

**Título em Português:** Interação de agentes antimicrobianos com modelos de membrana celular investigada através de espectroscopia vibracional e microscopia

**Título em Inglês:** Interaction of antimicrobial agents with cell membrane models investigated by vibrational spectroscopy and microscopy

**Autor:** João Romero de Padua Bicego

**Instituição:** Universidade de São Paulo

**Unidade:** Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:** Paulo Barbeitas Miranda

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Físico-Química

**Agência Financiadora:** CNPq - PIBIC

## Interação de agentes antimicrobianos com modelos de membrana celular investigada através de espectroscopia vibracional e microscopia

João R. P Bicego<sup>1</sup>, Juan J. R. Arias<sup>2</sup>, Marco A. G. Cadavid<sup>2</sup>, Juan C. Calderon<sup>3</sup>,  
Paulo B. Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Física, Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia

[joaoromero1@usp.br](mailto:joaoromero1@usp.br)

### Objetivos

O objetivo do estudo, foi verificar a interação de peptídeos antimicrobianos sintetizados a partir do veneno da tarântula *P. verdolaga* pelo grupo dos professores colaboradores da Universidad de Antioquia (UdeA), Juan C. Calderón e Marco A. G. Cadavid, com Filmes de Langmuir, monocamadas fosfolipídicas espalhadas sobre subfase aquosa utilizadas como modelo de membrana celular.

Esta interação, foi investigada através de curvas isobáricas, medindo-se a área média por molécula no filme de Langmuir a pressão constante, para verificar a expansão ou contração do filme após a injeção dos peptídeos antimicrobianos, e da espectroscopia SFG para monitorar eventuais variações no ordenamento das caudas apolares dos fosfolídeos.

### Métodos e Procedimentos

**Filmes de Langmuir e curvas isobáricas:** os filmes de Langmuir são compostos por monocamadas de moléculas

anfílicas dispostas nas superfícies de subfases aquosas.

Neste estudo, as moléculas utilizadas foram DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol), dois fosfolípidios bem conhecidos para mimetizar membranas celulares de mamíferos e bactérias, respectivamente. Estes, foram espalhados sobre subfase de tampão de fosfato salino (PBS) para simular o meio extracelular.

A montagem dos filmes foi feita em cuba de Langmuir comercial (KSV NIMA) de teflon com 65 mL.

Para a realização das curvas isobáricas, os filmes foram comprimidos até uma pressão específica, mantendo-a constante, e então injetando o peptídeo antimicrobiano na subfase e monitorando a variação da área por molécula do filme.[1]

**Peptídeo Antimicrobiano (AMP0):** o peptídeo antimicrobiano utilizado no experimento foi o AMP0, que é catiônico e cuja massa molar é 878,04 g/mol, sintetizado a partir do veneno da tarântula colombiana tarântula *P.verdolaga*. Sua estrutura detalhada é confidencial.

**SFG:** Na espectroscopia SFG, um feixe de luz intenso com comprimento de onda na faixa do visível juntamente com outro feixe infravermelho, são lançados concomitantemente na amostra a fim de excitar duas oscilações da nuvem eletrônica das moléculas gerando assim, por meio da interação não linear das duas oscilações, uma terceira frequência SFG, que é equivalente a somas das duas frequências iniciais. [2] Varrando-se a frequência do feixe infravermelho enquanto se mede a intensidade do feixe SFG gerado, obtém-se o espectro vibracional das moléculas na interface (lipídeos e água interfacial).

## Resultados e Conclusões

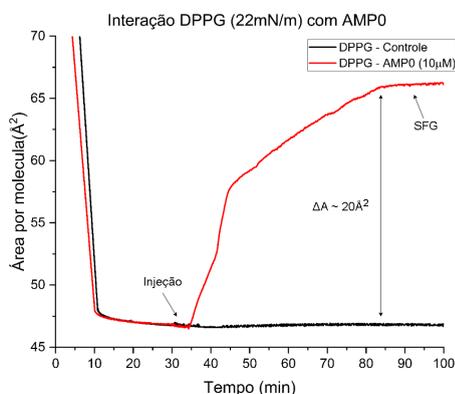


Figura 1: variação da área por molécula de DPPG devido a interação com AMP0.

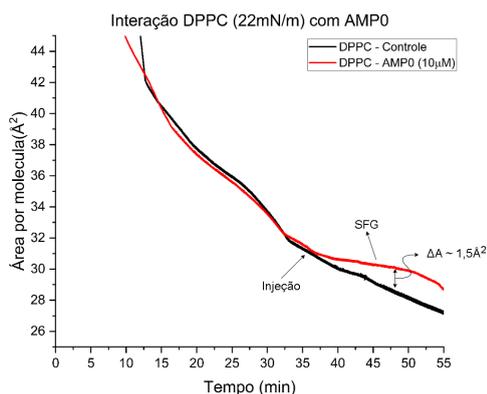


Figura 2: variação da área por molécula de DPPC devido a interação com AMP0.

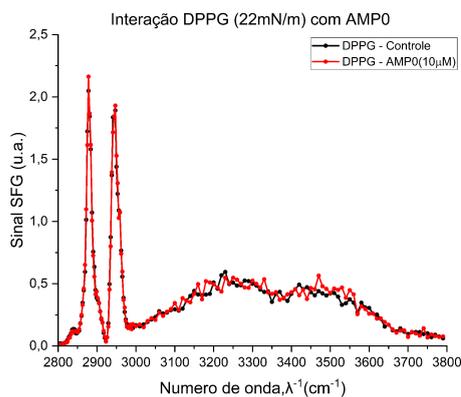


Figura 3: Espectro SFG do filme de DPPG interagindo com AMP0.

Comparando a expansão isobárica dos filmes após a injeção de AMP0 na subfase (Figuras 1 e 2), observamos que ocorreu uma expansão significativamente maior em DPPG a 22 mN/m do que em DPPC. Além disso, notamos que a pressão máxima de inserção de AMP0 em DPPG é próxima a 30 mN/m (dados não mostrados). Essas observações sugerem uma possível interação eletrostática entre o peptídeo AMP0 e o fosfolípídeo aniônico DPPG. Além disso, ao analisar os espectros SFG da Figura 3, notamos caudas bem ordenadas mesmo após a grande expansão causada pela injeção de AMP0, o que pode indicar uma inserção dos AMPs entre os domínios lipídicos.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer, Aos alunos de pós graduação que me ajudaram ao longo deste projeto, Bruna Borges Freri e Marcos da Silva Sousa, ao grupo de polímeros Bernhard Gross do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) e por fim, a CNPq pelo incentivo da bolsa dirigida diretamente a mim e ao

suporte financeiro para a compra de materiais e afins.

## Referências

1- RIMOLI, Caio Vaz. Mecanismos de interação molecular de polieletrólitos antimicrobianos em membranas modelo por espectroscopia vibracional não linear. 2015. Universidade de São Paulo, [s.l.], 2015. Disponível em:<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/6/76132/tde-06102015-083354/>.

2 - X. Zhuang, P. B. Miranda, D. Kim and Y. R. Shen, *Phys. Rev. B* **59**, 12632 (1999).

## Interaction of antimicrobial agents with cell membrane models investigated by vibrational spectroscopy and microscopy

João R. P Bicego<sup>1</sup>, Juan J. R. Arias<sup>2</sup>, Marco A. G. Cadavid<sup>2</sup>, Juan C. Calderon<sup>3</sup>,  
Paulo B. Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos-SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Physics, University of Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup>Medical School, University of Antioquia, Medellín, Colombia

[joaoromero1@usp.br](mailto:joaoromero1@usp.br)

### Objectives

The aim of this study was to investigate the interaction of antimicrobial peptides synthesized from the venom of the tarantula *P. verdolaga* by the collaborating professors from the Universidad de Antioquia (UdeA), Juan C. Calderón and Marco A. G. Cadavid, with Langmuir films and spread monolayers of phospholipids on an aqueous subphase used as a model of a cell membrane.

This interaction was examined through isobaric curves, where the average area per molecule in the Langmuir film was measured at constant pressure to determine the expansion or contraction of the film after the injection of antimicrobial peptides. Additionally, SFG spectroscopy was employed to monitor potential changes in the ordering of the apolar tails of the phospholipids.

### Materials and Methods

**Langmuir Films and Isobaric Curves:** Langmuir films consist of monolayers of amphiphilic molecules arranged at the surfaces of aqueous subphases.

In this study, the molecules used were DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) and DPPG

(dipalmitoylphosphatidylglycerol), two well-known phospholipids used to mimic mammalian and bacterial cell membranes, respectively. These were spread on a subphase of phosphate-buffered saline (PBS) to simulate the extracellular environment.

The assembly of the films was conducted in a commercial Teflon Langmuir trough (KSV NIMA) with a volume of 65 mL.

To perform the isobaric curves, the films were compressed to a specific pressure and kept constant, followed by the injection of the antimicrobial peptide into the subphase, while monitoring the variation in the area per molecule of the film [1].

**Antimicrobial Peptide (AMP0):** The antimicrobial peptide used in the experiment was AMP0, which is cationic and has a molecular mass of 878.04 g/mol. It was synthesized from the venom of the Colombian tarantula, *P. verdolaga*. Its detailed structure is confidential.

**SFG:** In Sum Frequency Generation (SFG) spectroscopy, an intense light beam with a wavelength in the visible range, along with another infrared beam, is simultaneously directed into the sample to excite two

oscillations of the electronic cloud of the molecules. This generates, through the nonlinear interaction of the two oscillations, a third SFG frequency, which is equivalent to the sum of the two initial frequencies [2]. By sweeping the frequency of the infrared beam while measuring the intensity of the generated SFG beam, the vibrational spectrum of molecules at the interface (lipids and interfacial water) can be obtained.

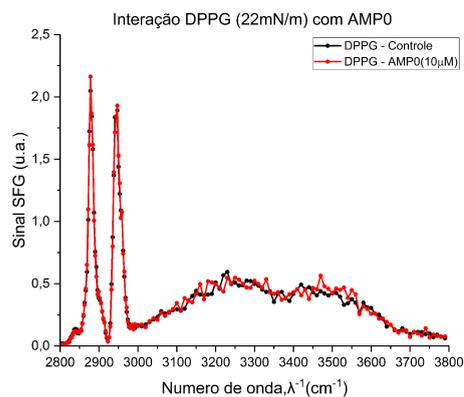


Figure 3: SFG Spectrum of the DPPG film interacting with AMP0.

## Results and Conclusions

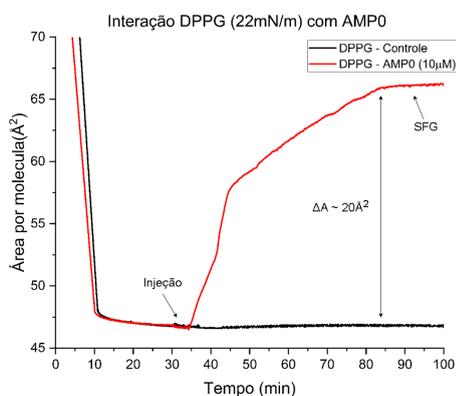


Figure 1: Variation in the area per molecule of DPPG due to interaction with AMP0.

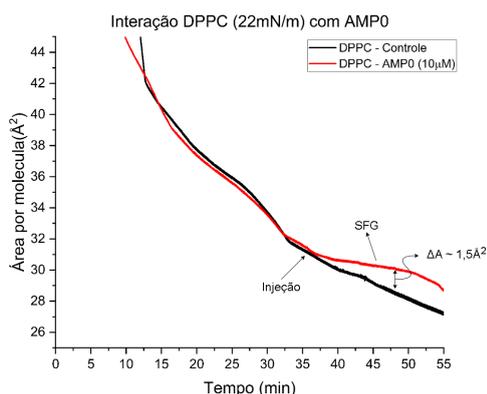


Figure 2: Variation in the area per molecule of DPPC due to interaction with AMP0.

Comparing the isobaric expansion of the films after the injection of AMP0 into the subphase (Figures 1 and 2), we observed a significantly larger expansion in DPPG at 22 mN/m compared to DPPC. Additionally, we noted that the maximum insertion pressure of AMP0 into DPPG is close to 30 mN/m (data not shown). These observations suggest a possible electrostatic interaction between the cationic AMP0 peptide and the anionic phospholipid DPPG. Furthermore, when analyzing the SFG spectra in Figure 3, we observed well-ordered tails even after the significant expansion caused by the injection of AMP0, which may indicate the insertion of AMPs between the lipid domains.

## Acknowledgements

I would like to express my gratitude to the graduate students who assisted me throughout this project, Bruna Borges Freri and Marcos da Silva Sousa, to the Bernhard Gross polymer group at the Institute of Physics of São Carlos (IFSC-USP), and finally, to CNPq for the scholarship support directed specifically to me

and for the financial support for the purchase of materials and related resources.

## References

- 1- RIMOLI, Caio Vaz. Mecanismos de interação molecular de polieletrólitos antimicrobianos em membranas modelo por espectroscopia vibracional não linear. 2015. Universidade de São Paulo, [s.l.], 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-06102015-083354/>.
- 2 - X. Zhuang, P. B. Miranda, D. Kim and Y. R. Shen, *Phys. Rev. B* **59**, 12632 (1999).