.8	0.0	0.0	2.6	0.0	6.6	0.0	0.01725
7.40	72.6	17.8	0.0	0.0	6.1	0.0	3.5	0.0	0.02424

Estruturas secundárias HsIDP6 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



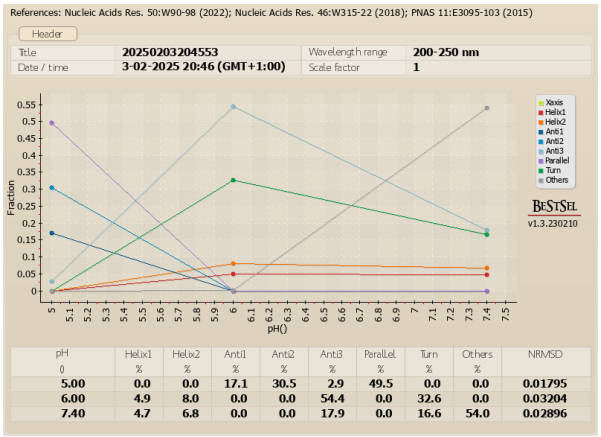
pH	Helix1	Helix2	Anti1	Anti2	Anti3	Parallel	Turn	Others	NRMSD
()	%	%	%	%	%	%	%	%	
5.00	52.4	26.0	0.0	1.5	0.0	0.0	6.5	13.6	0.01311
6.00	54.7	26.9	0.0	0.0	1.1	0.0	8.5	8.8	0.01089
7.40	55.8	20.4	0.0	5.5	2.5	0.0	5.5	10.3	0.01740

Estruturas secundárias HsIDP1.1



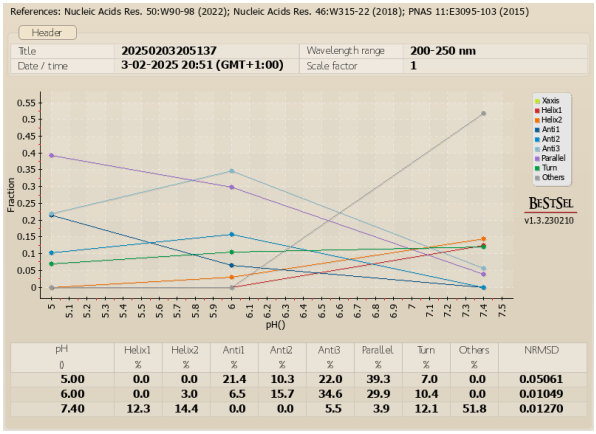
pH	Helix1	Helix2	Anti1	Anti2	Anti3	Parallel	Turn	Others	NRMSD
()	%	%	%	%	%	%	%	%	
5.00	0.0	0.0	15.3	30.2	0.0	54.5	0.0	0.0	0.03826
6.00	0.0	0.8	0.2	1.7	23.5	0.0	20.3	53.5	0.02955
7.40	3.4	2.2	0.0	0.0	26.2	0.0	20.7	47.4	0.02005

Estruturas secundárias HsIDP1.1 + DMPC.



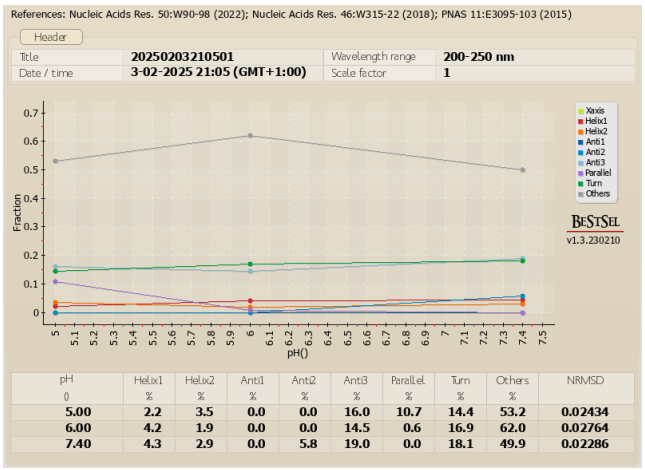
pH	Helix1	Helix2	Anti1	Anti2	Anti3	Parallel	Turn	Others	NRMSD
()	%	%	%	%	%	%	%	%	
5.00	0.0	0.0	17.1	30.5	2.9	49.5	0.0	0.0	0.01795
6.00	4.9	8.0	0.0	0.0	54.4	0.0	32.6	0.0	0.03204
7.40	4.7	6.8	0.0	0.0	17.9	0.0	16.6	54.0	0.02896

Estruturas secundárias HsIDP1.1 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m)



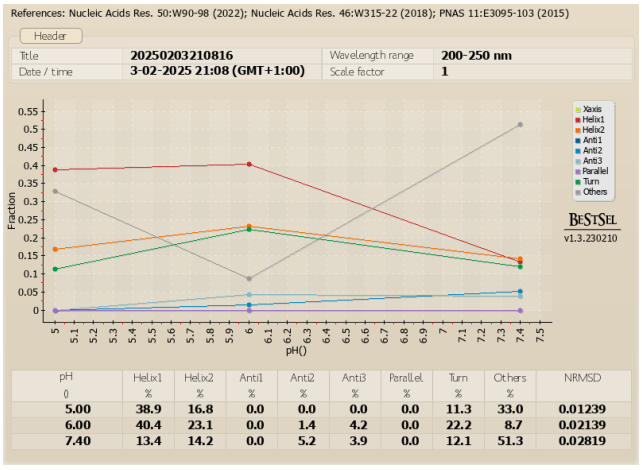
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	0.0	0.0	21.4	10.3	22.0	39.3	7.0	0.0	0.05061
6.00	0.0	3.0	6.5	15.7	34.6	29.9	10.4	0.0	0.01049
7.40	12.3	14.4	0.0	0.0	5.5	3.9	12.1	51.8	0.01270

Estruturas secundárias HsIDP1.2



pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	2.2	3.5	0.0	0.0	16.0	10.7	14.4	53.2	0.02434
6.00	4.2	1.9	0.0	0.0	14.5	0.6	16.9	62.0	0.02764
7.40	4.3	2.9	0.0	5.8	19.0	0.0	18.1	49.9	0.02286

Estruturas secundárias HsIDP1.2 + DMPC.



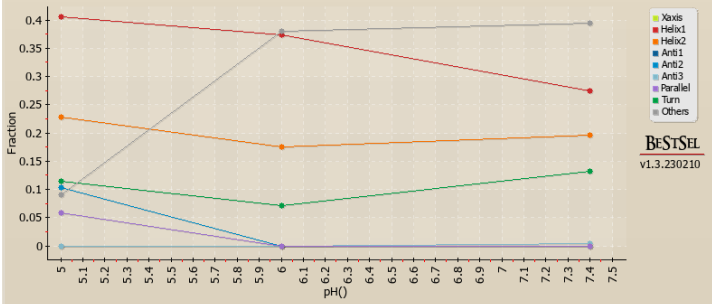
pH ()	Helix1 %	Helix2 %	Anti1 %	Anti2 %	Anti3 %	Parallel %	Turn %	Others %	NRMSD
5.00	38.9	16.8	0.0	0.0	0.0	0.0	11.3	33.0	0.01239
6.00	40.4	23.1	0.0	1.4	4.2	0.0	22.2	8.7	0.02139
7.40	13.4	14.2	0.0	5.2	3.9	0.0	12.1	51.3	0.02819

Estruturas secundárias HsIDP1.2 + DMPC/DMPG 2:1 (m/m).

References: Nucleic Acids Res. 50:W90-98 (2022); Nucleic Acids Res. 46:W315-22 (2018); PNAS 11:E3095-103 (2015)

Header

Title	20250203211341	Wavelength range	200-250 nm
Date / time	3-02-2025 21:13 (GMT+1:00)	Scale factor	1



pH	Helix1	Helix2	Anti1	Anti2	Anti3	Parallel	Turn	Others	NRMSD
()	%	%	%	%	%	%	%	%	
5.00	**40.5**	**22.8**	**0.0**	**10.3**	**0.0**	**5.9**	**11.5**	**9.0**	**0.00826**
6.00	**37.4**	**17.5**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**7.1**	**38.0**	**0.01062**
7.40	**27.4**	**19.5**	**0.0**	**0.0**	**0.4**	**0.0**	**13.2**	**39.5**	**0.00946**

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 05 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOAO GABRIEL TEIXEIRA LARA RESENDE
Data: 21/03/2025 09:26:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do/a discente: _____

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da UnB (PPGQ-IQ/UnB)

Nome completo: João Gabriel Teixeira Lara Resende

Título do Trabalho: Prospecção de segmentos proteicos membrano-ativos dependentes de pH encriptados no proteoma humano

Nível: (X) Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Guilherme Dotto Brand