

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA - MESTRADO

RAUL LIMA FERREIRA

Molhabilidade e interações moleculares em
substratos peptídicos

Maceió - Brasil
Julho - 2018

RAUL LIMA FERREIRA

Molhabilidade e interações moleculares em substratos peptídicos

Dissertação apresentada no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Italo Marcos Nunes de Oliveira
Co-orientador: Prof. Emerson Rodrigo da Silva

Maceió - Brasil
Julho - 2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante - CRB:1664

F383m	<p>Ferreira, Raul Lima</p> <p style="padding-left: 40px;">Molhabilidade e interações moleculares em substratos peptídicos / Raul Lima Ferreira. – Maceió, 2018.</p> <p style="padding-left: 40px;">78 f.: il.</p> <p style="padding-left: 40px;">Orientador: Italo Marcos Nunes de Oliveira.</p> <p style="padding-left: 40px;">Coorientador: Emerson Rodrigo da Silva.</p> <p style="padding-left: 40px;">Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Programa de Pós Graduação em Física da Matéria Condensada, 2018.</p> <p style="padding-left: 40px;">Bibliografia: f. 74 – 48.</p> <p style="padding-left: 40px;">1. Peptídeos - Propriedades físico-químicas. 2. Nanoestruturação. 3. Fenômeno de molhagem. 4. Interações moleculares.</p> <p>I. Título</p>
-------	---

CDU: 53:544.112



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL, Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***“Molhabilidade e interações moleculares em substratos
peptídicos nanoestruturados”***

por

Raul Lima Ferreira

A Banca Examinadora composta pelos professores Italo Marcos Nunes de Oliveira (orientador e presidente da banca), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Sérgio Henrique Albuquerque Lira, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas e Ana Paula Perdigão Praxedes, do Instituto Federal de Alagoas consideram o **candidato aprovado com grau “A”**.

Maceió, 23 de julho de 2018

Italo Marcos Nunes de Oliveira
Prof. Dr. Italo Marcos Nunes de Oliveira

Sérgio Henrique Albuquerque Lira
Prof. Dr. Sérgio Henrique Albuquerque Lira

Ana Paula Perdigão Praxedes
Profa. Dra. Ana Paula Perdigão Praxedes

A meus pais, e todos aqueles que de forma direta ou indireta ajudaram-me nessa caminhada.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre está comigo...

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional...

A Tia Lena, Tia Josiclea, Tia Tereza, Tia Genicléa, Soraia, Wellington, enfim, a todos da minha família que incentivaram-me desde o início...

Ao parceiro de cela, Giclênio, pelos momentos de descontração e pelas boas conversas/discursões que tivemos ao longo desse tempo juntos. A Rafaella Catonio, que nos últimos tempos tornou-se mais que uma amiga, pelos ótimos conselhos, carinho e por vezes orientar-nos na cozinha. Aos amigos Everton e Ari, por todas as refeições que compartilhamos, pelos acordos, pelas jogatinas, pelas risadas, enfim, por tornar essa vida de morar longe de “casa” um pouco mais fácil.

Aos amigos de graduação, que mesmo sem contato diário não se distanciaram.

Aos colegas do grupo de pesquisa, pelas sugestões que ajudaram-me e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do condomínio vizinho, Pâmela, Júlio, Ícaro e Fernanda, pela amizade e pelos momentos de extroversão.

Ao professor Italo, o orientador, pela disposição em orientar e pelos conselhos e ajudas que contribuíram diretamente para o desenvolvimento da pesquisa. Ao professor Emerson Rodrigo, que embora o tempo de convivência tenha sido pouco, mostrou-se um ótimo co-orientador.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e ao programa de pós-graduação do Instituto de Física - UFAL.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio.

A todos os amigos e familiares que não citei, mas que de forma direta ou indireta contribuíram nessa caminhada...

A todos, meu muito obrigado!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”
Isaac Newton

Resumo

Peptídeos são sequências curtas de aminoácidos que têm atraído bastante atenção devido à sua grande diversidade química, o que permite um vasto número de ligações e arranjos diferentes baseados nessas moléculas. Outro aspecto interessante desses compostos é a biocompatibilidade que nanomateriais peptídicos apresentam. Diversos trabalhos têm demonstrado o crescimento de nanoestruturas peptídicas 1-D diretamente sobre substratos sólidos quando estes são convenientemente incubados sob uma atmosfera saturada com vapor de solventes convencionais como, por exemplo, a água. Essa característica abre possibilidades para a produção de filmes peptídicos capazes de modular propriedades físico-químicas de superfícies com grande potencial para o desenvolvimento de biointerfaces. Nesse contexto, o entendimento das propriedades de molhabilidade desses substratos, assim como das interações de superfície, são cruciais para produção biointerfaces com ampla aplicação tecnológica. Neste trabalho, os peptídeos Penetratina, um pedaço da proteína Antennapedia; TAT1, derivado do vírus HIV; SV40, derivado do vírus vacúolo que atinge macacos; e C105Y, derivado da alpha-1 anti-tripsina, são usados para produzir filmes nanoestruturados em substratos sólidos e análises detalhadas de ângulo de contato, AFM e dicroísmo circular são realizadas para obter-se informações sobre a molhabilidade e interações moleculares na interface fluido/substrato, topologia e conformação composicional. Medidas dinâmicas do ângulo de contato possibilitam o uso de um modelo físico no contexto da teoria cinético-molecular, que descreve fenômenos de molhabilidade em termos de dinâmica estatística. Com o presente estudo determinou-se como são as interações moleculares nos filmes peptídicos amorfos e nanestruturados, e as medidas revelaram que o aumento no ângulo de contato de equilíbrio nos filmes nanoestruturados é devido entre outros fatores do aumento da rugosidade, como pôde-se comprovar com as medidas de AFM.

Palavras-chave: 1. Peptídeo 2. Nanoestruturação 3. Molhagem

Abstract

Peptides are short sequences of amino acids that have attracted a lot of attention because of the great chemical diversity, allowing a vast number of different arrangements and bonds based on these molecules. Another interesting aspect is the biocompatibility of these peptidic nanomaterials. Several studies have shown the growth of peptide substrates when they are conveniently incubated under an atmosphere saturated with solvent vapor such as water. This feature opens up possibilities for the production of peptide compounds capable of modulating physicochemical properties of surface, with great potential for the development of biointerfaces. In this context, the understanding of the wettability properties of such substrates, as well as the surface interactions, are crucial to produce biointerfaces with the broad technological application. In this work, the peptides Penetratina, a piece of protein Antennapedia; TAT1, derived from the HIV virus; SV40, derived from the vacuole virus that attacks monkeys; and C105Y, alpha-1 antitrypsin derivatives, are used to produce nanostructured films on solid substrates and then contact angle analysis, AFM and circular dichroism are performed to obtain information on wettability and molecular interactions at the fluid/substrate interface, topology and conformation compositional. Dynamic contact angle measurements allow the use of a physical model in the context of kinetic-molecular theory, which describes wettability phenomena in terms of statistical dynamics. With the present study, the molecular interactions in the amorphous and nanostructured peptide films were determined, and the measurements showed that the increase in the equilibrium contact angle in the nanoestrurados films is due, among other factors, to the increased roughness, as evidenced by the AFM measures.

Keywords: 1. Peptide. 2. Nanostructure. 3. Wetting

Lista de Figuras

1.1	Estrutura da asparagina	3
1.2	Estrutura do dipeptídeo glicilglicina	3
1.3	Levantamento de publicações e classificação por categorias. Os artigos foram classificados pelo tópico principal do trabalho, mas alguns foram incluídos em múltiplas categorias.	5
1.4	Estrutura molecular da Glutathiona	5
1.5	Estrutura molecular da gramicidina S	6
1.6	Estrutura geral de um aminoácido	7
1.7	Estrutura do dipeptídeo Phe-Phe	9
1.8	Estrutura da (a) ocitocina e do (b) tireotropina	9
1.9	Mecanismos de translocação de peptídeos em membranas. A depender do tipo de peptídeo, há distintas interações desse material com a membrana.	10
1.10	Imagem de penetratina em solução bicelar obtida por espectroscopia de NMR de solução	11
1.11	Estrutura do peptídeo TAT	12
1.12	Estrutura da somatostatina	14
1.13	Estrutura da encefalina	14
1.14	Estrutura do colágeno, que é formado por três cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias α . Dependendo do processo enzimático utilizado, são gerados combinações de peptídeos com diferentes funcionalidades, como estimulação otimizada de osteoblastos nos ossos.	16
1.15	Estrutura do peptídeo β -Amyloid ($A\beta$).	17
2.1	Estrutura organizacional de proteínas	18
2.2	Estrutura organizacional de proteínas	20
2.3	Ângulos de torção ϕ , ψ e ω de aminoácido em um peptídeo.	20
2.4	Estrutura helicoidal	21
2.5	Estruturas β -folha	22
2.6	Principais tipos de ligação de hidrogênio observados em peptídeos. A direita tem-se os doadores, o grupo amino (a), o peptídeo (p) e água (w). Do lado esquerdo tem-se os receptores, o grupo carboxila (x), carbonilo peptídico (c) e novamente, água (w)	23
2.7	Esquema de automontagem de peptídeos afílicos em nanotubos.	25

2.8	Imagens de SEM exibindo a morfologia de um filme do dipeptídeo Fenilalanina (FF) como função do tempo de encubação.	26
3.1	Regimes de molhagem.	30
3.2	Comportamento de fluido em superfície hidrofílica, hidrofóbia e super hidrofóbica.	31
3.3	Gota sobre uma superfície sólida. θ é o ângulo de contato, L é a linha de contato, γ_{SL} é a tensão superficial na interface sólido/líquido, γ_{SG} é a tensão superficial na interface sólido/gás e γ_{LG} é a tensão superficial na interface líquido/gás.	31
3.4	Ilustração dos ângulos de contato a) de avanço e b) de recuo em superfícies horizontais, a seta indica o sentido do movimento da linha de contato. Em c) tem-se os ângulos de contato de avanço e recuo em uma gota sobre uma superfície vertical.	34
3.5	Ângulo de contato de avanço e recuo.	35
3.6	superfícies com a) $\lambda < \xi$ e b) $\lambda > \xi$	37
3.7	Ângulo de contato de avanço e recuo.	39
3.8	Gota espalhando-se em um substrato sólido. θ é o ângulo de contato.	41
4.1	Estrutura molecular da Penetratina	47
4.2	Estrutura molecular da TAT	48
4.3	Estrutura molecular da SV40	49
4.4	Estrutura molecular do C105Y	50
4.5	Imagens do a) HFIP e b) amostra de C105Y depositado sobre mica. As demais amostras apresentam nenhuma coloração.	51
4.6	Esquema de funcionamento do AFM-IR	53
4.7	Espectrômetro infravermelho baseado em AFM da Anasys Instruments, modelo nanoIR-s. Equipamento pertencente à Unicamp.	53
4.8	Tensiometro óptico Theta (Attension Instruments)	54
4.9	Representações da luz circularmente polarizada à direita.	56
4.10	Curvas características dos principais elementos estruturais.	56
4.11	Esquema de funcionamento de um equipamento que mede dicroísmo circular de compostos.	57
5.1	Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo penetratina, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Note o aumento da rugosidade dos filmes quando submetidos à atmosfera saturada.	59

5.2	Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo TAT, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Mais uma vez, é possível notar o aumento da rugosidade dos filmes quando submetidos à atmosfera saturada em água.	60
5.3	Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo SV40, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Aqui é possível notar a formação de granulos após o processo de hidratação dos filmes.	61
5.4	Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo C105Y, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Aqui é possível notar a formação de vales profundos no filme após o processo de hidratação.	63
5.5	Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo penetratina	64
5.6	Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo TAT	64
5.7	Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo SV40	65
5.8	Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo penetratina em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha). Note o aumento no ângulo de contato após a hidratação.	67
5.9	Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo TAT em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha).	68
5.10	Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo SV40 em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha). Note que embora as curvas convergem para o mesmo valor do ângulo de contato de equilíbrio θ_e , o número de sítios para cada caso é diferente n , e com isso tem-se dinâmicas de molhagem diferentes	69
5.11	Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo C105Y em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha).	69
5.12	Medidas de dicroísmo circular nos filmes dos peptídeos penetratina, TAT e SV40.	71

Lista de Tabelas

1.1 Famílias de peptídeos penetrantes de células	11
1.2 Peptídeos bioativos gerados a partir de proteínas de alimentos por Hidrólise enzimática	13
4.1 Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo penetratina quanto a polaridade.	47
4.2 Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo TAT analisado, quanto a polaridade.	48
4.3 Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo SV40 quanto a polaridade.	49
4.4 Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo C105Y quanto a polaridade.	50
4.5 Propriedades físico-químicas do glicerol	54
5.1 Parâmetros morfológicos dos filmes de penetratina. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$	59
5.2 Parâmetros morfológicos dos filmes de TAT. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$	60
5.3 Parâmetros morfológicos dos filmes peptídicos SV40. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$	61
5.4 Parâmetros morfológicos dos filmes peptídicos C105Y. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$	62
5.5 Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo penetratina	66
5.6 Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo TAT	67
5.7 Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo SV40	68
5.8 Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo C105Y	70

5.9 Parâmetros calculados a partir das medidas de diâmetro circular.	72
--	----

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	2
1.2 Peptídeos	7
1.2.1 Peptídeos Penetrantes de Células	9
1.3 Atividades funcionais de peptídeos.	12
2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PEPTÍDEOS	18
2.1 Primeira estrutura	18
2.2 Segunda estrutura.	19
2.3 Nanoestruturação	22
2.3.1 Tipos de estruturas	24
2.4 Aplicações de nanoestruturas peptídicas	27
3 FENÔMENO DE MOLHAGEM	29
3.1 Ângulo de contato.	30
3.1.1 Molhagem	32
3.1.2 Histerese do Ângulo de Contato.	33
3.2 Teoria Cinético molecular	37
4 MATERIAS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	46
4.1 Materiais	46
4.1.1 Peptídeo Penetratina	46
4.1.2 Peptídeo TAT	47
4.1.3 Peptídeo SV40	49
4.1.4 Peptídeo C105Y	49
4.1.5 Preparação das amostras.	51
4.2 Métodos de análise	51
4.2.1 AFM e AFM-IR	52
4.2.2 Tensiometria óptica	53
4.2.3 Dicroísmo circular	55
5 RESULTADOS	58

5.1	Medidas de AFM e AFM-IR	58
5.1.1	Medidas de AFM	58
5.1.2	Medidas de AFM-IR	63
5.2	Medidas de molhagem.	65
5.3	Medidas de Dicroísmo Circular	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	Bibliografia	74

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta simultânea de Emil Fischer e Franz Hofmeister que aminoácidos em peptídeos [1], e conseqüentemente em proteínas, são conectados por ligações peptídicas, as pesquisas relacionadas a peptídeos vêm crescendo consideravelmente. O número de publicações científicas aumentou substancialmente nas últimas décadas, de modo que a criação de novas revistas científicas internacionais sobre esta área de pesquisa demonstra esse notório desenvolvimento. A maioria das publicações é relacionada ao isolamento, síntese e determinação da estrutura, mas uma grande parte é relacionada com a aplicação prática e utilização desses materiais como uma ferramenta em pesquisa.

Um grande número de funções fisiológicas e bioquímicas necessárias para a vida são influenciadas por peptídeos. Peptídeos são fragmentos relativamente curtos de proteínas, sendo constituídos por aminoácidos. Eles aparecem em uma série de macromoléculas biológicas, como neurotransmissores, hormônios, enzimas, etc. Mais de uma centena de peptídeos tem funções no sistema nervoso central e periférico, em processos imonológicos, e no sistema cardiovascular. Peptídeos atuam na comunicação célula-célula sob a interação com receptores, e estão envolvidos em um vasto número de processos bioquímicos.

Uma importante classe de peptídeos é a dos peptídeos penetrantes em células. Alguns grupos de pesquisa os chamam de domínios de transdução de proteínas ou modelo de peptídeos anfipáticos. Esse material é formado por uma sequência curta de aminoácidos e, como o nome sugere, apresenta a capacidade de penetrar e alcançar o interior de células. Essa característica torna os peptídeos uma ferramenta promissora para a entrega tanto de moléculas biologicamente ativas, quanto no desenvolvimento de fármacos mais eficientes. Um bom exemplo para aplicação de peptídeos penetrates em células é no tratamento do globo ocular [2]. Isto porque o tecido do olho apresenta uma resistência natural a absorção de substâncias, dificultando seu tratamento e forçando a utilização de métodos mais invasivos para tal. Nesse contexto, há trabalhos publicados em que demonstra-se a eficiência do peptídeo penetratina, um dos peptídeos estudados no presente trabalho, na superação da barreira do tecido do globo ocular, tornando assim esse peptídeo um excelente candidato para utilização como transportador [2].

Com avanço da pesquisa sobre peptídeos, houve a necessidade de compreender a arquitetura destes compostos. Graças ao trabalho dos físicos ingleses W. H. Bragg and W. L. Bragg, que por meio da cristografia de raio-X determinaram a estrutura do cloreto

de sódio, diversos pesquisadores, com o uso dessa mesma técnica, conseguiram elucidar a configuração estrutural de diversos peptídeos [3]. Outra técnica também bastante útil na análise da estrutura de peptídeos é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, esse método apresenta resultados satisfatórios para estudo de peptídeos em solução [1].

Diversas das características de peptídeos atraem atenção das mais distintas áreas, mas principalmente da farmacologia e das ciências médicas. Neste âmbito, o presente trabalho traz uma análise de como dar-se o processo de umedecimento em filmes peptídicos, tanto amorfos quanto hidratados, buscando compreender como essa nanoestruturação influencia a dinâmica das moléculas do fluido que entra em contato com o filme. E com o auxílio de técnicas como difração circular e AFM, obtém-se ainda mais informações sobre a arquitetura desses filmes.

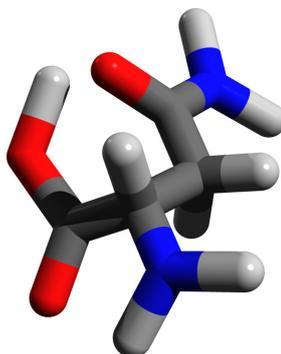
1.1 Histórico

Em meados de 1930, quase não havia rastreamento de peptídeos em materiais naturais e muito pouco dos peptídeos artificiais, que interessavam apenas aos especialistas. Até então, as classes dos peptídeos eram pouco conhecidas. A partir de 1950, é que percebeu-se a importância do papel dos peptídeos nos processos biológicos dos seres vivos, de modo particular, no do ser humano, o que acarretou os esforços em desenvolver métodos analíticos e cromatográficos para o estudo desses materiais [1].

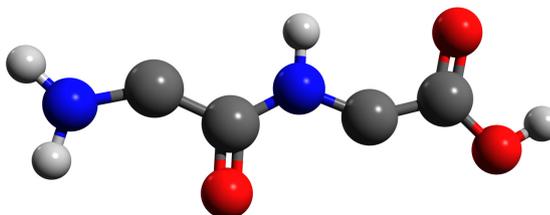
O primeiro composto natural da classe dos aminoácidos, embora tenha sido reconhecido como tal oitenta anos depois, foi a asparagina (figura 1.1), a qual foi cristalizada de brotos de aspargos, em 1806, por Vauquelin e Robiquet [1]. Em 1899, mesmo com os limitados métodos de investigação, Emil Fischer (1852-1919) dedicou-se ao campo de proteínas, que era evitado pela maioria dos químicos. Então, juntamente com E. Fourneau (1872-1949), Fischer preparou o primeiro dipeptídeo, a glicilglicina (Figura 1.2), por hidrólise parcial da dicetopiperazina. Apenas em 1902, na décima quarta reunião dos Cientistas e Médicos Naturais Alemães, em Karlsbad, foi que introduziram o nome "peptídeo". Nesse mesmo evento, o fisiologista e farmacologista Franz Hofmeister (1850-1922) apresentou seu trabalho sobre estrutura de proteínas, que segundo ele, eram formadas por longas correntes de α -aminoácidos, ligados uns aos outros por ligações amidas entre grupo carboxílico e amino.

Hofmeister estudava sistematicamente o comportamento físico-químico de peptonas¹ e proteínas. Fischer deu menção ao trabalho de Hofmeister escrevendo: "Finalmente o palestrante discutiu o acoplamento de aminoácidos em proteínas. A ideia de que grupos ácido-amino desempenham papel principal mais rapidamente vem à mente, como Hofmeister também assumiu em sua palestra geral essa manhã"[1].

¹Eram classificados como peptonas, nutrientes contendo nitrogênio, essenciais para a vida

Figura 1.1: Estrutura da asparagina

Fonte: Autor, 2018

Figura 1.2: Estrutura do dipeptídeo glicilglicina

Fonte: Autor, 2018

A contribuição mais importante de Fischer para a química dos peptídeos pode ser a inserção de cloretos de ácidos graxos α -halogênio, no qual o átomo de halogênio, após acoplamento a um componente amino, pode ser convertido em um grupo amino. Essa estratégia permitiu a Fischer, em colaboração com diversos laboratórios, a síntese de cerca de 100 peptídeos simples. Mesmo após sua morte, vários de seus colaboradores continuaram seus estudos sobre peptídeos e conseguiram importantes avanços [3].

Emil Abderhalden (1877-1950) foi um dos mais fiéis associados de Fischer. Após graduar-se em medicina em Besel, mudou-se para Berlin para trabalhar com Fischer, sendo considerado como a mão bioquímica do laboratório. No campo da química, Abderhalden continuou a síntese de peptídeos por meio do método Fischer, entretanto, conseguiu superar o comprimento do octadecapeptídeo, conhecido por possuir apenas um resíduo de L-leucina. Em colaboração com Brockmann, demonstrou que a clivagem de ligações peptídicas ocorrem com metanol/HCl mesmo a 60 °C, em 30min, e que o peptídeo encurtado glicilucina poderia ser sujeito a mesma operação [1].

Outro importante associado de Fischer foi Hermann Leuchs (1879-1945), que fez doutorado com mesmo, e foi seu assistente até sua morte, em 1919. Leuchs observou, em 1906, que o cloreto de aminoácido N-etoxicarbonila da glicina, na perda de etilcloreto a 70 °C, era convertido em um composto que ao ser aquecido na presença de pouca água,

tornava-se insolúvel. Mais tarde, esse composto ficou conhecido como substância de Leuchs (Leuchs'scher Körper) [1].

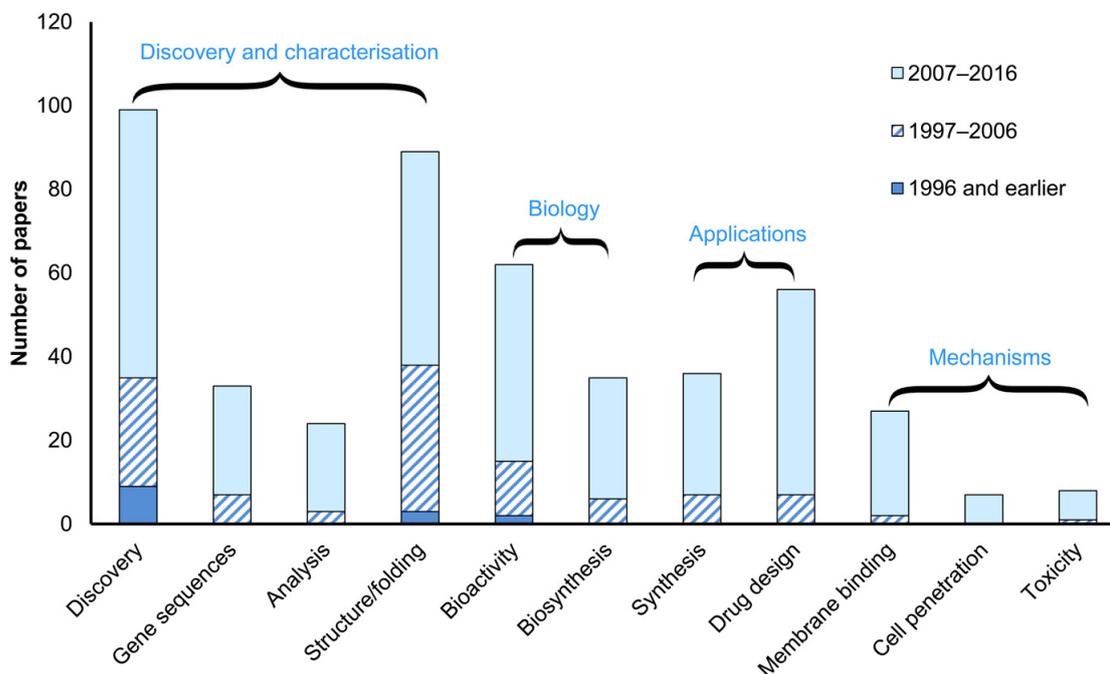
A principal contribuição para o desenvolvimento da química de peptídeos, após a morte de Fischer, foi feita por seu principal colaborador, Max Bergmann (1886-1944). Graduado em química, em Berlin, Bergmann foi contratado como assistente de laboratório por Fischer. Em 1926, Max descreveu um novo princípio de síntese de peptídeo, nomeadamente, abertura do anel de azlactona por um aminoácido na presença de um álcali.

Outro importante personagem para o avanço na pesquisa sobre peptídeo, foi Theodor Curtius (1857-1928). Em seus estudos sobre glicina no laboratório de Adolf Baeyer em Munique, Theodor criou a esterificação de aminoácidos em etanol e ácido clorídrico e constatou a fácil formação de dicetopiperazina e ésteres de glicina poliméricos no aquecimento do éster etílico livre [1, 3]. Ésteres de aminoácidos e dicetopiperazina viriam a desempenhar papel de elevada destaque nos estudos de Emil Fischer. O empenho de Curtius no estudo em compostos de diazo o traz para Erlangen, onde obtém a hidrazina, $H_2N - NH_2$, um composto que mais tarde teve relevante importância na química de peptídeos. Na química orgânica, a degradação de Curtius é conhecida como a decomposição de azidas ácidas seguida pelo rearranjo das aminas produtoras de nitrene encurtadas por um átomo de carbono [3]. Na química de peptídeos essa reação tenta ser evitada, assim, azidas de aminoácidos são frequentemente usadas como derivados de aminoácidos catalisador para estabelecer uma ligação peptídica com o segundo grupo amino de um aminoácido ou um peptídeo (éster). Este método de azida não consegue remover o resíduo de benzoilo dos peptídeos hipurilo ou o grupo acetilo dos peptídeos aceturilo sem destruição das ligações peptídicas formadas pela síntese. O método de Curtius consegue o alongamento de uma cadeia peptídica apenas por acoplamento na extremidade carboxila, nos métodos atuais a construção de peptídes, de modo geral, é por acoplamento de blocos ativados ao grupo amino. Sob a influência de Fischer, Theodor Curtius estende seu método para síntese de peptídeos benzoilados contendo alanina e ácido aspártico [1].

Desde a descoberta do primeiro peptídeo, até os dias atuais, a avanço no estudo desses materiais cresceu de forma espetacular e, como consequência direta, aumentou também o número de aplicações. A Figura 1.3 [4] ilustra uma classificação dos trabalhos publicados sobre substâncias polipeptídicas, onde nela nota-se que a principal utilização é no design de drogas e que a maior parte dos esforços está na descoberta e caracterização desses materiais. Vale salientar que os artigos foram classificados pelo tópico principal do trabalho, mas alguns foram incluídos em múltiplas categorias. Inúmeros são os trabalhos publicados ilustrando a aplicação de peptídeos nos mais diversos aspectos como na melhoria da saúde mental [5], como agente anticancerígeno [6], e até mesmo na produção de vacinas [7].

A síntese de novos peptídeos sempre esteve condicionada à inovação de métodos de acoplamento, e isso é bem ilustrado pelo aumento no comprimento dos peptídeos sintéticos com o avanço nesse campo de pesquisa. A Glutathione (Figura 1.4), um dos mais estudados

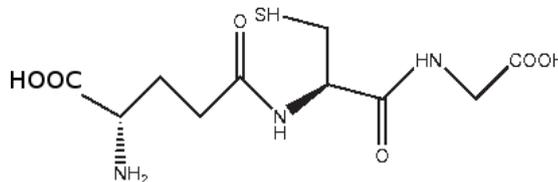
Figura 1.3: Levantamento de publicações e classificação por categorias. Os artigos foram classificados pelo tópico principal do trabalho, mas alguns foram incluídos em múltiplas categorias.



Fonte: Brown et al., 2018 [4]

e disseminados peptídeos entre os que ocorrem naturalmente, foi observado pela primeira vez em agentes redutores em fungos por Rey-Pailhade em 1888. Este peptídeo foi isolado do fígado e músculos em 1921 por F. G. Hopkins e sintetizado pela primeira vez por Harington e Mead em 1935. A síntese da glutatona foi o primeiro acontecimento que chamou a atenção dos químicos para peptídeos após a era Fischer [8, 3].

Figura 1.4: Estrutura molecular da Glutatona



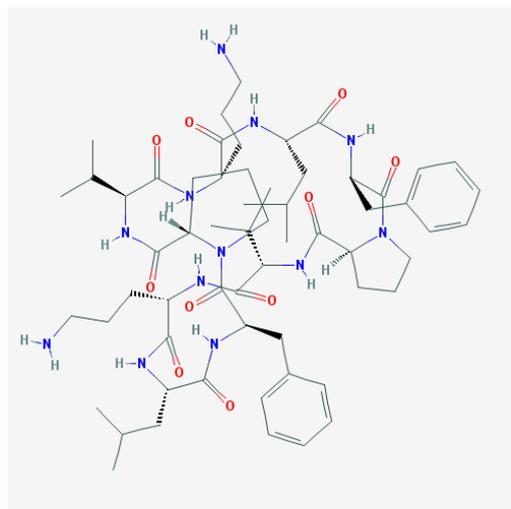
Fonte: Autor, 2018

Depois da ocitocina, o segundo principal hormônio da glândula pituitária é a vasopressina, um peptídeo com propriedades pressóricas e antidiuréticas, cujo sua isolamento conseguiu ser obtida em forma pura. O primeiro a fazer a síntese da vasopressina foi du Vigneaud em 1954, e mais tarde, por vários outros laboratórios, o que tornou possível a fabricação desse peptídeo e análogos para ser aplicado no controle de diabetes e inibidores

farmacologicamente relevantes [1].

Um outro tipo de peptídeo que chama atenção é a gramicidina S (Figura 1.5). A natureza e sequência de aminoácidos desse ciclopeptídeo foi determinada por Conden em 1946, com o auxílio da recém criada técnica de cromatografia em papel. A presença de ornitina, um aminoácido não muito comum, foi uma surpresa para os pesquisadores. Assim, a gramicidina S tornou-se um dímero cíclico pentapeptídeo, D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu [3].

Figura 1.5: Estrutura molecular da gramicidina S



Fonte: Pubchem, 2018 [9]

Técnicas como cristalografia por raio-X revelaram a arquitetura de moléculas de diversas proteínas. Outras tantas análises, mostraram que proteínas são macromoléculas polipeptídicas. Por meio da ressonância magnética obteve-se a informação sobre a resignação de muitos peptídeos, e a partir da degradação por etapas ou da derivação de fragmentos do DNA, foram reconhecidas as sequências de aminoácidos (estruturas primárias) de inúmeros peptídeos [1].

Um dos primeiros a utilizar raios-X no estudo de aminoácidos e peptídeos foi Robert B. Corey, no Instituto de tecnologia em Pasadena. Nos primeiros anos da década de 1930, Corey com R. W. G. Wyckoff investigaram ligações amidas e em 1938, determinaram as dimensões, distâncias interatômicas e ângulos de ligação na mais simples dicetopiperazina, cyclo (Gly). Deste ponto em diante, a estrutura de vários outros peptídeos foram analisadas a partir da cristografia de raio-X [1].

Uma vez que a cristografia de raios-X fornece informações sobre conformação apenas no estado sólido, para situações diferentes, tem-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que desenvolveu-se de tal forma que tornou-se o método mais utilizado para o estudo da conformação de peptídeos em solução. A técnica de RMN foi introduzida por Bloch e Purcell, ganhadores do prêmio Nobel de 1952. Já em 1957, pesquisadores americanos descreveram o espectro da espectroscopia de ressonância mag-

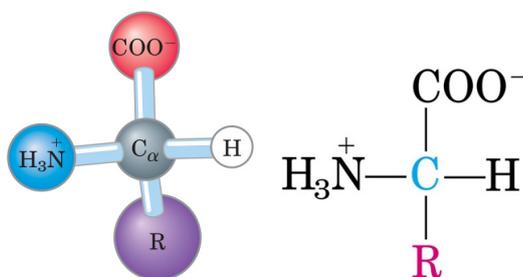
nética de aminoácidos e peptídeos, embora nessa época apenas alguns picos poderiam ser atribuídos a elementos estruturais [1, 3].

Desde a sua primeira observação, até os dias atuais, alguns milhares de trabalhos sobre peptídeos foram publicados, muitas das descobertas tiveram aplicações nas mais diversas áreas, por exemplo na de indústria de fármacos, que move um montante considerável em dinheiro com produtos baseados nesses materiais. Após tantos anos de pesquisa, ainda há muito o que fazer, e é nesse contexto que o presente trabalho traz sua singela contribuição, fazendo uma análise da interação das moléculas de um fluido na superfície de filmes peptídicos.

1.2 Peptídeos

Peptídeos são polímeros de aminoácidos, conectados por ligações peptídicas (ligações amidas) entre grupo carboxílico de um bloco de construção e o grupo amino do bloco seguinte [8]. Essa ligação é formada pela remoção de elementos de água tanto do grupo carboxílico quanto do grupo amino. Cada aminoácido é formado por um grupo carboxílico, um grupo amino e um hidrogênio todos ligados ao mesmo carbono. O que os difere são suas cadeias laterais ou grupos R (Figura 1.6). As características desse grupo contribuem fundamentalmente no seu comportamento bioquímico [10]. Há 20 aminoácidos mais comuns (todos desses grupo são conhecidos como α -aminoácidos), no entanto há outros menos comuns na natureza. Uma ligação peptídica entre dois desses aminoácidos forma um dipeptídeo, a ligação entre três aminoácidos forma um tripeptídeo, de maneira análoga, três ligações peptídicas unindo quatro aminoácidos forma um tetrapeptídeo, e assim sucessivamente. Portanto, peptídeos diferem-se entre si pela quantidade e ordem de seus constituintes, ou seja, um mesmo grupo de aminoácidos pode originar diferentes peptídeos simplesmente alterando a ordem em que são ligados.

Figura 1.6: Estrutura geral de um aminoácido



Fonte: Cox et al., 2014 [11]

O resíduo de aminoácido de um peptídeo na extremidade com um α -amino livre é chamado de aminoterminal e a outra extremidade com grupo α -carboxílico livre é denominado

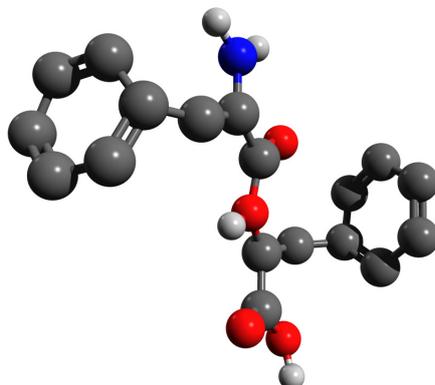
carboxiterminal. Além da variedade de peptídeos lineares há também peptídeos cíclicos, macromoléculas que ocorrem em diferentes tamanhos de anel. Esses peptídeos cíclicos são formados pela ligação dos terminais amino e carboxilo de um peptídeo linear [8].

Peptídeos podem ser distinguidos por seu modo de ionização. Os grupos α -amino e α -carboxilo dos aminoácidos não terminais são ligados covalentemente (ligações químicas em que há o compartilhamento de um ou mais pares de elétrons entre os átomos), e portanto não se ionizam. Entretanto, os grupos R de alguns aminoácidos, em um peptídeo, favorecem determinadas propriedades acidobásicas gerais da molécula.

Os peptídeos são nomeados com prefixos gregos como di-, tri-, tetra-, ... octa-, e etc., de acordo com o número de resíduos aminoácidos que são incorporados. Na situação em que o peptídeo é muito longo, o prefixo grego pode ser trocado por um número, por exemplo, um decapeptídeo pode ser chamado de 10-peptídeo. Formalmente, peptídeos que são constituídos por menos que dez aminoácidos são classificados como oligopeptídeo (do Grego oligos=poucos), enquanto que peptídeos com 10-100 resíduos aminoácidos são chamados de polipeptídeos. Sob a ótica da química, a diferença entre polipeptídeos e proteína é ambígua. Polipeptídeos têm massas moleculares abaixo de 10.000 *g/mol*, enquanto as chamadas de proteínas apresentam massas moleculares mais elevadas. Convencionalmente, para a nomenclatura, os peptídeos são considerados como aminoácidos N-acíclicos (compostos cíclicos sem saturação, "N" indica que não há ligações duplas ou triplas), somente os resíduos aminoácidos dos terminais carboxílos da cadeia peptídica mantêm o nome sem sufixo. Um forma de simplificar uma fórmula peptídica é obtida do código de três letras para aminoácidos. Sequências peptídicas lineares, de modo geral, são escritas horizontalmente, iniciando pela esquerda a partir do terminal amino e terminando a direita com o terminal carboxilo. Quando não há nada anexado ao símbolo de três letras, isso indica que o grupo amino (sempre a esquerda) e o grupo carboxilo, são ambos sem modificação, por exemplo, $Ala - Ala = H_2N - Ala - Ala - COOH$. A Glutathione, um peptídeo bioquimicamente importante, usado no tratamento de glaucoma, catarata, asma entre outros, compreende uma ligação α -peptídica e também uma ligação γ -peptídica [12].

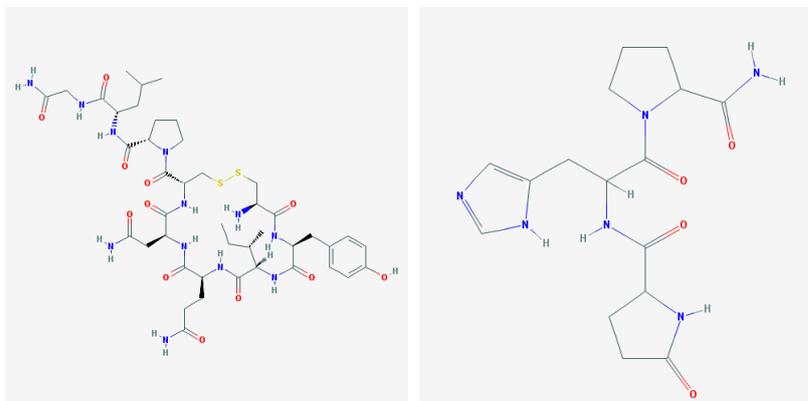
Peptídeos que ocorrem naturalmente possuem tamanhos variados, partindo de dois a milhares de resíduos de aminoácidos. Até mesmo os menores peptídeos podem desempenhar funções de grande importância biológica [13], como por exemplo, o dipeptídeo (Phe-Phe) formado pelo aminoácido Fenilalanina (Phe, F), que é um dos aminoácidos essenciais ao ser humano (Figura 1.7).

Diversos peptídeos biologicamente ativos, mesmo os curtos, manifestam seus efeitos em baixas concentrações, como é o caso dos hormônios de vertebrados [8]. Esses incluem a tireotropina (Figura 1.8 (b)), com três resíduos aminoácidos, que é formado no hipotálamo, e a ocitocina (Figura 1.8 (a)), formada por nove resíduos, secretada pela glândula neurohipófise, que origina as contrações uterinas [11]. Sistemas complexos de sinalização por hormônios e neurotransmissores formam a base da comunicação bioquímica usada por

Figura 1.7: Estrutura do dipeptídeo Phe-Phe

Fonte: Autor, 2018

todos os organismos vivos para a coordenação de suas atividades em qualquer nível de organização [8]. Peptídeos e seu homólogo mais elevado, a proteína, desempenham papéis primordiais em todos os processos da célula viva, e mediam com eficácia e precisão o comportamento químico das células tanto no seu interior quanto exterior.

Figura 1.8: Estrutura da (a) ocitocina e do (b) tireotropina

Fonte: Pubchem, 2018 [14]

1.2.1 Peptídeos Penetrantes de Células

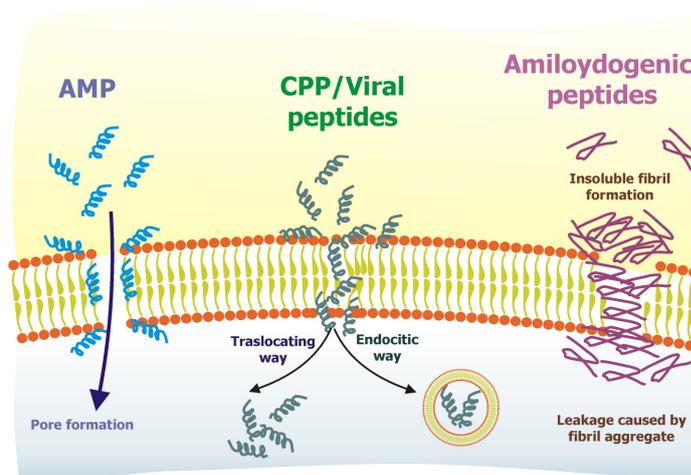
Dentre as notáveis características dos peptídeos, alguns apresentam uma outra peculiaridade a qual será dada atenção no presente tópico, a capacidade de penetrar em células. O interesse no campo da pesquisa de peptídeos penetrante de células (PPC) cresceu consideravelmente nas últimas décadas, pois esse material é uma promissora ferramenta para a liberação de moléculas biologicamente ativas em células, e portanto desempenha um importante papel no futuro do desenvolvimento de fármacos. PPC tem apresentado melhora

na eficiência de entrega intracelular de diversas biomoléculas, como DNA plasmidial, PNA (ácido nucleico peptídico), proteínas e peptídeos, e também nanopartículas de lipossomos, em células e tecidos *in vitro* e *in vivo* [15].

Os primeiros peptídeos penetrantes de células foram obtidos de proteínas naturais e que apresentam a capacidade de entrar em célula. Como exemplo, pode-se citar um dos peptídeos analisados no presente trabalho, a Penetratina, que foi descoberta em 1994 e é um pedaço da proteína Antennapedia (Figura 1.10), da mosca *Drosophila*. Mas há também peptídeos penetrantes de células que são conhecidos por CCPs não naturais, como o peptídeo anfipático, que não provém de nenhuma proteína original.

De modo geral, há alguma dificuldade em definir exatamente um peptídeo como penetrante de célula, devido a algumas incertezas na caracterização dos mecanismos de deslocação. Contudo, entende-se que CPP são peptídeos relativamente curtos (5-40 aminoácidos), com a habilidade de penetrar a célula por meio de diversos artifícios, incluindo principalmente endocitose² e com a capacidade de promover a entrega intracelular de conjugados de cargas bioativas covalentemente ou não covalentemente conjugadas [8, 15] (ver Figura 1.9).

Figura 1.9: Mecanismos de translocação de peptídeos em membranas. A depender do tipo de peptídeo, há distintas interações desse material com a membrana.



Fonte: GALDIERO et al., 2013 [16]

Na classe dos PPCs há vários subgrupos que são diferenciados pela origem ou sequência característica do peptídeo. A classificação é uma forma de compreender os mecanismos de funcionamento dos peptídeos penetrantes de células como também suas conexões, e determinar se um dado peptídeo faz parte desse grupo. A Tabela 1.1, exibe alguns exemplos de PPCs.

²Endocitose é o processo de entrada de partículas na célula por meio de vesículas chamadas endossomos.

Tabela 1.1: Famílias de peptídeos penetrantes de células

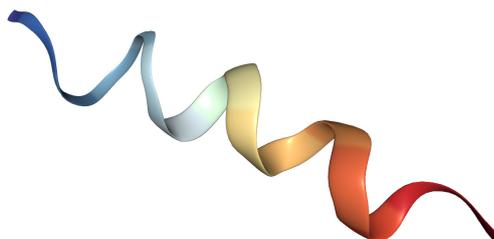
Família	Nome e sequência	Origem
Derivado de proteína	Penetratina, RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	Antitrapedia homeoproteína de <i>Drosophila</i>
	Tat (48-60), GRKKRRQR-RRPPQ	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) Tat
Quimérico	MPG, GALFLGFLGAAGSTMGAcya	Um domínio hidrofóbico da sequência de fusão do HIV gp41 e NLS do antígeno SV40 T
Sintético	MAP, KLALKLALKALKAALKLA	Peptídeo anfipático

Fonte: Langel, 2011 [15]

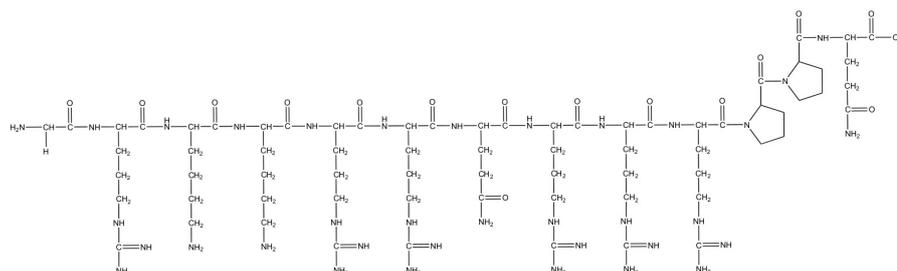
Alguns autores sugerem que os peptídeos penetrantes em células possuam um código, um sinal que o sistema celular reconheça e então, seja possível a entrega transcelular. Outras publicações sugerem que deva existir um equilíbrio através da membrana celular, onde não é preciso nenhum sinal especial na célula. Outra possibilidade natural para a papel dos PPCs, é baseado na similaridade estrutural com os peptídeos da membrana celular [15].

Dar-se-á atenção agora aos peptídeos penetrantes de células que são utilizados no presente estudo, a Penetratina e o TAT. Como já mencionado antes, PPCs conduzem a internalização de cargas hidrofílicas em células [15], o que é de grande valia para o desenvolvimento de diversas substâncias terapêuticas. Coincidentemente, os peptídeos penetrantes em células mais utilizados, Penetratina e TAT, são derivados de proteínas naturais. A Penetratina (Figura 1.10) é derivada da Homeoproteína Antennapedia e TAT (Figura 1.11) do vírus da imunodeficiência humana HIV Tat.

Figura 1.10: Imagem de penetratina em solução bicelar obtida por espectroscopia de NMR de solução



Fonte: Protein data bank, 2018 [17]

Figura 1.11: Estrutura do peptídeo TAT

Fonte: Autor, 2018

O avanço do preceito da impermeabilidade da membrana celular por moléculas hidrofílicas teve origem com o estudo dos reguladores transcricionais, TAT e Penetratina. Em ambos peptídeos é necessário verificar a atividade intracelular pura, e para isso, esses compostos são adicionados em meio extracelular. Os resultados foram surpreendentes, e sugeriram a internalização por cultura celular, culminando no desenvolvimento dos primeiros peptídeos permeáveis em células e a procura da função biológica da transdução de proteínas [15].

A penetratina pode ser internalizada por mecanismos independentes de energia nas temperaturas 4 °C e 37 °C, e com isso, tem acesso ao citoplasma e ao núcleo celular onde é recuperada, aparentemente, sem degradação [15]. Na penetratina há resíduos hidrofóbicos, em particular o triptofano, o que torna delicado o processo de translocação³.

O HIV vem sendo extensivamente estudado desde a descoberta do gene essencial na sua replicação, daí deriva-se o interesse em um de seus fragmentos, o peptídeo TAT. Uma sequência curta de TAT, entre 32 a 62 aminoácidos, permite uma eficiente internalização de um fragmento de anticorpos. Trabalhos publicados mostraram que a recombinação de proteínas como a β -galactosidase com o peptídeo TAT, abrangendo o domínio do TAT básico permitiu a compreensão em diversas linhas celulares. Observou-se também que a absorção do TAT com uma sequência mais longa ou TAT conjugado foi aumentada após uma biotinilação⁴ do TAT [18]. Portanto, peptídeos penetrantes de células como o TAT foram efetivamente utilizados para a entrega de carga bioativa em células e aplicações in vivo.

1.3 Atividades funcionais de peptídeos

Peptídeos bioativos são sequências curtas de aminoácidos com capacidade de desempenhar algum papel biologicamente relevante. Nesse grupo, pode-se incluir exemplos como

³Translocação é movimento ou deslocação do peptídeo dentro da célula

⁴Biotinilação é o processo de ligação de biotina, ou vitamina H, com uma proteína ou outras moléculas

as sequências já mencionadas, a Penetratina e a Ocitocina. Algumas doenças ou distúrbios que não apresentam cura total podem ser amenizadas por meio da ingestão de peptídeos naturalmente presentes em diversos alimentos que apresentam características anti-proliferativas, anti-mutagênicas, anti-inflamatórias, anticancerígenas ou antioxidantes, males que manifestam-se em doenças como câncer e diabetes. Peptídeos bioativos podem ser gerados a partir de tecnologias de processamento de alimentos, como o uso do calor ou alterações do pH. A fermentação do leite, por exemplo, é uma forma natural de gerar peptídeos bioativos [13]. Diversos alimentos, como cereais, ao passarem pelo sistema digestivo podem ser fontes de obtenção de peptídeos, e até mesmo o processo de fabricação de alimentos pode também gerar tais substâncias, nesse caso, os componentes bioativos são ingeridos como parte dos alimentos. A tabela ilustra alguns peptídeos bioativos gerados a partir de proteínas de alimentos por hidrólise enzimática⁵ [13].

Tabela 1.2: Peptídeos bioativos gerados a partir de proteínas de alimentos por Hidrólise enzimática

Proteína	Protease ⁶	Peptídeo	Atividade
Caseína	Tripsina	Phe-Phe-Val-Ala-Pro	Inibição da ECA, Imunomodulação
Albumina de arroz	Tripsina	Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg	Contração do íleo, Imunoestimulação
Soja	Proteinase S	Leu-Leu-Pro-His-His	Antioxidante

Fonte: Hettiarachchy et al., 2012 [13]

Função Hormonal

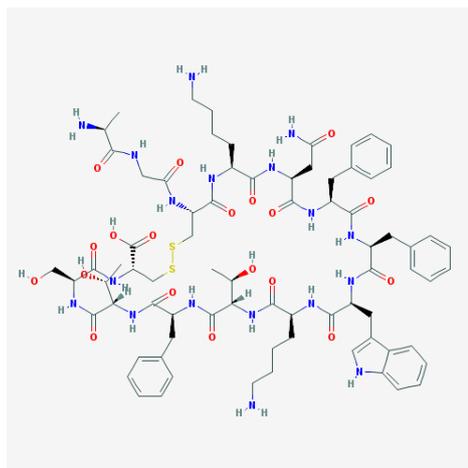
Dentre os inúmeros peptídeos que ocorrem naturalmente, pode-se destacar os hormônios peptídicos, que regulam funções biológicas importantes e alguns são utilizados para tratamento terapêutico. A Somatostatina é um hormônio peptídico cíclico (Figura 1.12), formado por quatorze aminoácidos, que foi identificado como regulador do sistema endócrino, e é liberado no sangue, nas fendas sinápticas e no espaço intracelular como resposta a diversos estímulos [3]. A Somatostatina pode ser classificada como um hormônio inibitório, pois inibe a secreção do hormônio do crescimento, do hormônio estimulante da tireóide, dos hormônios gastrointestinais entre outros. Outros hormônios peptídicos interessantes são as encefalinas (Figura 1.13), hormônios envolvidos na regulação da dor nociceptiva⁷, e

⁵Uma hidrólise enzimática consiste numa reação química catalisada por uma enzima (uma hidrolase) que utiliza água para quebrar uma molécula em duas outras moléculas.

⁷Nociceção é o termo médico para a recepção de estímulos aversivos, transmissão, modulação e percepção de estímulos agressivos.

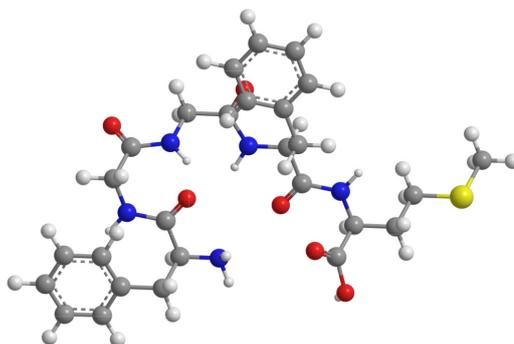
que faz parte de famílias bem conhecidas de peptídeos opióides⁸, que incluem encefalinas, endorfinas e dinorfinas. A função biológica de peptídeos de encefalina incluem controle da dor e analgesia. Estudos tentam aperfeiçoar as propriedades da encefalina para melhorar suas características farmacêuticas, e fornecer ferramentas para o desenvolvimento de drogas baseadas em peptídeos.

Figura 1.12: Estrutura da somatostatina



Fonte: Pubchem, 2018 [19]

Figura 1.13: Estrutura da encefalina



Fonte: Autor, 2018

Atividade quimioterápica

Embora a quimioterapia seja bastante utilizada no tratamento de câncer, estudos são realizados afim de estabelecer a eficiência de fármacos no controle de células cancerígenas.

⁸Opióide é qualquer composto químico psicoativo que produza efeitos farmacológicos semelhantes aos do ópio.

Nesse contexto, peptídeos podem ser incorporados em multicomponentes para ministração de drogas direcionadas para células específicas. Quando comparada com anticorpos monoclonal⁹, peptídeos destacam-se pela sua capacidade de penetrar em membranas, o que permite ótima penetração em tumores e tornando-o um material ideal para o uso como transportador. A depender das propriedades associadas a um peptídeo ou grupo de peptídeos, é possível determinar a natureza da atividade funcional de cada peptídeo [13]. Alguns apresentam uma predisposição natural para receptores em certas células cancerígenas, enquanto outros apresentam comportamento diferente. Mas para o tratamento de câncer em seres humanos, peptídeos são uma excelente alternativa, podendo reduzir alguns problemas que os métodos mais usuais apresentam.

Atividade enzimática e o desenvolvimento de vacinas

Como era de se esperar, com os avanços no campo da pesquisa dos benefícios que peptídeos bioativos trazem à saúde humana, despertou o interesse da indústria pela produção desses materiais de diversas fontes. Mas a produção de peptídeos em escala industrial é limitada devido a ausência de melhores tecnologias. Com isso, faz-se necessário inovação nas técnicas de modo a reter ou melhorar as atividades bioativas de peptídeos em sistemas alimentares [13]. De modo geral, o uso de enzimas como biocatalisadores apresenta vantagens como alta eficiência e especificidade, sendo um processo natural e o custo de instrumentação é bastante reduzido. Mesmo com essas limitações, é possível produzir remédios, como vacinas baseadas em peptídeos, em uma quantidade apreciável.

Vacinas baseadas em peptídeos podem ser construídas a partir de uma subunidade de um patógeno, seja com um peptídeo de ocorrência natural ou sintético, o importante é que esse material possua regiões com propriedades necessárias para a função do patógeno [8]. O objetivo dessa estratégia é uma vacina com uma estrutura mínima que consista de um antígeno bem definido e uma eficiente resposta imune específica, reduzindo o máximo possível algum risco potencialmente perigoso. Os grupos Wiesmüller e Jung, na década de 90, produziram a primeira vacina totalmente sintética, essas substâncias baseiam-se na seleção de epítomos imunodominantes, constituindo-se de cerca de 15 resíduos aminoácidos. Um benefício que o uso de peptídeos sintéticos traz é a flexibilidade de alteração na sequência dos aminoácidos, o que permite uma modificação ou substituição de um ou dois resíduos aminoácidos. Vacinas, mais recentes, baseadas em peptídeos são formadas por coquitéis multipeptídicos, sintéticos ou híbridos, e combinado com outras terapias apresentam bons resultados no tratamento de cânceres como câncer de próstata, gastrite, pancreática e cânceres de mama [20]. Diversas estratégias de vacinas vem sendo desenvolvidas nos laboratórios, sendo os antígenos mais comuns os peptídeos e as proteínas, seguidos de células dendríticas¹⁰ e vacinas de DNA [20]. Vacinas baseadas em peptídeos

⁹Anticorpo mais popular no tratamento de câncer.

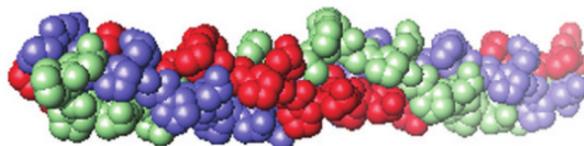
¹⁰Células dendríticas são células do sistema imunológico que têm a função de capturar microorganismos

podem ser facilmente sintetizadas e armazenadas, o que chama ainda mais atenção para utilização desses materiais.

Atividade de peptídeos em doenças degenerativas

Doenças degenerativas são caracterizadas por progressiva deteriorização da estrutura e função dos órgãos afetados, e seu controle e tratamento ainda é difícil. Doenças como câncer, diabetes, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, osteoporose entre outras são consideradas degenerativas. Na busca de uma melhora dos tecidos e articulações danificadas por essas doenças, peptídeos de colágeno¹¹ foram testados na Ásia e países ocidentais, e alguns casos estudados sugerem atividade benéfica desses peptídeos, ou seja, uma melhora nas condições dos tecidos e articulações (ver Figura 1.14). Várias pesquisas demonstraram que os peptídeos derivados de alimentos possuem grande potencial para controle e modulação de doenças complicadas, como as degenerativas.

Figura 1.14: Estrutura do colágeno, que é formado por três cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias α . Dependendo do processo enzimático utilizado, são geradas combinações de peptídeos com diferentes funcionalidades, como estimulação otimizada de osteoblastos nos ossos.



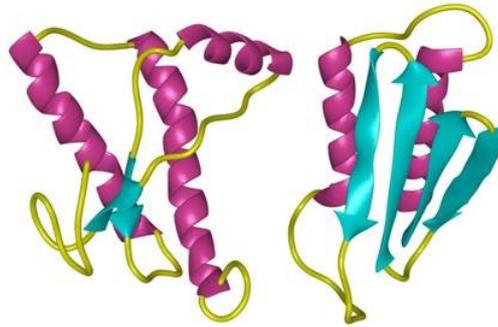
Fonte: Fratzi, 2008 [21]

O diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer, que é caracterizada pelo declínio gradual de processos cognitivos, requer o acúmulo extracelular de peptídeos β -Amyloid ($A\beta$) (Figura 1.15) em placas senis do cortex cerebral [5]. Peptídeos $A\beta$ são polipeptídeos 4-kDa [5] contendo uma sequência de 40 e 42 aminoácidos, estudos indicaram que o peptídeo $A\beta$ com 42 aminoácidos é o tipo predominante nas acumulações neuropatológicas. Essa aglomeração de peptídeos $A\beta$ no cérebro, é um forte indício de que esses peptídeos desempenham papel fundamental para o perfeito funcionamento deste órgão tão importante para os seres humanos. Os peptídeos $A\beta$ apresentam-se como monômeros, dímeros e oligômeros superiores, com agrupamentos protofibrilas e eventualmente fibrilas, em uma conformação de folhas dobradas, suas propriedades funcionais ainda não são totalmente compreendidas, mas numerosos estudos identificaram funções neurotróficas, neurotóxicas e fisiológicas.

prejudiciais ao organismo

¹¹Peptídeos de Colágeno são fragmentos protéicos produzidos por hidrólise enzimática

Figura 1.15: Estrutura do peptídeo β -Amyloid ($A\beta$).



Fonte: APExBIO, 2018 [22]

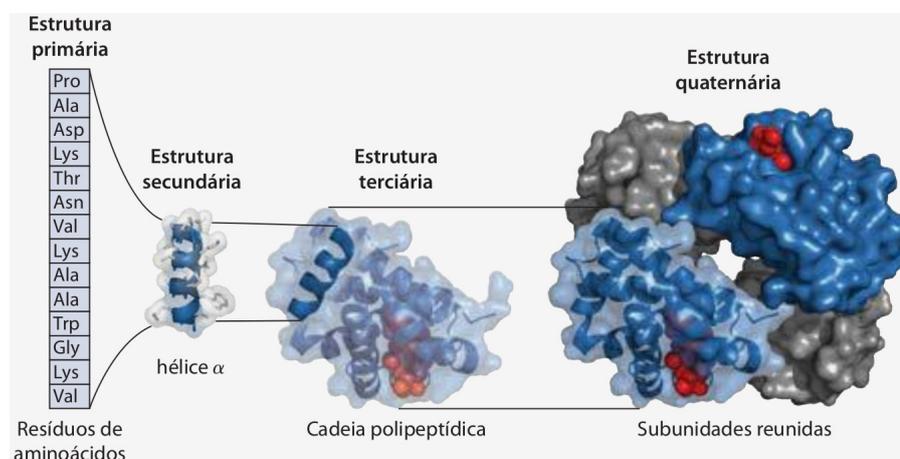
Peptídeos têm atraído bastante atenção devido à sua grande diversidade química, o que permite um vasto número de ligações e arranjos diferentes. Nesse contexto, nos próximos capítulos será buscado o entendimento das propriedades de molhabilidade de substratos peptídicos, assim como das interações de superfície, uma vez que esse conhecimento é crucial para produção de biointerfaces com ampla aplicação tecnológica.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PEPTÍDEOS

2.1 Primeira estrutura

Para a análise de qualquer composto peptídico, faz-se necessário que o mesmo esteja o mais puro e homogêneo possível, para que não haja distorção das informações sobre a estrutura obtida a partir de técnicas como cristalografia de raios-X. A estrutura organizacional de proteínas pode ser considerada consistindo de quatro níveis, como representado na Figura 2.1 [8]. A estrutura primária, compreende a sequência de aminoácidos conectados sucessivamente por ligações peptídicas em uma mesma cadeia. A estrutura secundária, é uma estrutura tridimensional local na armação peptídica. A estrutura terciária é uma estrutura tridimensional, que é resultado das interações intermoleculares entre os constituintes da estrutura secundária. E por fim, a estrutura quaternária, que está relacionada com o arranjo de duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas por interações não covalentes.

Figura 2.1: Estrutura organizacional de proteínas



Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Um passo necessário antes de iniciar a análise das sequências aminoácidas é a determinação do número de diferentes cadeias peptídicas presentes no material estudado,

por análise dos resíduos N-terminal (amino terminal) e/ou C-terminal (carboxi-terminal). Essa não é uma tarefa fácil, pois os grupos amino e carboxilo podem estar quimicamente bloqueados ou o material se tratar de um peptídeo cíclico.

A análise do N-terminal pode ser efetuada tanto por métodos químicos quanto enzimáticos [8]. Alguns métodos químicos para bloqueio do N-terminal como arilsulfonação, carbamoilação ou carboximetilação, e aminopeptidases¹ podem ser utilizados como uma alternativa enzimática na análise do grupo amino terminal. A análise por liberação enzimática necessita da presença de uma α -amina desbloqueada. O método químico é baseado na transformação ou bloqueio da função α -amino do N-terminal, seguida por hidrólise, separação e caracterização do terminal aminoácido.

A análise do C-terminal não ganhou tanta importância quanto do N-terminal, mas pode ser analisado tanto química quanto enzimaticamente. Usando método da hidrazina, todos os aminoácidos com exceção os do C-terminal são transformados em hidrazina no tratamento de hidrazina anidra, com isso, apenas os aminoácidos do C-terminal são lançados como aminoácidos livres e podem ser identificados por cromatografia [8]. Para os peptídeos no qual esse método é ineficiente, usa-se um método baseado no tratamento do peptídeo com tiocianato de amônio e anidrido acético.

Outra forma de separar cadeias peptídicas é por clivagem de ligações de dissulfureto², e no caso onde essas ligações estejam estabilizadas a conformação nativa de peptídeos e proteínas é destruída. Ligações dissulfureto intra ou inter-cadeias podem ser clivadas por redução ou oxidação (Figura 2.2). Introduzida por Sanger, a oxidação usando ácido performico transforma todos os resíduos de cisteína (Cys) em resíduos de ácido cisteico, e após mais alguns processos, a localização das ligações de dissulfureto é determinada como um passo final na análise das sequências de aminoácidos.

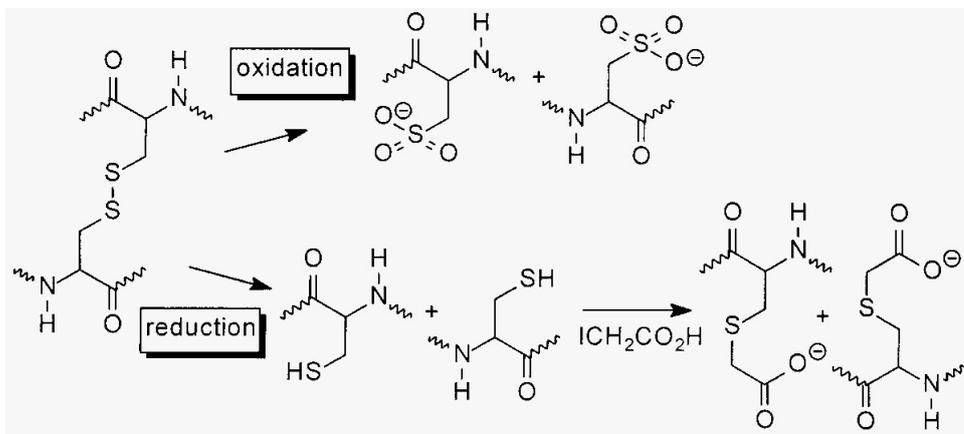
De modo geral, para iniciar a análise da sequência de peptídeos em uma cadeia faz-se necessário conhecer o conjunto de aminoácidos que a compõe. Para isso, diversos métodos químicos e enzimáticos são conhecidos, mas nenhum deles consegue resultados satisfatórios sozinho. Uma análise eficiente da sequência requer que um fragmento da proteína seja analisada, uma vez que a degradação passo a passo é limitada a 40-80 resíduos. Ou seja, uma longa cadeia polipeptídica deve ser clivada em fragmentos adequados para análise passo a passo por métodos químicos ou enzimáticos.

2.2 Segunda estrutura

A conformação preferida de cadeias peptídicas sob condições fisiológicas é governada pelas torções nos ângulos ϕ , ψ e ω que são energeticamente favorecidas, ver Figura 2.3,

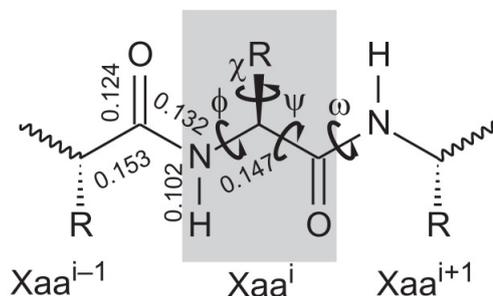
¹Aminopeptidases são enzimas que catalisam a clivagem de aminoácidos do terminal amino (N-terminal) de proteínas ou peptídeos

²Ligações dissulfureto correspondem a ligações fracas que ocorrem entre átomos de enxofre presentes em uma molécula.

Figura 2.2: Estrutura organizacional de proteínas

Fonte: Sewald et al., 2012 [8]

além de fatores de estabilização como ligações de hidrogênio. Numa cadeia peptídica, o número de possíveis conformações na cadeia é restrito devido ao caráter de ligação dupla parcial da ligação amida com uma barreira rotacional significativa [8].

Figura 2.3: Ângulos de torção ϕ , ψ e ω de aminoácido em um peptídeo.

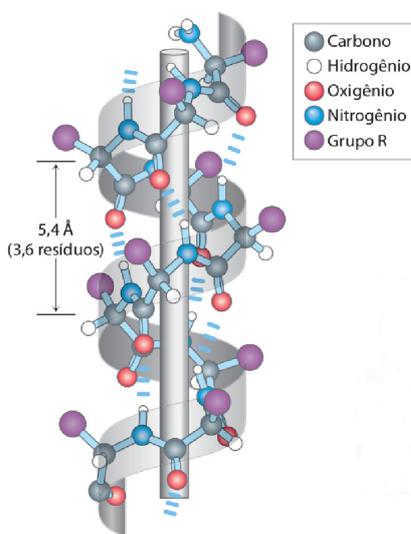
Fonte: Sewald et al., 2012 [8]

Grande parte dos elementos de estrutura secundária são estabilizados por múltiplas ligações de hidrogênio, e são essas inúmeras interações desse sistema conjugado que conferem uma notável estabilidade a estrutura. A ligação de hidrogênio é formada basicamente pelo grupo NH, doador de ligações de hidrogênio, e o átomo de hidrogênio da carbonila, que é receptor dessas junções de ligações peptídicas [8].

Dentre as conformações de segunda estrutura, a do tipo hélice possui uma ampla incidência de ocorrência. Essa estrutura consiste de elementos organizados em forma de espiral e é estabilizada por ligações intramoleculares de hidrogênio alinhadas em paralelo com o eixo da hélice (Figura 2.4). Uma hélice é caracterizada por um número bem definido de resíduos aminoácidos por volta, pelo passo da hélice e o número de átomos incorporados ao esqueleto. A estrutura helicoidal proporciona uma utilização otimizada

das ligações de hidrogênio internas, de modo que todas as ligações peptídicas contribuam em tais ligações de hidrogênio, mas a natureza da cadeia lateral dos aminoácidos é de fundamental importância para a estabilização da hélice [11]. Estruturas em hélice são estruturas quirais, sendo possível determinar o sentido do giro helicoidal (sentido horário ou anti-horário). A forma mais comum é a α -hélice, que foi proposta primeiramente por Linus Pauling e Robert Corey baseados nas investigações a respeito dos padrões de difração de raios-X das α -queratina.

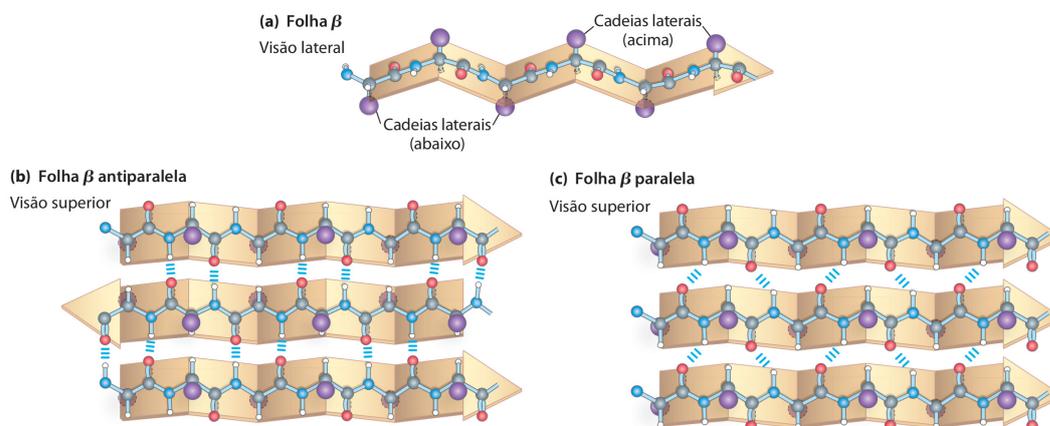
Figura 2.4: Estrutura helicoidal



Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Outro modelo possível de conformação de estrutura secundária é a β -folha, que é formada por ligações de hidrogênio de duas cadeias polipeptídicas vizinhas ou pelos átomos da mesma molécula (intracadeia). Essa estrutura assemelha-se com uma folha dobrada em ziguezague, como mostra a Figura 2.5 [11]. A estrutura pode ser reconhecida como β -folha paralela quando as cadeias estão alinhadas de forma paralela, e β -folha anti-paralela na situação contrária. Uma estrutura β -folha ideal é caracterizada por ângulos ϕ e ψ medindo $\pm 180^\circ$ [8].

Tanto a conformação em hélice quanto a β -folha podem apresentar comportamento anfifílico, ou seja, podem constituir-se por partes hidrofóbicas e hidrofílicas. Na hélice anfifílica, um lado da hélice apresenta principalmente resíduos hidrofóbicos, enquanto o outro lado é formado basicamente por resíduos hidrofílicos. Determinadas localizações dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de uma sequência de aminoácidos estimulam a formação de hélices anfifílicas. As β -folhas anfifílicas são formadas por resíduos polar e apolar dispostos alternadamente [11].

Figura 2.5: Estruturas β -folha

Fonte: Cox et al., 2014 [11]

2.3 Nanoestruturação

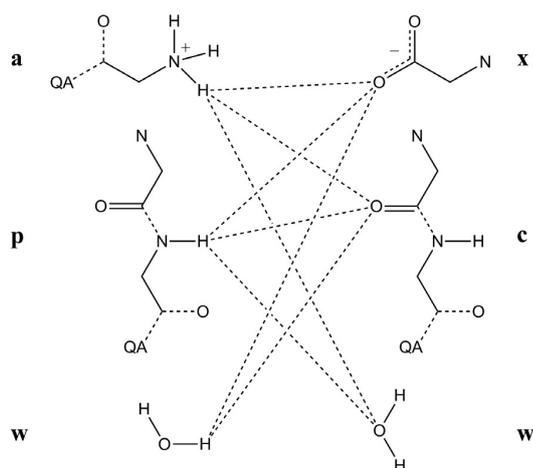
O avanço das pesquisas no campo de peptídeos nos últimos anos é algo impressionante, tanto em relação aos fundamentos básicos como mecanismos moleculares, quanto na aplicação desse conhecimento. Na busca por biomateriais, estruturas auto-montadas de peptídeos apresentam-se como uma alternativa promissora para as mais diversas aplicações, como em biosensores, eletrônicos, reparo de tecidos, entrega de fármacos e etc. [6].

Os blocos de construção que formam peptídeos podem se auto-organizar em nanoestruturas de uma, duas ou três dimensões com o uso de técnicas simples e sem necessidade de maquinário especializado ou condições particulares de altas temperaturas ou pressão. Além disso, há um vasto número de peptídeos tanto na natureza quanto sintetizados em laboratórios que podem se auto-organizar em nanoestruturas. Entende-se o termo auto-montagem como o processo onde um sistema com configuração aleatória vai para um estado com um alto grau de organização estrutural. Nesse sentido, o que coloca peptídeos na dianteira quando comparado com outros materiais, é a flexibilidade em construir compostos com características previamente determinadas pela simples organização da sequência de aminoácidos, como por exemplo, de maneira a obter estruturas secundárias distintas (hélice ou β -folha) ou superfícies biocompatíveis com propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas específicas.

A organização ordenada de blocos de ligação em nanoestruturas definidas depende de um reconhecimento molecular específico, o que é facilitada por uma combinação de interações não covalentes incluindo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, empilhamento $\pi - \pi$, forças hidrofóbicas, forças de Van der Waals, e interações dipolo-dipolo quirais. Essas forças não são grandes quando comparadas com as interações térmicas, o que permite variação de estruturas e propriedades por uma pequena alteração de parâ-

metros [23]. Os resíduos carregados são fornecidos por aminoácidos com cadeias laterais ácidas ou básicas. Por sua vez, estes podem ser explorados para criar interações carga-carga específicas para favorecer (grupos com cargas opostas) ou desfavorecer (grupos com cargas iguais) a auto-montagem [6].

Figura 2.6: Principais tipos de ligação de hidrogênio observados em peptídeos. A direita tem-se os doadores, o grupo amino (**a**), o peptídeo (**p**) e água (**w**). Do lado esquerdo tem-se os receptores, o grupo carboxila (**x**), carbonilo peptídico (**c**) e novamente, água (**w**)



Fonte: Castillo-León et al., 2012 [6]

Um fenômeno bastante conhecido quando trata-se de auto-montagem em nanoestruturas é a cristalização, que no caso de moléculas orgânicas é dada por uma complexa série de eventos envolvendo reconhecimento molecular. Para análise de difração de raios X de um composto, como peptídeo, faz-se necessário a obtenção de cristais adequados mas para tal é preciso um controle no processo de nucleação. Aminoácidos e peptídeos fixos em uma rede cristalina interagem uns com os outros pelas mesmas forças responsáveis pelo reconhecimento molecular [6]. Em uma nanoestrutura peptídica há diversas interações intermoleculares, entre elas, ligações de hidrogênio tanto fortes quanto fracas. Uma ligação de hidrogênio forte do tipo $D - H \cdots A$, onde tanto o doador (D) quanto o receptor (A) são N ou O , é o tipo de "cola" mais comum entre moléculas individuais em estruturas peptídicas. Há inúmeros tipos de ligações de hidrogênio forte quando considera-se todos os possíveis doadores e receptores da cadeia lateral, como mostra a Figura 2.6. Aqui é possível notar as interações mais importantes envolvendo a cadeia principal. Nas últimas décadas vem crescendo o interesse nas ligações de hidrogênio fracas, pois alguns tipos dessa ligação proporcionam a estabilidade da segunda estrutura em proteínas, e também são importantes elementos estruturais nos padrões de empacotamento de cristais em peptídeos menores [6].

A capacidade de peptídeos de se automontarem permite uma fácil manipulação para

formarem nanoestruturas bem definidas e com diversas funções, o que impulsionou esse campo de pesquisa nas últimas décadas. Com os estudos, um número considerável de blocos de construção baseados em peptídeos como peptídeos cíclicos, peptídeos dendríticos, peptídeos anfífilos, oligopeptídeos do tipo surfactante, copolipeptídeos e dipeptídeos aromáticos, foram explorados para possíveis aplicações em bio-nanotecnologia.

2.3.1 Tipos de estruturas

Peptídeos lineares

Peptídeos lineares classificam estruturas baseadas na maneira como os grupos hidrofóbicos organizam-se nos cristais, conduzindo a identificação de dois padrões. Estudos revelaram que estruturas de dipeptídeos podem ser divididas em quatro padrões distintos, sendo diferenciadas não somente pela simetria cabeça-cauda das cadeias e o tipo de ligação de hidrogênio, mas também por propriedades como conformação peptídica [6].

A cristalização de peptídeos com mais de alguns resíduos é bastante desafiadora devido a flexibilidade conformacional, que pode ter origem não somente da construção de moléculas cíclicas, mas também pela introdução de resíduos ácido aminoisobutírico, o qual é um indutor de formação em hélice.

Nanotubos peptídicos

Peptídeos e proteínas atraem muita atenção como potenciais componentes na fabricação de nanoestruturas tubulares (ver Figura 2.7). A primeira vez que usou-se o termo nanotubo, foi por Ghadiri [24] em 1993, em um trabalho publicado sobre automontagem de nanotubos orgânicos baseados em uma arquitetura peptídica cíclica. Peptídeos cíclicos podem se auto-organizar para formar nanotubos de peptídeos, com comprimento da ordem de micrômetros e diâmetro de cerca de 7 – 8Å. Kimura estudou o campo da engenharia de peptídeos com ênfase em estruturas tubular compostas por β -peptídeos cíclicos, ele propôs modelos para arquitetura automontada com base em dipolos moleculares. A intensa e direcional interação dipolo-dipolo pode contribuir para o arranjo das moléculas em uma maneira específica, seja quando dipolos são incorporados em uma molécula ou por exposição a um campo elétrico externo [25].

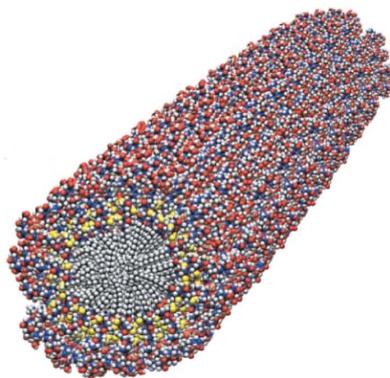
Outra classe de peptídeos que formam estruturas tubulares são os dipeptídeos. Carl Henrik Görbitz [26], em um trabalho publicado em 2001, foi o primeiro a demonstrar que pequenos fragmentos dipeptídicos podem se auto-montar em estruturas organizadas como nanotubos. Com o uso apenas da técnica de cristografia, Görbitz conseguiu identificar mais 160 dipeptídeos que podem se auto-organizar em estruturas supramoleculares semelhantes a tubulares [25, 23]. Após o reconhecimento de que o dipeptídeo fenilalanina (FF) pode se auto-montar, Gazit e colaboradores propuseram dezenas de outros dipeptídeos, compostos de aminoácidos naturais e não naturais, que podem se auto-organizar

em nanoestruturas peptídicas, todos com uma característica comum, a presença de uma região aromática, que aparenta ter um papel fulcral nas propriedades das estruturas auto-montadas.

Nanotubos peptídicos podem ser gerados por outros tipos de peptídeos como peptídeo amiloide, peptídeos modificados por N-Terminus e peptídeo Coiled-Coil entre outros, onde as propriedades dos nanotubos dependeram do tipo de peptídeo utilizado. Uma outra vantagem de nanotubos peptídicos é que seu tamanho e estrutura podem ser facilmente controlados por ambiente externo, como surfactante, solvente, temperatura e pH [27].

Nanotubos de peptídeos são solúveis em água, o que os torna muito práticos para aplicação biológica e medicinal, e os grupos funcionais tais como a amino e o carboxilo podem melhorar o processo de auto-montagem via ligação de hidrogênio em solução. É possível adicionar funcionalidades em nanotubos de peptídeos por meio da incorporação de grupos funcionais nos monômeros peptídicos. Porém, deve-se ter cuidado na escolha dos grupos funcionais a ser adicionados, pois o processo de automontagem é bastante sensível e os elementos acrescentados afetam diretamente nesse fenômeno, podendo otimizar o processo ou impedi-lo [27].

Figura 2.7: Esquema de automontagem de peptídeos anfífilos em nanotubos.



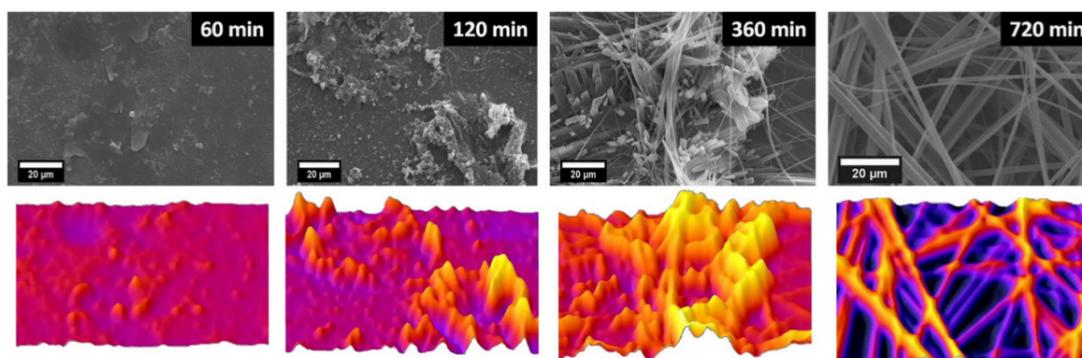
Fonte: Matsui, 2004 [27]

Filmes peptídicos nanoestruturados

O processo de automontagem espontânea de peptídeos desempenha papel essencial nos mais variados sistemas biológicos, seja para conseguir uma função biológica ou como parte de um processo patológico, e também atrai grande atenção pelo seu potencial na fabricação de novos nanomateriais. Devido a sua flexibilidade na funcionalização e propriedades de reconhecimento molecular, bem como as condições bastante acessíveis no processo de fabricação de nanoestruturas peptídicas, diversos grupos avançaram consideravelmente nesse campo de pesquisa [28].

Apesar dos muitos trabalhos publicados e progressos obtidos em relação à auto-montagem de peptídeos em materiais nanoestruturados, pouco foi o avanço no alinhamento e posicionamento de nanoestruturas peptídicas em superfície sólida [29, 30]. Um dos maiores obstáculos é a abordagem utilizada na nanofabricação de peptídeos, que pode causar deficiência na dispersão e aglomeração, e também pode exigir modificação química da superfície sólida. A ausência de mecanismos para um melhor controle do fenômeno de aglomeração torna o gerenciamento de arquiteturas regulares muito difícil. Afim de minimizar esses efeitos indesejados, Ryu e Park desenvolveram uma estratégia onde filmes amorfos são depositados em substratos sólidos e então nanoestruturas são crescidas pela exposição desses filmes a uma atmosfera saturada com vapor de solvente. Ryu e Park observaram o crescimento de nanoestruturas após um longo período de tempo, e com isso, conseguiram obter algum controle da morfologia final [31]. Essa abordagem foi utilizada para alinhamento vertical de fibras peptídicas na forma chamada de nanofloresta. Desde então, diversos grupos usaram essa técnica para o crescimento de nanoestruturas em substratos sólidos usando também vapor de outros solventes, como a água [31], e até mesmo comparando a nanoestrutura formada por nanotubos e nanofios de peptídeos após passar pelo processo [32].

Figura 2.8: Imagens de SEM exibindo a morfologia de um filme do dipeptídeo Fenilalanina (FF) como função do tempo de encubação.



Fonte: E.R. Silva et al., 2012 [31]

A nanoestruturação em substratos sólidos permite a fabricação de filmes peptídicos capazes de modular propriedades físico-químicas de superfícies, com forte potencial no desenvolvimento de biointerfaces para as mais diversas aplicações. E é nesse contexto que o presente trabalho faz um estudo sobre os efeitos da exposição à atmosfera saturada de filmes peptídicos, formados por peptídeos penetrantes em células, no fenômeno de molhagem bem como na morfologia final.

2.4 Aplicações de nanoestruturas peptídicas

O avanço da ciência trouxe consigo a elaboração de técnicas de alta precisão e ferramentas de alta resolução para geração de imagens, o que permitiu o crescimento de pesquisa em nanotecnologia. Hoje consegue-se construir materiais nanométricos com propriedades particulares desejadas. A bionanotecnologia, por exemplo, explora o que foi descoberto com as observações de processos biológicos para confecção de transportadores eficientes, determinação dos principais fatores que causam doenças degenerativas, compreensão e utilização do fenômeno de auto-montagem espontânea de peptídeos, dentre outras aplicações. As nanoestruturas de peptídeos apresentam as mais variadas aplicações, que vão desde a fabricação de hidrogéis, à entrega de moléculas bioativas. Nesta seção dar-se-á atenção para algumas das aplicações de peptídeos nanoestruturados.

Peptídeos anfifílicos conseguem automontar-se em uma arquitetura supramolecular complexa tridimensional que fornece microambientes favoráveis para adesão de células, crescimento, proliferação, migração, e morfogênese necessária para funcionalização de tecidos orgânicos [6]. Essa nanoestrutura peptídica, também chamada de hidrogel, possui propriedades semelhantes ao da matriz extracelular³, e desempenha papel fundamental na prática de cultura celular. Trabalhos recentes demonstram a ação benéfica de hidrogéis peptídicos no tratamento da cartilagem [33], tecido que devido as suas peculiaridades, no caso de enfermidades, possui algumas complicações no tratamento. Peptídeos anfifílicos conseguem, também, nanoestruturar-se em outras formas como vesículas, micelas, mono e bi-camadas, dentre outras. Por modificação de segmentos estruturais, da morfologia, da química da superfície e características funcionais do peptídeo podem ser moduladas, dando origem a um bio-material inteligente, que responde a fatores como luz e temperatura. Alguns hidrogéis formados por peptídeos pode ser utilizados como um mecanismo para entrega de fármacos, como é o caso dos polímeros semelhantes a elastina de seda (PSEs), uma classe de polipeptídeos que tem sido utilizado na administração de drogas antitumorais.

Na biomineralização, processo no qual materiais estruturados hierarquicamente são produzidos de maneira biológica, peptídeos automontados vem sendo utilizados no desenvolvimento de métodos sintéticos para simular o processo de nucleação, crescimento e morfologia, necessários em tal técnica. Trabalhos mostraram que nanofibras de peptídeos podem ser utilizados como matrizes orgânicas para a fabricação de nanopartículas inorgânicas, que vem despertando o interesse de muitos pesquisadores devido às suas propriedades ópticas, magnéticas e eletrônicas [6].

Inspirados em processos de automontagem que ocorrem naturalmente na natureza, cientistas desenvolvem sistemas de filmes peptídicos nanoestruturados para serem utilizados

³Matriz extracelular é a massa que une as células dos animais e que é composta de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, segregadas pelas próprias células.

na entrega mais eficiente de drogas. Peptídeos vem sendo utilizados também em técnicas de imagem molecular, principalmente em tecnologias para imagens de alvos biológicos in vivo, devido a algumas vantagens como boa permeação tecidual, acessibilidade ao alvo e ausência de antigenicidade.

Portanto, o esforço de todos os pesquisadores desde a descoberta do primeiro peptídeo até os dias atuais, já apresenta bons frutos há décadas, como o volume de artigos publicados e as inúmeras pessoas tratadas por fármacos provindos desses estudos. E com o desenvolvimento de novas técnicas cada vez mais precisas de manipulação de partículas cada vez menores, a compreensão da mecânica de sistemas biológicos combinado com o trabalho mútuo de diferentes áreas do conhecimento, muito ainda há de contribuir no desenvolvimento da humanidade.

FENÔMENO DE MOLHAGEM

O fenômeno de molhagem é abundante na natureza e pode ser facilmente observado. As borboletas por exemplo, conseguem voar logo após uma chuva, enquanto pássaros maiores tem a necessidade de secar-se. A diferença desses dois comportamentos se deve a uma camada hidrofóbica que as asas das borboletas possuem. Folhas de diversas plantas, como a do pé de abóbora, também apresentam um comportamento parecido. Na indústria também não é diferente, inúmeros segmentos, como a construção civil, fazem uso do fenômeno de molhagem. O entendimento básico das interações entre uma gota de fluido e uma superfície sólida, como molhar, espalhar, aderir e desumidificar, não é apenas crucial para a ciência em si, mas também bastante valorosa para muitas aplicações aparentemente não relacionadas.

Assim como para o presente estudo, o fenômeno de molhagem tem grande importância nos mais diversos aspectos da sociedade e da ciência, passando por áreas como física, química e engenharia. Trabalhos sobre interação de fluidos com superfícies datam de mais de dois séculos atrás, como o trabalho de Thomas Young intitulado "Um Ensaio sobre a Coesão dos Fluidos" (*An Essay on the Cohesion of Fluids*) de 1805 [34]. Ele demonstrou descritivamente que o ângulo de contato estático entre um fluido e uma superfície sólida é resultado do equilíbrio mecânico entre as três tensões superficiais na linha de contato. Os focos na pesquisa vão desde a compreensão fundamental do fenômeno de molhagem, que embora muito já se tenha feito ainda gera discussões, até suas aplicações em materiais, revestimentos e inovação em dispositivos [35].

O ângulo de contato é a medida mais utilizada na caracterização de propriedades de superfícies, tendo como objetivo investigar interações entre líquido-sólido. Embora a obtenção desse ângulo não seja difícil, sua interpretação não é tão trivial, uma vez que existem várias teorias para a descrição do fenômeno de contato. Diversos autores chamam atenção para o cuidado na preparação das amostras, procedimento experimental e análise dos dados.

Neste capítulo será abordado o fenômeno de molhagem bem como o seu tratamento teórico, informações necessárias para o entendimento de alguns dos resultados apresenta-

dos na presente dissertação.

3.1 Ângulo de contato

Quando uma gota de algum líquido é colocado sobre uma superfície sólida, pode-se observar três regimes de molhagem: total, parcial ou seco, como mostra a Figura 3.1. No regime de molhagem total, o fluido espalha-se totalmente na superfície sólida, formando um filme. No regime parcial, uma fina camada do fluido é adsorvida pela superfície do sólido, com isso há a formação de uma gota, onde é caracterizada pela a presença de um ângulo de contato, θ . Este ângulo é formado entre a superfície sólida e a tangente a gota. No regime de molhagem parcial, θ apresenta valores no intervalo de $0^\circ < \theta < 90^\circ$. No caso do regime de molhagem total, o ângulo de contato é zero ($\theta = 0$), ou seja, o líquido molha completamente a superfície. E no regime de molhagem seco, o fluido não consegue molhar a superfície do sólido, fazendo com que o ângulo de contato θ assuma valores maiores que 90° . Nessa situação, as moléculas do fluido são repelidas pela superfície sólida. O tipo de molhagem depende efetivamente da interação entre as moléculas do líquido com o substrato sólido. A porção molhada da superfície é delimitada pela chamada linha de contato (L), como representada na Figura 3.3. Essa linha está na fronteira entre o fluido, a superfície e o gás envolvidos no processo.

Figura 3.1: Regimes de molhagem.

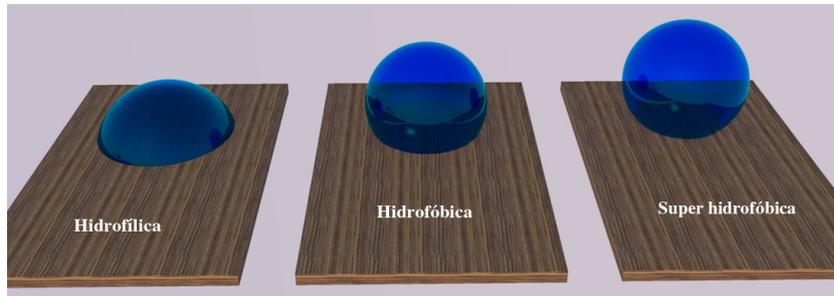


Fonte: Autor, 2018

É possível com as informações do ângulo de contato no equilíbrio, classificar a superfície na qual um fluido polar (água, por exemplo) foi depositado, como mostra a Figura 3.2. A superfície é reconhecida como hidrofílica, se o ângulo de contato é $\theta < 90^\circ$, hidrofóbica se $\theta > 90^\circ$, ou superhidrofóbica se $\theta > 150^\circ$. Essa classificação nos diz que superfícies hidrofílicas favorecem a molhagem por um líquido polar, ao mesmo tempo que, superfícies hidrofóbicas apresentam comportamento totalmente inverso.

Uma gota arbitrária colocada sob uma superfície perfeitamente plana e homogênea tenderá a espalhar-se ou contrair-se de modo a minimizar a densidade de energia superficial, até atingir o ângulo de contato de equilíbrio θ_e . De acordo com Young [34], há uma certa quantidade de energia livre por unidade de área em cada interface, denominada tensão superficial: γ_{SL} é a tensão superficial na interface sólido/líquido, γ_{SG} é a tensão superficial na interface sólido/gás e γ_{LG} é a tensão superficial na interface líquido/gás. Estes

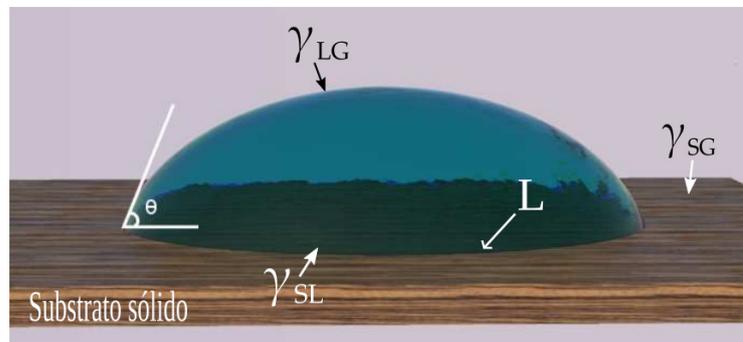
Figura 3.2: Comportamento de fluido em superfície hidrofílica, hidrofóbica e super hidrofóbica.



Fonte: Autor, 2018

parâmetros descrevem adequadamente as energias contidas nas interfaces. Nas vizinhanças da linha de contato (L), a estrutura é bem complexa e depende do conhecimento detalhado do sistema. Há uma região central em torno da posição da linha de contato (L) onde as complicações ocorrem, contudo, é possível relacionar as densidades superficiais de energia livre com o ângulo de contato no equilíbrio θ_e .

Figura 3.3: Gota sobre uma superfície sólida. θ é o ângulo de contato, L é a linha de contato, γ_{SL} é a tensão superficial na interface sólido/líquido, γ_{SG} é a tensão superficial na interface sólido/gás e γ_{LG} é a tensão superficial na interface líquido/gás.



Fonte: Autor, 2018

A ideia é que, encontrando-se um sistema em equilíbrio, de modo que não haja movimento da linha de contato (a energia seja estacionária), seja possível descrever o fenômeno de molhagem a partir da equação de Young [36], que é escrita como:

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos(\theta_e) = 0. \quad (3.1)$$

As medidas de θ_e fornecem alguma informação sobre as energias interfaciais. Geralmente, γ_{LG} é conhecido medindo-se a tensão superficial do líquido usando outras técnicas, tais como a técnica de gota pendente. Como somente a diferença $(\gamma_{SG} - \gamma_{SL})$ é relevante em experimentos envolvendo fluidos, a equação acima tem apenas uma incógnita. Vale

ressaltar que a validade da Equação de Young está vinculada ao fato da superfície ser plana e homogênea, e no equilíbrio (quando não há deslocamento da linha de contato), fazendo com que seu uso seja limitado, uma vez que grande parte dos fenômenos de molhagem estudados ocorrem fora do equilíbrio.

Algumas observações podem ser feitas [37]:

- A diferença entre as tensões superficiais ($\gamma_{SG} - \gamma_{SL}$) tem valores tipicamente entre 20 e 1000 mN/m;
- Se $(\gamma_{SG} - \gamma_{SL})$ for maior que γ_{LG} , a gota tende a espalhar-se completamente sobre o sólido. Isso explica porque líquidos com baixa tensão superficial molham a maioria dos sólidos.
- Se $(\gamma_{SL} - \gamma_{SG})$ for maior que γ_{LG} , a gota deverá estar em um regime de molhagem seco, apresentando ângulo de contato maior que 90° .

Para a situação em que há molhagem total, $\theta_e = 0$, a equação de Young pode ser escrita como,

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} = \gamma_{LG}. \quad (3.2)$$

Desta equação percebe-se que $\gamma_{SL} + \gamma_{LG}$ nunca será maior que γ_{SG} , no âmbito onde a equação de Young é válida. Por outro lado, se lidarmos com a situação fora do equilíbrio, a equação de Young não é mais válida e deve haver $\gamma_{SO} > \gamma_{SL} + \gamma_{LG}$, assim escrevemos,

$$S = \gamma_{SO} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG}. \quad (3.3)$$

S é chamado de coeficiente de espalhamento. Fisicamente, γ_{SO} é vinculado a uma densidade de energia de uma superfície seca, enquanto γ_{SG} corresponde a densidade de energia de uma superfície úmida. Os valores de γ_{SG} e γ_{SO} podem diferir substancialmente. A partir do valor do coeficiente de espalhamento S , é possível inferir o regime de molhagem da superfície. Quando $\theta_e = 0$, $S = 0$, então o fluido molha completamente a superfície sólida. Quando $S > 0$, o fluido espalha-se sobre a superfície sólida, e quando $S < 0$ o líquido apresenta um ângulo de contato constante.

3.1.1 Molhagem

Nesta seção, será dada uma explicação qualitativa de como o ângulo de contato θ_e depende das características tanto da superfície sólida quanto do líquido. É conhecido que sólidos duros (ligação covalente, iônica ou metálica) tem altas energias superficiais, enquanto sólidos moleculares (ligações através das forças de Van der Waals) possuem baixa energia superficial [38].

Assumindo que ligações fortes (ligações covalentes) controlam a tensão superficial γ_{SO} , enquanto interações de Van der Waals controla a energia na interface líquido/sólido γ_{SL} [38], pode-se escrever

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SO} + \gamma_{LG} - V_{SL} \quad (V_{SL} > 0). \quad (3.4)$$

Onde o termo V_{SL} descreve a atração nas interações de Van der Waals entre a superfície sólida e o líquido. Na equação (3.4), caso o líquido não entrasse em contato com sólido a atração nas interações seria nula, $V_{SL} = 0$. Analogamente, se colocarmos dois líquidos em contato, iniciaremos com $2\gamma_{LG}$, e terminamos com energia interfacial zero,

$$0 = 2\gamma_{LG} - V_{LL} \quad (V_{LL} > 0), \quad (3.5)$$

onde, de modo semelhante, V_{LL} descreve a atração de Van der Waals entre os líquidos. Agora, substituindo a eq.(3.4) em (3.3), e usando a eq.(3.5), chegamos a

$$S = -2\gamma_{LG} + V_{SL} = V_{SL} - V_{LL}, \quad (3.6)$$

e a condição de molhagem completa ($S > 0$) [38], corresponde a

$$V_{SL} > V_{LL}. \quad (3.7)$$

Em superfícies com baixa energia superficial, diferente das com alta energia que favorecem a molhagem completa, pode ocorrer a molhagem parcial ou total, dependendo da escolha do líquido. Através das observações de muitos casos [38], e plotando essas informações em gráfico, foi possível perceber que nunca alcança-se $\cos(\theta_e) = 1$, mas é possível extrapolar os dados para um valor crítico $\gamma_{LG} = \gamma_C$, o qual poderá corresponder a $\cos(\theta_e) = 1$. Os detalhes dessa extrapolação difere de autor para autor, e não é objetivo do presente texto fazer essa discussão aqui, para mais detalhes ver referência [38].

De modo geral, espera-se que γ_C dependa tanto da superfície sólida quanto do líquido utilizado, contudo, observou-se que quando lida-se com líquidos onde as forças de Van der Waals são dominantes, γ_C depende apenas das características da superfície sólida [38].

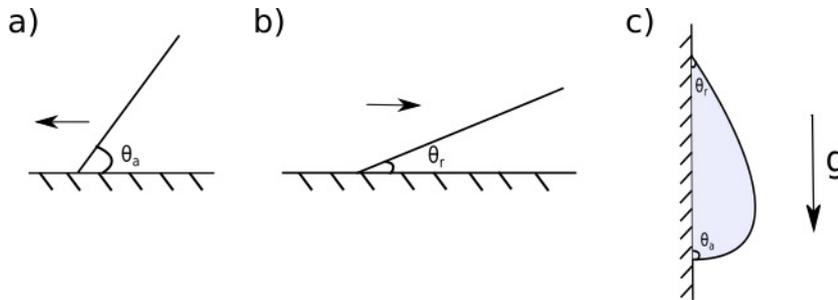
3.1.2 Histerese do Ângulo de Contato

A histerese do ângulo de contato é um importante fenômeno físico que está presente em abundância na natureza, e em diversos processos industriais. Dentre as aplicações industriais onde a histerese do ângulo de contato desempenha um papel elementar, incluem litografia de imersão, revestimentos de fibras e impressão a jato de tinta. É preciso ter em mente que em alguns casos a histerese do ângulo de contato é um problema, como na litografia de imersão, enquanto que em outros é essencial (revestimento por imersão). Daí, percebe-se a necessidade de caracterizar e controlar a histerese do ângulo para a operação

de sistemas industrialmente relevantes [39].

O componente dinâmico da histerese é causado pela interação do movimento do líquido com a superfície sólida, e especialmente a incapacidade do líquido de simplesmente fluir sobre ele [39]. Fatores como rugosidade e heterogeneidade da superfície podem fazer com que haja uma diferença do ângulo de contato, medido nas extremidades opostas de uma gota depositada em uma superfície sólida [39]. Numa situação ideal, em que a superfície do substrato é plana e homogênea, o ângulo medido deve ser o mesmo. Se ao espalhar-se a gota aumenta a área de contato com o substrato, o ângulo de contato está diminuindo e nomea-se como ângulo de avanço θ_a . Mas, se a gota diminui a área de contato com o substrato ela está se contraindo e há o aumento do ângulo de contato. A esse fenômeno denomina-se ângulo de recuo θ_r . Uma boa maneira de ver esse efeito é observar uma gota em uma superfície inclinada ou até mesmo vertical, como por exemplo, uma gota de chuva na janela. A gravidade a puxa para baixo, deformando-a, mas a existência da força capilar é capaz de equilibrar o peso para pequenas gotas [39].

Figura 3.4: Ilustração dos ângulos de contato a) de avanço e b) de recuo em superfícies horizontais, a seta indica o sentido do movimento da linha de contato. Em c) tem-se os ângulos de contato de avanço e recuo em uma gota sobre uma superfície vertical.



Fonte: Autor, 2018

A diferença entre o ângulo de avanço e o de recuo é definida como histerese (H),

$$H = \theta_a - \theta_r. \quad (3.8)$$

O intervalo $\theta_a - \theta_r$ pode ser de 10° , ou maior para superfícies que não receberam algum tratamento a fim de reduzir essas diferenças [38].

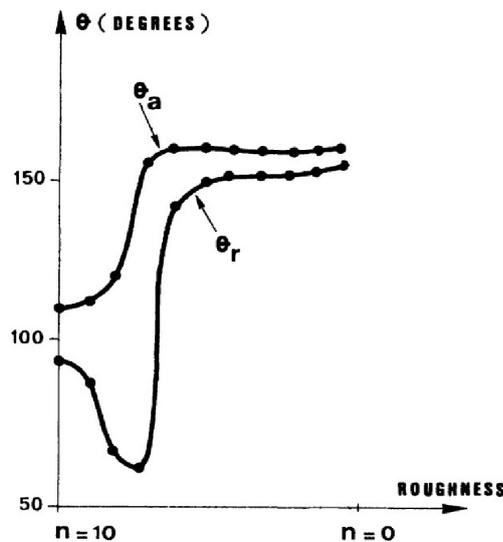
Como já mencionado acima, algumas características do sólido como, heterogeneidade química e estrutural, adsorção e dessorção na superfície, tamanho da gota e reorientação molecular [40], podem ocasionar histerese, mas o agente mais comum é a rugosidade.

Rugosidade

O fenômeno de molhagem, mensurado pelo ângulo de contato, depende da interação do líquido com a superfície sólida. Diversos fatores, como a rugosidade, conseguem influenciar

essa interação. Defeitos na superfície sólida induzem flutuações no ângulo de contato, que podem de fato modificar o valor dessa grandeza. As informações obtidas por Gennes [38] ao observar a deposição de gotas de água sobre cera de fluorcarboneto é mostrada na Figura 3.5. No experimento, a rugosidade na superfície é obtida a partir da borrficação da cera aquecida, e foi analisado a dependência dos ângulos de contato de avanço e recuo com essa aspereza. O número n é a quantidade de vezes de aquecimento do substrato.

Figura 3.5: Ângulo de contato de avanço e recuo.



Fonte: Gennes, 1985 [38]

A medida que a rugosidade aumenta, nota-se pequenas variações no ângulo de contato, juntamente com aumento significativo da histerese. Então, ambos os ângulos aumentam fazendo com que a histerese quase desapareça [37]. Isso indica que texturizar uma superfície sólida além de modificar a histerese pode alterar drasticamente o valor médio do ângulo de contato.

Um modelo fenomenológico proposto por Wenzel [37], busca compreender como a rugosidade afeta a molhagem. Considerando um sólido rugoso, esse modelo relaciona o ângulo de contato com a rugosidade dessa superfície através de um parâmetro de rugosidade $r = A_r/A_s$, sendo definido como a razão entre a área superficial real e a aparente [37]. O avanço da linha de contato implica na variação da densidade de energia (por unidade de comprimento da linha de contato), dada por:

$$dE = r(\gamma_{SL} - \gamma_{SG})dx + \gamma_{LG}dx \cos(\theta_{ap}), \quad (3.9)$$

E é mínimo no equilíbrio e θ_{ap} é o ângulo de contato aparente [37]. Para uma superfície lisa, $r=1$, deduz-se a equação de Young (eq.(3.1) a partir da eq.(3.9)). Para superfícies rugosas, deduz-se a relação de Wenzel:

$$\cos(\theta_{ap}) = r \cos(\theta_e) \quad (3.10)$$

A presença de rugosidade em uma superfície plana pode acentuar sua característica hidrofóbica ou hidrofílica. Por exemplo, se um material liso e plano apresenta ângulo de contato menor (maior) que 90° , com a inserção da rugosidade esse ângulo irá ficar ainda menor (maior). Portanto, a rugosidade intensifica a hidrofobicidade ou hidroflicidade da superfície sólida.

Em filmes de molhagem, as interações intermoleculares não devem ser negligenciadas. As interações de Van der Waals por exemplo, frequentemente favorecem a formação de filmes mais espessos que o comprimento de uma molécula líquida (a). O pontencial intermolecular relacionado a essas interações pode ser escrito (por área) como $W(h) = -A/12\pi h^2$, onde h é a espessura do filme e A é a constante de Hamaker do sistema [37]. Enquanto as interações de Van der Waals favorecem filmes mais espessos, a tensão superficial opõe-se a isso e propicia a formação de um filme suave, com menor área superficial e minimizando a energia do sistema.

A equação de Wenzel (eq.(3.10)) apresenta algumas limitações, como o fato de descrever bem apenas os fenômenos nos quais o fluido preenche todos as microestruturas da superfície (Figura 3.6). No entanto, há situações em que formam-se bolhas de ar entre o fluido e a superfície sólida, implicando no aumento do ângulo de contato proporcional a quantidade de ar presa entre o sólido e o líquido. Há um limite até onde o ângulo de contato pode crescer nessa situação, esse efeito leva o nome de Lottus [40] e é usado em multiplas aplicações na indústria.

Para a situação em que há ar entre o fluido e superfície sólida, deve-se recorrer a equação proposta por Cassie-Baxter [41], que descreve o ângulo de contato nesse contexto. Assim, quando uma superfície sólida tem uma fração de sua área (f) molhada, e o fluido não consegue preencher todas as vacâncias, o ângulo de contato com a superfície é expressa por:

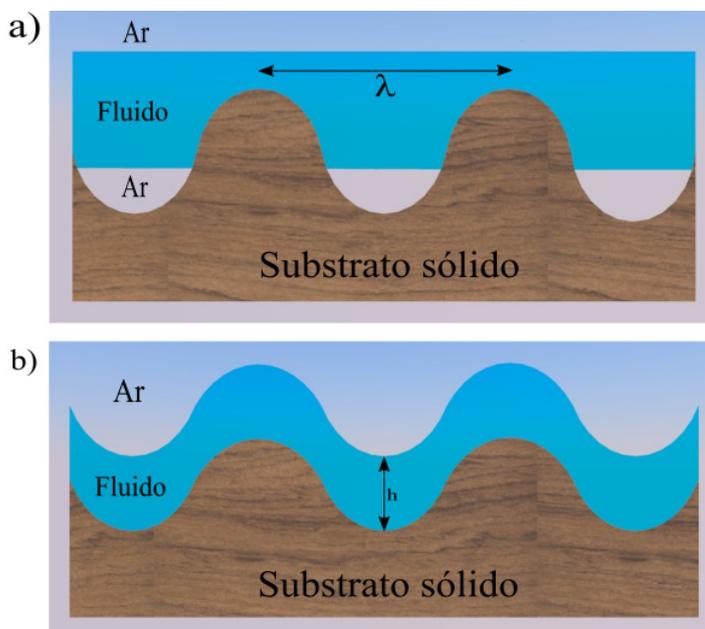
$$\cos \theta_{ap} = f \cos \theta + (1 - f) \cos 180^\circ = f \cos \theta + f - 1. \quad (3.11)$$

Onde θ é o ângulo de contato da superfície e θ_{ap} é o ângulo de contato aparente. O termo $(1 - f)$ corresponde a contribuição do ar que está preso. Como já mencionado antes, o aumento da rugosidade acentua características hidrofóbicas (ou hidrofílicas) das superfícies, mas alguns estudos realizados por Johnson Jr. e Dettre [41] demonstraram que com o aumento da rugosidade, a histerese também aumenta em sistemas onde o modelo de Wenzel é dominante. Demonstraram também que a histerese cresce até ultrapassar um limiar de rugosidade, a partir do qual começa a decrescer. Esse decaimento da histerese é devido a fração de ar entre as interfaces líquido/sólido.

Com a informação do comprimento λ (comprimento entre as vacâncias), e do parâ-

metro $\xi = h^2/a$ é possível prever a modulação do líquido em contato com uma superfície rugosa. Se $\lambda > \xi$, o fluido segue a rugosidade da superfície. Por outro lado, se $\lambda < \xi$, a superfície do fluido é plana, ver Figura 3.6.

Figura 3.6: superfícies com a) $\lambda < \xi$ e b) $\lambda > \xi$.



Fonte: Autor, 2018

Comumente o comprimento de ξ pode ser entre $10nm$, para $h = 1nm$, e $100\mu m$ para $h = 100nm$. Portanto, tornar uma superfície hidrofóbica, enquanto mantém a rugosidade, deve-se tornar h da ordem de $1nm$ [37]. No presente trabalho o único modelo teórico utilizado é a teoria cinético molecular, e as equações provindas desta. Na próxima seção será abordado tal modelo teórico, pois este conhecimento será necessário para entender os resultados das medidas de molhagem.

3.2 Teoria Cinético molecular

Nos últimos duzentos anos tem crescido o interesse acadêmico no fenômeno de molhagem, e mais recentemente, na dinâmica desse processo [42]. Embora os fundamentos de molhagem no equilíbrio já tenham sido bem explorados, a dinâmica de molhagem, que apresenta uma particular importância em diversas aplicações práticas, ainda não foi totalmente compreendida [43]. Nesse contexto, algumas teorias foram desenvolvidas a fim de prever o comportamento experimental da molhagem de superfícies. Na literatura os modelos teóricos mais conhecidos na descrição desse processo, são: hidrodinâmico, cinético-molecular e um combinado hidrodinâmico-molecular.

No modelo hidrodinâmico, desenvolvido por Cox [44], a dinâmica de molhagem é

dominada pela dissipação viscosa do líquido, assumindo que a fricção viscosa é a principal força de resistência do movimento da linha de contato. Esse modelo separa o fluido em duas regiões, interior e exterior. Na região exterior, o limite antederrapante clássico é aplicado, enquanto que na região interior, o deslizamento do fluido ocorre nas primeiras camadas de moléculas adjacentes da superfície sólida [43]. Embora a teoria hidrodinâmica apresente bons resultados nos casos onde o fluido espalha-se rapidamente ou apresente baixa viscosidade, ela não leva em consideração as características da superfície sólida, com a qual o fluido está interagindo.

Contrastando com o modelo hidrodinâmico, a teoria cinético molecular considera as características microscópicas da superfície sólida, deixando de lado a dissipação viscosa. Criada em 1969 por Blake e Haynes [45], o modelo cinético molecular é baseado no tratamento estatístico de Eyring de processo de transporte [46], e assume que a dissipação de energia ocorre somente pelo movimento da linha de contato seguindo os processos de adsorção e dessorção [43]. Embora esse modelo apresente boa concordância com os dados experimentais para espalhamentos de fluidos viscosos de baixa ou média velocidade, o mesmo não consegue explicar possíveis assimetrias entre os ângulos de avanço e recuo.

Os modelos hidrodinâmico e cinético molecular são duas formas distintas de explicar a dinâmica do fenômeno de molhagem, e em muitas situações nenhum dos modelos abarca todas as velocidades do espalhamento de fluido. Assim, uma abordagem da combinação hidrodinâmica-molecular foi proposta em 1992, por Petrov [47]. Nesse modelo, a dependência da velocidade da linha de contato com o ângulo de contato é devido há uma combinação de dissipação viscosa com deslocamento molecular. O modelo hidrodinâmico-molecular ajusta-se bem nos diversos alcances de velocidade da linha de contato, e consegue explicar o porque da assimetria entre ângulos de avanço e recuo, porém, os valores obtidos diferem um pouco dos valores observados experimentalmente [40].

Como o fluido usado nos experimentos do presente trabalho foi o glicerol ($\gamma = 64mJ/m^2$, $\rho = 1,261g/cm^3$ e $\eta = 0,945Pa \cdot s$) que apresenta alta viscosidade e espalha-se a baixas velocidades sobre substratos sólidos, será usada a teoria cinético molecular para fazer os ajustes teóricos necessários. Daqui em diante, será feita um explanação mais detalhada dessa teoria.

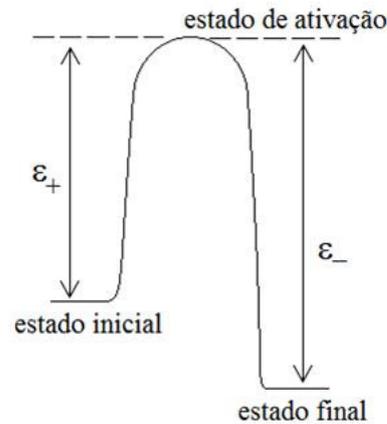
A teoria cinético molecular proposta por Blake, e mais tarde estendida por Blake e De Coninck [48], vem sendo aprimorada a fim de levar em conta os efeitos da viscosidade no fenômeno de molhagem. Nessa teoria, o movimento da linha de contato é devido a dinâmica coletiva de moléculas individuais que ocorrem nas vizinhanças da linha de contato, que para deslocar-se em uma certa direção as moléculas de um fluido devem empurrar (ou serem empurradas) as moléculas de um outro fluido, na qual estão imersas (de modo geral esse fluido é o ar). A formulação do vínculo entre essa atividade molecular e o fluxo macroscópico do fluido é o que a teoria cinético molecular fornece, e que permite relacionar os parâmetros que definem a velocidade da linha de contato com a variação do

ângulo de contato com o tempo.

Consideremos, para efeitos de análise, um fluido viscoso espalhando-se em uma superfície sólida plana, ambos imersos em um meio gasoso. A superfície sólida é composta por n sítios idênticos por unidade de área, nos quais as moléculas podem ser adsorvidas. A linha de contato desloca-se com uma velocidade v , e o ângulo de contato tem uma dinâmica do tipo $\theta = \theta(v)$ tal que $\theta > \theta_0$, onde θ_0 é o ângulo de contato de equilíbrio e é obtido após constatar-se a estagnação do movimento da linha de contato. Assim, de acordo com a teoria, a velocidade da linha de contato irá depender da distância entre os sítios λ que podem adsorver as moléculas do fluido, e a frequência K com que essas moléculas trocam de sítios.

Se a linha de contato move-se de modo a reduzir o valor de θ , as moléculas do fluido superarão uma barreira de potencial (ver Figura 3.7) afim de deslocarem-se de um sítio para outro. Nesse movimento, podem ser constatados movimentos das moléculas tanto para frente quanto para trás. No contexto da Figura, ε_+ representa a diferença de energia entre os estado inicial e o estado ativado, e ε_- é a diferença entre o estado final e o ativado. A partir da estatística de Boltzmann, uma vez que é um sistema de dois níveis, é possível determinar a probabilidade de encontrar as moléculas em um dado estado de energia, ε_+ ou ε_- [40]:

Figura 3.7: Ângulo de contato de avanço e recuo.



Fonte: Praxedes, 2015 [40]

$$p_+ = \exp\left(\frac{\varepsilon_+}{kT}\right), \quad (3.12)$$

$$p_- = \exp\left(\frac{\varepsilon_-}{kT}\right). \quad (3.13)$$

Onde p_+ é a probabilidade do sistema ser encontrado com energia ε_+ , p_- a probabilidade de ser encontrado com energia ε_- , k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

Essa situação é análoga ao de uma partícula em um poço de potencial, que neste caso, ε_+ e ε_- corresponde aos valores esperados do hamiltoniano, cuja as soluções de ψ na função de onda são dadas por:

$$\frac{h^2}{8\pi m_i} \left(\frac{\partial^2 \psi}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z_i^2} \right) + (E - V)\psi = 0, \quad (3.14)$$

onde h é a constante de Plank, m_i é massa da partícula, E é a energia e V é o potencial.

Sendo o poço de potencial com geometria cúbica de lado L , e submetido a potencial nulo $V = 0$, os valores esperados de energia são,

$$\varepsilon_n = \frac{h^2}{8\pi m L^2} (n_x^2 + n_y^2 + n_z^2) \quad (3.15)$$

onde n é um número inteiro [40, 46]. No caso unidimensional, onde o poço tem largura L , os valores de energia podem ser escritos como,

$$\varepsilon_n = \frac{h^2 n^2}{2\pi m L^2}. \quad (3.16)$$

Para o problema de deslocamento da linha de contato em uma superfície sólida, o poço de potencial é uma boa aproximação para descrever as variações nos níveis de energia. Como para tal deslocamento há um número elevado de partículas, um tratamento estatístico faz-se necessário. Como já mencionado, para que uma molécula do fluido avance, ela terá que deslocar uma molécula do gás no qual está imerso, movendo a linha de contato que delimita dois regimes distintos de adsorção. K_+ é o número de vezes em uma unidade de tempo ao longo de uma unidade de comprimento com que as moléculas do fluido descolam-se para frente. Assim, a partir da aplicação do tratamento estatístico de Eyring [45], a taxa de variação para o estado com energia ε_+ é dada por,

$$K_+ = \left(\frac{kT}{h} \right) \frac{Z^*}{Z_+} \exp \left(\frac{-\varepsilon_+}{kT} \right). \quad (3.17)$$

Onde Z^* é a função partição das partículas no estado ativado, Z_+ é a função partição dos estados com energia ε_+ . Para a situação em que as moléculas do líquido deslocam-se na direção inversa, a taxa de variação K_- para o estado com energia ε_- , é escrita de forma análoga a anterior:

$$K_- = \left(\frac{kT}{h} \right) \frac{Z^*}{Z_-} \exp \left(\frac{-\varepsilon_-}{kT} \right). \quad (3.18)$$

Quando o sistema encontra-se em equilíbrio, ou seja, a linha de contato para de mover-se, a taxa líquida K_{liq} de permuta entre os estados é zero:

$$K_{liq} = K_+ - K_- = 0 \quad \rightarrow \quad K_+ = K_- \quad (3.19)$$

Então, a partir das equações (3.17) e (3.18), tem-se que:

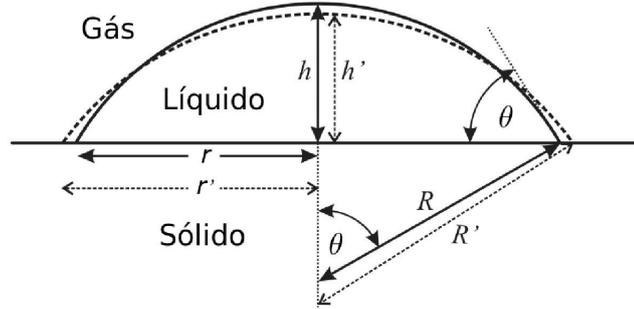
$$\frac{K_-}{K_+} = \exp\left(\frac{\varepsilon_+ - \varepsilon_-}{kT}\right) \quad (3.20)$$

Supondo que a gota tenha um formato de calota esférica com raio r , e que a gota seja pequena de modo que a contribuição da gravidade possa ser ignorada, a partir da equação de Young-Laplace, obtém-se a diferença de pressão da gota em movimento, dada por:

$$\Delta p = \frac{2\gamma_{LG} \cos \theta}{r}. \quad (3.21)$$

Onde γ_{LG} é a tensão superficial na interface gás/fluido, r é o raio da gota e θ é o ângulo de contato dinâmico. No equilíbrio, tem-se a mesma condição para a diferença de pressão, logo,

Figura 3.8: Gota espalhando-se em um substrato sólido. θ é o ângulo de contato.



Fonte: Butt et al., 2003 [49]

$$\Delta p^0 = \frac{2\gamma_{LG} \cos \theta_0}{r}, \quad (3.22)$$

onde θ_0 é o ângulo de contato no equilíbrio. De modo geral, $\theta \neq \theta_0$.

A diferença entre os valores da pressão $\Delta p - \Delta p^0$ fornece a medida do trabalho necessário para mover a linha de contato em velocidade finita. Nesse movimento, as funções partição Z_+ e Z_- não se alteram uma vez que considera-se o fluido incompressível. O que acontece é uma alteração nas barreiras de energia, ε_+ e ε_- , enquanto uma aumenta a outra diminui, e vice e versa. Disto resulta o deslocamento da linha de contato em uma direção preferencial. Portanto, o trabalho feito por unidade de deslocamento da linha de contato é dado por:

$$W = \gamma_{LG}(\cos \theta_0 - \cos \theta) \quad (3.23)$$

Se o trabalho é usado para aumentar ou diminuir os valores das energias ε_+ e ε_- , então,

$$W = n\delta w, \quad (3.24)$$

onde n é o número de sítios afetados na interface sólido/fluido, por unidade de área, e δw é o trabalho realizado em cada sítio, isso implica que o trabalho feito em cada sítio independe do mesmo está ocupado por uma molécula do gás. Se W é positivo, as barreiras de energia ε_+ e ε_- serão, respectivamente, reduzida e aumentada por uma quantidade de W/n . Assim, no deslocamento da linha de contato, a taxa líquida de transições entre os estados inicial e final será:

$$\begin{aligned} K_{liq} &= \left(\frac{kT}{h}\right) \left[\frac{Z^*}{Z_+} \exp\left(\frac{W - n\varepsilon_+}{nkT}\right) - \frac{Z^*}{Z_-} \exp\left(\frac{-W - n\varepsilon_-}{nkT}\right) \right] \\ &= K_+ \exp\left(\frac{W}{kT}\right) - K_- \exp\left(\frac{-W}{kT}\right) \end{aligned} \quad (3.25)$$

Se a linha de contato avançar, ou seja, o movimento reduz o ângulo de contato, a energia será $\varepsilon_+ - W/n$, na situação contrária, a energia será $\varepsilon_- + W/n$. Ao chegar-se ao equilíbrio, $K_+ = K_- = K_W$, então:

$$\varepsilon_+ = \varepsilon_- = \Delta g_S. \quad (3.26)$$

E conseqüentemente,

$$K_W = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{-\Delta g_S}{nkT}\right), \quad (3.27)$$

onde Δg_S é a densidade superficial de energia de interção do fluido com a superfície sólida por unidade de área. Além disso, a partir da equação (3.27), tem-se também que:

$$\begin{aligned} K_{liq} &= K_W \left[\exp\left(\frac{W}{kT}\right) - \exp\left(\frac{-W}{kT}\right) \right] \\ &= 2K_W \sinh\left(\frac{W}{2nkT}\right). \end{aligned} \quad (3.28)$$

Onde k e T são, respectivamente, a constante de Boltzmann e a temperatura.

Portanto, de acordo com a teoria cinético molecular, a velocidade da linha de contato levando em consideração a equação anterior, será:

$$v = \lambda K_{liq} = 2\lambda K_W \sinh\left(\frac{W}{2nkT}\right), \quad (3.29)$$

onde λ é a distância média entre os sítios de adsorção/desorção e n a densidades de sítios por unidade de área. Substituindo a equação (3.23) em (3.29) tem-se,

$$v = 2\lambda K_W \sinh\left[\frac{\gamma_{LG}(\cos\theta_0 - \cos\theta)}{2nkT}\right]. \quad (3.30)$$

Se os sítios de adsorção forem uniformemente distribuídos, tem-se que $\lambda = (n)^{-1/2}$.

A equação (3.30) descreve satisfatoriamente o fenômeno de molhagem para fluidos que apresentem baixa viscosidade, onde a energia de molhagem será $\Delta G_W = \Delta G_S$, uma vez que a única contribuição para a energia livre ΔG_W é a de interação entre fluido e a superfície sólida. A partir dessa equação, também é possível obter os parâmetros livres da teoria, n , a densidade de sítios, e a densidade de energia por unidade de área $\Delta g_S = \frac{\Delta G_W \cdot n}{N}$, com N sendo o número de Avogadro. Por outro lado, a equação (3.30) é limitada por não leva em consideração os efeitos da viscosidade do fluido η_L , que afeta diretamente a dinâmica de molhagem. Afim de suprir essa necessidade, a teoria cinético molecular deve ser modificada uma vez que a dissipação viscosa tende a conduzir mais rapidamente o ângulo de contato para um estado de relaxamento. Portanto, a influência da viscosidade pode ser considerada se entendermos a densidade de energia livre ΔG_W , como a superposição das contribuições da superfície ΔG_S e da viscosidade ΔG_V :

$$\Delta G_W = \Delta G_S + \Delta G_V. \quad (3.31)$$

Qualquer outro tipo de dissipação de energia, implicará na adição de mais um termo em (3.31). Com isso, permitimos que as moléculas do fluido tenham seus movimentos limitados não somente pelas barreiras de energia da interação com a superfície, mas também pela interação viscosa com as moléculas vizinhas. Assim, de acordo com a teoria de Eyring, a viscosidade está relacionada com a energia de dissipação viscosa por:

$$\eta_L = \frac{h}{\nu_L} \exp\left(\frac{\Delta G_V}{NkT}\right). \quad (3.32)$$

Onde η_L é a viscosidade e ν_L é o volume de uma molécula líquida ($\nu_L = M_L/N\rho_L$, onde M_L é a massa molar, ρ_L é densidade de massa do fluido). Combinando as equações (3.27), (3.31) e (3.32) e definindo,

$$k_S = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta g_S}{NkT}\right). \quad (3.33)$$

Obtem-se,

$$K_W = \frac{kT}{\eta_L \nu_L} \exp\left(\frac{-\Delta G_S}{NkT}\right) = \frac{kT}{h} \left(\frac{-\Delta g_S}{nkT}\right) = k_S \left(\frac{h}{\eta_L \nu_L}\right) \quad (3.34)$$

Substituindo o resultado (3.34) na equação (3.30), chegar-se-á a expressão que descreve a velocidade da linha de contato com dependência do ângulo de contato, que considera explicitamente, a viscosidade do fluido. A expressão é dada por [48]:

$$v = \frac{2\lambda k_S h}{\eta_L \nu_L} \sinh\left[\frac{\gamma_{LG}(\cos \theta_0 - \cos \theta)}{2nkT}\right] \quad (3.35)$$

A equação acima descreve bem as medidas de espalhamento de fluidos em superfícies

sólidas, como também, permite explicar os efeitos da viscosidade e assim isolar a influência da interação entre o fluido e sólido. A relação entre a taxa de variação temporal do ângulo de contato com a velocidade da linha de contato pode ser obtida geometricamente a partir do formato apresentado pela gota, que pode variar entre formato de calota esférica, semi-esférica ou semi-elipsoidal.

Considerando uma gota com volume pequeno, a influência da gravidade pode ser negligenciada, e assim tem-se uma gota com formato de calota esférica. Essa geometria de gota pode ser caracterizado pela seguinte relação [50]:

$$r = \left[\frac{3V}{\pi} \frac{\text{sen}^3\theta}{(2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta)} \right]^{1/3}. \quad (3.36)$$

Onde r é o raio da base, V é o volume da gota e θ é o ângulo de contato instantâneo. Assumindo que o volume mantém-se constante, ou seja, não há evaporação. Então derivando equação (3.36) em relação ao tempo, tem-se:

$$\frac{\partial r}{\partial t} = -\frac{\partial \theta}{\partial t} \left(\frac{3V}{\pi} \right)^{1/3} \frac{(1 - \cos\theta)^2}{(2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta)^{4/3}} \quad (3.37)$$

Sabendo que a variação de r se dá pelo deslocamento da linha de contato, então, igualando as equações (3.37) e (3.35), tem-se:

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = -\left(\frac{\pi}{3V} \right)^{1/3} \frac{2\lambda k_S h (2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta)^{4/3}}{\eta_L \nu_L (1 - \cos\theta)^2} \text{senh} \left[\frac{\gamma_{LG}}{2nkT} (\cos\theta_0 - \cos\theta) \right] \quad (3.38)$$

Reescrevendo a equação (3.38), tem-se,

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = -a_0 \frac{(2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta)^{4/3}}{(1 - \cos\theta)^2} \text{senh} [a_1 (\cos\theta_0 - \cos\theta)]. \quad (3.39)$$

Onde,

$$\begin{aligned} a_0 &= \left(\frac{\pi}{3V} \right)^{1/3} \frac{2\lambda k_S h}{\eta_L \nu_L} \\ a_1 &= \frac{\gamma_{LG}}{2nkT} \end{aligned} \quad (3.40)$$

A partir da solução da equação (3.39), é possível fazer o ajuste do modelo teórico aos dados experimentais. Os valores de a_0 e a_1 podem ser determinados por meio do ajuste da curva dos dados experimentais, determinando assim os valores dos parâmetros livres: a densidade de sítios n de adsorção da superfície sólida e a frequência k_S . Isso é possível uma vez que os demais parâmetros podem ser determinados a partir de alguma outra técnica experimental ou das informações do fluido usado: a tensão superficial γ_{LG} é medida usando técnica de gota pendente; o ângulo de equilíbrio θ_0 , é obtido da medição feita em

uma gota após um longo período de tempo; e a distância média entre os sítios λ , como já mencionado, é dada por $\lambda = 1/\sqrt{n}$. O modelo cinético molecular afirma que o desvio sistemático do ângulo de contato dinâmico em relação ao seu valor de equilíbrio reflete quantitativamente a dissipação de energia local (fricção) na linha de contato móvel, ao atravessar os sítios de interação de fluido/sólido. Particularmente, prevê que o coeficiente de fricção da linha de contato ζ seja proporcional à viscosidade do fluido η_L e exponencialmente dependente das interações sólido-líquido, conforme medido pelo trabalho [42]. O coeficiente de fricção é dado por:

$$\zeta = \frac{\eta_L \nu_L}{\lambda^3} \exp\left(\frac{\Delta g_S}{nkT}\right). \quad (3.41)$$

A teoria cinético molecular apresenta resultados em boa concordância com os dados experimentais, encontrando valores para λ e k_S muito próximos dos obtidos por técnicas experimentais mais avançadas. Diversas publicações demonstram a validade da teoria. Em um artigo feito por Damien Duvivier, Terence D. Blake e Joel De Coninck [42], são analisados mais de vinte publicações com dados da dinâmica de molhagem, as informações extraídas confirmam algumas das previsões da teoria. Na literatura há muitos trabalhos com o mesmo objetivo, ou até mesmo fazendo comparações entre a teoria cinético molecular e outros modelos distintos [43].

MATERIAS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Materiais

Nesta seção, será descrito detalhes dos peptídeos penetrantes em células usados no presente trabalho. Serão apresentados ainda os métodos utilizados para preparação das amostras. Diversas publicações descrevem esses peptídeos, e embora em algumas situações ainda não haja uma compreensão completa dos mecanismos de penetração celular, muitas das suas principais propriedades são conhecidas.

4.1.1 Peptídeo Penetratina

O peptídeo penetratina, cuja a sequência de aminoácidos é representada por RQI-KIWFQNRMRMKWKKK, faz parte da família dos peptídeos derivados de proteínas, e como descrito por Prochiantz e Joliot [51] é derivado de uma homoproteína¹ (homoproteína de *Drosophila*), da Antennapedia. A penetratina, como já mencionado antes, pode ser internalizada tanto em 4 °C quanto em 37 °C, e tem acesso ao núcleo e ao citoplasma [15]. Estudos sugerem a presença de uma sequência de translocação celular na terceira hélice do homeodomínio da Antennapedia [52]. Nesse peptídeo, há a presença de resíduos hidrofóbicos, em particular o tripofano, que desempenham papel crucial no processo de translocação, e nas extremidades de sua sequência de aminoácidos estão presentes os aminoácidos polares argenina e lisina. Na Tabela 4.1 há informações sobre os resíduos aminoácidos que compõem esse peptídeo, bem como suas respectivas polaridades. Análises de mutação indicaram também a importância das propriedades eletrostáticas nesse processo. Muitos autores sugerem que deva existir um equilíbrio sutil entre as propriedades eletrostáticas e hidrofóbicas da penetratina para ocorrer sua translocação [51].

A penetratina é um dos peptídeos mais comuns na literatura. Diversos trabalhos demonstram sua eficiência no processo de entrega de fármacos ou moléculas biologicamente ativas, como no artigo de Weiyue Lu e co-autores [2]. Eles demonstraram a eficiência da penetratina para a entrega de drogas intra-oculares, pois esse tecido apresenta uma

¹Homoproteínas são as proteínas compostas apenas por aminoácidos.

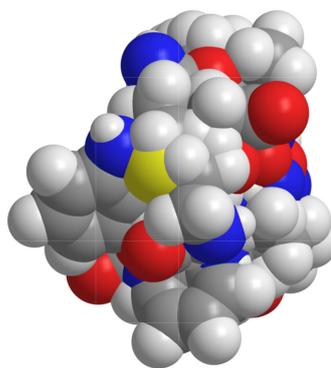
resistência natural a absorção de diversas substâncias.

Tabela 4.1: Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo penetratina quanto a polaridade.

Penetratina		
Letra de identificação	Nome	Polaridade
R	Arginina	Polar
Q	Glutamina	Polar
I	Isoleucina	Apolar
K	Lisina	Polar
W	Tripofano	Apolar
F	Fenilalanina	Apolar
N	Asparagina	Polar
M	Metionina	Apolar

Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Figura 4.1: Estrutura molecular da Penetratina



RQIKIWFQNRMRMKWKK

Fonte: Autor, 2018

4.1.2 Peptídeo TAT

Um peptídeo rico em arginina² [53], o TAT (48-60), que possui sequência de aminoácidos GRKKRRQRRRPPQ, é derivado do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 Tat. Como a penetratina, faz parte da família dos peptídeos oriundos de proteínas, especificamente da proteína Tat trans-ativadora, que é uma reguladora viral fundamental para a replicação do HIV-1 [54]. A proteína Tat é organizada em três diferentes grupos funcionais: Uma região N-terminal importante para trans-ativação; uma região de ligação ao

²Arginina (R) é um aminoácido polar básico

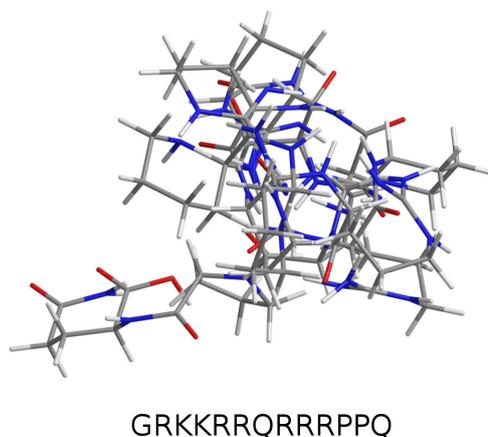
DNA rica em cisteína (22-37 aminoácidos); e uma região básica (48-60 aminoácidos) [15]. O N-terminal que contém a região básica é suficiente para o processo de translocação, e mostra localização celular e nuclear, uma vez que o TAT consegue trafegar pelo citoplasma e núcleo. A Tabela 4.2 trás informações sobre os resíduos aminoácidos do TAT. A absorção do Tat depende da concentração e da temperatura, podendo ser parcialmente inibida por baixas temperaturas [15]. TAT transloca-se com facilidade através das membranas celulares e é utilizado como transportador de macromoléculas, como proteínas e oligoDNAs. O primeiro exemplo do possível uso terapêutico da transdução de proteína mediada por TAT data de 1994, quando foi demonstrado a entrega de proteínas de fusão por conjugação ao domínio de transdução do TAT e outros domínios de transdução de proteína [15].

Tabela 4.2: Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo TAT analisado, quanto a polaridade.

TAT		
Letra de identificação	Nome	Polaridade
G	Glicina	Apolar
R	Arginina	Polar
K	Lisina	Polar
Q	Glutamina	Polar
P	Prolina	Apolar

Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Figura 4.2: Estrutura molecular da TAT



Fonte: Autor, 2018

4.1.3 Peptídeo SV40

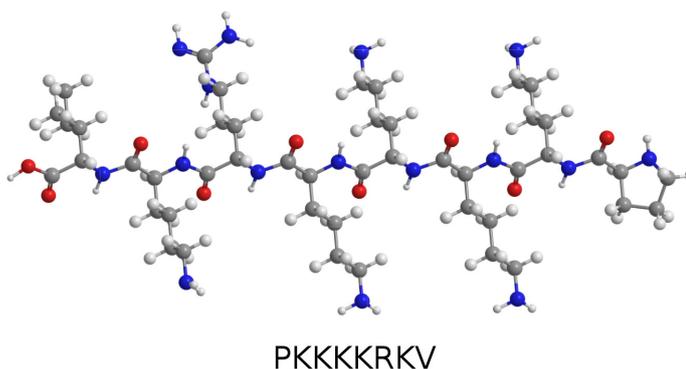
O SV40 (Vírus símios 40) é comumente propagado em linhagens celulares derivadas do macaco verde africano [55]. O SV40 vem sendo extensivamente usado em estudos que visam compreender como as drogas anticancerígenas e os carcinogênicos interrompem a replicação do DNA nas células de mamíferos [56]. O SV40 faz uso de vários mecanismos celulares para realizar diversas etapas na infecção viral. Demonstrou-se que esse peptídeo é uma poderosa sonda na análise de transcrição molecular, replicação de DNA e controle de crescimento. A sequência de aminoácidos PKKKRKV reduzida do SV40, que é usada no presente trabalho, pode atuar como um sinal de localização nuclear [57]. Na Tabela 4.3 há informações sobre a sequência de resíduos aminoácidos utilizada.

Tabela 4.3: Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo SV40 quanto a polaridade.

SV40		
Letra de identificação	Nome	Polaridade
P	Prolina	Apolar
K	Lisina	Polar
R	Arginina	Polar
V	Valina	Apolar

Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Figura 4.3: Estrutura molecular da SV40



Fonte: Autor, 2018

4.1.4 Peptídeo C105Y

Peptídeo C105Y (com a sequência de aminoácidos CSIPPEVKFNKPFVYLI) é um peptídeo sintético penetrante em célula baseado na sequência de aminoácidos correspondente aos resíduos 359-374 da α 1-antitripsina (α 1-AT) [58]. Este peptídeo foi inicialmente

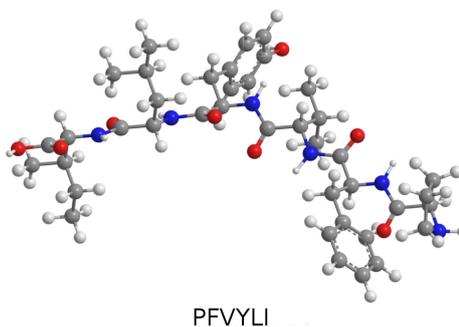
identificado como a extremidade C-terminal da α 1-AT, que poderia mediar a ligação do complexo enzimático de serpin [59]. C105Y é capaz de aumentar a transferência gênica e a expressão gênica *in vitro* e *in vivo*. Com base na capacidade de entrar de forma rápida no citoplasma, núcleo, e nucléolo de células vivas, o peptídeo C105Y foi estudado [59] a fim de determinar quais os mecanismos que possibilitam sua entrada em células. Dentre os diversos fatores que contribuem para esta propriedade, conclui-se que o peptídeo C105Y consegue transpor-se através da sequência hidrofóbica C-terminal (PFVYLI), pois esta mesma sequência de seis aminoácidos pode entrar nas células e localizar núcleos que tenham forma semelhante ao C105Y inteiro. Um peptídeo com ausência dessa sequência não consegue internalizar nas células [59]. A Tabela 4.4 contém informações sobre os seis resíduos aminoácidos utilizados no presente trabalho. O C105Y localiza-se no nucleólo, uma organela responsável pelo processamento do RNA, biogênese do ribossomo, supressão tumoral e replicação viral, o que torna-o ótimo candidato para transportador de cargas com potencial terapêutico [59], e de outras cargas moleculares.

Tabela 4.4: Classificação dos aminoácidos que compõem o peptídeo C105Y quanto a polaridade.

C105Y		
Letra de identificação	Nome	Polaridade
P	Prolina	Apolar
F	Fenilalanina	Apolar
V	Valina	Apolar
Y	Tirosina	Apolar
L	Leucina	Polar
I	Isoleucina	Apolar

Fonte: Cox et al., 2014 [11]

Figura 4.4: Estrutura molecular do C105Y



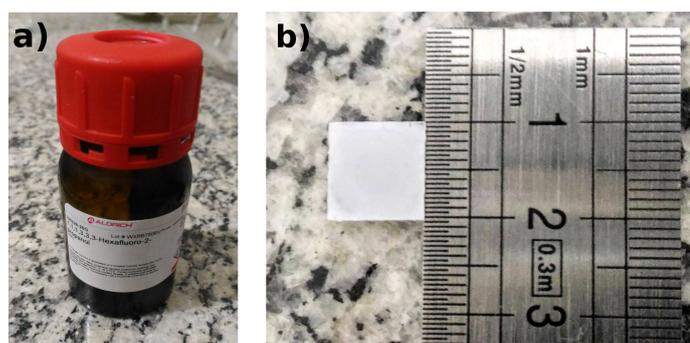
Fonte: Autor, 2018

4.1.5 Preparação das amostras

Todos os peptídeos apresentam-se em pó e todos passaram pelo mesmo processo, que consiste na diluição no solvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), que é um líquido incolor e muito volátil que se caracteriza por um odor forte, obtido da Sigma-Aldrich. A escolha desse solvente se deve ao ótimo resultado apresentado na diluição dos peptídeos, associado a sua alta volatilidade, o que permite produzir filmes de peptídeos sem resquícios de solvente. Após diluídos os peptídeos em uma concentração de 40mg/mL , foi depositado $20\mu\text{L}$ dessa solução em uma mica clivada com dimensões de $10\text{mm}\times 10\text{mm}$. Após completa evaporação do HFIP, tem-se os filmes amorfs com cerca de $0,8\text{mg}$ de peptídeos distribuídos na superfície.

Para o processo de hidratação, os filmes amorfs são expostos a uma atmosfera saturada com vapor de água. Para esse procedimento as micas com os filmes amorfs foram depositadas em uma placa de petri, que por sua vez foi colocada em uma segunda placa contendo água, o conjunto foi selado com papel alumínio afim de que apenas o vapor de água entrasse em contato com o filme peptídico. As placas de petri foram levadas a um forno e mantidas a uma temperatura aproximada de 98°C durante 12 horas. O protocolo de produção dos filmes nanoestruturados foi reproduzido da referência [31]. Todas as amostras foram preparadas no Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Figura 4.5: Imagens do a) HFIP e b) amostra de C105Y depositado sobre mica. As demais amostras apresentam nenhuma coloração.



Fonte: Autor, 2018

4.2 Métodos de análise

Nesta seção serão discutidas as técnicas utilizadas na análise dos filmes amorfs e nanoestruturados. Iniciando com medidas de microscopia de força atômica (AFM) e AFM-IR, com a qual teremos informações topográficas e de absorção de radiação infravermelho das amostras. Além disso, apresentaremos o protocolo utilizado para as medidas

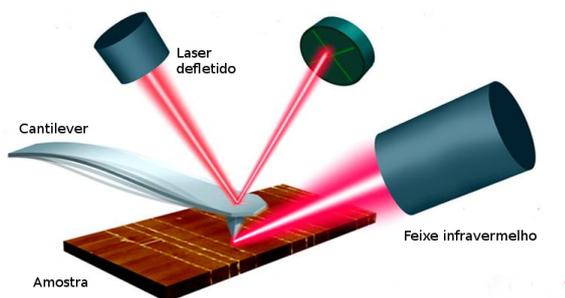
de ângulo de contato, que fornecerá informações sobre a energia de adesão, assim como o protocolo usado nas medidas de dicroísmo circular, que fornecerão informações sobre a conformação das moléculas dos peptídeos.

4.2.1 AFM e AFM-IR

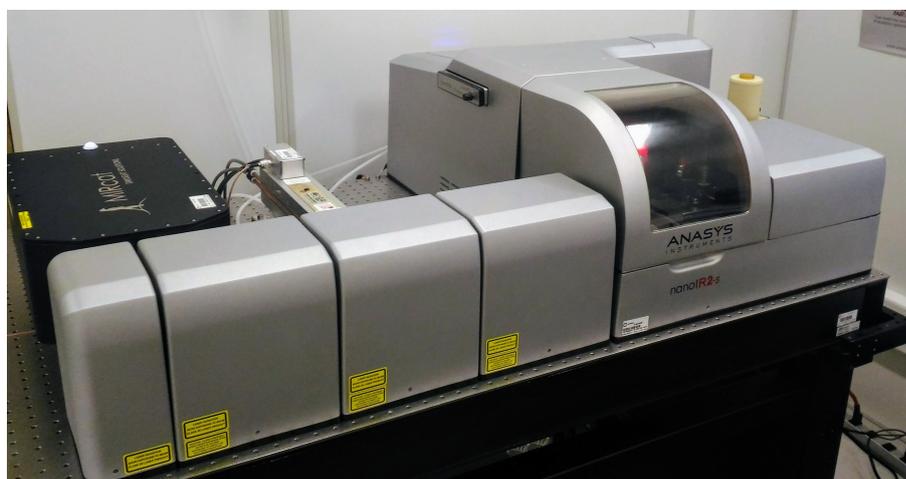
A espectroscopia de força atômica (AFM) tornou-se uma poderosa ferramenta para o estudo de estruturas e mapeamento topográficos em escala nanométrica. Desde a sua criação em 1986, usado inicialmente para sondar a rugosidade atômica de uma superfície, essa técnica vem sendo cada vez mais aperfeiçoada e hoje fornece resultados surpreendentes, e a possibilidade de mover e posicionar com precisão uma ponta foi explorada na fabricação de dispositivos em nanoescala [60]. O funcionamento de equipamento de AFM é baseado no monitoramento das deflexões de um cantiliver, que possui uma ponta em sua extremidade. Essas oscilações são registradas com o auxílio de um computador e, ao varrer a área total da amostra linha por linha, obtém-se informações do relevo numa escala nanométrica. As deflexões no cantiliver são devido a forças de interação entre a ponta e a superfície, que são de modo geral de natureza eletrostáticas. No entanto, há outros fatores que contribuem.

A espectroscopia de infravermelho baseada na microscopia de força atômica (AFM-IR), se desenvolveu de maneira relativamente rápida e fornece a análise química e o mapeamento da composição do substrato em análise, combinado com a resolução espacial do AFM [61]. Individualmente essas técnicas são muito úteis em diferentes campos de pesquisa, mas combinadas elas conseguem superar algumas limitações que ambas apresentam. O funcionamento do AFM-IR (Figura 4.6) consiste em um laser infravermelho focalizado numa região da amostra próxima à ponteira do cantiliver do AFM. Ajustando o feixe de luz para um comprimento de onda que seja absorvido pela amostra, uma medida de AFM consegue detectar essa absorção. A absorção da radiação IR é convertida em calor provocando um rápido pulso de expansão térmica sob a ponteira do AFM, induzindo uma oscilação ressonante no cantiliver. A partir dessa resposta, é possível relacionar essa oscilação com o comprimento de onda absorvido e assim, criar espectros de absorção do infravermelho de regiões nanométricas [62].

Neste trabalho foram realizadas medidas tanto de AFM quanto de AFM-IR. As medidas de AFM-IR foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp - SP), usando o espectrômetro infravermelho baseado em AFM da Anasys Instruments, modelo nanoIR-s, mostrado na Figura 4.7. Para essas medidas, os peptídeos foram depositados em substrato de ouro, pois esse material otimiza a difusão de calor. As medidas de AFM foram efetuadas também na Unicamp, mas para estas, os substratos utilizados foram as micas.

Figura 4.6: Esquema de funcionamento do AFM-IR

Fonte: Anasys Instruments [62]

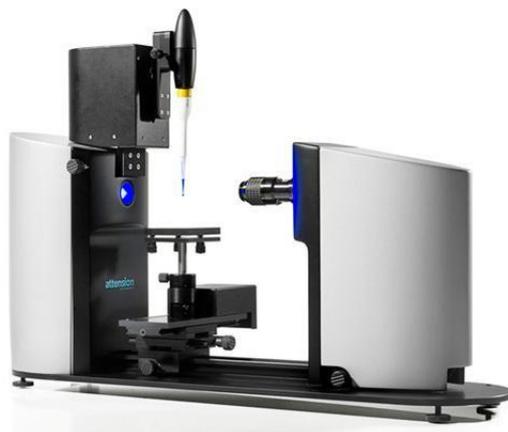
Figura 4.7: Espectrômetro infravermelho baseado em AFM da Anasys Instruments, modelo nanoIR-s. Equipamento pertencente à Unicamp.

Fonte: Autor, 2018

4.2.2 Tensiometria óptica

As medidas de ângulo de contato foram obtidas pela técnica de tensiometria óptica. Há algumas outras formas de inferir o ângulo de contato como a elevação de um líquido por um capilar e o espalhamento de um fluido sobre uma superfície sólida [63]. A tensiometria óptica mede o perfil da imagem da gota espalhando-se em uma superfície sólida ou líquida, através de um equipamento chamado goniômetro ou tensiômetro, como mostrado na Figura 4.8. Basicamente, um tensiômetro óptico possui uma câmera CCD (charge-coupled device), que faz a captura das imagens da gota e um software para leitura e tratamento dos dados. É necessário também, quando deseja-se obter informações sobre a superfície sólida, conhecer previamente as características do fluido de prova, tais como sua tensão superficial, viscosidade e polaridade.

O software analisa a variação do perfil da gota e o reproduz em uma curva, a qual será usada para determinar o ângulo de contato. O tensiômetro utilizado nos experimentos

Figura 4.8: Tensiometro óptico Theta (Attension Instruments)

Fonte: Attension [64]

foi o tensiômetro óptico Theta (Attension Instruments), que acompanha software próprio para análise dos dados. Com este equipamento é possível realizar dois tipos de experimentos: medidas de ângulo de contato e de gota pendante. Neste último, é possível obter informações sobre a tensão superficial do fluido. Usando o software do equipamento, é possível escolher com precisão o volume da gota do fluido teste, assim como a velocidade de deposição da gota na superfície sólida. A dinâmica de molhagem é então fotografada pela CCD, sendo então analisadas pelo software do equipamento.

Vale salientar que para realizar medidas de ângulo de contato alguns cuidados devem ser tomados, como: a superfície sólida deve está plana, caso contrário efeitos relacionados à gravidade tornam-se relevantes; o fluido deve manter o volume constante, caso ele evapore é necessário um outro tratamento teórico mais adequado (detalhes sobre esse comportamento pode ser visto em [65]); e a superfície deve está limpa e lisa, pois qualquer contaminante ou rugosidade irá induzir histerese do ângulo de contato, prejudicando o resultado.

Tabela 4.5: Propriedades físico-químicas do glicerol

Fórmula química	Massa molecular	Densidade	Viscosidade	Tensão superficial
$C_3H_8O_3$	92,09382 g/mol	1,261 g/cm ³	1,5 Pa · s	64 mN/m

Fonte: Lima et al., [66]

Para a análise do fenômeno de molhagem nos filmes peptídicos foi utilizado 8 μ L de glicerol como fluido teste (ver tabela 4.5). O glicerol foi escolhido como fluido de prova devido a sua alta viscosidade, o que é de particular interesse para quando for utilizada a teoria cinético molecular. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente

(25 °C), e repetidas 10 vezes para cada tipo de peptídeo. O software fez aquisição de imagens do espalhamento do glicerol sobre os filmes peptídicos durante 20 segundos a uma taxa de 60 frames por segundo, tempo suficiente para o completo relaxamento do líquido de prova. Assim, obtivemos a curva do ângulo de contato em função do tempo para cada tipo de peptídeo, tanto na configuração amorfa quanto hidratada.

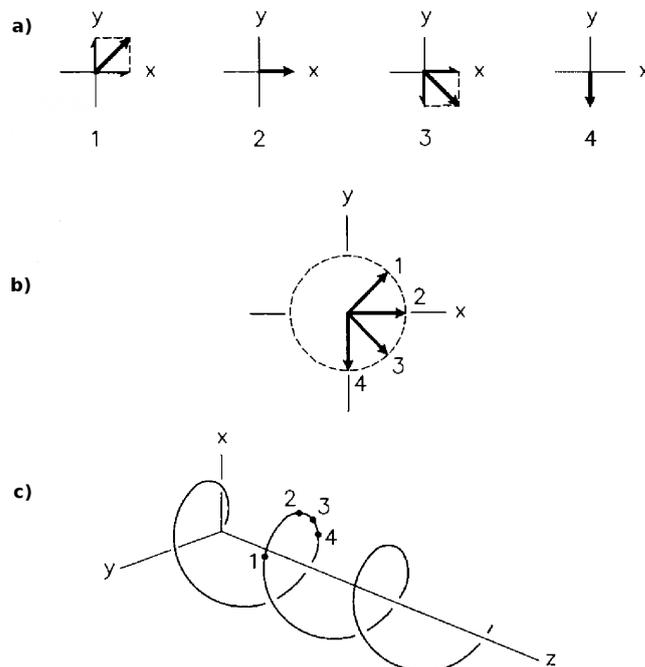
4.2.3 Dicroísmo circular

Com o intuito de conhecer a estrutura conformacional dos peptídeos utilizados nesse estudo, foram realizadas medidas de dicroísmo circular (DC), que é um ótimo recurso para determinação rápida de segunda estrutura e propriedades de dobramento de proteínas. Dicroísmo pode ser definido como a absorção desigual entre a luz polarizada circularmente (ver Figura 4.9) para direita e para esquerda, de maneira que as ondas estão com uma defasagem de 90° [67]. O método de medição de dicroísmo circular usufrui do fato de que quando dois feixes de luz polarizados num plano, mas como sentidos de giros contrários, atravessam um meio dicróico circular, a diferença de absorção das duas componentes circulares converte a luz circularmente polarizada em luz elípticamente polarizada [68]. Quando os vetores do campo elétrico das duas componentes circulares estão na mesma direção, somam-se, gerando o eixo maior, e quando estão contrários subtraem-se gerando o eixo menor da elipse. A razão entre o eixo menor e o maior, que é a tangente de um ângulo α denominado elipticidade, caracteriza o dicroísmo circular. Outra forma de caracterizar o dicroísmo circular é calculando a diferença entre as intensidades das componentes elétricas da luz circularmente polarizada no sentido horário e anti-horário. O dicroísmo circular pode ser utilizado para vislumbrar estruturas desconhecidas, de peptídeos por exemplo, valendo-se do fato que diferentes elementos estruturais possuem espectros de DC característicos. Por exemplo, as proteínas α -helicoidais têm bandas negativas nos comprimentos de onda 222 nm e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm [67]. Na Figura 4.10, tem-se curvas características para os principais elementos estruturais obtidas por Norma Greenfield e Gerald D. Fasman [69].

As medidas de dicroísmo circular apresentadas nesse trabalho foram geradas com o equipamento JASCO 810, no Infar - Unifesp. A Figura 4.11 esquematiza o funcionamento de um equipamento de dicroísmo circular. Para efetuar as medidas é preciso fazer um processo semelhante ao de produção dos filmes peptídicos, mudando apenas o substrato de deposição, que neste caso é feito numa cubeta do equipamento. As medidas foram realizadas entre 180 e 260nm, em passos de 1nm usando 1s por passo. Em todas as amostras foi subtraído o espectro relativo ao ar.

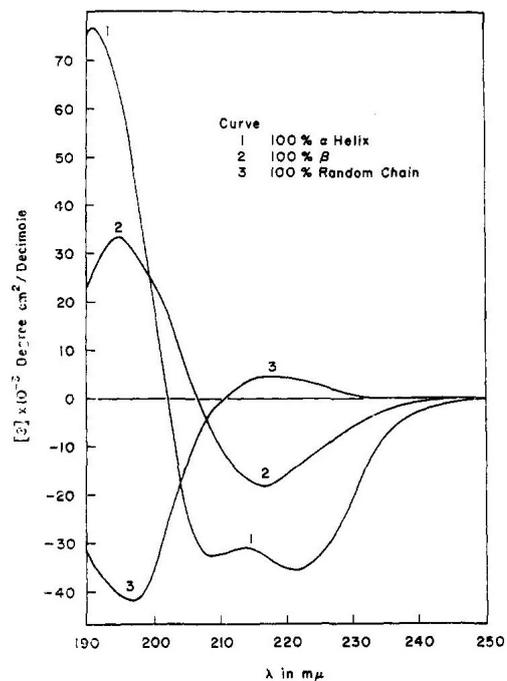
Nos próximos capítulos serão apresentados as medidas realizadas, bem como uma discussão desses resultados. Para com isso, chegar-se a uma conclusão dos efeitos induzidos nas propriedades de molhagem, de filmes formados por peptídeos penetrates em células,

Figura 4.9: Representações da luz circularmente polarizada à direita:



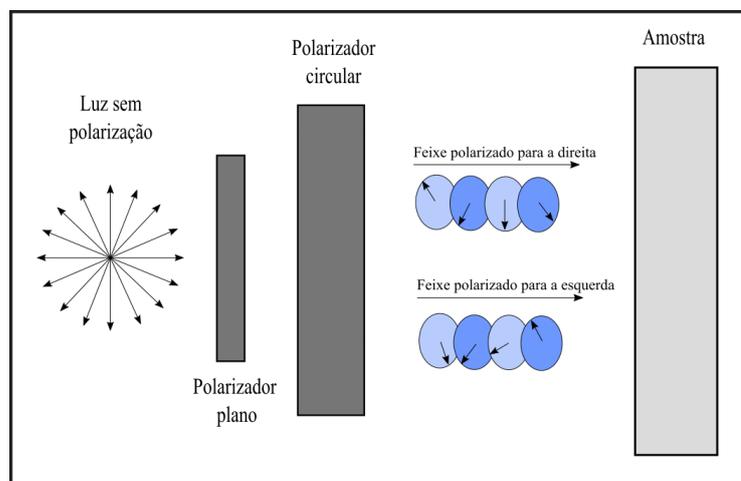
Fonte: Kliger et al., [70]

Figura 4.10: Curvas características dos principais elementos estruturais.



Fonte: Fasman et al., [69]

Figura 4.11: Esquema de funcionamento de um equipamento que mede dicroísmo circular de compostos.



Fonte: Autor, 2018

devido exposição a uma atmosfera saturada com água.

RESULTADOS

No capítulo anterior, foi apresentado os peptídeos utilizados na presente pesquisa, bem como as técnicas que foram utilizadas. Como já mencionado, no fenômeno de molhagem diversos fatores influenciam na dinâmica do ângulo de contato. Apesar dessa dinâmica ser observada macroscopicamente, as características microscópicas contribuem diretamente. Com isso em mente, foram realizadas as medidas AFM para entender como é a superfície dos filmes peptídicos estudados em escala nanoscópica. Embora as particularidades topológicas contribuam consideravelmente na molhagem, as propriedades químicas da superfície sólida também tem grande importância. Pensando nisso, foram realizadas medidas de AFM-IR para conhecer como estão distribuídos os sítios com β -folha.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos, bem como uma discussão destes. Veremos como o processo de exposição a uma atmosfera saturada com água influencia nas propriedades de molhagem de filmes formados por peptídeos, pertencentes à classe PPC¹.

5.1 Medidas de AFM e AFM-IR

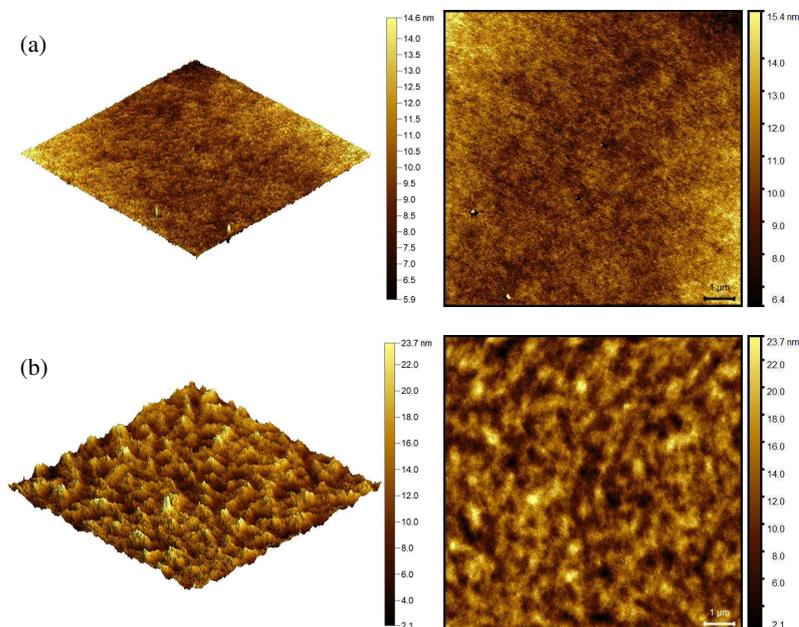
5.1.1 Medidas de AFM

Para entender os efeitos topográficos induzidos pelo processo de hidratação, foram realizadas medidas de microscopia de força atômica (AFM). Na literatura há diversos trabalhos mostrando que a deposição de peptídeos produz alterações morfológicas em superfícies [71] e que o processo de nanoestruturação induz o crescimento de nanofios, nanoflorestas e até aglomerados [31]. Para o caso particular de crescimento de nanoestruturas utilizado no presente trabalho, que consiste na exposição dos filmes peptídicos a uma atmosfera saturada com água, o tempo de incubação influencia diretamente nas estruturas auto-organizadas formadas pelas moléculas sobre o substrato utilizado, a mica. Com base em resultados encontrados na literatura [31], nossas amostras foram expostas a atmosfera saturada com água por 12 horas.

Na Figura 5.1 são exibidas as imagens de AFM para os filmes amorfo e submetidos a atmosfera saturada do peptídeo penetratina. Nota-se que o filme amorfo apresenta baixa rugosidade, com regiões praticamente lisas e picos com alturas máximas de 14,6nm, como mostra a Figura 5.1(a). Nas amostras que foram expostas ao vapor de água, Figura 5.1(b),

¹PPC - Peptídeos penetrantes em células

Figura 5.1: Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo penetratina, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Note o aumento da rugosidade dos filmes quando submetidos à atmosfera saturada.



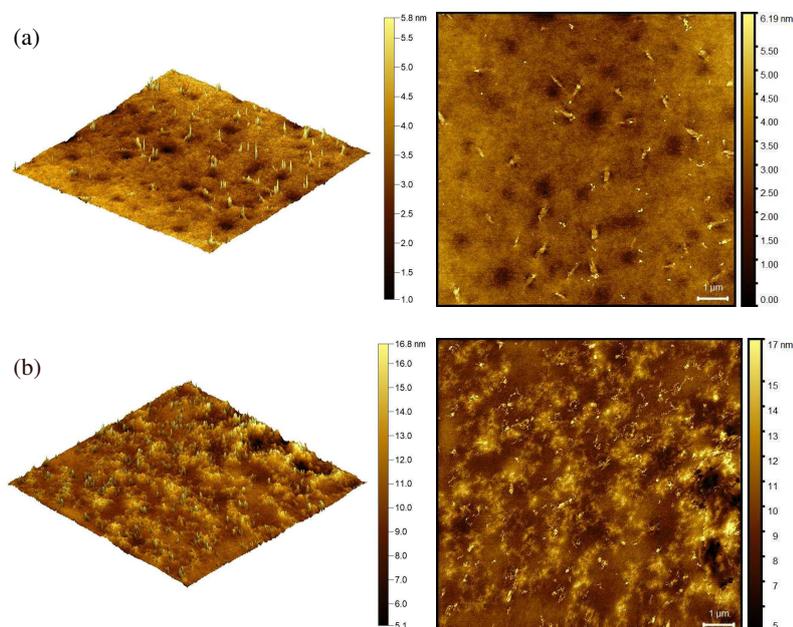
Fonte: Autor, 2018

Tabela 5.1: Parâmetros morfológicos dos filmes de penetratina. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$.

Peptídeo	Ra (nm)	Rms (nm)	He (nm)
Penetratina - amorfo	340,4	413,8	14,6
Penetratina - hidratado	498,8	578,3	23,7

percebe-se um aumento considerável na rugosidade do filme peptídico, constatando-se uma heterogeneidade topológica com picos de 23,7nm. O aumento de rugosidade no filme submetido a atmosfera saturada em água é um indício de que há a formação de nanoestruturas peptídicas sobre o substrato. No entanto, não é possível afirmar se há a formação de nanofios ou de outras estruturas similares a partir das medidas de AFM. Na tabela 5.1 tem-se os parâmetros morfológicos dos filmes amorfos e hidratados do peptídeo penetratina. A rugosidade da superfície é medida pelo parâmetro Ra que é definido como a média dos desvios verticais no plano médio. Usaremos esse indicador em nossas análises. Na tabela também encontram-se a raiz quadrática média da rugosidade (Rms) e altura máxima observada (He). Como podemos notar, há um aumento substancial na rugosidade dos filmes após serem submetidos a uma atmosfera saturada com água.

Figura 5.2: Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo TAT, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Mais uma vez, é possível notar o aumento da rugosidade dos filmes quando submetidos à atmosfera saturada em água.



Fonte: Autor, 2018

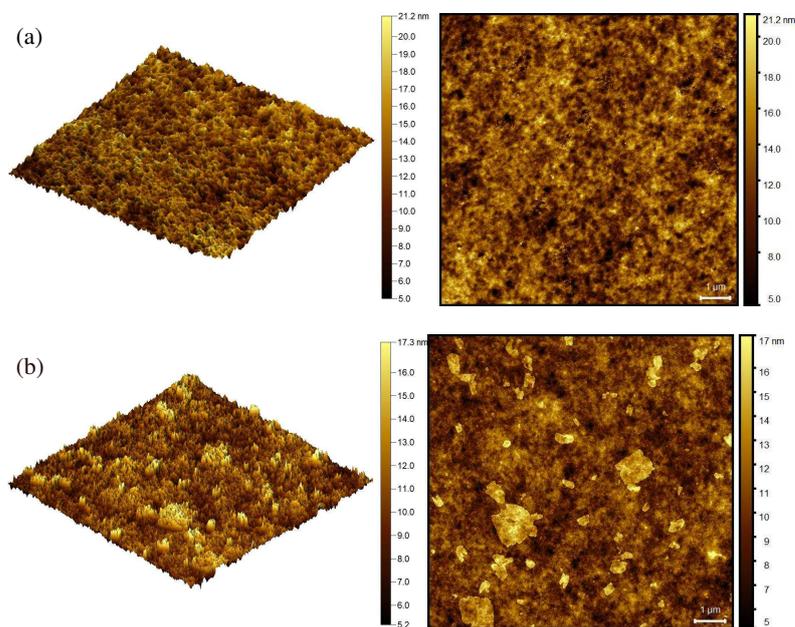
Tabela 5.2: Parâmetros morfológicos dos filmes de TAT. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$.

Peptídeo	Ra (nm)	Rms (nm)	He (nm)
TAT - amorfo	46.68	55.47	5.8
TAT - hidratado	1230	1412	16.8

Na Figura 5.2 são mostradas as medidas de AFM para os filmes do peptídeo TAT, tanto no estado amorfo (seco) como no estado hidratado. Na Figura 5.2(a), percebe-se que o filme amorfo apresenta uma baixa rugosidade, com a formação de pequenos picos, com altura máxima de $5,8nm$. Esses picos podem ter surgido do processo de deposição do peptídeo sobre a mica, que consiste no espalhamento de uma solução volátil contendo peptídeos. Além disso, as imagens de AFM mostram a presença de linhas curtas mais altas sobre regiões planas, bem como a formação de alguns poros (identificadas pelas regiões circulares escuras). A Figura 5.2(b) exibe as imagens da topologia do filme de TAT após ser submetido à atmosfera saturada em água. Aqui observa-se o surgimento de vários picos com uma altura máxima de $16,8nm$, distribuídos de forma heterogênea

na área da amostra. Mas com concentração de picos em uma região lateral do substrato. Na tabela 5.2 são apresentados os valores dos parâmetros que caracterizam a morfologia dos filmes. Neste caso, vemos um aumento significativo da rugosidade do filmes após serem submetidos à atmosfera saturada com água. Onde a média da rugosidade passa de 134,7nm no caso amorfo para 263,7nm no caso hidratado, indicando que há formação de nanoestruturas auto-organizadas do peptídeo TAT.

Figura 5.3: Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo SV40, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Aqui é possível notar a formação de granulos após o processo de hidratação dos filmes.



Fonte: Autor, 2018

Tabela 5.3: Parâmetros morfológicos dos filmes peptídicos SV40. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$.

Peptídeo	Ra (nm)	Rms (nm)	He (nm)
SV40 - amorfo	134.7	166.3	16
SV40 - hidratado	263.7	305.1	17.3

A Figura 5.3 mostra as medidas de AFM realizadas com os filmes do peptídeo SV40. Na Figura 5.3(a), observa-se que o filme amorfo de SV40 apresenta rugosidade acentuada, com uma superfície de aspecto poroso, mas com uma distribuição próxima de uniforme. Nas imagens do filme submetido ao processo de hidratação mostrado na Figura 5.3(b),

percebe-se o surgimento de domínios locais caracterizados pela formação de granulos. Embora haja um aumento na rugosidade média do filme submetido ao processo de hidratação, a altura dos picos não é muito diferente daquela observada nos filmes amorfos. Isto indica que a eventual formação de nanoestruturas deste peptídeo deve ocorrer no plano do substrato. Embora a nanoestruturação tenha alterado a topologia do filme peptídico, a distribuição de rugosidade é semelhante a observada no filme amorfo. Este fato se refletiu nas medidas de molhagem, como poderá ser visto mais adiante. A tabela 5.3 contém os valores dos parâmetros morfológicos, onde é possível notar o aumento da média de rugosidade (Ra) entre os filmes.

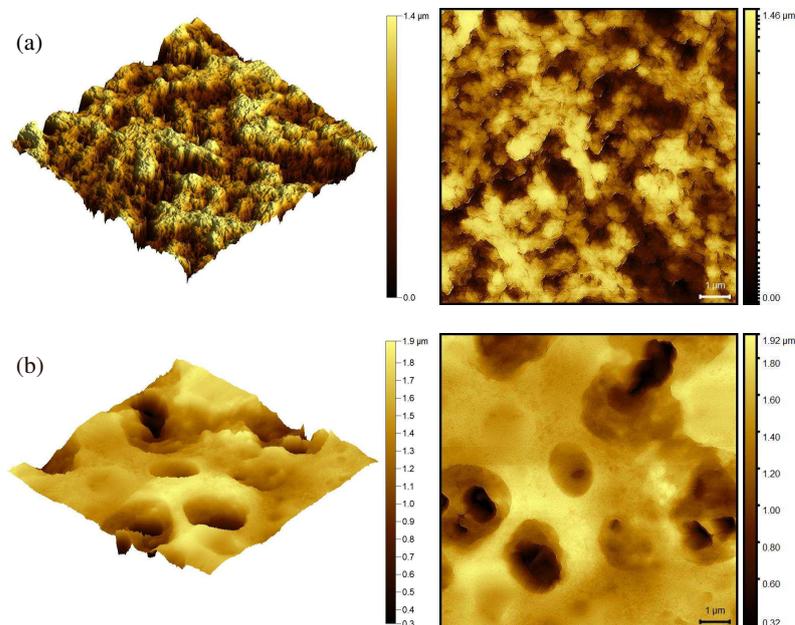
Por fim, a Figura 5.4 mostra as medidas de AFM dos filmes de peptídeo C105Y. Na Figura 5.4(a), vemos que o filme seco apresenta um estado amorfo caracterizado por uma superfície bastante rugosa, com a formação de picos de até $1,4\mu m$ de altura. Além disso, é possível notar a formação de estrutura granulares e de vales ao longo do filme. Na Figura 5.4(b) é mostrado filme de peptídeo C105Y após o processo de hidratação. Aqui verifica-se a presença de uma morfologia irregular, caracterizada pela ocorrência de vales profundos e picos de $1,9\mu m$ de altura, sem a presença das estruturas granulares dos filmes secos. Esse relevo acidentado das amostras pode induzir histerese nas medidas de ângulo de contato. Além disso, é possível verificar o aumento acentuado na rugosidade dos filmes na tabela 5.4. Essa rugosidade acentuada pode estar vinculada ao fato desse peptídeo ser formado em sua maioria, por resíduos apolares. Isso induz uma resistência para adesão na mica, e uma forte interação repulsiva entre as moléculas do peptídeo e do vapor de água.

Tabela 5.4: Parâmetros morfológicos dos filmes peptídicos C105Y. Ra é a média aritmética da rugosidade, Rms é a raiz quadrática média da rugosidade e He é altura máxima observada. A área mapeada foi em média $110\mu m^2$.

Peptídeo	Ra (nm)	Rms (nm)	He (nm)
C105Y - amorfo	143.1	184.9	1400
C105Y - hidratado	355.6	423.6	1900

As medidas de AFM revelam que o processo de hidratação induz um aumento de rugosidade na superfície dos filmes, indicando a ocorrência de uma certa nanoestruturação das moléculas de peptídeos. A natureza hidrofílica da mica contribui para a adesão dos grupos polares dos compostos [71], o que favorece a exposição de grupos apolares na superfície mais externa. Neste caso, a presença das moléculas de água na atmosfera perturba a configuração molecular dos peptídeos ao longo do filme, uma vez que há uma interação repulsiva entre os grupos tripofano, prolina, valina, fenilalanina e outros resíduos apolares que formam os peptídeos estudados, e as moléculas polares da água. Desta forma, há um rearranjo das moléculas do peptídeo de maneira a reduzir esta interação repulsiva, em

Figura 5.4: Imagens representativas de AFM em duas e três dimensões de filmes do peptídeo C105Y, sob diferentes condições: (a) filme não hidratado exibindo uma textura amorfa e (b) filme submetido a uma atmosfera saturada em água. Aqui é possível notar a formação de vales profundos no filme após o processo de hidratação.



Fonte: Autor, 2018

um comportamento similar ao processo micelização das moléculas de surfactante em água. A mudança da configuração das moléculas de peptídeo induz assim o processo nanoestruturação, o que tem um impacto significativo sobre as propriedades de molhabilidade dos filmes peptídicos, como poderemos constatar nas medidas de ângulo de contato.

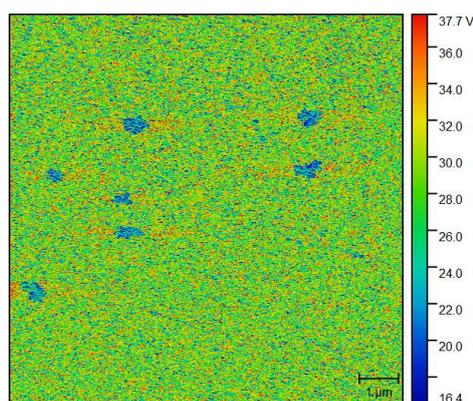
5.1.2 Medidas de AFM-IR

A espectroscopia infravermelho (IR) baseada na microscopia de força atômica (AFM-IR) é uma técnica mais recente e reúne o melhor de cada uma das técnicas, permitindo a análise química e o mapeamento composicional das amostras [61]. De uma maneira geral, os peptídeos, por terem os mesmos grupos funcionais mudando apenas a cadeia lateral ($-R$) de um para outro, apresentam espectros de IR semelhantes, principalmente no que diz respeito às absorções características dos grupos $-NH_2$, $-COOH$ e estes podem ser utilizados como base para demonstrar os principais sinais [72]. Sendo assim, realizou-se uma medida de IR com número de onda de 1628cm^{-1} , uma vez que o espectro IR apresenta uma banda amida na região entre 1600 e 1700cm^{-1} . O número de onda escolhido corresponde a vibração de amidas emparelhadas na conformação β -folha. As imagens de AFM-IR podem ser consideradas mapas químicos, onde as cores indicam a intensidade de absorção do número de onda de 1628cm^{-1} . Com isso, é possível visualizar

a presença de conformações β -folha, indicadas pela cor verde nas Figuras 5.5 a 5.7.

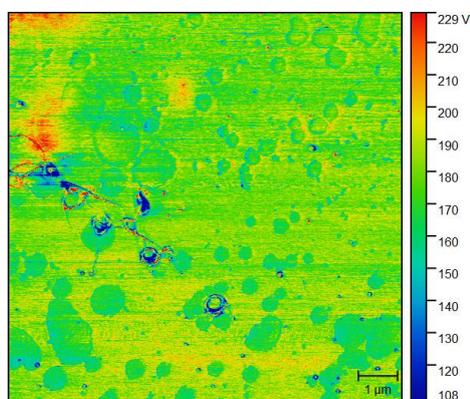
No filme com penetratina, Figura 5.5, nota-se a presença de um padrão granular da coloração verde com o aparecimento de algumas regiões pontuais onde a cor azul é predominante. Esse padrão granular da cor verde indica uma homogeneidade do ponto de vista químico, ou seja, os sítios com a presença de β -folha estão organizados uniformemente. Nos filmes preparados com TAT e SV40, mostrados nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente, observa-se uma distribuição heterogênea da cor verde, com regiões onde as cores azul e vermelha prevalecem. Isso revela que há regiões com acúmulo de sítios com β -folha e outras sem qualquer vestígios (regiões com coloração azul ou vermelha). Essa diversidade superficial de composição dos sítios dos filmes implica em uma maior dificuldade em reproduzir amostras muito semelhantes, e essa característica tem influência nas propriedades de molhagem desses filmes.

Figura 5.5: Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo penetratina

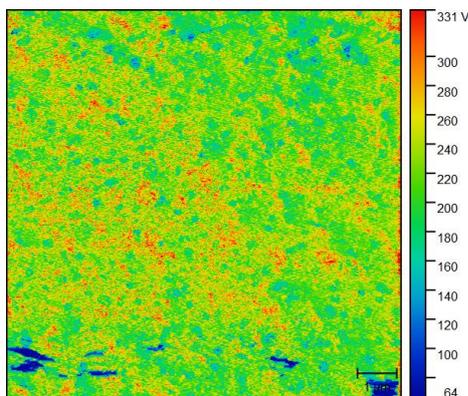


Fonte: Autor, 2018

Figura 5.6: Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo TAT



Fonte: Autor, 2018

Figura 5.7: Imagens de AFM-IR do filme amorfo do peptídeo SV40

Fonte: Autor, 2018

5.2 Medidas de molhagem

Para caracterizar os efeitos da hidratação nas propriedades de molhagem dos filmes peptídicos, foram realizadas medidas de ângulo de contato usando a técnica de tensiometria óptica. Em todos os casos analisados percebeu-se que o processo de expor os filmes a atmosfera saturada afetou diretamente a dinâmica do ângulo de contato. Esta mudança ocorreu em alguns casos de forma bem sutil.

A dinâmica de relaxação foi analisada usando a teoria cinético molecular para a variação da posição da linha de contato. Neste modelo, a evolução temporal do ângulo de contato é dada pela dinâmica coletiva das moléculas do fluido de prova, do substrato sólido e do gás onde estão imersos, na região próxima da linha de contato, conhecida como zona de três fases. Para fazer uso dessa teoria alguns cuidados devem ser tomados, como por exemplo, o substrato dever ser plano e o volume do fluido de prova deve manter-se constante durante a medida. Além disso, foi levado em consideração tanto as contribuições associadas à energia de interação na interface sólido-líquido quanto a energia viscosa. Mais detalhes podem ser encontrados no capítulo 3 da presente dissertação. Com o auxílio da teoria cinético molecular, obtém-se parâmetros como densidade de sítios de adsorção das moléculas do fluido n , distância média entre esses sítios λ e a densidade de energia livre de molhagem, g_s , que são informações bastante importantes para a completa caracterização dos filmes peptídicos estudados. O fluido teste usado foi o glicerol, que possui uma viscosidade relativamente alta. Deste modo, o tempo de relaxação do ângulo de contato foi lento, com a configuração de equilíbrio sendo atingida 20 segundos após a liberação da gota. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente, de aproximadamente 25 °C. Os parâmetros computados a partir da teoria cinético molecular foram obtidos do ajuste teórico de 10 medidas para cada tipo de peptídeo.

Os parâmetros desejados foram calculados a partir do ajuste teórico das curvas ângulo

de contato em função do tempo obtidas experimentalmente. Para tal, fizemos uso da equação:

$$\frac{\partial\theta}{\partial t} = -a_0 \frac{(2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta)^{4/3}}{(1 - \cos\theta)^2} \operatorname{senh} [a_1(\cos\theta_0 - \cos\theta)]. \quad (5.1)$$

Onde,

$$\begin{aligned} a_0 &= \left(\frac{\pi}{3V}\right)^{1/3} \frac{2\lambda k_s h}{\eta_L \nu_L} \\ a_1 &= \frac{\gamma_{LG}}{2nkT} \end{aligned} \quad (5.2)$$

a_0 e a_1 são obtidas do fitting dos dados experimentais, e com isso determina-se os valores das grandezas desejadas.

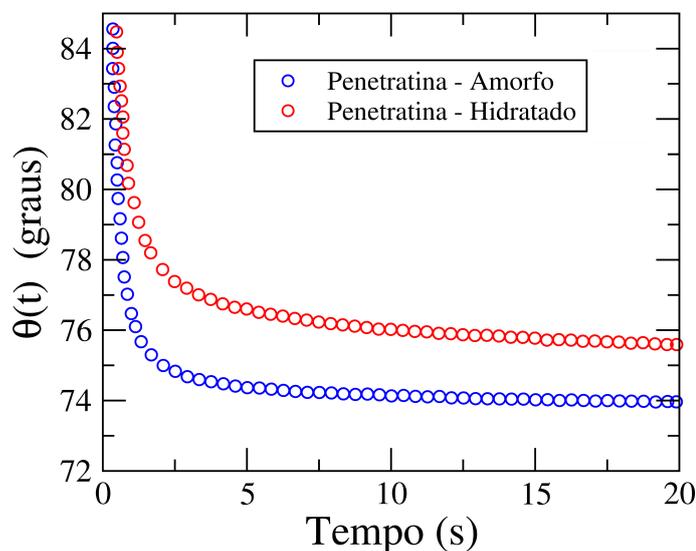
Na Figura 5.8, tem-se a evolução temporal do ângulo de contato médio no filme de penetratina, para o filme amorfo e para o filme submetido à atmosfera saturada em água. Percebe-se de imediato que a hidratação dos filmes implicou em um aumento do ângulo de contato de equilíbrio θ_e , passando de $74,0^\circ$ no caso amorfo para $75,6^\circ$ com a hidratação. Esse aumento no ângulo de contato, dentre outros fatores, é devido ao aumento na rugosidade que foi revelada nas medidas de AFM (Figura 5.1). Isso implica diretamente numa redução da densidade superficial de energia e aumento na densidade superficial de sítios, que reflete-se na mudança no comportamento das curvas $\theta(t)$ na Figura 5.8. A inflexão da curva vermelha (filme hidratado) é diferente que o da curva azul (filme amorfo). Nota-se também que as curvas evoluem no tempo de forma suave, isso corrobora com as medidas de AFM e AFM-IR (Figura 5.5), pois dessas medidas concluímos que esse filme é o mais homogêneo, tanto do ponto de vista topológico quanto químico. A tabela 5.5 exhibe os valores dos parâmetros fornecidos pela teoria cinético molecular.

Tabela 5.5: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo penetratina

Peptídeo penetratina	n ($10^{18}m^{-2}$)	λ ($10^{-10}m$)	g_s ($10^{-03}J/m^2$)	K_s ($10^{10}s^{-1}$)
Filme amorfo	1,12	9,45	81,0	1,64
Filme hidratado	1,28	8,85	78,7	2,01

Na Figura 5.9, temos as curvas ângulo de contato médio como função do tempo para os filmes do peptídeo TAT nos estados amorfo e hidratado. De imediato percebe-se que a hidratação induziu um aumento do ângulo de contato de equilíbrio θ_e , passando de $76,9^\circ$ no caso amorfo para $79,1^\circ$ com a hidratação. Assim como a penetratina, o aumento no ângulo de contato é uma consequência do aumento de rugosidade que foi constatado nas

Figura 5.8: Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo penetratina em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha). Note o aumento no ângulo de contato após a hidratação.



Fonte: Autor, 2018

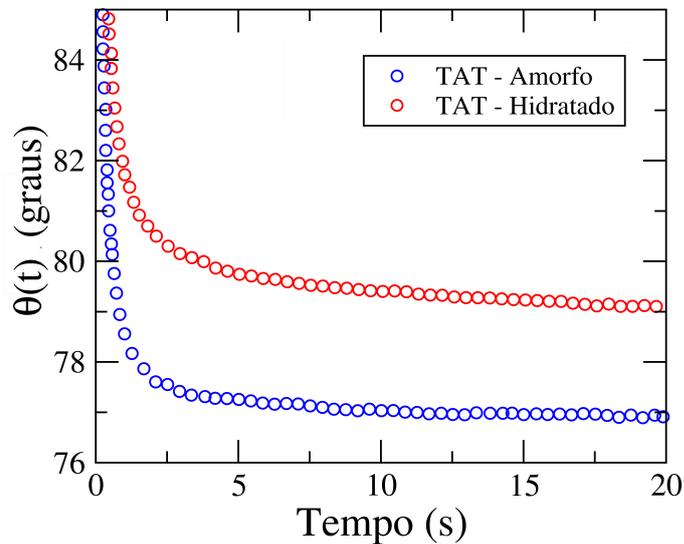
medidas de AFM (Figura 5.6). Esse aumento na rugosidade juntamente com a interação entre os grupos químicos com os quais o líquido teste interagiu, contribuiu para a redução na densidade superficial de energia. Além disso, vemos mais uma vez que há um aumento na densidade superficial de sítios associados à molhagem, como mostra a tabela 5.6. Nesta, é possível encontrar outros valores como a distância média entre os sítios e a frequência de troca de sítios.

Tabela 5.6: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo TAT

Peptídeo TAT	n ($10^{18}m^{-2}$)	λ ($10^{-10}m$)	g_s ($10^{-03}J/m^2$)	K_s ($10^{10}s^{-1}$)
Filme amorfo	1,13	9,41	77,8	3,17
Filme hidratado	1,57	7,99	75,4	4,90

Na Figura 5.10 é mostrada a dinâmica de molhagem para os filmes do peptídeos SV40 nas morfologias amorfa e com hidratação. Aqui observamos que o ângulo de equilíbrio para os dois tipos de filmes do peptídeo SV40 são idênticos, com $\theta_e = 76,4$. Esse fato pode está vinculado ao fato deste peptídeo ser formado por um número maior de resíduos polares (ver tabela 4.3), que possuem uma afinidade para aderir no substrato sólido (a mica), que é hidrofílica. Com isso, as interações repulsivas entre as moléculas do vapor de água e as do peptídeo SV40, são um pouco menores quando comparadas com as da penetratina ou TAT. No entanto, percebemos que uma pequena alteração na dinâmica

Figura 5.9: Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo TAT em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha).



Fonte: Autor, 2018

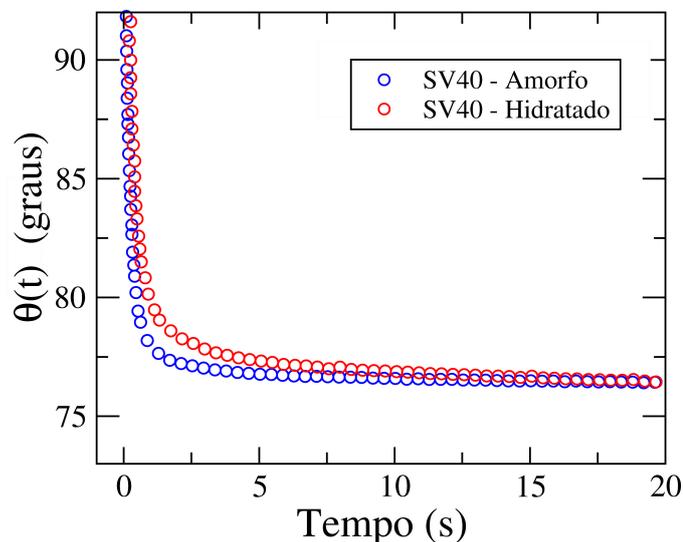
de molhagem após a hidratação. Neste caso, a densidade de energia superficial associada ao processo de molhagem é a mesma nas duas morfologias, mas a densidade superficial de sítios é bem diferente, como mostra a tabela 5.7. Este último fato pode ser devido a exposição de grupos químicos, antes escondidos, induzidos pela interação entre os grupos hidrofóbicos e as moléculas polares do vapor de água.

Tabela 5.7: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo SV40

Peptídeo SV40	n ($10^{18}m^{-2}$)	λ ($10^{-9}m$)	g_s ($10^{-03}J/m^2$)	K_s ($10^{10}s^{-1}$)
Filme amorfo	0,957	1,02	78,3	2,28
Filme hidratado	1,40	0,844	78,3	2,84

A dinâmica de molhagem para os filmes do peptídeo C105Y é mostrada na Figura 5.11. Como nota-se, há uma pequena diferença entre os ângulo de equilíbrio dos filmes nos estados amorfo ($\theta_e = 101,0^\circ$) e hidratado ($\theta_e = 102,0^\circ$). Além disso, vemos que a dinâmica é mais lenta no filme amorfo. Isto pode estar associado à alta rugosidade do filme neste estado, como foi revelado nas medidas de AFM (Tabela 5.4), fazendo com que o movimento da linha de contato seja irregular. O conjunto de resíduos aminoácidos que formam o C105Y, que em sua maioria são apolares, contribuiu para a observação de ângulos de contato de equilíbrio acima dos 100° . O processo de hidratação, tendo em vista o grande número de resíduos polares do C104Y, pode ter deixado exposto muitos

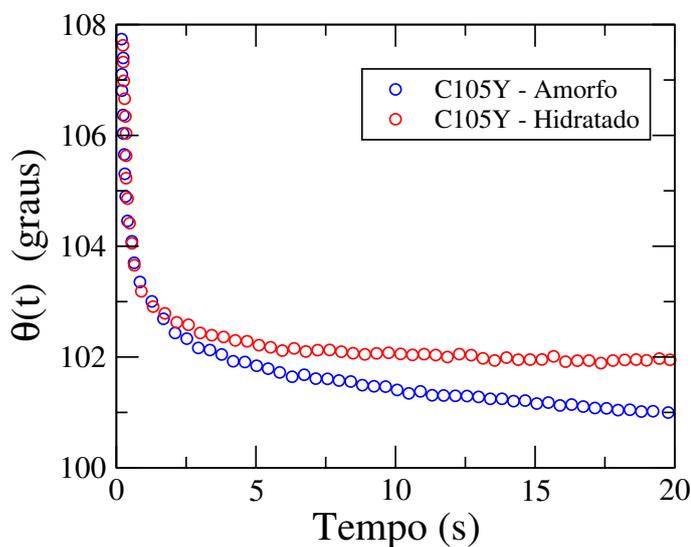
Figura 5.10: Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo SV40 em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha). Note que embora as curvas convergem para o mesmo valor do ângulo de contato de equilíbrio θ_e , o número de sítios para cada caso é diferente n , e com isso tem-se dinâmicas de molhagem diferentes



Fonte: Autor, 2018

grupos químicos. O que justifica a aumento na densidade superficial de sítios, e implica diretamente no comportamento observado nas curvas $\theta(t)$ (Figura 5.11). A tabela 5.8 exhibe os valores computados para o peptídeo C105Y usando a teoria cinético molecular.

Figura 5.11: Variação do ângulo de contato médio em função do tempo para os filmes do peptídeo C105Y em diferentes morfologias: filme amorfo (curva azul) e filme hidratado (curva vermelha).



Fonte: Autor, 2018

Tabela 5.8: Parâmetros calculados a partir do ajuste teórico dos dados experimentais para o peptídeo C105Y

Peptídeo C105Y	n ($10^{17}m^{-2}$)	λ ($10^{-9}m$)	g_s ($10^{-03}J/m^2$)	K_s ($10^{10}s^{-1}$)
Filme amorfo	6,25	1,27	51,3	1,16
Filme hidratado	8,06	1,11	50,3	2,25

A exposição dos filmes a atmosfera saturada com água induz um aumento na rugosidade da superfície, como foi verificado nas medidas de AFM. O que pode justificar, juntamente com a exposição de grupos químicos e outros fatores, o aumento no ângulo de contato de equilíbrio nos filmes peptídicos de penetratina, TAT e C105Y. Embora o ângulo de contato de equilíbrio nos filmes de SV40 sejam muito próximos, a hidratação levou a um aumento na densidade superficial de sítios o que pode explicar a alteração observada na dinâmica de molhagem, como nos outros filmes. Os valores para a frequência de mudança de sítios estão dentro dos valores obtidos na literatura, como pode visto no trabalho de T. D. Blake e co-autores [50].

Esses resultados sugerem que para o conjunto de peptídeos penetrantes em células estudados, a hidratação pode alterar características como densidade superficial de energia e aspereza de superfícies recoberta por estes, peculiaridades que são grande de importância na criação de transportadores mais eficientes e desenvolvimento de métodos de tratamento menos invasivos [15, 2].

5.3 Medidas de Dicroísmo Circular

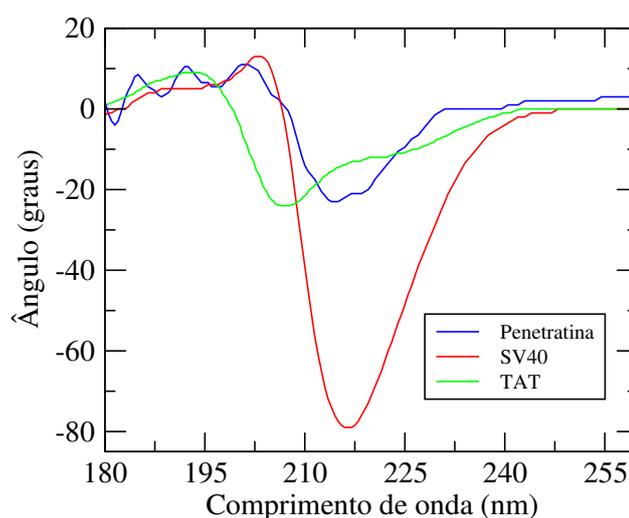
O dicroísmo circular (DC) é uma ferramenta bastante utilizada no estudo de moléculas biológicas pois permite obter conhecimento sobre a conformação estrutural das moléculas, como estruturas secundárias [67]. No capítulo 2 é possível encontrar mais detalhes sobre essa técnica. Uma vez que diferentes elementos estruturais apresentam espectros de dicroísmo característicos [67], é possível determinar o tipo de segunda estrutura presente nas substâncias analisadas. As medidas de AFM-IR (Figuras 5.5 a 5.7), revelaram a presença de estruturas do tipo β -folha, e como elas estão distribuídas ao longo da área da amostra. Com as medidas de dicroísmo, buscamos verificar quais outros tipos de segunda estruturas estão presentes nos peptídeos analisados. A Figura 5.12 apresenta os resultados das medidas de dicroísmo circular para os filmes peptídicos de penetratina, TAT e SV40. Essas medidas foram realizadas também com o filme do peptídeo C105Y, mas como esse peptídeo apresenta uma coloração esbranquiçada e opaca, reflete grande parte da luz incidente. Isto prejudica a medida de dicroísmo, uma vez que ela é feita a partir da luz transmitida pela amostra.

Com base em alguns resultados da literatura [52, 67, 73] foram analisadas as curvas da

Figura 5.12. Os espectros observados são resultados da superposição de espectros característicos, correspondentes a cada tipo de estruturas presentes nos compostos. Todas os espectros de dicroísmo, em conformidade com as medidas de AFM-IR, apresentam curvas características de β -folha. Na Figura 4.10 tem-se as curvas características dos principais elementos estruturais, entre elas, a do tipo β -folha. A curva azul na Figura 5.12, corresponde à medida do peptídeo penetratina, a partir dela e dos resultados obtidos por Fasman e colaboradores [69], é possível constatar que há uma forte presença de conformação aleatória (conformação sem organização). A curva vermelha é o resultado da medida de dicroísmo para o filme com o peptídeo SV40, neste caso tem-se um espectro característica de β -folha, mas nota-se a existência de alguma fração de conformação aleatória, pela perturbação observada na região entre 180 e 200nm [69]. Por fim, a curva verde é o espectro de dicroísmo do filme do peptídeo TAT, com base na comparação de resultados prévios [69], constata-se presença de segundas estruturas do tipo α -hélice e conformação aleatória. A tabela 5.9 exibe os valores dos picos dos espectros observados na Figura 5.12.

A existência de estruturas β -folha, α -hélice e aleatória, são alguns dos fatores que contribuíram para os efeitos observados após o processo de exposição a atmosfera saturada, uma vez que a dependência da polaridade desses grupos pode haver uma forte interação repulsiva com as moléculas de água. E conseqüentemente, como conseguimos verificar nas medidas de ângulo de contato, há uma alteração na dinâmica de molhagem.

Figura 5.12: Medidas de dicroísmo circular nos filmes dos peptídeos penetratina, TAT e SV40.



Fonte: Autor, 2018

Tabela 5.9: Parâmetros calculados a partir das medidas de dicroísmo circular.

Peptídeo	Penetratina	TAT	SV40
Máximos na banda positiva (nm)	185, 192 e 201	193	193
Mínimos na banda positiva (nm)	188 e 196		
Máximos na banda negativa (nm)	220		
Mínimos na banda negativa (nm)	182 e 214	216	217
Estruturas	β -folha conf. aleatória	α -hélice, conf. aleatória	β -folha

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho teve como propósito estudar os efeitos induzidos pela exposição a atmosfera saturada com água nos filmes formados pelos peptídeos Penetratina, TAT, SV40, e C105Y, todos pertencentes à classe de peptídeos penetrantes em células. Para tal, foram utilizadas técnicas experimentais distintas, bem como a comparação dos resultados entre os filmes amorfos e hidratados.

A fim de compreender a influência da exposição a atmosfera saturada na molhagem dos filmes peptídicos, medidas de ângulo de contato dinâmico foram realizadas e com isso informações importantes para a caracterização dessas superfícies foram obtidas. As medidas de ângulo de contato revelaram que a hidratação induz um aumento no ângulo de contato de equilíbrio (com exceção no peptídeo SV40), uma redução da densidade superficial de molhagem, e aumento na densidade superficial de sítios de adsorção dentre outros dados. A fim de compreender como era a topologia dos filmes, foram realizadas medidas de AFM que constataram o aumento da rugosidade nas superfícies dos filmes após exposição ao vapor de água, o que contribuiu para o aumento no ângulo de contato de equilíbrio observado. Indicando que esses materiais podem ser utilizados para modular características topológicas. Foram realizadas também medidas de AFM-IR, uma técnica mais recente e que nos permitiu identificar grupos funcionais das amostras, bem como observar como é a distribuição de sítios com estruturas do tipo β -folha. As medidas de AFM-IR mostraram que apenas o filme de penetratina apresenta homogeneidade do ponto de vista químico analisado. E por fim, foram realizadas medidas de dicroísmo circular para entender quais estruturas secundárias estão presentes nos compostos. Embora haja frações de conformação aleatória, além de β -folha, em todas as amostras, identificou-se a existência de estruturas α -hélice no peptídeo TAT.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que tanto filmes amorfos quanto hidratados de peptídeos podem ser utilizados para modular características topológicas e físico-químicas de superfícies, com grande potencial para aplicação na indústria e na pesquisa. Devido a sua biocompatibilidade intrínseca, peptídeos, de modo particular a classe dos penetrantes em células, vem sendo estudados para o desenvolvimento de transportadores eficientes para tratamento de doenças como o câncer, e nesse contexto, o presente estudo tem relevante importância uma vez que traz informações do comportamento de revestimentos peptídicos com outras substâncias.

Bibliografia

- [1] *Peptides: synthesis, structures, and applications*. Bernd Gutte, 1995.
- [2] Wenjian Zhang Gang Wei Weisan Pan Chang Liu, Lingyu Tai and Weiyue Lu. Penetratin, a potentially powerful absorption enhancer for noninvasive intraocular drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 2014.
- [3] *The World of Peptides: A Brief History of Peptide Chemistry*. Springer, 1991.
- [4] *Cyclic Peptides From Bioorganic Synthesis to Applications*. The Royal Society of Chemistry, 2018.
- [5] *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Springer, 2007.
- [6] *Self-assembled peptide nanostructures: Advances and applications in nanobiotechnology*. Pan Stanford, 2012.
- [7] Edecio Cunha-Neto e Luiza Guilherme Jorge Kalil. Novas estratégias de vacinas. *Gazeta Médica da Bahia*, 2008.
- [8] *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH, 2002.
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73357section=2d-structure>.
- [10] Hubert Bradford Vickery and Carl L. A. Sshmidt. The history of the discovery of the amino acids. *CHEMICAL REVIEWS*, 1961.
- [11] *Principios de bioquímica de Lehninger*. 2014.
- [12] Ligação isopeptídica.
- [13] *Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health*. CRC Press, 2012.
- [14] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439302section=top>.
- [15] *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. Humana Press, 2011.
- [16] Marco Cantisani Mariateresa Vitiello Giancarlo Morelli Stefania Galdiero, Annarita Falanga and Massimiliano Galdiero. Peptide-lipid interactions: Experiments and applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013.

- [17] <http://www.rcsb.org/structure/1omq>.
- [18] *Cell-penetrating peptides : processes and applications*. CRC PRESS, 2002.
- [19] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129706section=top>.
- [20] *Peptide-based Drug Discovery Challenges and New Therapeutics*. Hong Shen, 2017.
- [21] *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer, 2008.
- [22] <https://www.apexbt.com/amyloid-peptide-1-40-human.html>.
- [23] Pengli Zhu Xuehai Yan and Junbai Li. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chemical Society Reviews*, 2010.
- [24] Ronald A. Milligan Duncan E. McRee M. Reza Ghadiri, Juan R. Granja and Nina Khazanovich. Self-assembled organic nanotubes based on a cyclic peptides architecture. *Nature*, 1993.
- [25] *Peptide Materials From Nanostructures to Applications*. Wiley, 2013.
- [26] Carl Henrik Gorbitz. Nanotube formation by hydrophobic dipeptides. *Chem. Eur. J.*, 2001.
- [27] Hiroshi Matsui. Peptide nanotubes. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004.
- [28] Jungki Ryu and Chan Beum Park. Solid-phase growth of nanostructures from amorphous peptide thin film: Effect of water activity and temperature. *Chem. Mater*, 2008.
- [29] Jungki Ryu and Chan Beum Park. High-temperature self-assembly of peptides into vertically well-aligned nanowires by aniline vapor. *Adv. Mater*, 2008.
- [30] Jr. Emerson R. Silva Mauricio D. Coutinho-Neto Luis P. B. Scott Ricardo H. Silva Vani X. Oliveira Jr. Ro mulo A. Ando Michelle S. Liberato, Sergio Kogikoski and Wendel A. Alves. Self-assembly of argâphe nanostructures via the solidâvapor phase method. *J. Phys. Chem. B*, 2013.
- [31] S. Kogikoski. SILVA E.R. SOUZA J.A. AMARAL, H.R. J and W.A. ALVES. Micro- and nano-sized peptidic assemblies prepared via solid-vapor approach: Morphological and spectroscopic aspects. *Materials Chemistry and Physics*, 2012.
- [32] Jungki Ryu and Chan Beum Park. High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010.

- [33] Soo Hyun Kim Ji Eun Kim and Youngmee Jung. In situ chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in bioactive self-assembled peptide gels. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015.
- [34] Thomas Young. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1805.
- [35] *Surface Wetting: Characterization, Contact Angle, and Fundamentals*. Springer, 2016.
- [36] ZISMAN. W. A. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. 1964.
- [37] David Quere. Rough ideas on wetting. *Physica A*, 2002.
- [38] P. G. de Gennes. Wetting: statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics*, 1985.
- [39] D. J. C. M. t Mannelje H. B. Eral and J. M. Oh. Contact angle hysteresis: a review of fundamentals and applications. *Colloid Polym Sci*, 2013.
- [40] A. P. P. Praxedes. *Propriedades termo-ópticas, interfaciais e morfológicas de quitosana dopada com nanopartículas de prata*. PhD thesis, Universidade Federal de Alagoas, 2015.
- [41] Kazuhito Hashimoto Akira Nakajima and Toshiya Watanabe. Recent studies on super-hydrophobic films. *Monatshefte für Chemie*, 2001.
- [42] Terence D. Blake Damien Duvivier and Joel De Coninck. Toward a predictive theory of wetting dynamics. *Langmuir*, 2013.
- [43] Lenore L. Dai Srinivas R. Ranabothu, Cassandra Karnezis. Dynamic wetting: Hydrodynamic or molecular-kinetic? *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005.
- [44] R. G. COX. The dynamics of the spreading of liquids on a solid surface. part 1. viscous flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 1986.
- [45] T. D. Blake and J.M. Haynes. Kinetics of liquid/liquid displacement. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1969.
- [46] H. Eyring J. F. Kincaid and A. E. Stearn. The theory of absolute reaction rates and its applications to viscosity and diffusion in the liquid state. *Unknown*, 1940.
- [47] Peter G. Petrov and Jordan G. Petrov. A combined molecular-hydrodynamic approach to wetting kinetics. *Langmuir*, 1992.

- [48] T. D. Blake and J. De Coninck. The influence of solid-liquid interactions on dynamic wetting. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2002.
- [49] *Physics and Chemistry of Interfaces*. WILEY-VCH GmbH and Co. KGaA, 2003.
- [50] J. De Coninck T. D. Blake, A. Clarke and M. J. de Ruijter. Contact angle relaxation during droplet spreading: Comparison between molecular kinetic theory and molecular dynamics. *Langmuir*, 1997.
- [51] Alain Joliot. Transduction peptides within naturally occurring proteins. 2005.
- [52] Gérard Chassaingl Daniele Derossit, Main H. Joliot and Main Prochiantz. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological-membranes. *The Journal OF Biological Chemistry*, 1994.
- [53] Tomoki Suzuki Miki Niwa Seigo Tanaka Kunihiro Ueda-Hideyoshi Harashima Shiroh Futaki, Wakana Ohashi and Yukio Sugiura. Stearilated arginine-rich peptides: A new class of transfection systems. *Bioconjugate Chem.*, 2001.
- [54] Elena Woods Barbara Roe Kieran Wynne Giuliano Elia William W. Hall Virginie W. Gautier Mohamed Ali Jarbouï, Carlo Bidoia. Nucleolar protein trafficking in response to hiv-1 tat: Rewiring the nucleolus. *PLOS ONE*, 2012.
- [55] *SV40 protocols*. Humana Press, 2001.
- [56] *The SV40 Replicon Model for Analysis of Anticancer Drugs*. Academic Press, 1996.
- [57] William D. Richardson Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts and Alan E. Smith. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 1984.
- [58] *Peptides from A to Z*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, 2008.
- [59] Melanie Rhee and Pamela Davis. Mechanism of uptake of c105y, a novel cell-penetrating peptide. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2006.
- [60] *Fundamentals of Atomic Force Microscopy*. World Scientific, 2016.
- [61] Alexandre Dazzi and Craig B. Prater. Afm-ir: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging. *Chemical Reviews*, 2017.
- [62] Anasys Instruments. advertising magazine noir2-s.
- [63] S. Ribeiro A. P. Luz and V. C. Pandolfelli. Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica*, 2008.
- [64] Installation manual à oneattension. *Optical Tensiometer*.

-
- [65] *Surface Chemistry Of Solid and Liquid Interfaces*. Blackwell Publishing, 2006.
- [66] Yara J. K. Araújo e Dênis Pires de Lima Adilson Beatriz. Glicerol: um breve historico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Química nova*, 2011.
- [67] Norma J. Greenfield. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *NIH Public Access*, 2009.
- [68] *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer Science+ Business Media, LL C, 1996.
- [69] Norma Greenfield and Gerald D. Fasman. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 1969.
- [70] *Polarized light in optics and spectroscopy*. Academic Press, Inc, 1990.
- [71] Mehedi Reza Valeria Castelletto Janne Ruokolainen Che John Connon Wendel Andrade Alves Emerson Rodrigo da Silva, Merlin Nathaniel Mark Walter and Ian William Hamley. Self-assembled arginine-capped peptide bolaamphiphile nanosheets for cell culture and controlled wettability surfaces. *Biomacromolecules*, 2015.
- [72] *Intrdução à Espectroscopia*. Cengage Learning, 2013.
- [73] Marcus C. Grant Matthew R. Hicks Daniel E. Waldron, Rachel Marrington and Alison Rodger. Capillary circular dichroism. *CHIRALITY*, 2010.