

INCT de Fluidos Complexos

Proc. Nº: 2014/50983-3 (FAPESP) e 465259/2014-6 (CNPq)

Vigência: de 01/07/2017 a 30/06/2023 e 25/11/2016 a 30/11/2022

Recursos aprovados: R\$ 6.809.104,08

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto

Sede: Instituto de Física da USP

RELATÓRIO DE ATIVIDADES ANO 4 (julho de 2020 a junho de 2021)

Resumo

Neste projeto propomos o aperfeiçoamento e continuidade das atividades do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx), com a missão de congrega profissionais das áreas de física, química, biologia, farmácia, medicina, engenharia biomédica, matemática e estatística, em torno de problemas que requeiram um enfoque multidisciplinar envolvendo fluidos complexos, para gerar conhecimentos de fronteira, disseminá-los no ambiente acadêmico e divulgá-los à sociedade. Os fluidos complexos são sistemas formados por várias moléculas que se auto-agregam e geram constituintes básicos com diferentes escalas de tamanho, dando origem a propriedades características. Esta proposta do INCT-FCx foi precedida do Instituto do Milênio de Fluidos Complexos, que focalizou as atividades em cristais líquidos, colóides magnéticos e fluidos biológicos, seguida do INCT-FCx, que teve ênfase em agregados supra-moleculares de interesse biológico, principalmente membranas e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) além do assunto dos cristais líquidos e ferrofluidos. Este projeto pretende focalizar as atividades propostas em sistemas multi-componentes que apresentam auto-agregação molecular em condições termodinâmica específicas, como os cristais líquidos, nanopartículas e colóides magnéticos, micelas, lipossomas e vesículas, surfactantes, complexos surfactantes-membranas, surfactantes-proteínas e surfactantes-DNA, e lipoproteínas de alta e baixa densidade. Incorporamos a esta proposta novos pesquisadores, potencializando a atuação da rede formada na área de Fluidos Complexos. As atividades de pesquisa terão ênfase em (i) materiais/sistemas modelo, em condições físico-químicas controladas em laboratório, que visam a obtenção de relações entre estrutura e atividade ou função biológica e a dinâmica das interfaces, a fim de entender as interações moleculares que produzem o comportamento complexo; (ii) novos materiais, que serão desenvolvidos, sintetizados e caracterizados com finalidade de aplicações tecnológicas e médicas; e (iii) materiais biológicos, em particular lipoproteínas de baixa e alta densidade, que visam aplicação em medicina e imunologia. O projeto foi dividido em 3 subprojetos, que serão apresentados em seções subsequentes, e têm os seguintes marcos: (i) desenvolvimento de conhecimento em física básica: investigar as fases nemáticas biaxiais na escala microscópica e elucidar se as micelas apresentam simetria ortorrômbica; estudar efeitos de superfície e organização molecular em sistemas com ordem líquido cristalina; estudar e compreender a seletividade iônica interfacial de micelas e como isso altera suas propriedades; recriar a partir de membranas-modelo situações que são encontradas em células de seres vivos; confeccionar membranas-modelo e propor mecanismos de ação lítica e possíveis caminhos para a obtenção de novos fármacos; estudar propriedades físicas e físico-químicas de diversos tipos de membranas-modelo, caracterizando-as estruturalmente e descrevendo suas interações com biosensores fluorescentes, peptídeos microbianos, surfactantes e proteínas; propor novos modelos teóricos, estatísticos ou atomísticos em multiescala, e ferramentas computacionais para estudar as interações de sistemas supramoleculares de alta densidade e prever situações pouco acessíveis aos experimentos; (ii) desenvolvimento de aplicações tecnológicas como: *displays*, materiais inteligentes com cristais líquidos, partículas coloidais com ordem líquido cristalina, fases nemáticas biaxiais termotrópicas em filmes finos, dispositivos eletro-ópticos, elastômeros dopados com partículas magnéticas e corantes para o controle mecânico via campos externo; carreadores que controlem a entrega de fármacos e outros materiais, incluindo material genético para células, visando a terapia genética com complexos DNA-surfactantes; e materiais biocompatíveis visando implantes sintéticos através do estudo da adesão de proteínas em substratos sólidos; (iii) desenvolvimento de novos materiais através da síntese e caracterização de nanopartículas, colóides magnéticos e peptídeos microbianos com aplicações biomédicas; (iv) caracterização de aspectos fisiopatológicos, diagnósticos e de aplicação prática, envolvendo principalmente o tratamento das doenças cardiovasculares e de neoplasias: desenvolver novos métodos de diagnóstico das doenças cardiovasculares utilizando técnicas de físico-química, em particular técnicas de óptica não-linear, lipidômica e ressonância magnética nuclear; utilizar vetores de droga para o tratamento das doenças cardiovasculares relacionados às lipoproteínas de transporte do colesterol nos seres humanos; disponibilizar no Brasil uma metodologia de análise do plasma humano, por meio da ressonância magnética nuclear, que forneça de maneira rápida e barata o perfil das lipoproteínas.

Introdução

O relatório aqui apresentado traz os principais resultados obtidos pela equipe na investigação dos temas do nosso Projeto.

Neste terceiro ano de atividades do novo INCT-FCx é possível notar os progressos na sinergia entre os enfoques e membros da equipe do Instituto. O total de trabalhos publicados no período foi de **243** artigos. Foram publicados 11 artigos em periódicos de divulgação internacional com participação de mais de um Grupo do INCT.

Apesar dos problemas trazidos pela pandemia da COVID-19, A seguir relatamos os principais resultados das pesquisas por nós desenvolvidas, enfatizando aquelas em que houve a colaboração efetiva de membros de diferentes Grupos do INCT. O relatório traz os assuntos de pesquisa nos quais as interações e interdisciplinaridade procurou ser evidenciada.

Há 2 anexos a este relatório: I) explicita a produção científica, a formação de estudantes e informações complementares; II) traz a lista de seminários do Instituto proferidos de forma *online* no período.

1) Síntese dos principais resultados alcançados no período

a) Modificações em lipoproteínas associadas a estratégias farmacológicas em pacientes com infarto agudo do miocárdio

Os pesquisadores, pós-doutores e estudantes pós-graduação e graduação) envolvidos neste trabalho são: Zahra Lotfollahi, Ana P. Q. Mello, Francisco A. H. Fonseca, Luciene O. Machado, Andressa F. Matias, Maria C. Izar, Nagila R. T. Damasceno, Cristiano L. P. Oliveira, Antônio M. F. Neto.

As terapias hipolipemiantes e antiplaquetárias são universalmente prescritas para pacientes com quadro agudo síndromes coronárias. A possibilidade de interações farmacocinéticas, ao com partilhar as mesmas vias metabólicas, levantaram questões de segurança em relação à sua eficácia, particularmente para pró-drogas, como sinvastatina e clopidogrel. Ticagrelor, um inibidor P2Y12 reversível, diferentemente da tienopiridina derivados (por exemplo, clopidogrel ou prasugrel) não requerem metabolização para sua atividade antiplaquetária.

O objeto de estudo foi abordado por meio de diferentes técnicas de análise, tanto as usadas em biomedicina, quanto da Física da Matéria Condensada. Essa abordagem multidisciplinar é inédita na literatura e produziu resultados muito interessantes, revelando sinergia entre os membros da equipem de diferentes especialidades. Equipes do Instituto de Física e Faculdade de Nutrição da USP e do Departamento de Medicina, Disciplina de Cardiologia da UNIFESP estiveram envolvidos nesse trabalho.

Apesar da redução de lipídios e da terapia antiplaquetária, o padrão das lipoproteínas parecem relevantes para os desfechos cardiovasculares em longo prazo.

Este estudo multidisciplinar teve como objetivo avaliar os efeitos das terapias combinadas, comumente utilizadas em indivíduos com infarto agudo do miocárdio, na qualidade das partículas de LDL.

Tratou-se de um estudo prospectivo aberto que incluiu pacientes com infarto agudo do miocárdio do Hospital da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Os pacientes foram randomizados para tratamento antiplaquetário (ticagrelor ou clopidogrel), posteriormente à terapia

hipolipemiante (rosuvastatina ou sinvastatina / ezetimiba) tendo sido acompanhados por seis meses.

Propriedades ópticas não-lineares de amostras de LDL foram examinadas por meio da Varredura-Z (*Z-scan*) para verificar o estado oxidativo dessas lipoproteínas (Fig. a1 e a2). Experimentos de óptica linear também foram realizados com as LDLs dos pacientes para determinar a quantidade de anti-oxidantes nessas partículas em diferentes tempos desde o enfarte e após 6 meses da intervenção. O espalhamento de raios X em pequenos ângulos (SAXS) foi utilizado para analisar mudanças estruturais nessas partículas. O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizado para avaliar o grau de agregação das LDLs dos pacientes submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos. A espectroscopia UV-visível foi utilizada para determinar o espectro de absorção das diferentes amostras para avaliar a absorbância no comprimento de onda de 484 nm (típico de carotenóides). Finalmente, a eletroforese em gel de poliacrilamida (Lipoprint) foi utilizada para analisar as subfrações de LDL.

Os resultados obtidos puderam ser sintetizados em: a combinação Sinvastatina / ezetimiba com clopidogrel ou ticagrelor foi associada com LDL menos oxidada; a sinvastatina / ezetimiba com ticagrelor reduziu o colesterol nas subfrações aterogênicas de LDL (partículas pequenas e densas); a rosuvastatina com ticagrelor foi a única combinação associada ao aumento no tamanho da LDL, i.e., aquelas menos aterogênicas. Os experimentos de SAXS mostraram que não houve modificação significativa da estrutura das LDLs com os diferentes tratamentos.

Como conclusão principal, a qualidade das partículas de LDL foi influenciada pela estratégia farmacológica utilizada com antiagregante plaquetário / lipídico, com o ticagrelor sendo associado ao melhor desempenho com ambas as terapias redutoras de lipídeos.

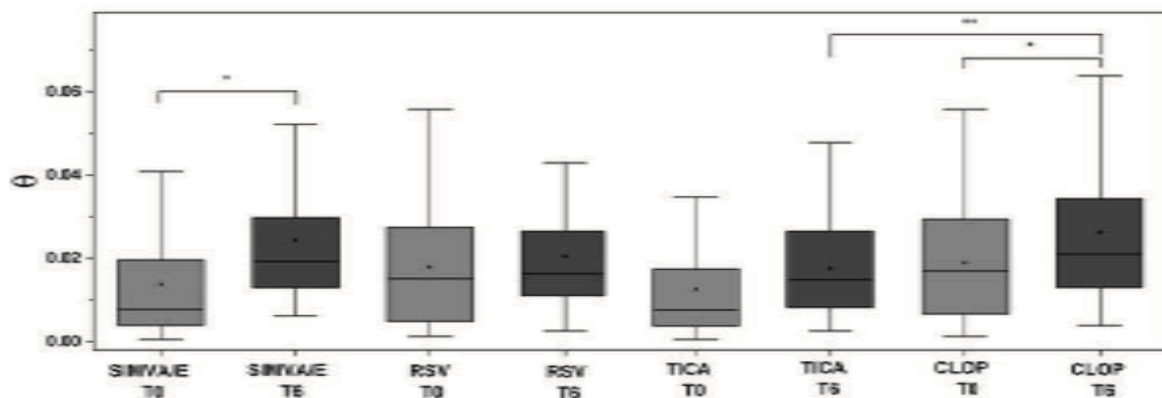


Figura a1: *Box-plot* para mudança de fase (θ) de acordo com drogas hipolipemiantes e antiplaquetárias. Sinvastatina / ezetimiba (SIMVA / E), rosuvastatina (RSV), ticagrelor (TICA) e clopidogrel (CLOP) grupos no início do estudo (T0) e após 6 meses (T6).

(*: diferença significativa, teste de classificação sinalizada de Wilcoxon,
**: diferença significativa, teste U de Mann-Whitney).

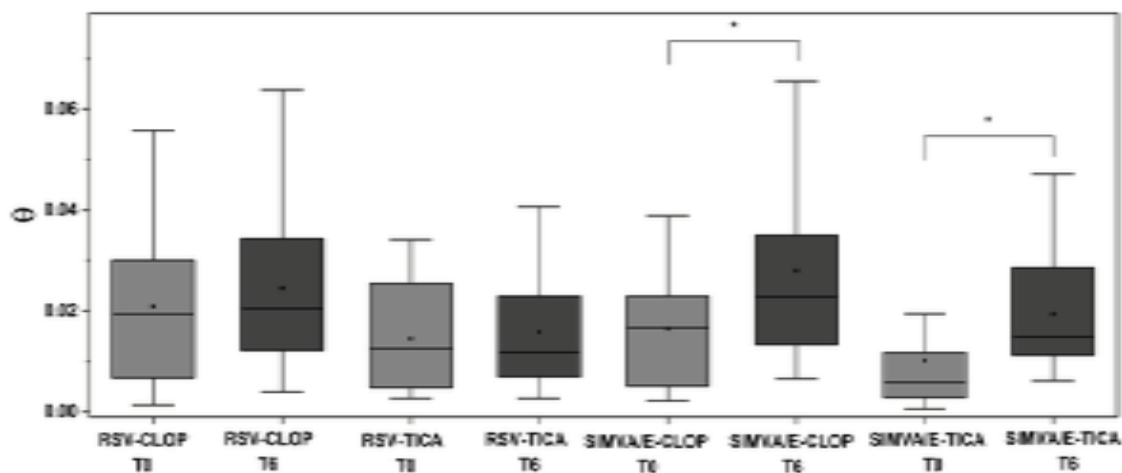


Figura a2: *Box-plot* para mudança de fase (θ) para terapias combinadas no início do estudo (T0) e após seis meses (T6). Sinvastatina / ezetimiba (SIMVA / E), rosuvastatina (RSV), ticagrelor (TICA) e clopidogrel (CLOP).
 (*:diferença significativa, $p < 0,05$, teste dos postos sinalizados de Wilcoxon).

O manuscrito com esses resultados está em processo de revisão por pares.

O Dr. Lionel Gamarra, do Hospital Israelita Albert Einstein, seu grupo e colaboradores são os responsáveis pelas pesquisas relatadas a seguir (b → e).

b) Modificações Rastreamento multimodal de células-tronco hematopoiéticas de camundongos jovens e velhos marcados com nano partículas de fluorescência magnética e seu enxerto por bioluminescência em um modelo de transplante de medula óssea

Este estudo é uma forma inovadora que se propõe a avaliar o homing e rastreamento de células-tronco hematopoiéticas de camundongos jovens e velhos marcados com SPION conjugado com dois tipos de fluoróforos (NIRF e Rodamina), e seu enxerto por bioluminescência (BLI) em um osso modelo de transplante de medula (BMT). Estudo in vitro, isolamos células mononucleares da medula óssea (BM-MNC) de camundongos jovens e velhos, analisamos as características físico-químicas do SPION-NIRF-Rh, sua internalização, viabilidade celular e a quantificação de ferro por NIRF, ICP-MS e ressonância magnética. O estudo in vivo foi realizado em modelo de BMT para avaliar o homing, rastreamento e enxerto de jovens e idosos BM-MNC marcados com SPIONNIRF-Rh por NIRF e BLI, bem como a reconstituição hematológica por 120 dias. 5FU influenciou o número de células isoladas principalmente em células jovens. SPIONNIRF-Rh teve características adequadas para internalização eficiente em BM-MNC. A quantificação da carga de ferro por NIRF, ICP-MS e MRI foi da ordem de 104 SPIONNIRF-Rh / BM-MNC. No estudo in vivo, a avaliação aguda do NIRF mostrou maior intensidade de sinal na medula espinhal e região abdominal, e a avaliação do BLI permitiu o acompanhamento (11-120 dias), atingindo um pico de intensidade em 30 dias, manteve-se estável em torno de 108 fótons / s até o fim. A avaliação hematológica teve comportamento semelhante até 30 dias e os resultados

histológicos confirmam a presença de ferro em quase todos os tecidos avaliados. Nossos resultados no homing BM-MNC e rastreamento no modelo de BMT não mostraram uma diferença na migração ou enxerto de células de camundongos jovens ou velhos, a análise de hemograma tendendo à diferenciação em direção à linhagem mieloide em camundongos que receberam células de animais velhos. O homing celular pelo NIRF e o acompanhamento celular a longo prazo pelo BLI destacaram a relevância das nano partículas multimodais e combinam técnicas para avaliação (Fig. b1, b2 e b3).

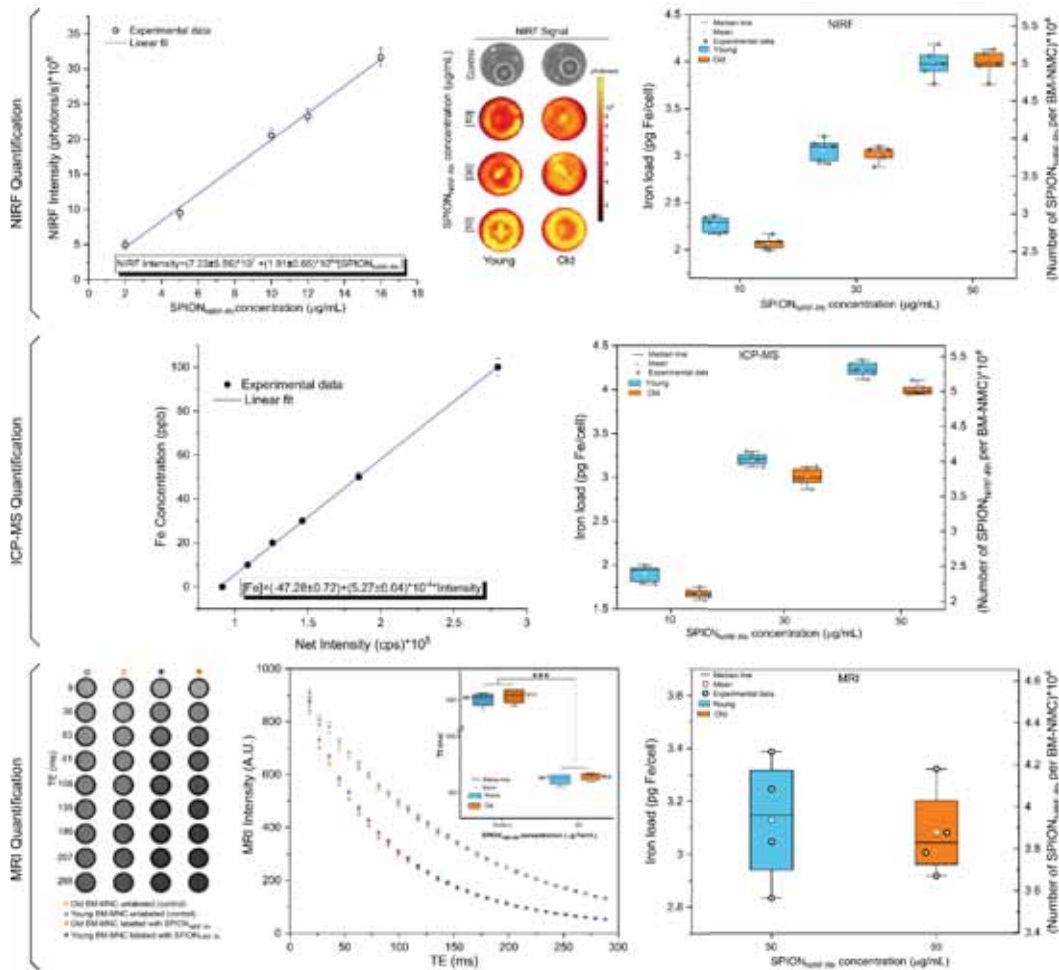


Figura b1. Quantificação da carga SPIONNIRF-Rh internalizada no BM-MNC por NIRF, ICP-MS e MRI. Em NIRF, a quantificação mostra a curva de calibração usada para calcular o sinal de intensidade de NIRF de cada concentração de SPIONNIRF-Rh usada (10, 30 e 50 µg / mL) na marcação de jovens e idosos BM-MNC no gráfico de *box-plot*.

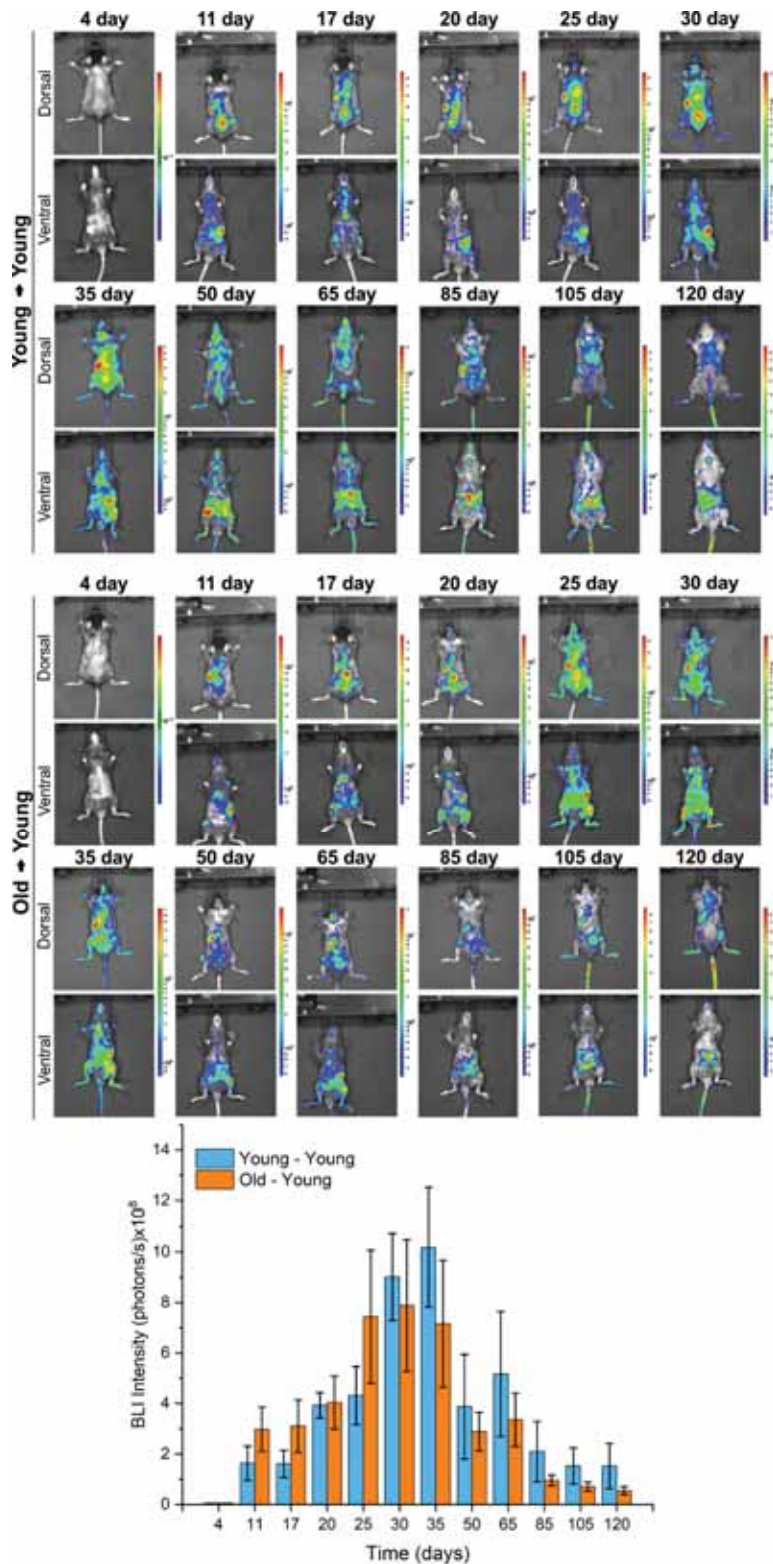


Figura b2. Imagens BLI in vivo (planos dorsal e ventral) de camundongos jovens que recebem células jovens (jovens→jovens) ou células velhas (velhos→jovens) durante 120 dias (aproximadamente a cada semana no primeiro mês e a cada 15 dias dentro nos próximos 3 meses).

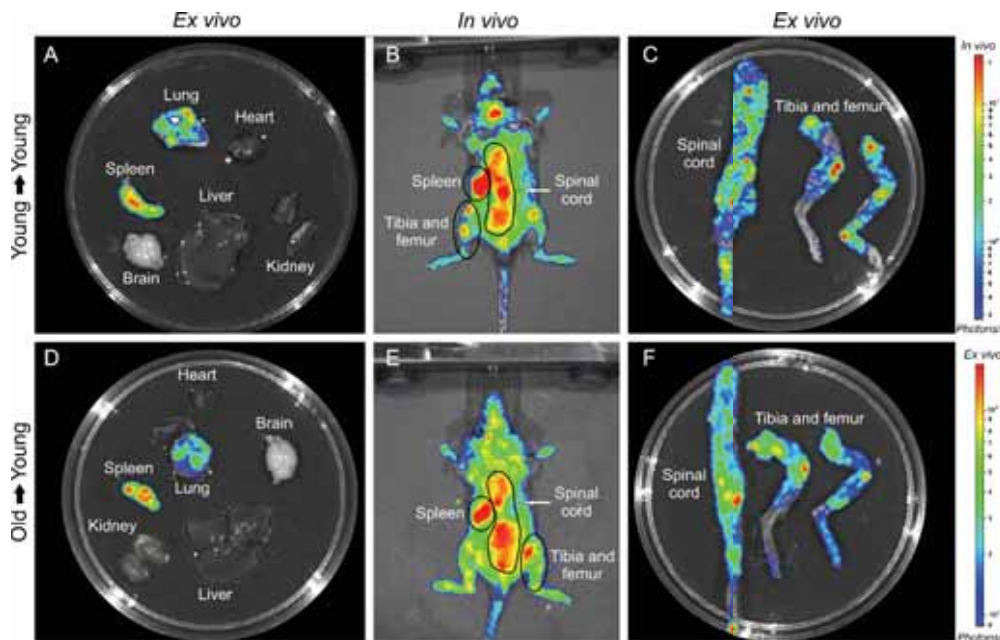


Figura b3. Imagens BLI in vivo e ex vivo de camundongos jovens que recebem células jovens (A, B e C) ou células velhas (D, E e F), e a imagem de seus principais órgãos (coração, baço, pulmão, cérebro, rim, fígado, medula espinhal, tíbia e fêmur) após 120 dias de TMO

- c) Avaliação in vitro da técnica de magneto hipertermia baseada na busca da melhor estratégia de internalização de nanopartículas de magnetita recobertas com aminosilane aplicado em células tumorais de glioblastoma.

Os gliomas são os tumores mais comuns do sistema nervoso central. Destes, os astrocitomas, incluindo o glioblastoma multiforme (GBM), são os mais prevalentes e os mais agressivos representando 76% de todos os gliomas. Assim, o diagnóstico geralmente é tardio, o prognóstico ainda é muito limitado e o tratamento atual envolve cirurgia, quimioterapia e / ou sessões de radioterapia para eliminar as células infiltrantes no tecido saudável e não é eficiente. Devido à baixa eficácia das terapias existentes, acima mencionadas, terapias alternativas têm sido exploradas, sendo uma das terapias a magneto hipertermia (MHT) induzida por nanopartículas magnéticas entre elas as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPION) que promovem lise de células tumorais pela dissipação de energia absorvida pela liberação de calor (SAR) após a exposição a um campo magnético alternado (AMF), induzindo a morte de células tumorais, por tanto presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência da técnica de magneto hipertermia (MHT) em células tumorais C6 in vitro, utilizando nanopartículas de Fe₃O₄ recobertas com aminosilane (SPIONAmine). Foi evidenciado o potencial de aquecimento das SPIONAmine de 100nm com o maior valor de SAR (337.83 W/kg) quando submetidas a 300 gauss com frequência de 551 kHz. Após a internalização eficiente dos SPIONAmine nas C6Luc e posterior aplicação da técnica de MHT foi possível determinar que a viabilidade celular foi de 31% em 44°C após aplicação de MHT por 40 min. Após análise dos resultados por BLI e citometria de fluxo podemos concluir o potencial dos

SPIONAmine baseado no SAR elevado quando aplicado na técnica de MHT no estudo *in vitro* (Figs. c1 e c2).

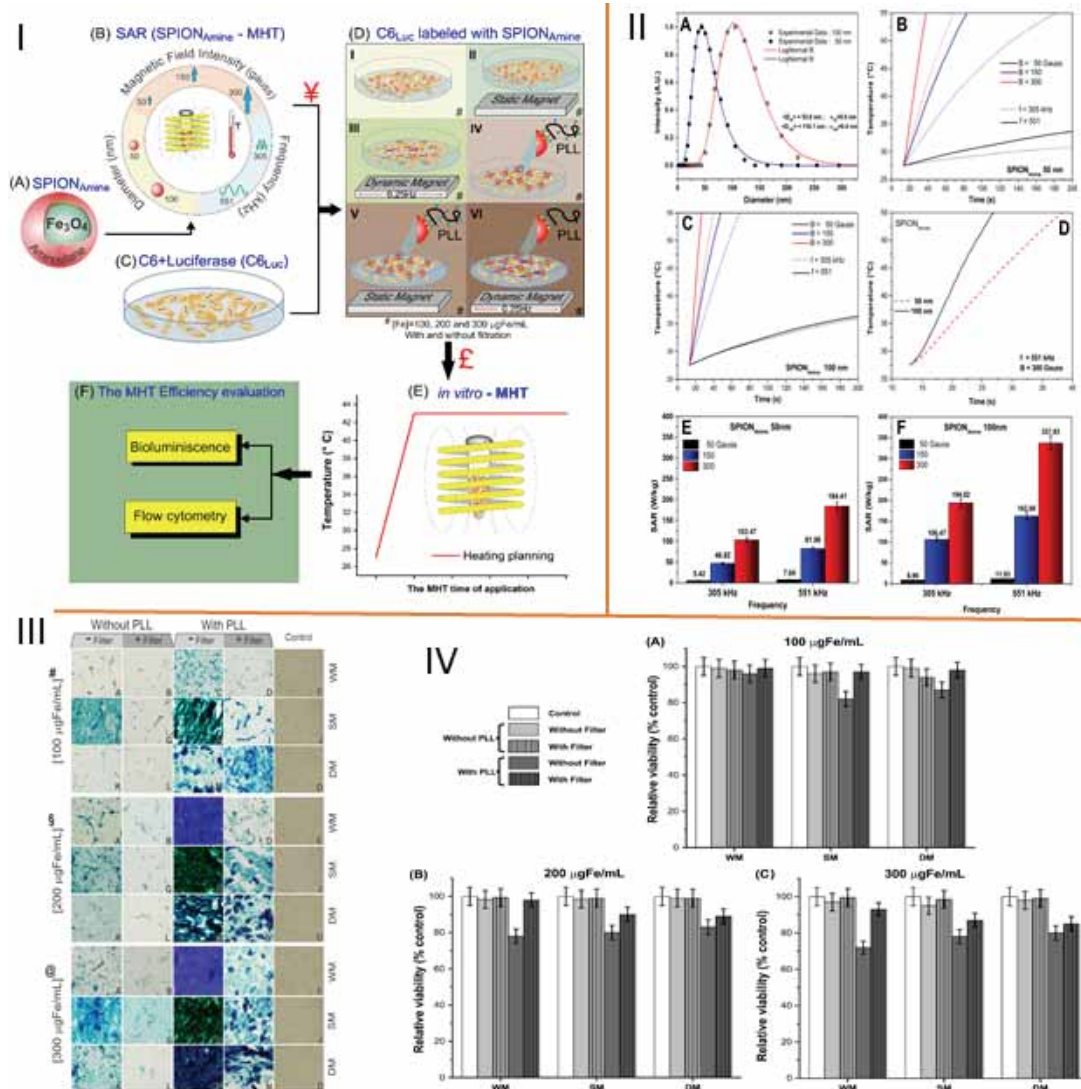


Figura c1. (I) desenho experimental no processo de magneto hipertermia-MHT (II) Avaliação das características de SPIONAmine 50 e 100 nm para MHT, Curvas de aquecimento adquiridas usando campos magnéticos (50, 150, 300 Gauss) combinadas com frequências (305 e 551 kHz); (III) Microscopia óptica microscópica da C6 marcada com SPIONAmine de 100 nm com as seguintes estratégias de internalização; e (IV) viabilidade celular.

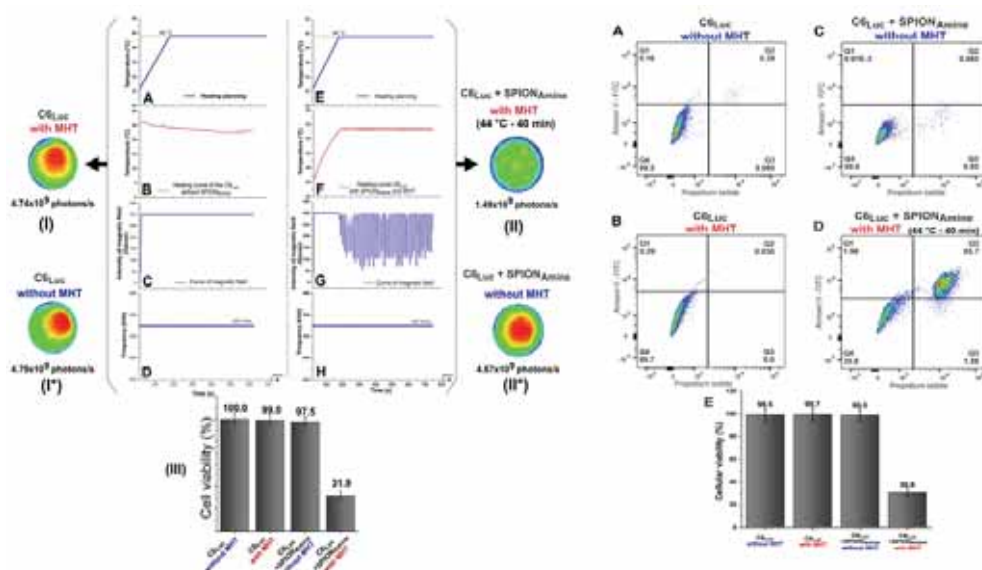


Figura c2. Avaliação da eficácia da MHT mediante as técnicas de citometria de fluxo e bioluminescência.

d) Avaliação da eficácia terapêutica das CTM marcadas com nanopartículas associada à atividade física no modelo de isquemia cerebral focal

No estudo foi possível encontrar a melhor concentração de NOF para a marcação das CTM com uma baixa toxicidade e em alto sinal de bioluminescência e fluorescência para estudos *in vivo*. No processo de marcação foi possível mostrar que tanto o meio de cultura, quanto os suplementos não interfere na estabilidade das NOF, mantendo o diâmetro hidrodinâmico. Na avaliação da carga superficial das NOF foi possível verificar que é positiva e que esta característica contribui no processo de internalização, dado que as CTM têm uma superfície com caráter negativo. Adicionalmente, a avaliação da cinética de bioluminescência das CTM transfectadas apresentaram um sinal intenso com potencial para ser visualizado em estudos *in vivo*. No estudo *in vivo*, foi possível realizar a indução do AVCi e verificar com técnicas de imagem e histológicas o sucesso da indução. O treinamento físico foi possível realizar em grupos experimentais e assim quando este seja aplicado nos grupos terapêuticos se tenha conhecimento do processo. A avaliação comportamental mediante o teste do cilindro mostrou que o escore de simetria para o grupo “AVCI+CTM+exercício” foi o maior comparado com os dois outros grupos ($p < 0,05$), concluindo que a terapia combinada de terapia celular e exercício tem melhor resultado que estas de forma isolada. Outra das avaliações comportamentais do efeito da indução isquêmica focal na atividade motora espontânea dos ratos (avaliação da atividade motora horizontal, vertical) mediante os parâmetros S-REA e F-REA são semelhantes aos analisados no S-MOV e F-MOV. Podemos verificar que teve diferença significativa entre os grupos desde do 7º, adicionalmente podemos observar que o grupo AVCI+CTM+exercício apresenta uma proximidade com o comportamento do grupo controle (sham), mas que ainda assim é possível verificar a influência da terapia celular e o exercício de forma isolada como de forma paralela.

Na avaliação do *homing* das CTM após administração desta no local do AVCi, podemos concluir que o sinal de BLM evidenciou pouca diferença do sinal das CTM administradas entre os grupos, mas que foi possível evidenciar a proliferação das células ao longo do tempo e realizar o *homing* delas por um período mais longo e como estas CTM são marcadas com nano partículas multimodais foi possível realizar o acompanhamento das CTM no período agudo mediante a técnica de fluorescência. Assim finalmente podemos afirmar que a avaliação da eficácia terapêutica das CTM marcadas com nano partículas associada à atividade física no modelo de isquemia cerebral focal se mostrou positivo quando é utilizado a terapia combinada e foi corroborada pela avaliação comportamental e técnicas de imagem (Figs. d1 e d2).

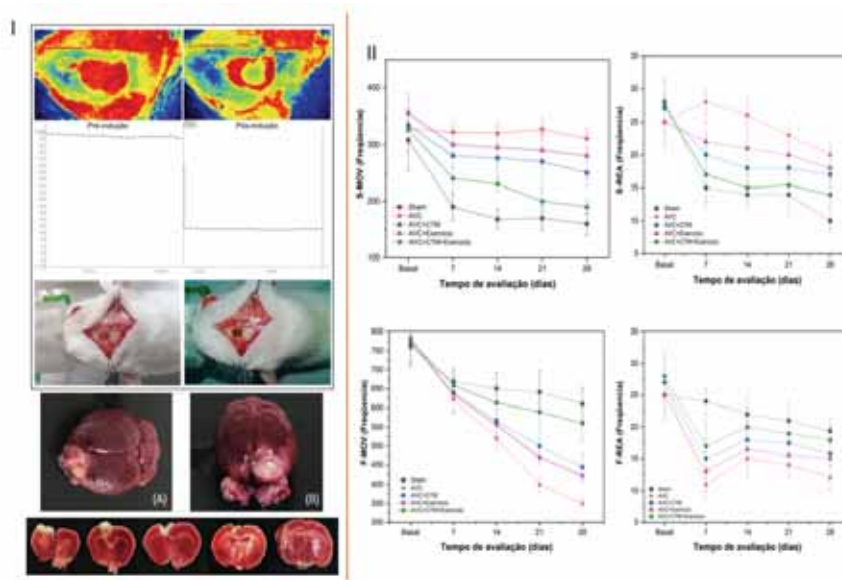


Figura d1. Avaliação da indução de AVCi e comportamental no processo terapêutico envolvendo terapia celular e exercício.

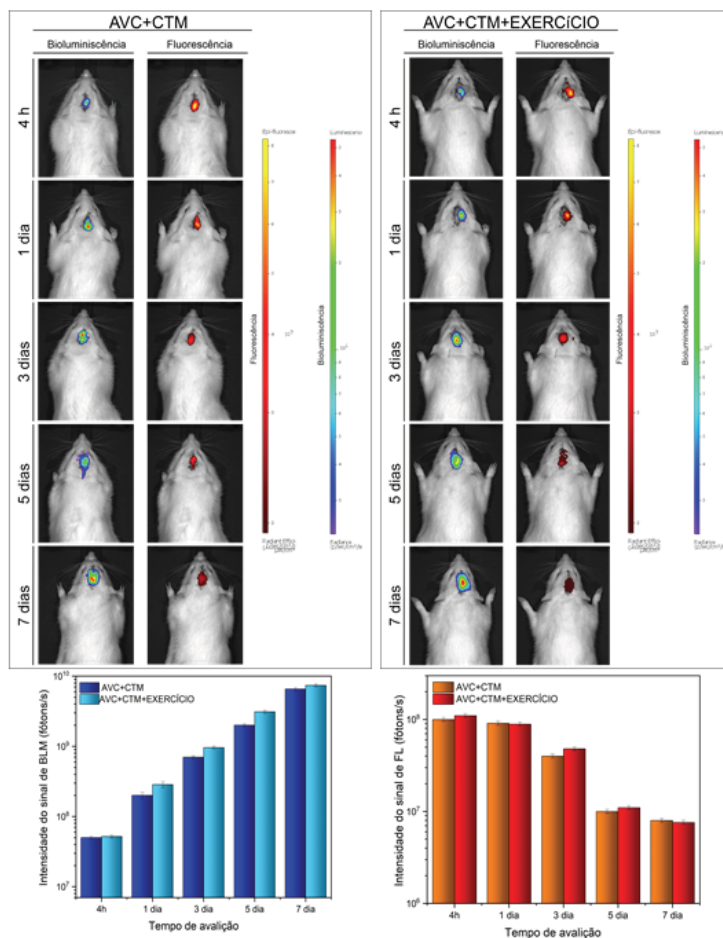


Figura d2. Avaliação do sinal de bioluminescência e fluorescência após a administração das CTM (4horas, 1, 3, 5 e 7 dias) marcadas com nanopartículas multimodais no grupo AVC+CTM e AVC+CTM+EXERCICIO.

e) **Magnetofecção mediada por nanopartículas de óxido de ferro em tumores de glioblastoma para posterior aplicação terapêutica da magneto hipertermia: estudos *in vitro* e *in vivo***

O objetivo do presente projeto foi elucidar o processo de magnetofecção *in vitro* e *in vivo* em tumores de glioblastoma induzidos por células C6 de glioma, com perspectiva futura de aplicação terapêutica da técnica de magneto hipertermia. Para tanto, utilizou-se nanopartículas super-paramagnéticas de óxido de ferro conjugadas com moléculas fluorescentes de Rhodamine-B (NOF-Rhod) e a imposição de um campo magnético externo para direcionamento ativo à região tumoral. Inicialmente, demonstramos que as nano partículas utilizadas neste estudo são estáveis em meio de cultura DMEM e também quando dispersas em solução salina ou PBS na concentração de 50 µgFe/mL. A análise da marcação celular por azul de Prússia e microscopia de fluorescência mostrou que as NOF-Rhod são eficientes para este fim em todas as concentrações utilizadas (1, 10, 30 e 50 µg/mL), sendo o processo potencializado com o uso de um campo magnético externo. Além disso, o ensaio de citotoxicidade evidenciou que a morte celular causada por essas nano partículas foi pouco evidente. O estudo de volumetria por IRM e histologia demonstrou que em

todas as concentrações o crescimento do tumor foi evidente e proporcional tanto ao dia de análise quanto à concentração de célula C6 utilizada (104, 105 ou 106). Os testes *in vitro* mostraram que o acúmulo de nano partículas foi eficiente em todos os gradientes de campo magnético utilizados. Entretanto, a adição de um polo de aço oblíquo formou uma agregação de nano partículas mais pontual em dos lados da mangueira utilizada no teste, sendo este artifício selecionado para o estudo *in vivo* subsequente. O monitoramento por IRM foi eficaz na identificação das NOF-Rhod na região do tumor após a administração por via local, evidenciando uma redução importante do sinal. A sensibilidade da IRM, entretanto, não foi capaz de detectar NOF-Rhod na região do tumor após administração via caudal ou via carótida, sendo necessários mais estudos para padronização destas vias de administração. A análise do processo de magnetofecção *in vivo* por histologia, no entanto, se mostrou mais sensível que a IRM, evidenciando a presença de ferro no tumor após aplicação das NOF-Rhod pelas três vias utilizadas (local, caudal e carótida). Além disso, quando a administração foi feita via caudal, o campo magnético externo utilizado para direcionamento foi capaz de otimizar a agregação destas nano partículas na região do tumor. Tomados em conjunto, nossos resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficiência da utilização do campo magnético no direcionamento magnético das NOF-Rhod, sendo esta uma promissora ferramenta para futuras aplicações da técnica de magneto hipertermia (Figs. e1 e e2).

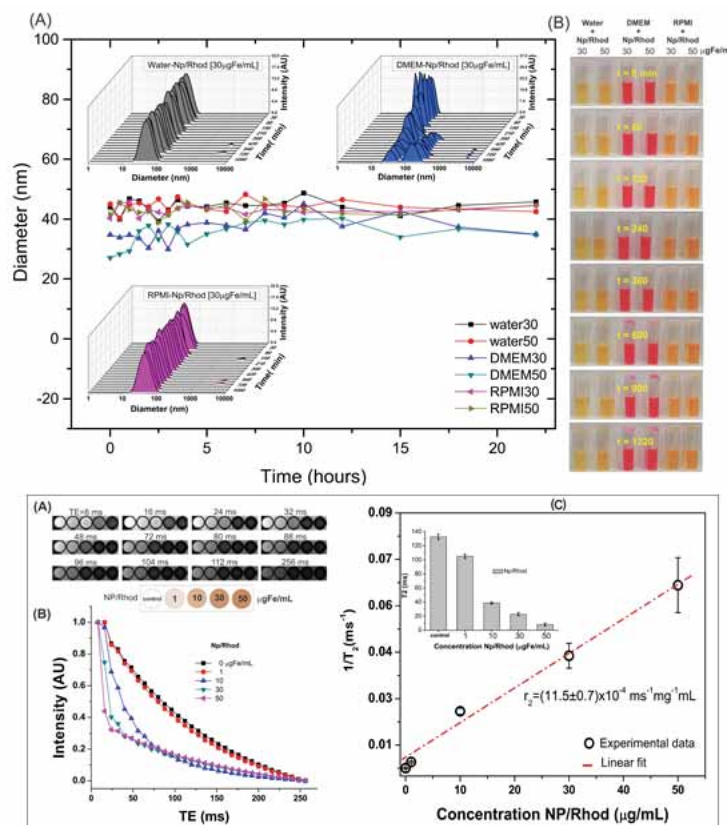


Figura e1. Avaliação da estabilidade das nano partículas e caracterização relaxométrica por Ressonância Magnética.

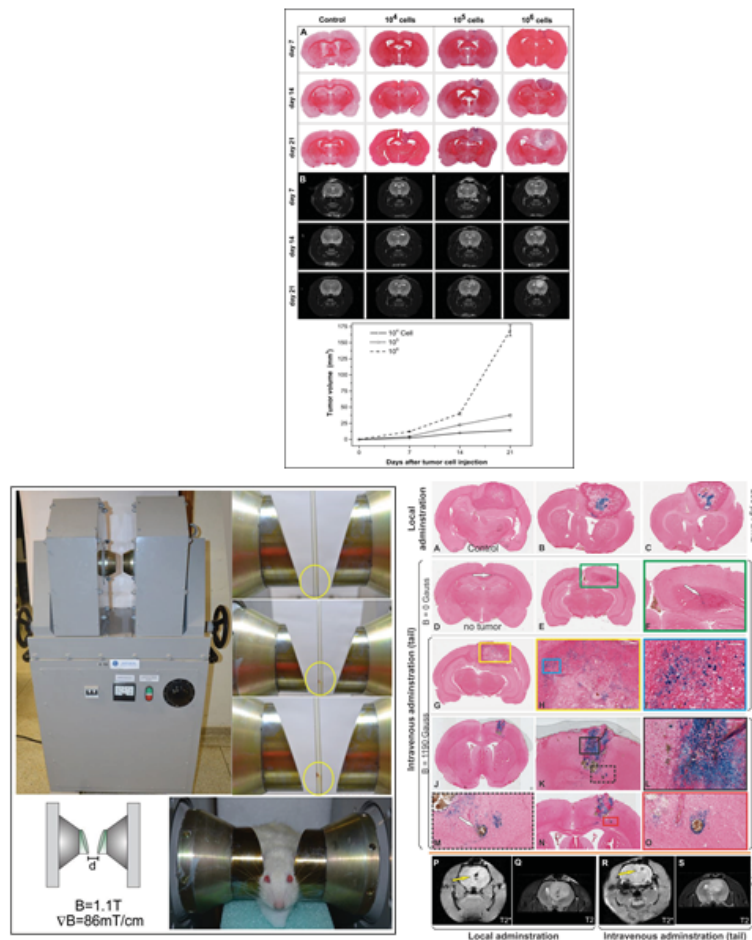


Figura e2. Avaliação tumoral e direcionamento de nanopartículas ao tumor alvo utilizando o equipamento desenvolvido de direcionamento de nanomaterial magnético.

f) Engenharia de proteínas imunorreativas e desenvolvimento de ferramentas computacionais de suporte e análise para simulação molecular clássica.

Os pesquisadores envolvidos neste trabalho são: Roberto Lins, Thereza Soares e Kaline Coutinho, bem como seus estudantes e pós-doutores.

Foram desenvolvidos *softwares* computacionais aplicados a simulação molecular. A participação de diversos atores com diferentes especialidades dentro do INCT-FCx foi essencial, visto que as atividades incluíram desde o desenvolvimento do formalismo até a implementação e disponibilização dessas ferramentas à comunidade. Em colaboração com os grupos das Profas. Thereza Soares (UFPE) e Kaline Coutinho (USP), desenvolvemos o programa Suave, um programa capaz de calcular e analisar propriedades dependentes da curvatura de superfícies macromoleculares e de interface. O programa é baseado na aplicação de uma função de base radial para interpolar pontos espalhados por uma interface de qualquer formato. Isso permite a

representação da interface química como totalmente diferenciável, de modo que as propriedades geométricas relacionadas possam ser calculadas por meio do emprego direto de técnicas de geometria diferencial bem estabelecidas. O programa utiliza coordenadas Cartesianas de sistemas moleculares e é capaz de tratar tanto estruturas isoladas, quanto ensembles (e.g., trajetórias). O mesmo pode ser baixado a partir do site: <https://www.biomatsite.net/suave-software>. Exemplo de resultado na Fig. f1.

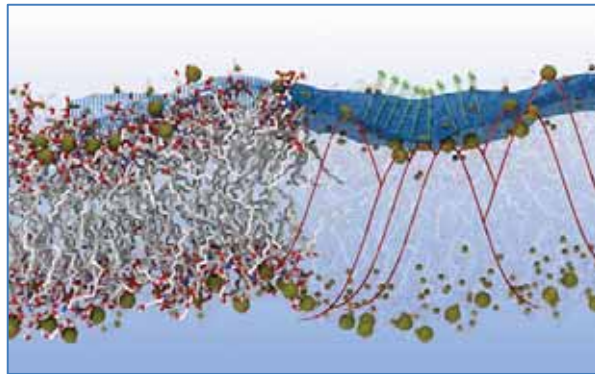


Figura f1: Exemplo de resultado obtido com simulação molecular

Uma segunda ferramenta computacional, desenvolvida em colaboração com o grupo de Profa. Thereza Soares (UFPE) trata-se do programa Rotational Profiler. O mesmo é capaz de gerar potenciais de torção para a simulação clássica de moléculas cujos parâmetros não se encontram disponíveis. O programa fornece um algoritmo analítico para calcular conjuntos de parâmetros diédricos de torção clássicos, ajustando um perfil de energia empírico a um de referência que pode ser obtido experimentalmente ou por métodos de mecânica quântica. Os perfis resultantes são compatíveis com as diversas formas funcionais nos diferentes campos de força biomoleculares, como por exemplo, GROMOS, AMBER, OPLS e CHARMM. O método de regressão de mínimos quadrados linear é empregado para gerar conjuntos de parâmetros que melhor satisfaçam o ajuste. O código foi portado com interface em PHP e encontra-se disponível para uso em *site* próprio mantido pelo Laboratório Nacional de Computação Científica em: <https://rotprof.lncc.br/>. Exemplo na Fig. f2.

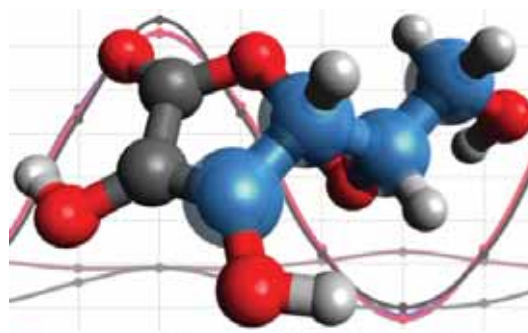


Figura f2: Exemplo de resultado obtido com simulação molecular.

A aplicação de técnicas de engenharia de proteínas seja com a finalidade de desenvolvimento de novas vacinas protéicas e de DNA, de marcadores diagnósticos para doenças

infecciosas ou na caracterização da imunorreatividade de proteínas sintéticas e naturais é também objetivo do nosso grupo de pesquisa junto ao INCT-FCx. Nesta área atuamos no período identificando as bases moleculares de como a expressão de determinados complexos principais de histocompatibilidade conferem proteção da forma severa da infecção por Zika bem como determinamos o mecanismo de evasão imunológica das variantes de preocupação do vírus SARS-CoV-2 e desenvolvemos um modelo capaz de classificar novas variantes como “de preocupação” (VOC) ou “de interesse” (VOI).

Os pesquisadores envolvidos nestes trabalhos (g → j) são: Italo Nunes de Oliveira, Marcelo Leite Lyra, Maria Socorro Seixas Pereira, Luiz Roberto Evangelista, Amando Ito e Sérgio Henrique Albuquerque Lira, bem como seus estudantes e pós-doutores.

g) Modelo Microscópico para Transições em Filmes Livrementemente Suspensos clássica.

Estudamos estudadas as transições de fase em bulk e em filmes livremente suspensos de sistemas apresentam a fase esmética C (Sm-C). Usando um potencial de campo médio de uma partícula, mostramos que o diagrama de fases de compostos com um pequeno transversal dipolo pode ser razoavelmente descrito quando há uma contração de camadas esméticas induzida pela inclinação molecular. Esta abordagem elimina a necessidade de introduzir uma contribuição adicional de volume excluído para estabilizar a fase esmética A (Sm-A), reduzindo assim o número de parâmetros livres do modelo. Variando o parâmetro do modelo associado aos dipolos transversais em moléculas calamíticas, uma rica variedade de diagramas de fase foi observado. Em particular, identificamos um ponto crítico terminal Sm-A-Sm-C, correspondendo à posição em que a linha de transição contínua entre as fases Sm-C e Sm-A encontra a linha de coexistência entre as fases Sm-C e nemática. Com relação aos filmes livremente suspensos na fase Sm-C, nossos resultados mostraram que a interação de efeitos de tamanho finito e as condições de ancoragem superficial afetam o diagrama de fase de filmes finos. Considerando um perfil de ângulo de inclinação e uma versão discreta do potencial de campo médio de uma única partícula, calculamos os perfis de parâmetros de ordem de filmes livremente suspensos sob diferentes regimes de ancoragem. Nós observamos que os efeitos de superfícies estabilizam o parâmetro de ordem de inclinação nas camadas mais externas dos filmes acima da temperatura de transição Sm-C-Sm-A de bulk. Como consequência, as camadas superficiais podem permanecer na fase Sm-C, enquanto as camadas centrais estão na fase Sm-A. Tal coexistência das fases Sm-C e -Sm-A em um filme independente foi relatado em estudos experimentais. No entanto, algumas questões ainda permanecem em aberto, como a possível conexão entre a força de ancoragem de superfície e ângulo de inclinação da superfície (Fig. g1).

h) Propriedades Espectroscópicas de Compostos Conjugados

As condições do ambiente têm um efeito profundo no comportamento fotofísico de compostos altamente conjugados, que podem ser explorados em uma grande variedade de aplicações. Neste contexto, usamos uma combinação de métodos experimentais e computacionais para investigar os efeitos térmicos e solvatocrômicos sobre a fluorescência de um derivado dansila, contendo um substituinte tienil, denominado 2- (3-tienil) etil dansilglicinato (TEDG). Em particular, analisamos como a polaridade e a temperatura do solvente afetam as energias do estado

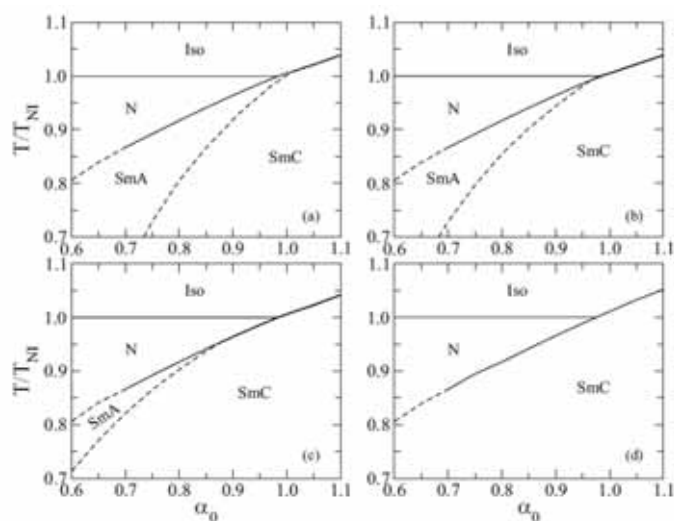


Figura g1: Diagramas de fase em temperature versus o parâmetro molecular da fase esmética-A, α_0 Foram consideradas moléculas calamíticas com diferentes dipolos transversais, representados pelo parâmetro β : (a) $\beta = 0.30$, (b) $\beta = 0.33$, (c) $\beta = 0.40$ e (d) $\beta = 0.70$. As linhas sólidas correspondem a transições de fase de primeira ordem, enquanto as linhas tracejadas representam as transições de fase de segunda ordem. Note que a fase esmética-A é suprimida à medida que o parâmetro β é aumentado.

fundamental e excitado do TEDG, usando as técnicas de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Nós mostramos que a emissão de TEDG apresenta um forte deslocamento de Stokes à medida que a polaridade do solvente, com o mecanismo de emissão envolvendo estados localmente excitados derivados de orbitais moleculares híbridos. Usando a teoria do funcional densidade dependente do tempo (TD-DFT), foi realizada uma análise dos orbitais HOMO-LUMO, do potencial eletrostático de superfície, e as energias de transições verticais. Além disso, foram estimadas as variações no momento de dipolo e do tempo de vida do estado excitado das moléculas de TEDG após fotoexcitação. Nossos resultados mostraram que o tempo de vida da fluorescência de TEDG apresenta uma dependência não monotônica com a polaridade do solvente, revelando uma contribuição não trivial da polaridade de meio para a estabilidade do estado excitado do TEDG. Em relação aos efeitos térmicos, observamos um aumento na intensidade de emissão conforme a temperatura da amostra é aumentada. No entanto, verificamos que a cinética da fluorescência não é afetada pela temperatura da amostra, indicando que a interação solvente-fluoróforo não é modificada com o aquecimento do sistema. Nossos resultados mostram que o TEDG exibe propriedades fluorescentes desejáveis, o que o torna um candidato promissor para uso em dispositivos eletrocromáticos e ópticos, bem como na produção de filmes poliméricos para termometria óptica e aplicações em termografia (Fig. h1).

i) Propriedades espectroscópicas de pontos quânticos de carbono

Pontos quânticos de carbono (CDs) surgiram como uma alternativa promissora de nanomateriais livres de metais, com grande potencial para uma ampla variedade de aplicações. Nesse contexto, foi realizado um estudo voltado à caracterização da morfologia e das propriedades e espectroscópicas de pontos de carbono derivados do cloreto de dansila. Usando o método de síntese hidrotermal, obtemos pontos de carbono (CD-DsCl) co-dopados com nitrogênio e enxofre, que exibem uma emissão azul, com um bom rendimento quântico (16%) sob fotoexcitação em

320 nm. Os efeitos térmicos na fotoluminescência CD-DsCl também foram investigados, onde um aumento pronunciado na intensidade de emissão foi observado à medida que a temperatura da amostra aumenta. Nossos resultados indicam uma contribuição relevante de um mecanismo de fluorescência termicamente ativado para o CD-DsCl. Além disso, analisamos a possibilidade de usar CDDsCl em aplicações de nanotermometria, com ênfase na faixa de temperatura de sistemas biológicos (20 °C - 60 °C). Além disso, foram determinadas as sensibilidades térmicas absoluta e relativa das nanopartículas, bem como a estabilidade da fotoluminescência após vários ciclos de aquecimento/resfriamento. Foram considerados ainda os efeitos do pH nas propriedades espectrais do CD-DsCl, onde foram observadas significativas modificações nos espectros de absorção e emissão conforme o valor do pH foi variado. Também foi investigada a possibilidade de utilização dos pontos quânticos de carbono derivados do cloreto de dansila para gerar espécies de oxigênio reativo (ROS) mediante fotoexcitação, o que viabilizaria o uso do CD-DsCl como fotossensibilizadores em aplicações de terapia fotodinâmica. Usando azul de metileno como uma referência padrão, o rendimento quântico de geração de oxigênio singleto foi determinado, que por sua vez apresenta uma dependência linear com a intensidade de excitação.

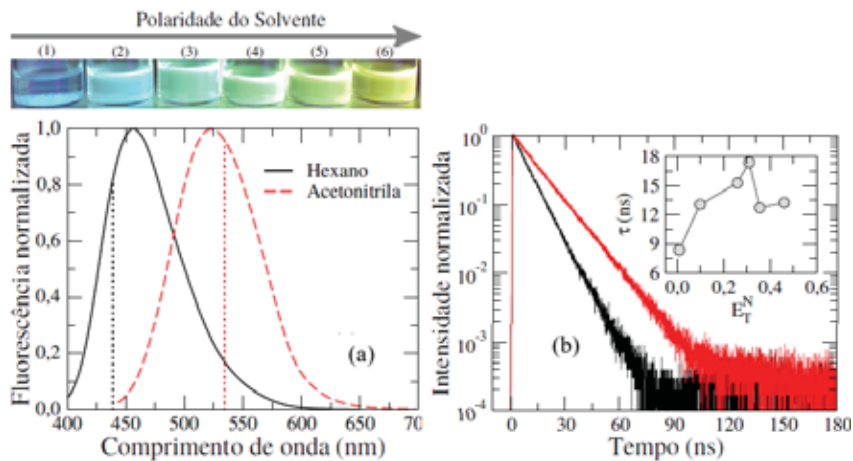


Figura h1: (a) Espectros de fluorescência normalizados de TEDG em solventes com polaridades diferentes: hexano (linha contínua preta) e acetonitrila (linha tracejada vermelha). As linhas pontilhadas verticais representam as previsões teóricas para os comprimentos de onda de emissão usando o método do funcional densidade. A caixa superior mostra a imagem da fluorescência TEDG em diferentes solventes: (1) Hexano, (2) tolueno, (3) clorofórmio, (4) diclorometano, (5) acetona e (6) acetonitrila. (b) Intensidade transiente normalizada de fluorescência TDGE para solventes com polaridades distintas: Hexano (linha preta) e Acetonitrila (linha vermelha). O detalhe mostra a dependência do tempo de vida do estado excitado, τ , com o parâmetro de polaridade do solvente E_T^N .

j) Transições de fase em monocamadas fosfolipídicas

Estes resultados de trabalhos teóricos foram coordenados pelo Prof. Mário Tamashiro e sua equipe.

Neste período demos continuidade ao trabalho abordado em relatórios anteriores, referente à investigação teórica de um modelo estatístico simplificado para descrever transições de fase em monocamadas fosfolipídicas e sua possível comparação com isotermas de compressão em filmes de Langmuir de sistemas modelo constituídos de um único tipo de molécula anfifílica. O modelo

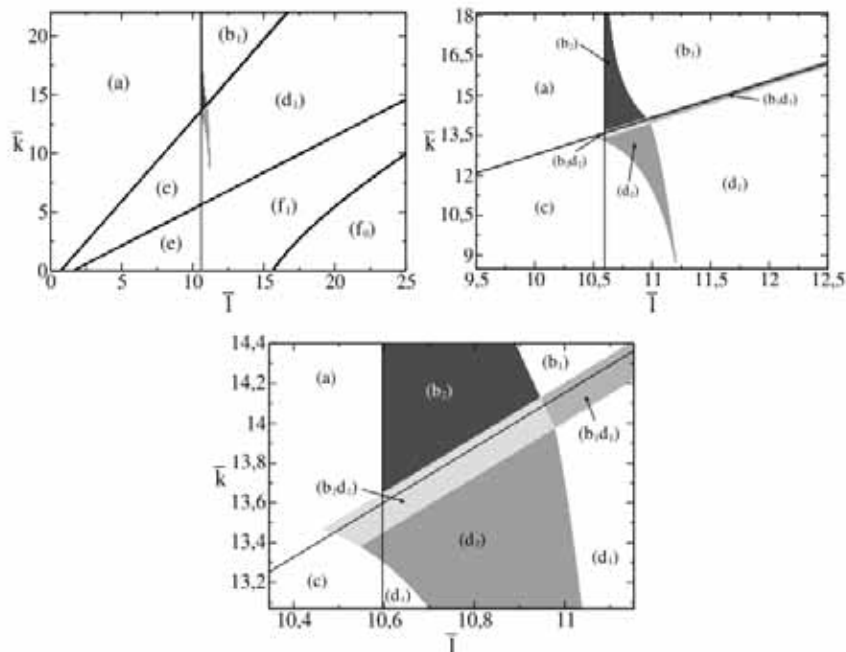


Figura j1: Topologias no plano $k \times l$ dos diagramas de fase do modelo DLG na aproximação de campo médio para os parâmetros $h=0$ e $w=4 \times 10^4$. A escolha desses parâmetros reflete valores apropriados para o ajuste de dados experimentais do fosfolípido DMPC. As várias figuras representam ampliações sucessivas do diagrama global $k \times l$, no qual se nota que as regiões sombreadas, associadas a essas topologias inéditas dos diagramas de fases, ocupam uma área relativamente pequena do espaço de parâmetros.

teórico investigado (DLG, *Doniach lattice gas*) foi proposto originalmente por Guidi & Henriques e analisado na aproximação de campo médio, tendo sido também investigado posteriormente através da aproximação de pares.

Anteriormente obtivemos duas topologias inéditas de diagramas de fases, denominadas de (b') e (f'), não encontradas em trabalhos anteriores do modelo DLG na aproximação de campo médio. A proposta para este período havia sido encontrar as regiões do espaço de parâmetros $k \times l$ (associados a parâmetros do hamiltoniano do modelo DLG) nos quais estas novas topologias ocorreriam. No entanto, ao se investigar em maior detalhe as possíveis topologias dos diagramas de fases, além das duas topologias (b') e (f'), que foram aqui renomeadas (b1) e (f0), encontramos várias outras topologias em regiões intermediárias, como mostra o diagrama $k \times l$ de estados/topologias na Figura j1.

As figuras a seguir apresentam diagramas de fases típicos no plano temperatura adimensional $t \times$ potencial químico adimensional μ , previstos pelo modelo DLG na aproximação de campo médio, para todas as topologias inéditas. Não apresentamos as topologias já obtidas anteriormente (a,c,e) que se localizam à esquerda da reta vertical $l \approx 10,6$, que apresentam a transição descontínua LE-LC, mas sem o ponto crítico associado. As linhas tracejadas representam linhas de transições descontínuas (de primeira ordem) entre as fases líquido-

expandido (LE), líquido-condensado (LC) e gás (G), além de duas fases líquido-expandido distintas (LE1 e LE2), para alguns casos. As linhas contínuas representam linhas de transições contínuas (de segunda ordem) entre a fase alternada (Stg: *staggered*) e as outras fases. As linhas contínuas coloridas representam linhas espinodais (limites de estabilidade). Os pontos especiais dos diagramas de fases são representados por símbolos sólidos: ponto crítico (l), ponto triplo (s), ponto crítico terminal (\square), ponto tricrítico (\square). Em alguns casos, o encontro de duas linhas espinodais numa região metaestável dá origem a um pseudo-ponto crítico (\square), que pode se tornar um ponto crítico quando o encontro das linhas espinodais passa a ocorrer numa região termodinamicamente estável.

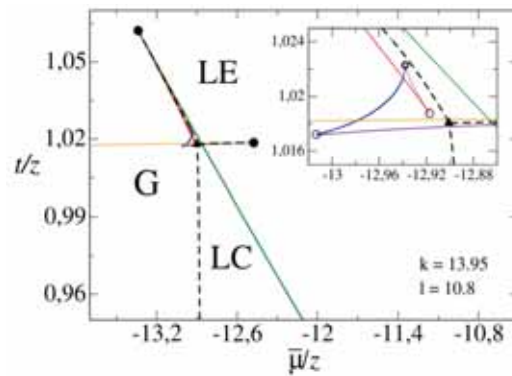


Figura j2: Diagrama de fases $t \times \mu$, correspondente à região b2.

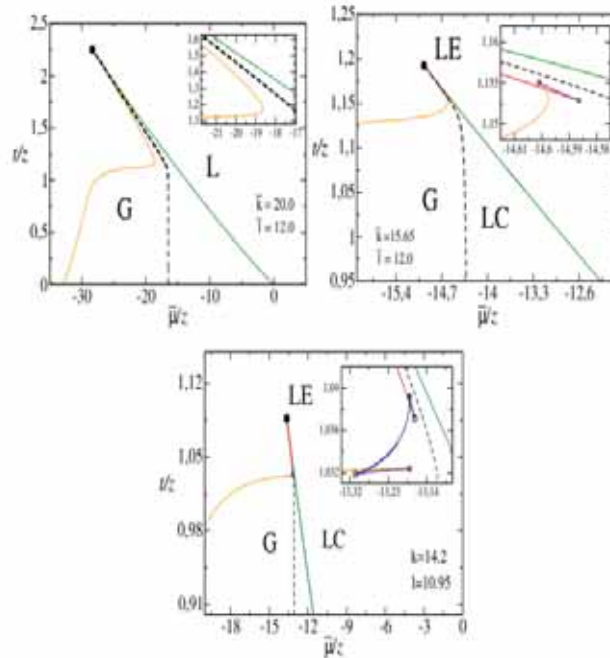


Figura j3: Diagramas de fases $t \times \mu$, correspondentes à região b1.

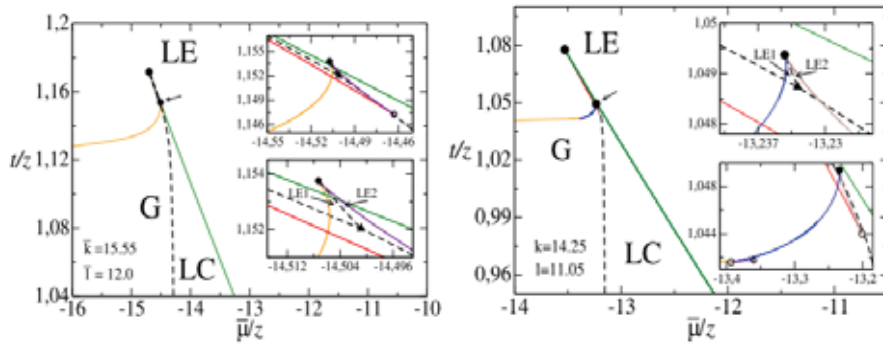


Figura j4: Diagramas de fases $t \times \mu$, correspondentes à região b1d1. As setas apontam para as transições descontínuas LE1-LE2 entre duas fases LE distintas.

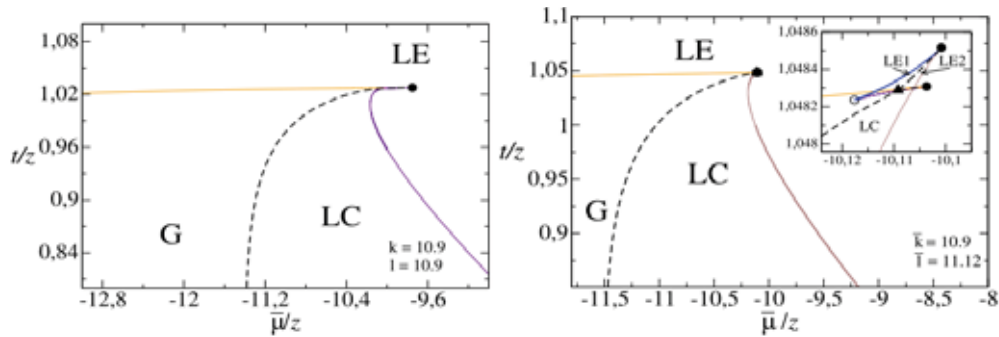


Figura j5: Diagramas de fases $t \times \mu$, correspondentes à região d1.

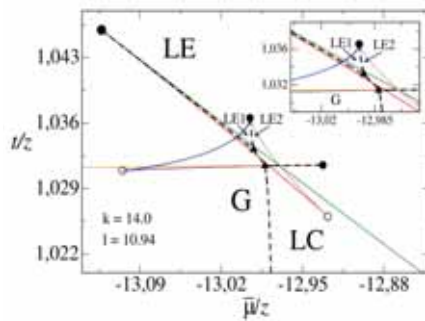


Figura j6: Diagramas de fases $t \times \mu$, correspondentes às regiões d1 e d2, respectivamente.

As tabelas j1 e j2 apresentam um resumo das propriedades associadas às várias topologias identificadas. Não esperávamos que o diagrama de estados apresentasse toda essa pluralidade de topologias, o que demandou tempo para sua obtenção e análise. Aliás, cabe mencionar que obter tais resultados numéricos é tarefa laboriosa e não trivial, pois exige o monitoramento das inúmeras soluções numéricas das quatro equações de estado (pois o sistema é analisado em uma rede bipartida, com dois parâmetros de ordem para cada sub-rede), acrescidas das condições críticas (no caso de se determinar os pontos críticos) em intervalos de parâmetros que são, muitas vezes, bem estreitos, conforme apresentado na Figura j1, bem como nas curvas espinodais e suas ampliações nas demais Figuras.

Tabela j1: Possíveis topologias dos diagramas de fase observados no diagrama $k \times l$ do modelo DLG na aproximação de campo médio, apresentado na Figura 1 e os possíveis pontos críticos (PC) associados a transições descontínuas, número de pontos triplos (PT) e ocorrência da fase alternada (Stg).

Tipo	PC G-LE	PC LE-LC	PC LE1-LE2	PT	fase Stg
a	✓	×	×	1	×
b ₁	✓	×	×	1	×
b ₂	✓	✓	×	1	×
b ₁ d ₁	✓	×	✓	1	×
b ₂ d ₂	✓	✓	✓	2	×
c	×	×	×	0	×
d ₁	×	✓	×	0	×
d ₂	×	✓	✓	1	×
e	×	×	×	0	✓
f ₀	×	×	×	0	✓
f ₁	×	✓	×	0	✓

Tabela j2: Colapsos de pontos críticos em pontos triplos associados às mudanças de topologias no diagrama $k \times l$ (Figura j1).

Tipo	Colapsos
b ₂ → b ₁	ponto crítico LE-LC colapsa no ponto triplo G-LE-LC
b ₁ d ₁ → b ₁	ponto crítico LE1-LE2 colapsa no ponto triplo G-LE1-LE2
b ₁ d ₁ → d ₁	ponto crítico G-LE colapsa no ponto triplo G-LE1-LE2
d ₂ → d ₁ (à esquerda)	ponto crítico LE1-LE2 colapsa no ponto triplo LE1-LE2-LC
d ₂ → d ₁ (à direita)	ponto crítico LE-LC colapsa no ponto triplo LE1-LE2-LC
b ₂ d ₂ → b ₂	ponto crítico LE1-LE2 colapsa no ponto triplo G-LE1-LE2
b ₂ d ₂ → d ₂	ponto crítico G-LE colapsa no ponto triplo G-LE1-LE2
b ₂ d ₂ → b ₁ d ₁	ponto crítico LE-LC colapsa no ponto triplo G-LE-LC
f ₁ → f ₀	ponto crítico LE-LC colapsa no ponto tricrítico

Estes projetos ($k \rightarrow m$) foram coordenados pelas professoras Karin do Amaral Riske e Kátia Regina Perez, e suas equipes.

k) Peptídeo antimicrobiano com atividade antiplasmódica

Estudamos a interação de modelos de membrana (LUVs e GUVs) com o peptídeo [Lys]⁷-Polybia-CP (ILGTILKLLKSL-NH₂), um análogo do peptídeo Polybia-CP, presente no veneno da vespa social (*Polibya paulista*), e que apresenta atividade antitumoral, antibactericida, antifúngica e antiplasmódica. Neste relatório mostramos resultados da interação do peptídeo nativo com

LUVs de POPG, POPC:POPC e POPC:col obtidos com a técnica de ITC. A figura k1 mostra os resultados da ITC obtidos para o peptídeo na concentração de 70 μM nas três diferentes composições de vesículas estudadas.

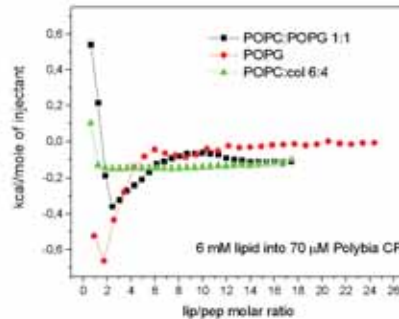


Figura k1. As análises de ITC foram realizadas a 25° C Cada experimento consistiu de 28 injeções sucessivas de 10 μL de LUVs a 6 mM lipídio a cada 10 minutos na cela de reação preenchida com 70 μM Polybia-CP em intervalos de 300s.

É possível observar, na Figura k1, que a o peptídeo interage com as vesículas aniônicas (POPG puro ou POPC:POPG), mas praticamente não há interação com a composição que mimetiza células de mamífero (POPC:col). Para a vesícula de POPC:POPG 1:1 a variação de calor inicia em um processo endotérmico e em seguida passa a ser exotérmico. A mesma tendência existe para a interação com POPG, mas a componente endotérmica inicial não é alta o suficiente para reverter o sinal total da interação. A Figura k2 mostra experimentos com LUVs de POPG injetadas em diferentes concentrações de peptídeo. À medida que a concentração do peptídeo aumenta, observa-se a formação da componente endotérmica. A presença da componente endotérmica tem sido associada à formação de poros, o que seria de fato esperado para as primeiras injeções e maior concentração de peptídeo.

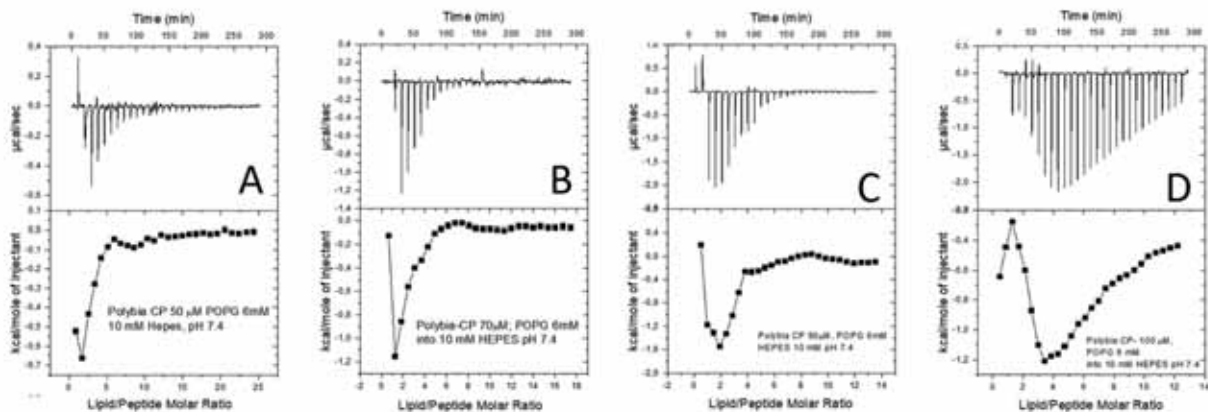


Figura k2. As análises de ITC foram realizadas a 25° C Cada experimento consistiu de 28 injeções sucessivas de 10 μL de LUVs de POPG (6mM) a cada 10 minutos na cela de reação preenchida com concentrações crescentes Polybia-CP: (A) 50 μM , (B) 70 μM , (C) 90 μM e (D) 100 μM em intervalos de 300 s.

Com esses dados ainda não é possível avaliar o mecanismo de ação desse peptídeo, mas é possível inferir, quando comparado com os resultados do vazamento de carboxifluoresceína, apresentadas no relatório anterior, que há uma desestabilização da membrana seja pela formação de poros, seja por agregação do peptídeo na membrana quando as análises são realizadas em concentrações

maiores de peptídeo que leva ao extravasamento do conteúdo interno (a carboxifluoresceína) nos três modelos de membranas estudados.

1) Interação do peptídeo antimicrobiano ocelatina com bicamadas lipídicas

Ocelatina PT7 (O-PT7) e ocelatina PT8 (O-PT8) são dois peptídeos antimicrobianos (PAMs) que foram purificados a partir da secreção da pele de um sapo (*Leptodactylus pustulatus*), ambos apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *S. choleraesuis* e *K. pneumoniae*) e Gram-positivas (*S. aureus*). O objetivo do presente estudo é desenhar, sintetizar e avaliar a atividade biológica de peptídeos antimicrobianos sintéticos cujas sequências foram inspiradas na sequência primária de O-PT7 e O-PT8. Inicialmente, a sequência de O-PT7 foi submetida a análise no *CAMP_{R3}* (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>), uma ferramenta online que identifica regiões na sequência primária do peptídeo com maior probabilidade de envolvimento na sua atividade antimicrobiana. Os peptídeos gerados pelo *CAMP_{R3}* foram analisados quanto a sua massa, carga, hidrofobicidade e índice de Bomam, usando a ferramenta *Antimicrobial Peptide Database* (<http://aps.unmc.edu/AP/>) e seu potencial antimicrobiano foi avaliado, *in silico*, através da ferramenta *iAMPpred* (<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>). Além disso, várias outras análises *in silico* foram realizadas, tais como:

- Avaliação da capacidade dos peptídeos de penetrarem em membranas celulares (*Cell Penetrating Peptides*, http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/multi_pep.php);
- Alergenicidade (*Predicting Antigenic*, <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>);
- Potencial hemolítico (*HemoPI*, <http://crdd.osdd.net/raghava/hemopi/index.php>);
- Digestibilidade (*Peptide Cutter* - http://web.expasy.org/peptide_cutter/);
- Resistência no ambiente intestinal (*HLP*, <http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/help.html>).
- Toxicidade (*ToxinPred*, <http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/design.php>).

Dentre os peptídeos gerados pelo *CAMP_{R3}*, selecionamos uma sequência que mostrou as características mais promissoras, essa sequência foi denominada de ocelatina-Pep1 (tabela 11). A partir da sequência de ocelatina-Pep1 foram desenhados outros 9 peptídeos, obtidos pela troca de 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácidos. Essas substituições de aminoácidos têm como objetivo melhorar características estruturais que estão intimamente relacionadas com a atividade antimicrobiana, tais como massa molecular, hidrofobicidade e carga do peptídeo. Nas tabelas 11 e 12 estão sumarizadas as características físico-químicas e os resultados obtidos das análises *in silico* dos peptídeos.

Tabela 11. Propriedades físico-químicas dos peptídeos desenhados a partir da sequência primária de O-PT7.

Peptídeo	Sequência	Massa (Da)	Carga	Hidrofobicidade	Índice de Boman
Ocelatina-Pep1	VFDIIKGAGKQLIA	1.472,78	+1	57%	-0,48
Ocelatina-Pep2	VFDIIKGAGKRLIA	1.500,84	+2	57%	0,18
Ocelatina-Pep2-W ₂	VWDIIKGAGKRLIA	1.539,88	+2	57%	0,22
Ocelatina-Pep2-W ₁₃	VFDIIKGAGKRLWA	1.573,89	+2	57%	0,36
Ocelatina-Pep3	KFDIIKGAGKRLIA	1.529,88	+3	50%	0,86
Ocelatina-Pep3-W ₂	KWDIIKGAGKRLIA	1.568,97	+3	50%	0,91
Ocelatina-Pep3-W ₁₃	KFDIIKGAGKRLWA	1.602,93	+3	50%	1,05
Ocelatina-Pep4	VFHIIKGAGKQLIA	1.494.83	+2,25	57%	-0,77
Ocelatina-Pep4-W ₂	VWHIIKGAGKQLIA	1.533.87	+2,25	57%	-0,73

Ocelatina-Pep4-W₁₃ VFHIIKGAGKQLWA 1.567.89 +2,25 57% -0,59

* Os resíduos de aminoácidos que estão sublinhados correspondem à resíduos que foram substituídos na sequência original de ocelatina-Pep1.

** A massa, carga, hidrofobicidade e índice de Boman foram calculados através do *Antimicrobial Peptide Database*. O índice de Boman estima o potencial de uma proteína interagir com outras proteínas, quanto maior seu valor, maior será essa probabilidade de interação. Um índice de Boman elevado pode ser indicativo de que o peptídeo irá interagir com proteínas de membrana, podendo apresentar efeitos tóxicos indesejados.

Tabela 12. Análises *in silico* dos peptídeos desenhados a partir da sequência primária de O-PT7.

Peptídeo	Potencial para penetrar membranas ¹	Potencial alergênico ²	Potencial hemolítico ³	Potencial tóxico ⁴	Potencial antifúngico ⁵ (%)	Potencial antibacteriano ⁵ (%)	Tempo de meia-vida ⁶	Sítio de clivagem ⁷ (tripsina)	Sítio de clivagem ⁷ (pepsina)
Ocelatina-Pep1	N	N	0,47	N	94	100	0,08	2	3
Ocelatina-Pep2	N	N	0,48	N	97	100	0,08	3	2
Ocelatina-Pep2-W ₂	N	N	0,43	N	83	98	0,42	3	2
Ocelatina-Pep2-W ₁₃	N	N	0,43	N	82	97	0,18	3	2
Ocelatina-Pep3	N	N	0,50	N	100	100	0,30	4	2
Ocelatina-Pep3-W ₂	N	N	0,45	N	96	100	0,42	4	2
Ocelatina-Pep3-W ₁₃	N	N	0,46	N	96	100	0,42	4	2
Ocelatina-Pep4	N	N	0,49	N	100	100	0,59	2	3
Ocelatina-Pep4-W ₂	N	N	0,45	N	96	100	0,80	2	3
Ocelatina-Pep4-W ₁₃	N	N	0,43	N	97	100	0,71	2	4

¹ O potencial dos peptídeos de penetrarem membranas celulares foi determinado através do *Cell Penetrating Peptide*. N: o peptídeo não apresenta potencial para penetrar membranas.

² O potencial alergênico dos peptídeos foi avaliado usando o *Antigenic Prediction*. N: o peptídeo não apresentou nenhum determinante antigênico.

³ O potencial hemolítico foi calculado pelo *HemoPI*. Quanto mais próximo de 1, maior será a probabilidade de que o peptídeo apresente atividade hemolítica.

⁴ O potencial tóxico foi calculado pelo *ToxinPred*. N: o peptídeo não apresenta potencial para ser categorizado como uma toxina.

⁵ O potencial antifúngico e antibacteriano dos peptídeos foi calculado pelo *iAMPpred*.

⁶ O tempo de meia-vida dos peptídeos no ambiente intestinal foi calculado usando o *HalfLife Prediction*. Baixa estabilidade: tempo de meia-vida menor que 0,1 s. Estabilidade normal: tempo de meia-vida entre 0,1 e 1 s. Alta estabilidade: tempo de meia-vida superior à 1 s.

⁷ A presença de sítios de clivagem para tripsina e pepsina (pH 1,3 e pH>2) foi determinada usando a ferramenta *Peptide Cutter*.

Os peptídeos apresentaram baixa massa molecular, carga final entre +1 e +3 e hidrofobicidade $\geq 50\%$ (tabela 11). De modo geral, peptídeos catiônicos com baixa massa molecular e elevada hidrofobicidade apresentam um melhor desempenho em relação à atividade antimicrobiana, uma vez que tais características estão intimamente relacionadas com a capacidade que os peptídeos apresentam de se inserirem nas membranas celulares de microrganismos.

Em relação aos resultados obtidos das análises *in silico* (tabela 12), nenhum dos peptídeos apresentou potencial de penetração na célula. Apesar da grande maioria dos PAMs atuarem promovendo a formação de poros na membrana plasmática, há PAMs que exercem sua ação antimicrobiana por outras rotas, sem necessariamente provocar danos nas membranas celulares. Portanto, o fato dos peptídeos não conseguirem penetrar membranas não limita sua aplicação. Nenhum dos peptídeos analisados apresentou potencial alergênico e tóxico. Além disso, todos os peptídeos apresentaram baixo potencial hemolítico. Este conjunto de dados é bastante animador, pois indica que os peptídeos são seguros, o que permite uma futura aplicação terapêutica dos mesmos. De modo geral, os peptídeos apresentaram um elevado potencial para atividade antimicrobiana (scores superiores a 90% para atividade antibacteriana e antifúngica (tabela 12), com destaque para os peptídeos ocelatina-Pep3 e ocelatina-Pep4, que exibiram scores de 100% para a atividade antifúngica e antibacteriana. Em relação à digestibilidade *in silico* dos peptídeos, a presença de sítios de clivagem para tripsina e pepsina foi verificada em todos os peptídeos, entretanto, a maioria deles demonstrou ter uma boa estabilidade em ambiente intestinal, com tempos de meia-vida superiores a 0,1 segundos (tabela 12). Para dar continuidade ao estudo, as sequências peptídicas de ocelatina-Pep1, ocelatina-Pep2 e ocelatina-P2-W₂ foram encaminhadas para síntese pela Empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil), sendo a pureza dos peptídeos comprovada por RP-HPLC ($\geq 95\%$). Após a síntese, os peptídeos foram solubilizados em solução salina 0,15 M e diluídos em série (concentrações entre 125 μM e 0,24 μM). A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi avaliada contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), conforme a metodologia descrita em Dias *et al.*, 2020. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir em 50% (CIM₅₀) e 100% (CIM₁₀₀) respectivamente, o crescimento dos microrganismos testados. Os valores de CIM₅₀ e CIM₁₀₀ estão dispostos na tabela 13. Nenhum dos peptídeos apresentou atividade contra *C. albicans*. O peptídeo ocelatina-Pep1 foi capaz de inibir em 50% e 100% o crescimento de *C. parapsilosis* nas concentrações de 45,9 μM e 114,5 μM , respectivamente, e demonstrou baixa atividade contra *C. krusei*. Já ocelatina-Pep2 apresentou baixa atividade contra *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Ocelatina-Pep2-W₂ foi ativo apenas contra *C. parapsilosis*. Nenhum dos peptídeos apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias testadas.

Tabela 13. Atividade antifúngica e antibacteriana de ocelatina-Pep1, ocelatina-Pep2 e ocelatina-Pep2-W₂ contra espécies de levedura do gênero *Candida*.

Microrganismos	Peptídeos					
	Ocelatina-Pep1		Ocelatina-Pep2		Ocelatina-P2-W ₂	
	CIM ₅₀	CIM ₁₀₀	CIM ₅₀	CIM ₁₀₀	CIM ₅₀	CIM ₁₀₀
Leveduras						
<i>C. albicans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. parapsilosis</i>	49,5	114,5	72	>125	>125	>125
<i>C. krusei</i>	60,3	>125	68,5	>125	ND	ND
Bactéria Gram-positiva						
<i>S. aureus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bactérias Gram-negativas						

<i>K. pneumoniae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

A atividade antimicrobiana dos peptídeos também foi avaliada frente ao protozoário *Leishmania infantum*, seguindo a metodologia descrita por Carneiro *et al.*, 2021. Ocelatina-Pep1, ocelatina-Pep2 e ocelatina-Pep2-W₂ mostraram-se ativos contra formas promastigotas de *L. infantum* após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento. O resultado mais promissor foi obtido para ocelatina-Pep2-W₂, que na concentração de 0,58 µg/mL (0,37 µM) reduziu em 50% a viabilidade celular de *L. infantum* (figura 1).

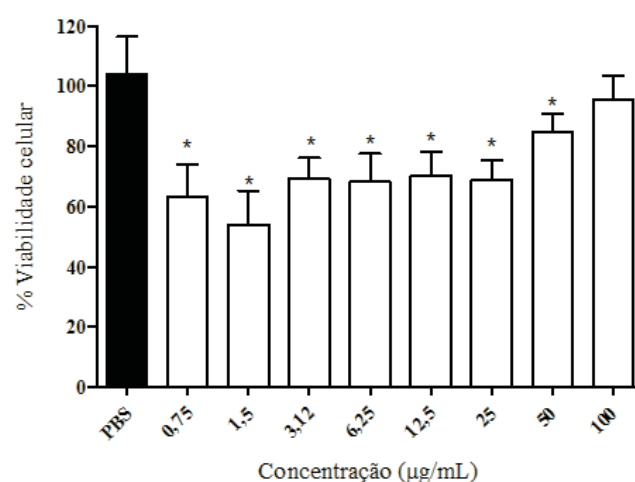


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de ocelatina-Pep2-W₂ na viabilidade celular das formas promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento. PBS = grupo controle. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± desvio padrão, de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (**p* < 0,05 vs. grupo controle).

m) Estudo da interação do extrato de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Hibisco) com membranas

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs) foram descritas pelo biólogo Valderly Kinupp como plantas nativas ou exóticas comestíveis que podemos encontrar em quintais, canteiros e terrenos baldios. No Brasil estima-se que pelo menos 10 % da flora nativa é alimentícia, totalizando em média cinco mil espécies. Além disso, elas são classificadas como alimentos funcionais, por serem fontes ricas de vitaminas essenciais, antioxidantes, fibras e sais minerais. Dentre as PANCs mais populares, podemos destacar o *Hibiscus sabdariffa* L., uma espécie vegetal da família *Malvaceae*, popularmente conhecida como hibisco. O *Hibiscus sabdariffa* L. possui uma alta concentração de antioxidantes flavonóides (principalmente antocianinas) e vitamina C, vitaminas do complexo B e minerais. Estudos demonstraram que o consumo de antocianinas tem um efeito hepatoprotetor contra o estresse oxidativo, além de prevenir outras doenças causadas por síndromes metabólicas e a diminuição da hiperglicemia. Estudos da interação do extrato de hibisco com a bicamada lipídica da membrana plasmática são escassos na literatura, portanto, este trabalho tem como objetivo principal estudar a interação do extrato bruto de *H. sabdariffa* L. com vesículas lipídicas como modelos miméticos da membrana.

Os EBH foram obtidos após o período de três dias de incubação dos bulbos de hibisco com uma solução alcóolica. O extrato obtido apresentou uma coloração acastanhada sugerindo a extração das antocianinas presentes no hibisco.

As bicamadas de fosfolipídeos saturados como o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e a mistura DPPC:DPPG 1:1 quando submetidas ao aumento da temperatura com uma taxa de variação controlada apresentam um perfil de termograma e uma temperatura de transição de fase do estado gel para o líquido cristalino característica de cada sistema. Esta propriedade permite analisar o efeito da inserção de substâncias nestas membranas, uma vez que sua presença nas bicamadas lipídicas causa modificações no perfil térmico destas membranas. A interação do extrato bruto do cálice de hibisco (EBH) nas membranas neutras de DPPC ou carregadas negativamente de DPPC:DPPG 1:1 ou DPPG puro foi estudado por calorimetria diferencial de varredura.

A Figura m1 mostra o perfil térmico das membranas compostas de DPPG na ausência ou na presença de EBH. A temperatura de transição de fase principal (T_m) da bicamada de DPPG na ausência do EBH foi 40,0 °C com um início da transição ($T_{m_{on}}$) em 39,4 °C e o final da transição em 45,8 °C. O acréscimo de 5 μ L do EBH ao filme de DPPG levou a perda do perfil térmico de transição de fase desta bicamada lipídica indicando a interação do EBH na membrana de DPPG (Figura m1).

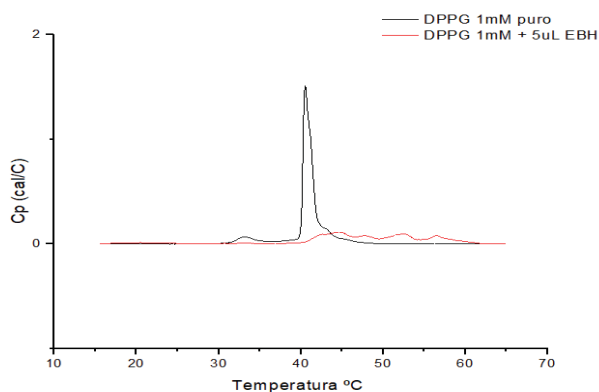


Figura m1 - Calorimetria diferencial de varredura de vesículas multilamelares de DPPG na ausência e na presença do EBH, conforme indicado na legenda da figura.

O perfil térmico das membranas compostas de DPPC na ausência ou na presença de EBH revelou que a T_m da bicamada de DPPC na ausência do EBH foi 41,3 °C com um início da transição em 38 °C e o final da transição em 43,4 °C. O aumento na concentração do EBH causou o alargamento e achatamento do pico de transição principal sem mudar significativamente a T_m da membrana de DPPC. A Figura m2 mostra o perfil térmico das membranas compostas de DPPC:DPPG 1:1 na ausência ou na presença de EBH. A temperatura de transição principal (T_m) destas bicamadas na ausência do EBH foi 40,5 °C com um início da transição ($T_{m_{on}}$) em 37,7 °C e o final da transição em 47,7 °C. O aumento na concentração do EBH causou o aumento da temperatura de transição de fase para valores acima de 50 °C indicando uma diminuição na fluidez destas membranas na presença do EBH.

A Figura m2 mostra o perfil térmico das membranas compostas de DPPC:DPPG 1:1 na ausência ou na presença de EBH. A temperatura de transição principal (T_m) destas bicamadas na ausência do EBH foi 40,5 °C com um início da transição ($T_{m_{on}}$) em 37,7 °C e o final da transição em 47,7 °C. O aumento na concentração do EBH causou o aumento da temperatura de transição de fase para valores acima de 50 °C indicando uma diminuição na fluidez destas membranas na presença do EBH.

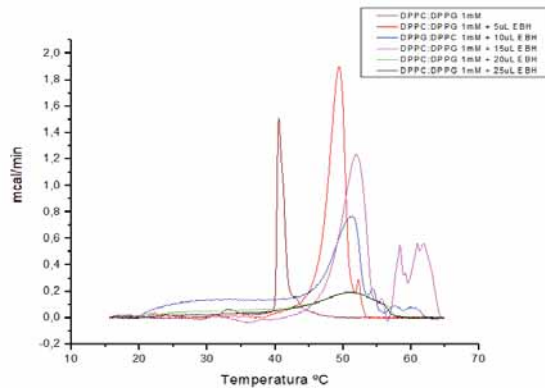


Figura m2 - Calorimetria diferencial de varredura de vesículas multilamelares de DPPC:DPPG 1:1 na ausência e na presença de diferentes concentrações do EBH, conforme indicado na legenda da figura.

Os resultados de DSC indicam que o EBH interage de forma distinta com membranas neutras ou carregadas negativamente. Estes ensaios estão sendo repetidos e os resultados analisados para obtermos informações mais precisas a respeito dos parâmetros termodinâmicos da interação do EBH com os sistemas miméticos de membranas propostos neste trabalho.

n) Estudo e caracterizações de fluidos complexos: efeitos de superfície, difusão e caracterizações físicas

Os Profs. Drs. Luiz R. Evangelista e Rafael S. Zola, bem como suas equipes de pós-doutores alunos e colaboradores.

Durante a execução desta parte do projeto nos dedicamos a estudar fluidos complexos limitados a diferentes geometrias, suas interações com superfícies limitantes, e a construção de códigos computacionais e modelagem analítica para desenvolver tais investigações. Um estudo que se mostrou frutífero no grupo, e que abriu uma nova vertente de estudos, é o de fases nemáticas quirais em geometrias esféricas, por meio do método de Monte Carlo. Este método é aqui baseado em um potencial quiral entre pares. A técnica desenvolvida por nós é consideravelmente mais simples de implementar e exige menos poder computacional para usar, o que significa que resultados são obtidos mais rapidamente, quando comparados ao modelo de Landau-de Gennes (atualmente, o modelo mais utilizado para tais estudos) e também pode ser usada em computadores tipo desktop, sem precisar de máquinas envolvendo cluster complexos. Além disso, a técnica permite prever estados estáveis de qualquer tipo de host nemático, no que diz respeito à elasticidade, graças a uma parametrização simples que relaciona o potencial às constantes elásticas

tradicionais de Frank. Assim, o efeito real de diferentes constantes elásticas pode ser compreendido se usarmos nosso método, o que não é possível diretamente quando se usa o método de Landau de Gennes. Nossa metodologia também permite a consideração de qualquer tipo de ancoragem à superfície bem como alterar o valor da energia com facilidade. Somando-se a isso, pode-se começar de um estado aleatório e realizar um verdadeiro quench térmico, uma vez que a temperatura é um parâmetro de controle do modelo. Demonstramos que estados conhecidos e estáveis encontrados experimentalmente podem ser obtidos considerando todos os ingredientes do modelo, sem a necessidade de qualquer estado inicial “provável”. Além disso, diferentes nós e a posição de defeitos metaestáveis e estáveis podem ser estudados, incluindo sua dependência da anisotropia elástica. Por último, mas não menos importante, propusemos uma nova ferramenta de visualização, baseada nas isosuperfícies de distorção ao quadrado, como uma nova maneira de visualizar o complexo arranjo de estruturas em camadas dentro do confinamento esférico. Essa ferramenta pode ser facilmente empregada em outros métodos de simulação, como o de Landau-de Gennes.

Assim, os resultados representam um avanço na simulação de estruturas lamelares em geometria curva, e podem ser prontamente aplicados em diferentes campos do conhecimento, da física básica e aplicada à biologia. Demonstramos a existência de vários estados estáveis de nemáticos quirais em geometrias esféricas, alguns nunca antes reportados, e sua evolução partindo de um estado desorganizado, mostrando seu processo completo de aniquilação de defeitos. A figura abaixo mostra este processo para duas gotas, com alta quiralidade, uma com ancoramento homeotrópico e outra com ancoramento tangencial. Nosso modelo deve ser prontamente utilizado em outras geometrias, esféricas ou não, para desenvolvermos o conhecimento sobre a organização lamelar em geometrias curvilíneas. É importante também ressaltar que, graças ao desenvolvimento destes modelos, iniciamos uma colaboração como grupo de fluidos complexos da UFAL, que deve resultar em produções bibliográficas em conjunto num futuro próximo.

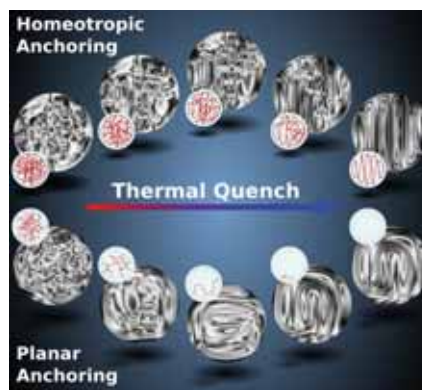


Figura n1: Duas gotas nemáticas com alta quiralidade evoluindo de um estado desorganizado para um estado estável, indicando a evolução e aniquilação de linhas de defeitos, que são estáveis em alguns casos. A parte de cima mostra uma gota homeotrópica enquanto que a parte de baixo, uma gota planar.

Outra vertente em que dedicamos grande esforços neste projeto foi em relação a processos difusivos em fluidos complexos. Em um dos trabalhos, estudamos a difusão de partículas neutras por um meio modulado em um sistema confinado com adsorção e dessorção. Esta abordagem recria como a difusão (iônica ou corantes, por exemplo) ocorre em displays onde o cristal líquido utilizado é naturalmente modulado, como no caso de colesterícos, esméticos e até mesmo a recém-descoberta fase twist-bend. Nossos resultados indicam que, devido a uma modulação natural do

coeficiente de difusão, existe uma modulação natural na densidade de partículas, e que essa modulação altera o processo de adsorção e produz regimes difusivos que podem ser tanto usuais quanto anômalos. Na figura n2 mostramos essa modulação na densidade (esquerda) e como os regimes difusivos vão de superdifusivos a subdifusivos dependendo da frequência e amplitude da modulação (direita). Estes trabalhos envolvendo difusão em meios limitados são os primeiros da área, e devem ser mais explorados no futuro. Vale ressaltar também que este projeto é desenvolvido em parceria com um pesquisador participante do INCT de sistemas complexos.

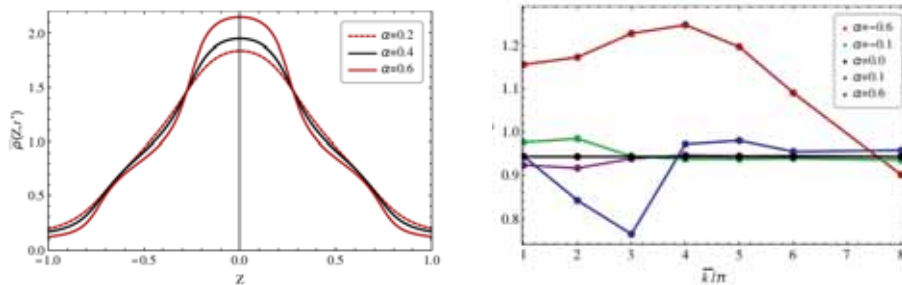


Figura n2: Efeito da modulação em um meio limitado. A esquerda, distribuição volumétrica demonstrando uma clara modulação espacial. A direita, expoente indicando como o regime difusivo muda conforme a frequência espacial é alterada, indo de superdifusivo para subdifusivo conforme a frequência aumenta.

Estes projetos (o → q) foram coordenados pela professora Luciana Andrade, colaboração com o Dr. Lional Gamarra, e suas equipes.

o) **Hiperlipidemia e estresse mecânico sobre alterações de citoesqueleto e dispersão lisossomal em células endoteliais e da parede de aorta de camundongos ApoE^{-/-} e suas implicações para o desenvolvimento da placa aterosclerótica**

A fim de entender se diferentes padrões de tensão de cisalhamento induzem fragilidade vascular e aumento da suscetibilidade a lesões em células, especialmente em células endoteliais (ECs – *endothelial cells*), nós implantamos cirurgicamente um dispositivo modificador de tensão de cisalhamento (*cast*) na artéria carótida direita (RC – *right carotid*) de camundongos ApoE-knock out (ApoE^{-/-}), um modelo animal bem conhecido para aterosclerose. A implantação do *cast* nos animais e coleta do material foi realizada em colaboração com o grupo do Professor Nikolaos Stergiopoulos, coordenador do Laboratório de Hemodinâmica e Tecnologia Cardiovascular (LHTC), o qual está localizado no Instituto Interdisciplinar de Bioengenharia (Interfaculty Institute of Bioengineering/IBI) da Escola Politécnica Federal de Lausanne (EPFL - Lausanne / Suíça). Para avaliar o papel da hiperlipidemia, juntamente com a força de cisalhamento na fragilidade vascular, o mesmo *cast* foi implantado em camundongos tipo selvagem, C57BL/6, os quais sabidamente não desenvolvem quadros hiperlipidêmicos. Adicionalmente, a carótida esquerda (LC – *left Carotid*) de ambos os animais, selvagem e ApoE^{-/-}, foram usados como controles internos. O dispositivo apresenta um formato em cone (figura o1), o qual é capaz de gerar uma estenose gradual do vaso, no caso a aorta, resultando no aumento da tensão de cisalhamento (HSS – *High Shear Stress*) no segmento de vaso dentro do dispositivo, uma

diminuição do fluxo sanguíneo, com baixa tensão de cisalhamento (LSS – *Low Shear Stress*), na região anterior àquela onde o *cast* foi implantado e, por último, uma região de fluxo em vórtice logo após à região de implantação do *cast* (OSS – *Oscillatory Shear Stress*). Para avaliar a influência destes fatores na fragilidade vascular e desta última como fator contribuinte para o desenvolvimento da aterosclerose, foi realizado um estudo para determinação do tempo de aparecimento da placa. Placas características foram observadas, como esperado, apenas em camundongos ApoE^{-/-}. Adicionalmente, foram evidentes somente na 5 semana, embora algumas alterações tenham sido observadas já na terceira semana após o implante. Dessa forma, os dados forma coletadaos com amostras cõkhidas de camundongos , uma semana após a implantação do *cast*. Ainda, ressalta-se que as placas foram observadas principalmente nas regiões de fluxo oscilatório, logo após a região de implante. Os dados obtidos no presente trabalho mostram uma tendência de acúmulo de fibras de actina em áreas com maior deposição de lipídios em camundongos ApoE^{-/-}, indicando que o excesso de lipídios pode interferir na organização do citoesqueleto de actina (figura o2). De fato, após análise adicionais da organização dos filamentos de actina nestes animais, pôde-se observar uma marcação mais difusa de actina nos camundongos ApoE^{-/-}, enquanto o grupo controle revelou a presença de estruturas mais semelhantes a filamentos. Além disso, a tensão de cisalhamento sozinha foi capaz de aumentar a lesão celular em áreas de HSS no RC de camundongos ApoE^{-/-} e C57BL / 6 (figure o3). Nesta análise, a hiperlipidemia não foi determinante para a suscetibilidade das células vasculares à lesão. No entanto, especulamos que a exposição das células ao excesso de lipídios pode ser prejudicial à sua capacidade de reparação de danos, já que a exocitose lisossomal, uma etapa importante para a membrana plasmática reparo, está comprometida em camundongos ApoE^{-/-}. Juntos, esses dados mostram que a dislipidemia e variações nos padrões de tensão de cisalhamento *in vivo*, afeta não apenas a modulação mecânica celular, como indicado pelas mudanças na organização do citoesqueleto de actina, mas também altera o tráfego de membrana das células do sistema vascular, o que provavelmente pode contribuir para a fragilidade endotelial e, portanto, para as etapas iniciais de desenvolvimento de aterosclerose.

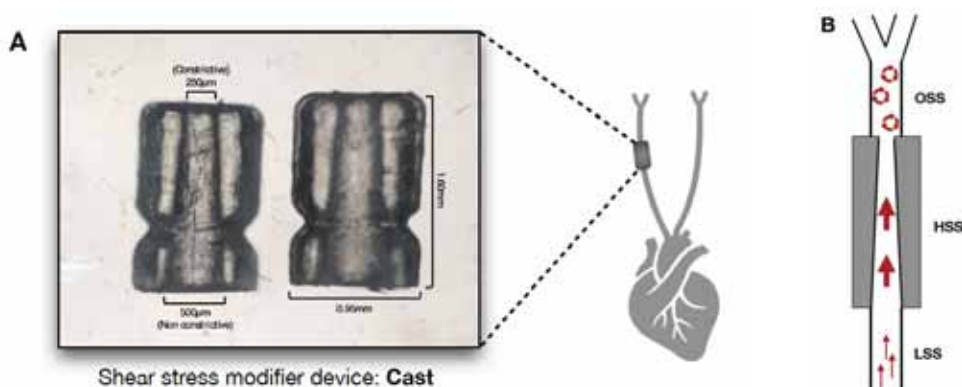


Figure 01: Experimental design. (A) Shear stress modifier device (*cast*). The *cast* consists of 2 longitudinal halves of a cylinder with a cone-shaped lumen, which imposes a fixed geometry of the vessel wall. (B) The geometry of the *cast* has been designed with computational flow dynamics software to produce vortices downstream of the *cast* when placed around the carotid artery. This downstream region therefore is expected to be exposed to spatio-temporal oscillations in shear stress (oscillatory shear stress region). The gradual decline in the inner diameter (from 500µm to 250µm) induces a gradual increase in shear stress (increased shear stress region). In addition, the constrictive stenosis decreases the blood flow, resulting in a relatively low (lowered) shear stress region upstream from the *cast* (approximately 30% reduction).

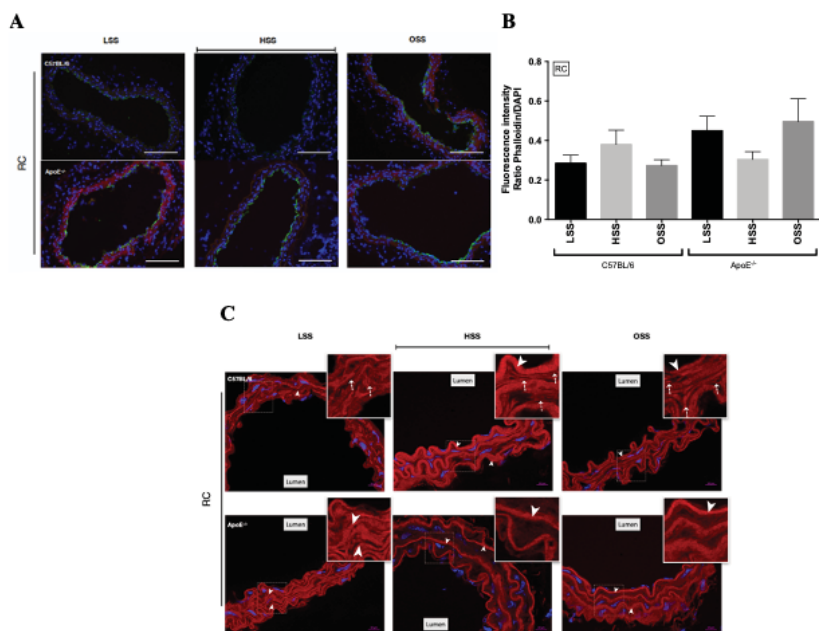


Figure o2: Actin cytoskeleton staining in the carotid artery of ApoE^{-/-} and C57BL/6 mice. (A) Representative images of phalloidin-Atto 565 staining of right carotids (RC) of C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice. (B) Quantification of Phalloidin-Atto 565 FI in RC endothelium of C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice. (C) Representative images of Phalloidin-Atto 565 staining in the different regions of right carotid artery (RC) of C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice.

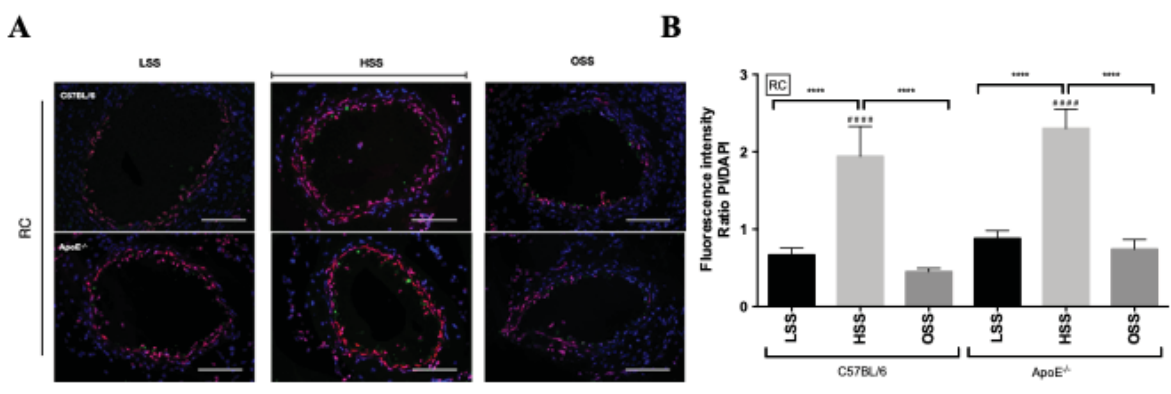


Figure o3: Representative images of Propidium Iodide (PI) staining of right carotids (RC) of C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice. (B) Quantification of PI FI in RC endothelium of C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice. Asterisks above bars indicate statistic difference in comparison to the respective contralateral artery; asterisks brackets indicate statistic difference between regions of the same artery ($p < 0,05$ using One-way ANOVA and Newman-Keuls post-test).

p) Dispositivo de microfluídica para desenvolvimento de modelo de vaso sanguíneo baseado na tecnologia “organ-on-a-chip” para estudo da aterosclerose

Design de dispositivo microfluidico:

O desenvolvimento de um design para dispositivo de microfluidica que seja capaz de mimetizar as forças cisalhantes encontradas em regiões propícias a aterogênese está lastreado por simulações de dinâmica dos fluidos. Diferentes métodos de análise numérica foram considerados para a reprodução dos perfis de fluxo hemodinâmico no dispositivo microfluídico, entre eles a solução das equações de Navier Stokes em regime permanente, análise dinâmica, e a solução do modelo de Oldroyd-B. Tais simulações foram implementadas em softwares *open source* e comerciais em parceria com o Departamento de Estruturas da UFMG e a FioCruz-Minas para acesso ao software. Sabe-se que regiões de baixa tensão cisalhante e regiões de fluxo oscilatório propiciam a formação de placa de ateroma. A reprodução dessas condições de fluxo na plataforma microfluidica foi pré-avaliada pelo método dos elementos finitos com o software Comsol Multiphysics em parceria com a Fio Cruz-Minas, em análise de fluxo em regime permanente, considerando a reprodução de um modelo de carótida murino utilizado na literatura e pelo grupo de pesquisa da Profa. Luciana Andrade em colaboração com o grupo do Professor Stergiopulos – EPFL, Suíça. Resultados dessa simulação são apresentados na Fig p1.

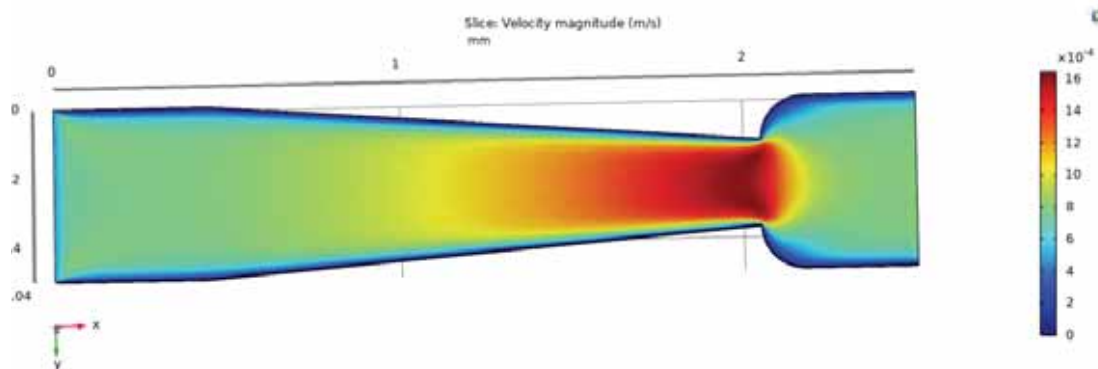


Figura p1: Análise numérica de fluido em geometria microfluidica mimetizando condições de fluxo da carótida murina.

O modelo de Oldroyd-B também foi implementado com formulação em elementos finitos no software Comsol Multiphysics, onde u corresponde a velocidade do fluido e λ ao tempo de relaxamento. Nessa simulação o meio de perfusão é modelado como um fluxo viscoelástico onde a energia elástica é proveniente da deformação das células vermelhas que por sua vez armazenam energia em sua estrutura.

Numa terceira aproximação numérica adotamos uma aproximação numérica do meio fluido pelo Particle Finite Element Method (PFEM), uma combinação do método de partículas com o método dos elementos finitos. A modelagem utilizando PFEM foi realizada no *software* aberto Kratos Multiphysics, e considera a resolução dinâmica das equações de Navier Stokes. Nessa aproximação geramos um perfil de fluxo e força de cisalhamento que melhor representa os padrões de fluxo desejados para os estudos a serem desenvolvidos. Resultados dessa simulação são apresentados na Fig p2.

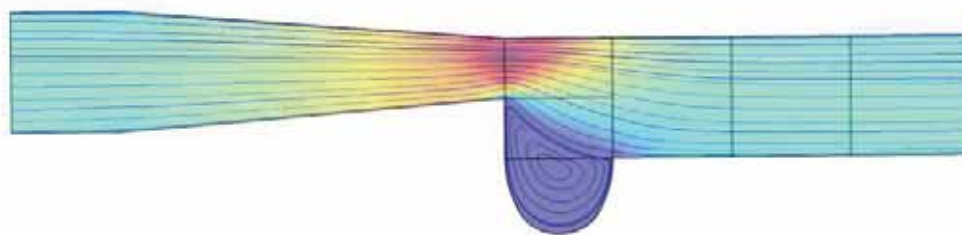


Figura p2: Linhas de fluxo em geometria de chip mimetizando condições de escoamento com diferentes tensões cisalhantes e presença de vórtice.

q) Caracterização morfológica de culturas 3D de células musculares em substratos formados por nanofibras de acetato de celulose, associadas ou não ao urucum, para uso como substitutos biológicos em medicina regenerativa.

O infarto do miocárdio é uma das principais causas de morte no mundo. O resultado clínico, em alguns casos, é a substituição do tecido nativo por tecido cicatricial, levando a perda de função naquele local. A engenharia de tecidos aplica os princípios da engenharia de materiais e das ciências da vida para produção de substitutos biológicos em medicina regenerativa, entre outros. O desenvolvimento da engenharia de tecidos cardíaca pode levar a produção de substitutos biológicos capazes de restaurar a função do miocárdio danificado. A criação de scaffolds bioativos, os quais são matrizes tridimensionais capazes de permitir a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, permitiram o cultivo celular tridimensional para a produção de órgãos e tecidos em vários tipos de matrizes. Nanofibras de acetato de celulose são uma excelente opção para a utilização como scaffolds, devido a sua biocompatibilidade e seu baixo custo. As nanofibras mimetizam a matriz extracelular nativa, permitem a regulação de propriedades mecânicas e possuem uma grande área superficial, possibilitando uma melhor adesão e proliferação celular. Para avaliar o uso de nanofibras de acetato de celulose para a produção de um substituto cardíaco, nos propusemos testar o cultivo celular de cardiomiócitos de linhagem nesses scaffolds, funcionalizados ou não com extrato bruto de urucum. A bixina, uma molécula bioativa derivada da semente de urucum tem propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Através de análises *in vitro* foi possível demonstrar que as membranas de nanofibras de acetato de celulose incorporadas ou não ao urucum apresentaram biocompatibilidade com células H9c2, mioblastos cardíacos, favorecendo a adesão e a viabilidade celular (figura q1 e q2). Além disso, as células H9c2 cultivadas nas nanofibras apresentaram morfologia semelhante a miócitos diferenciados, mesmo sem adição do meio de diferenciação. Ademais, quando incubadas em meio de diferenciação, essas células não apresentaram mudança significativa em sua morfologia, em relação àquelas mantidas em meio de proliferação. Esses dados indicam que apenas a adesão ao acetato de celulose possa já ser suficiente para a diferenciação dessas células. Os dados obtidos mostram que as membranas de nanofibras de acetato de celulose incorporadas ou não ao urucum apresentam bom potencial para o cultivo de células musculares cardíacas.

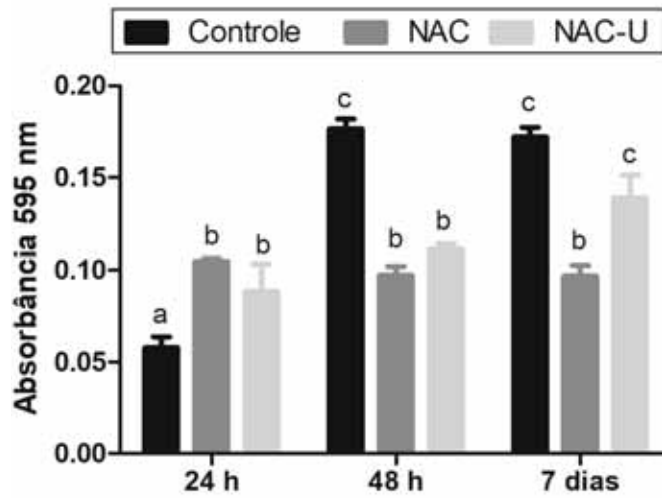


Figura q1: Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular por ensaio de MTT das células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro, NAC ou NAC-U, após 1, 2 e 7 dias. Cada ensaio de MTT foi realizado em triplicata e repetido três vezes. Os dados representam a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste t student).

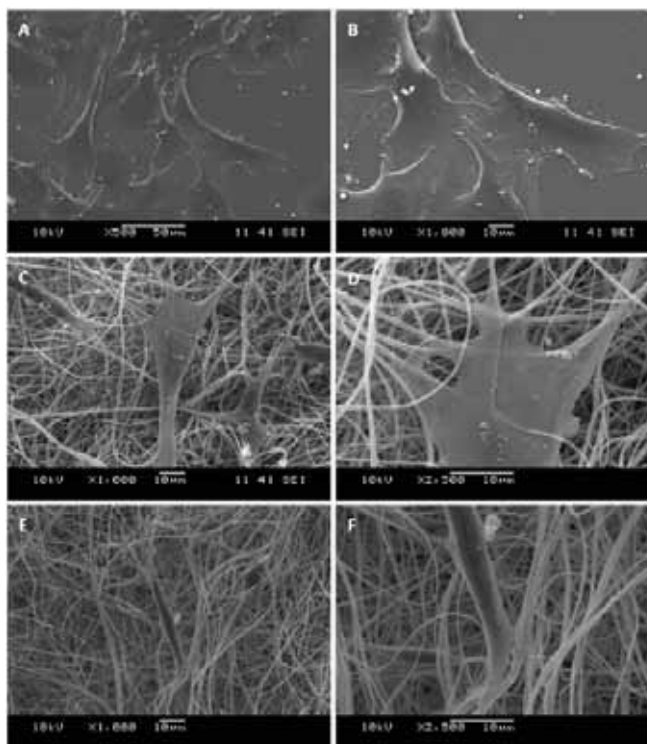


Figura q2: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando a adesão celular às nanofibras através de prolongamentos citoplasmáticos. Os painéis mostram imagens representativas de culturas de células H9c2 mantidas por 3 dias sobre lamínulas de vidro (controle) (A,B), NAC (C,D) e NAC-U (E,F). Aumentos: 1000x (A, C e E) e 2500x (B, D e F). A barra de escala corresponde a 10 μ m.

r) Resultados com maior ênfase em química

Os responsáveis por estes trabalhos são os professores Iolanda Cuccóvia, Hernan Chaimovich, Roberto K. Salinas, Kaline Coutinho, e suas equipes de alunos e pós-doutores.

Foi investigada a reatividade de derivados de cisteína de diferentes estruturas com naftalimidaz (Fig. R1)). Obtivemos fatores grandes fatores de aceleração e foi possível monitorar a presença de grupos de grupos SH no interior das células.

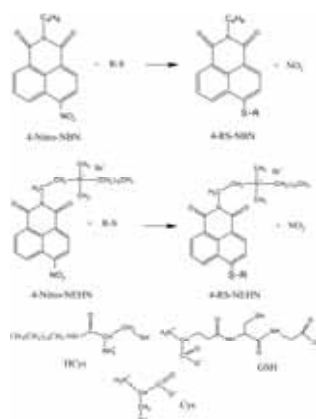


Figura r1: derivados de cisteína de diferentes estruturas com naftalimidaz.

Estudamos a ligação de ions H⁺ à interface de micelas determinando o pK de composto derivados de ácido benzoico ligado a sequencias com números diferentes de polioxietileno e uma cadeia hidrocarbônica longa. Assim, foi possível mapear o pH de superfícies de micelas a diferentes distância das interface carregada da micela e a fase aquosa (Fig. r2).

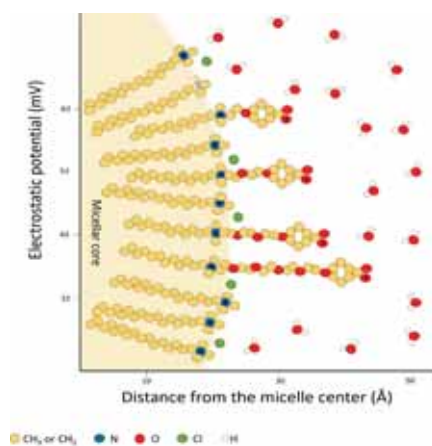


Figura r2: Esquema de interface micelar.

Estudamos as propriedades de um peptídeo derivado do BP100 contendo um grupo naftalimida que é fluorescente. Foi possível verificar sua interação com modelos de membrana e verificar também sua interação com DNA. Este peptídeo mostrou ter atividade antimicrobiana também (Fig. R3).

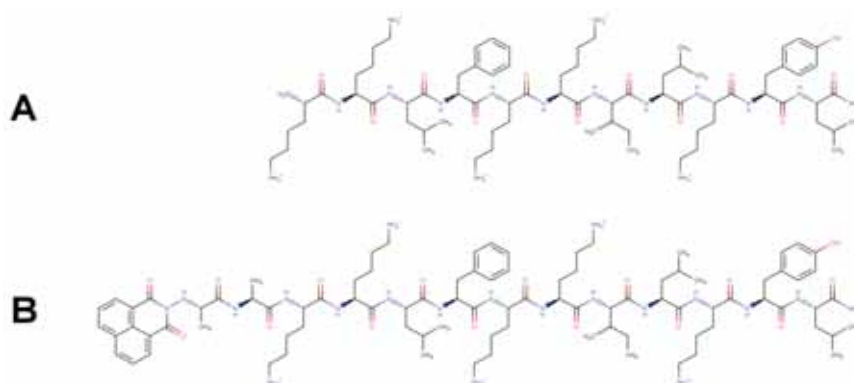


Figure r3. Structures of BP100 (KKLFKKILKYL-NH₂) (A) and Naphthalimide-AA-BP100 (1,8-Naphthalimide-AAKKLFKKILKYL-NH₂)(NAPHT-BP100) (B).

Estudamos as propriedades de polímeros e copolímeros catiônicos observando que os polímeros selecionados, derivados de PDMAEMA formam polimerossomos e são sensíveis a pH e temperatura (Fig. r4, r5 e r6). Outros copolímeros foram capazes de transfectar bactérias.

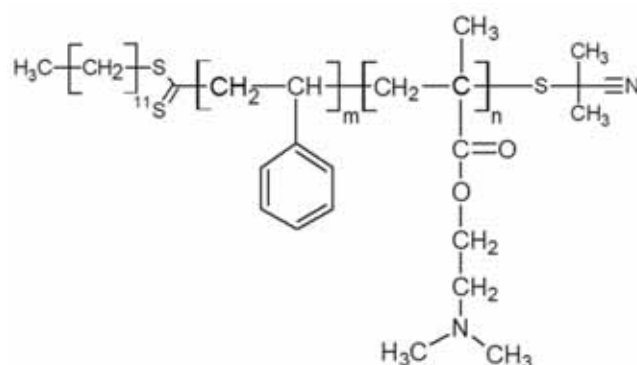


Figure r4. General Structure of diblock copolymers PDMAEMA_n-b-Ps_m, obtained by the RAFT technique, where *m* and *n* are the numbers of PS and PDMAEMA units, respectively. The end-groups are typical of a RAFT-made polymer.

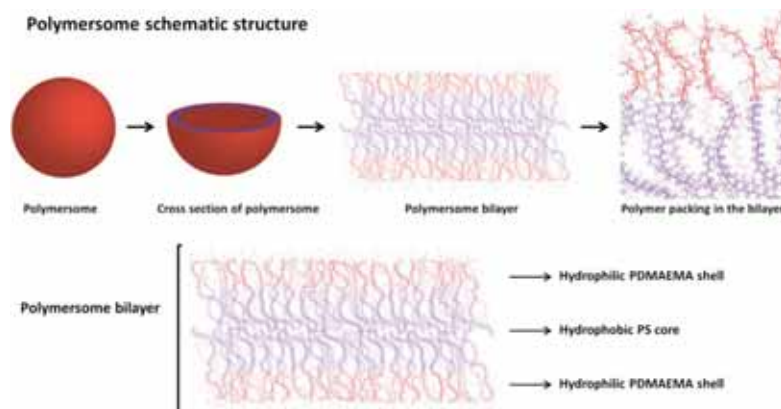


Figure r5: schematic representation of the suggested morphology of the polymersomes, supported by the data supported by the DLS, EPR, and TEM-Negative Staining data. Counter ions of the PDMAEMA cations are chloride ions.

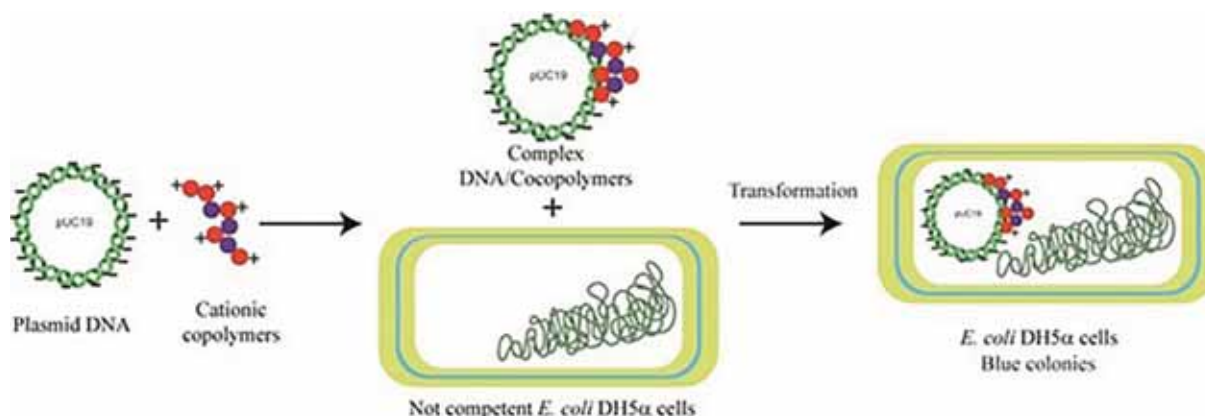


Figure r6: PDMAEMA-based cationic copolymers as novel carriers for DNA delivery into bacteria.

s) Desenvolvimento de Materiais Teranósticos

Os responsáveis por estes trabalhos são as professoras Lilia Courrol e Débora Levi, e suas equipes de alunos e pós-doutores.

A teranóstica, atua no sentido de que um único sistema desempenha o papel de agente diagnóstico e agente terapêutico simultaneamente. Conseguimos isso com o emprego de sistemas fotônicos nanométricos baseados em um material que é uma pró-droga, o ácido aminolevulínico (ALA), que induz a formação de porfirinas, um fluoróforo endógeno. A porfirina pode ser excitada com luz e assim produz emissão no vermelho. Em tecidos de alta multiplicação, como no caso de câncer e da aterosclerose, aparece em quantidade aumentada, o que reflete também na quantidade desse material no sangue, que é ainda mais incrementado quando ALA exógeno é administrado. Assim, por meio de espectroscopia de fluorescência, é possível diagnosticar doenças como o câncer e a aterosclerose, simplesmente verificando a intensidade do sinal fluorescente da porfirina

extraída do sangue dos pacientes. Para a terapia dessas doenças, associa-se ao ALA nanopartículas de ouro, que produzem radicais livres quando iluminadas, destruindo células tumorais e placas de ateroma através da terapia fotodinâmica e/ou fototérmica. Entre os materiais ópticos desenvolvidos, citamos ainda os materiais nanoestruturados baseados em nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro bimetálicas podendo ser utilizadas, ainda, como agentes de contraste em ressonância magnética de imagem.

t) Estudo dos efeitos de campo magnético e de diluição sobre os diagramas de fase de cristais líquidos biaxiais

Os responsáveis por estes trabalhos são os professores André Vieira e Silvio Salinas, e suas equipes de alunos e pós-doutores.

Utilizando um modelo estatístico simples, investigamos os efeitos de um campo magnético aplicado e da diluição sobre os diagramas de fase de sistemas nemáticos biaxiais, com ênfase na estabilidade do ponto multicrítico de Landau, em que duas fases nemáticas uniaxiais, a fase biaxial e a fase isotrópica tornam-se todas iguais. O modelo estatístico consiste em unidades nematógenas intrinsecamente biaxiais, que interagem por meio de um potencial de Maier–Saupe, e que são caracterizadas por uma escolha discreta das orientações dos diretores nemáticos microscópicos. Segundo cálculos anteriores na ausência de campo e de diluição, reproduzimos a sequência conhecida de uma fase uniaxial, uma fase biaxial e uma fase desordenada quando a temperatura é elevada, e localizamos o ponto de Landau. Em seguida, concentramos nossa atenção nas modificações na topologia do diagrama de fases pela aplicação de um campo magnético externo, mostrando que o ponto de Landau é desestabilizado pela aplicação de um campo. Por outro lado, na ausência de um campo, mostramos que somente uma diluição suficientemente forte é capaz de desestabilizar o ponto de Landau.

A figura t1 ilustra, na presença de um campo magnético moderado, os diagramas de fase no plano $\Delta \times T$, sendo Δ um parâmetro que mede a biaxialidade intrínseca das unidades nematógenas e T a temperatura em unidades apropriadas. O ponto crítico simples P_c e o ponto crítico P_l surgem da desestabilização do ponto multicrítico de Landau, que na ausência de um campo situa-se em $\Delta=1$, $T=1$. Os códigos de cores indicam os valores dos parâmetros de ordem uniaxial (à esquerda) e biaxial (à direita), mostrando que uma fase biaxial está presente em temperaturas suficientemente baixas.

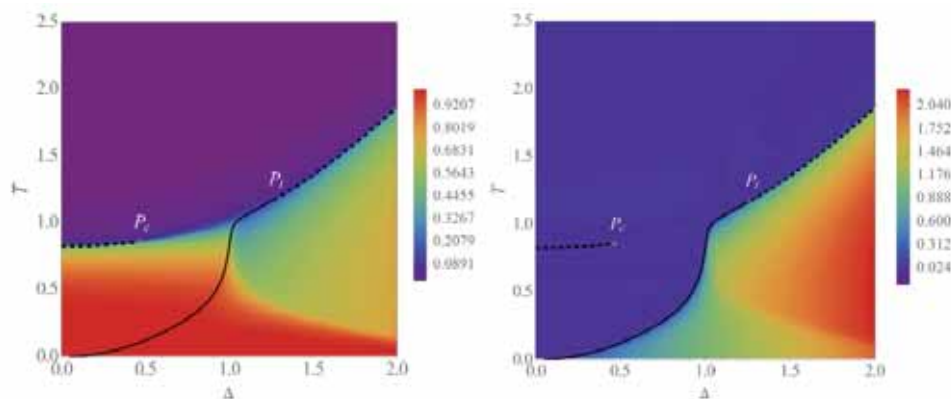


Figura t1: Diagramas de fase com fases nemáticas.

Em algum destes resultados (u→ y), além do Professor Alex Fabiano C. Campos, participaram das pesquisas os Professores A.M. Figueiredo Neto, e suas equipes.

u) Detecção de íons livres em ferrofluido à base de querosene por espectroscopia de impedância

A técnica de espectroscopia de impedância foi usada para investigar a influência da presença de íons livres e da natureza dos eletrodos na resposta elétrica de uma célula de ferrofluido à base de querosene. Os espectros medidos das partes real e imaginária da impedância elétrica da célula foram analisados com uma versão simplificada do modelo Poisson-Nernst-Planck, onde apenas um dos portadores de carga é móvel (Fig. u1). A presença de cargas no sistema ferrofluido é atribuída a uma concentração residual de oleato de sódio do procedimento de síntese. Na estrutura do modelo proposto, os íons oleato estão presos nas partículas enquanto os íons de sódio representam a carga móvel, o que é suportado pela alta qualidade do ajuste dos resultados experimentais (Fig. u1). A transferência de carga no eletrodo é um fenômeno rápido e a condutividade da superfície não é dispersiva. A densidade aparente dos íons é da ordem da densidade aparente das partículas magnéticas. Além disso, tanto a difusividade dos íons quanto a concentração determinada em nossos experimentos são independentes dos eletrodos usados. Finalmente, apenas os eletrodos de ouro se comportam de maneira peculiar.

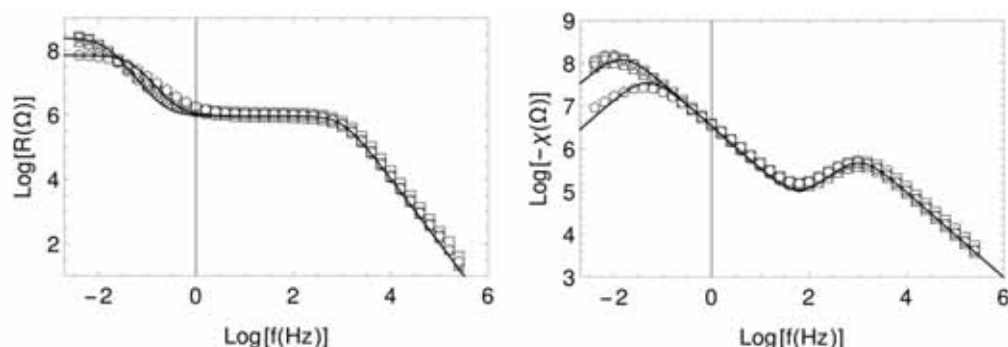
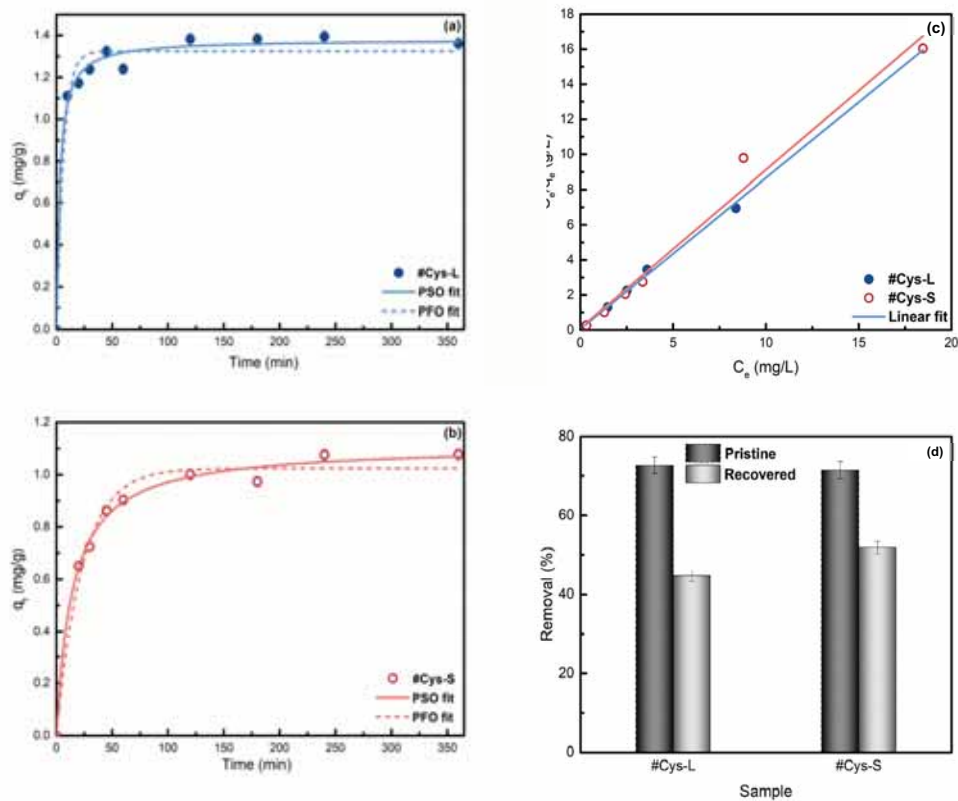


Figura u1. Espectros das partes real (R) e imaginária (χ) da impedância elétrica em função da frequência da voltagem aplicada, medidos entre eletrodos de diferentes materiais: □ platina, Δ aço cirúrgico, ∇ titânio e O latão e \diamond ouro.

v) Estudo da aplicação de nanoadsorventes magnéticos baseados em nanopartículas core@shell modificadas com cisteína na remoção de íons Pb(II) de água

Nanoadsorventes magnéticos foram desenvolvidos por funcionalização de nanopartículas bimagnéticas core@shell com cisteína ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{Cys}$). Amostras de dois tamanhos médios diferentes foram elaboradas e caracterizadas por XRD, TEM, FTIR, SER, zetametria e magnetometria SQUID (amostras #Cys-S de 7,6 nm e #Cys-L de 13,0). A adsorção de íons Pb(II) pelos nanoadsorventes magnéticos foi investigada em função de diferentes parâmetros, como pH, tempo de contato e concentração inicial do poluente. Os dados cinéticos foram bem correlacionados com o modelo de pseudo-segunda ordem e o melhor tempo de equilíbrio foi de

120 min (Fig. v2(a) e (b)). O modelo de Langmuir se ajustou bem aos dados de adsorção indicando adsorção em monocamada, e uma capacidade máxima de adsorção de 1,2 mg / g foi encontrada para pH 5 (Fig. v2(c)). A amostra de nanoadsorvente magnético com base em nanopartículas maiores exibiu a melhor adsorção e desempenho cinético. Além disso, as nanopartículas foram recuperadas e reutilizadas em experimentos de leitura, mantendo uma boa eficiência de remoção



(Fig. v2(d)). Esses resultados sugerem que os nanopós magnéticos propostos podem ser aplicados como uma alternativa promissora para a remoção de Pb (II) de água contaminada

Figura v2. (a,b) Cinética de adsorção ajustada pelo modelo de pseudo-segunda ordem em pH 5; (c) Ajuste dos resultados de capacidade de adsorção com o modelo de Langmuir; e (d) Resultado de reusabilidade dos nanoadsorventes após procedimento de recuperação.

w) Estudo das propriedades de superfície pH-dependentes de carbon dots ricos em nitrogênio obtidos pelo método hidrotérmico

O estudo abordou as propriedades de superfície dependentes do pH de pontos de carbono dopados com nitrogênio hidrofílico (N-Cdots) elaborados pelo método hidrotérmico. As amostras foram obtidas utilizando p-fenilenodiamina e ureia (N-CdotR), e ácido cítrico e hidróxido de amônio (N-CdotB) como precursores, respectivamente. As propriedades estruturais e morfológicas dos N-Cdots foram investigadas usando TEM, espectroscopia Raman e FTIR. As nanopartículas de ambas as amostras exibiram muitos grupos de superfície hidrofílicos. Títulações potenciométricas e condutimétricas foram utilizadas para determinar os pKs dos grupos de

superfície dos N-Cdots ($pK_1 = 3,4$ e $pK_2 = 6,6$ para N - CdotR; $pK_1 = 7,6$ e $pK_2 = 9,9$ para N - CdotB). Medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico em função do pH indicaram que a modulação de carga e estabilidade coloidal dos N-Cdots são controladas principalmente por grupos amina e carboxila na amostra N-CdotR e grupos carboxila e fenólicos na amostra N-CdotB. As propriedades ópticas dos N-Cdots foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis. Os resultados da fotoluminescência indicaram que o comportamento ácido-básico dos grupos superficiais promove mudanças nos estados de emissão de energia, com desvios para o azul e para o vermelho. Além disso, os N-Cdots apresentaram significativo rendimento quântico de fluorescência ($QY = 25\%$ para N - CdotR e $QY = 30\%$ para N - CdotB) e boa fotoestabilidade. O conjunto desses resultados demonstra que o pH é um parâmetro chave para monitorar a estabilidade coloidal e as propriedades ópticas dos N-Cdots, bem como suas potenciais aplicações tecnológicas.

x) Nanofluidos Magnéticos Fluorescentes e Seu Processo de Obtenção

Trata-se de uma invenção situada no campo da nanotecnologia, cujo pedido de patente foi submetido ao INPI sob número BR 10.2020.017446.0. A invenção se refere a nanofluidos compostos de nanopartículas magnéticas e nanopartículas fluorescentes que mantêm tanto propriedades magnéticas quanto fotoluminescentes sem perder a estabilidade de longo prazo, inclusive na presença de um campo magnético aplicado. As nanopartículas magnéticas utilizadas nas dispersões são compostas por ferritas de metal divalente e as propriedades de fluorescência advêm de nanopartículas carbonáceas. De forma geral, os nanofluidos apresentados no estado da técnica são obtidos a partir do encapsulamento e aglomeração de partículas magnéticas e fluorescentes, produzindo um fluido de baixa estabilidade. No entanto, na presente invenção os nanofluidos são estáveis devido à interação eletrostática repulsiva entre as partículas, maximizadas por meio do processo de compatibilização, sendo possível o controle das condições físico-químicas da dispersão variando a concentração relativa de material magnético e fluorescente.

y) Propriedades viscoelásticas de eritrócitos: aplicação na malária.

Nestes trabalhos estão envolvidos os professores Bruno Pontes, Nathan Viana, Paulo Américo Maia Neto, Herch Moysés Nussenzweig, Ubirajara Agero e suas equipes de pesquisa.

O grupo de pinças ópticas estabeleceu metodologia pioneira para medir as propriedades viscoelásticas de eritrócitos. Aplicou essa metodologia para mapear as propriedades viscoelásticas de eritrócitos infectados com o parasito da malária, *Plasmodium falciparum*, em seus diferentes estágios de maturação intra-eritrocítica. As células vermelhas foram caracterizadas com materiais vítreos moles. Observamos um enrijecimento da membrana plasmática, que foi caracterizado por uma mudança de comportamento tipo-líquido para tipo-sólido nos eritrócitos ao longo dos estágios de maturação do parasito. Em geral os resultados fornecem base para estudos futuros que procurem melhor compreender a doença da malária através de uma perspectiva mecanobiológica.

z) Modificações estruturais causadas por diferentes moléculas bioativas em modelos de membranas biológicas

A Professora Maria Teresa Lamy e sua equipe desenvolveram estas pesquisas.

Mostramos que o antibiótico levofloxacina interage fortemente com membranas lipídicas carregadas negativamente, criando domínios ricos de antibiótico coexistindo com domínios de lipídios puros. Além disso, mostramos que o antibiótico altera a estrutura das membranas aniônicas, e não interage com membranas neutras. Este é um dado biologicamente relevante, pois células mamíferas saudáveis não apresentam lipídios com cabeças polares negativas em sua membrana externa, porém células cancerígenas, e células de diferentes organismos, incluindo bactérias, expõem lipídios aniônicos em suas superfícies. Mostramos a relevância da carga de peptídeos antimicrobianos em suas interações com modelos de membranas e DNA. Este foi um estudo relevante para as possíveis ações tóxicas de peptídeos antimicrobianos em células eucarióticas.

aa) Peptídeos PLA2-1 e Bo-Met1: entendimento e otimização da ação fungicida, análise da possibilidade de desenvolvimento de resistência e outras ações celulares de interesse em saúde humana

A Professora Maria Terêsa Machini e sua equipe desenvolveram estas pesquisas.

Vimos estudando os peptídeos PLA2-1 e Bo-Met1 com ação membrana e capazes de matar espécies de *Candida* relacionadas à candidíase. Tais agentes candidíase sintéticos foram desenvolvidos por nós a partir de sequências de proteínas envolvidas na atividade antimicrobiana de venenos das serpentes peruanas *Bothrops pictus* e *Bothriopsis oligolepis*, respectivamente.

Em decorrência da COVID-19 e consequente interrupção de atividades presenciais e realização de experimentos em 2020, no período correspondente ao presente relatório tivemos como objetivo principal 1 dar continuidade na exploração de aspectos teóricos e necessários do projeto. Assim, por meio de ferramentas de bioinformática e de simulação por dinâmica molecular, continuamos a aprimorar o desenho e análise de dezenas de análogos com vistas a chegar a alguns poucos potencialmente interessantes sob os pontos de vista clínico (*ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral e/ou antiviral*), odontológico (*ação anti-biofilme dentário*) e científico (*já que nos possibilitarão melhor entender a interação peptídeo-membrana indispensável para elucidação dos mecanismos de ação de PLA2-1 e BoMet1*). O objetivo especificado foi atingido com o trabalho realizado (resultado principal 1). Através desse trabalho também, a graduanda Luiza A. Batista se iniciou na pesquisa (resultado principal 2).

Um exemplo de resultado obtido é mostrado na Fig. aa1. Como objetivo principal 2 do projeto proposto, tinha sido planejado sintetizar os análogos desenhados de maior interesse, mas este objetivo relacionado à atividade presencial no laboratório não foi atingido totalmente, já que apenas um dos análogos de BoMet1 pôde ser sintetizado quimicamente, teve comprovada a sua identidade química por LC-MS e aguarda oportunidade para purificação e caracterização completa do purificado; a síntese de um dos análogos de PLA2-1 também foi iniciada e interrompida.

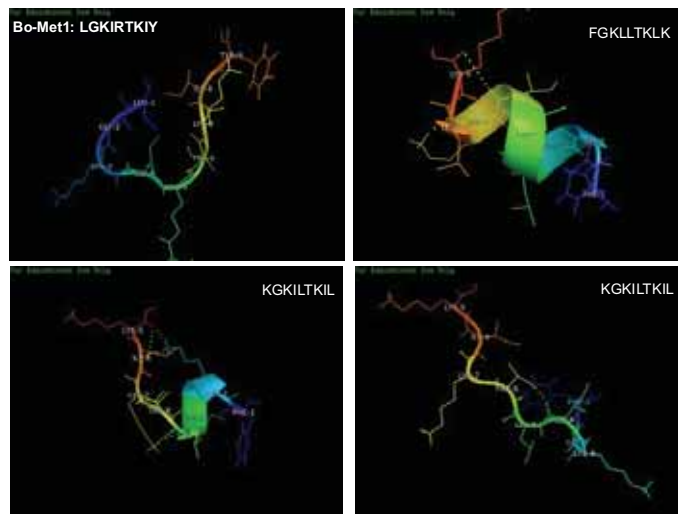


Figura aa1: Estruturas 3D obtidas através do *software* PEP-FOLD para Bo-Met1 e análogos.

bb) Indução de birrefringência por luz pulsada na fase isotrópica de um cristal líquido liotrópico

Os Professores Paulo Ricardo Garcia Fernandes, Breno Ferraz de Oliveira e Hatsumi Mukai, e suas equipes conduziram essas pesquisas.

Investigamos a ordem induzida por luz quando uma amostra isotrópica de KL-DeOH-água é acondicionada num porta-amostras com bordas circulares. A ordem induzida ocorre para concentrações dentro do intervalo $2.61 < C = \frac{[KL]}{DeOH} < 2.63$ em temperaturas do intervalo $36.0^{\circ}\text{C} < T < 48.0^{\circ}\text{C}$. Aplicando a Transformada Discreta de Fourier (TDF) aos dados experimentais de transmitância ótica, constatamos que a frequência $f = 29,5\text{Hz}$ é a única que independe da geometria de borda. E, para concentração $C = 2.62$ não detectamos nenhuma frequência típica ou de ressonância.

cc) Uso do Z-Scan para determinação do índice ALU em amostras de DNA plasmático de pacientes com câncer de próstata

A Professora Sarah Gomes e sua equipe desenvolveram estas pesquisas.

Foram incluídos 30 pacientes com câncer de próstata comprovado por exame anatomopatológico e bioquímico de PSA sérico com idade maior do que 18 anos, livres de tratamento quimioterápico ou radioterápico, sem comorbidades de próstata atendidos no Ambulatório de Urologia da Faculdade de Medicina do ABC. Foram excluídos aqueles pacientes que não se encaixam nos critérios de inclusão anteriormente citados ou que apresentem qualquer doença sorológica (HIV, hepatite etc). Como controle, são utilizadas amostras de DNA plasmático

de homens saudáveis sem alterações prostáticas, com valores de PSA dentro da normalidade (abaixo de 1,5 ng/ mL) e sem histórico de câncer de próstata na família.

Durante o período desse relatório, foram analisadas amostras de 10 pacientes ao longo do tratamento nos tempos: ao diagnóstico, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses e 15 meses. Os resultados de Z-Scan foram correlacionados com os seguintes parâmetros: PSA ao longo do tempo, Gleason da Biópsia, Gleason do Anatomo-patológico, Estadiamento Clínico, Estadiamento Patológico, Recidiva Bioquímica, Recidiva Clínica e ALU ao longo do tempo

Os resultados preliminares mostram que a técnica de Z-Scan é sensível a variação do PSA ao longo do tratamento, ao Estadiamento Anatomo-patológico, entretanto não é sensível ao Estadiamento Clínico.

Em relação a Recidiva Clínica e Recidiva Bioquímica, os resultados de Z-Scan mostram que não há diferença significativa ($p > 0,6$) entre pacientes que apresenta Recidiva Bioquímica dos que não apresentam. Já para a Recidiva Clínica os resultados apontam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os pacientes que apresentam Recidiva Clínica dos que não apresentam.

Em relação as escalas Gleason da Biópsia e do Anatomo-Patológico, os resultados do Z-Scan mostram que podemos separar os pacientes em dois grupos: valores de Gleason maiores ou menores que 6 para o Gleason da Biópsia e valores maiores ou menores que 7 para o Gleason do Anatomo-Patológico, entretanto não há diferença significativa dentro de cada grupo.

dd) Estudo da dinâmica entre os domínios CBD1 e CBD2 do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por simulações de dinâmica molecular, medidas de RMN, e SAXS

Os Professores Roberto K. Salinas e Cristiano Luis Pinto de Oliveira e suas equipes desenvolveram estas pesquisas.

A combinação de técnicas de alta (RMN) e baixa resolução (SAXS) é bastante poderosa para obter informações estruturais e de dinâmica sobre macromoléculas de interesse biológico, particularmente no caso de proteínas flexíveis contendo mais de um domínio. Neste trabalho, empregamos medidas de RMN, especificamente acoplamentos dipolares residuais de ^1H - ^{15}N (^1H - ^{15}N RDCs), para refinar um conjunto de estruturas da proteína CBD12, formada por dois domínios globulares, CBD1 e CBD2, conectados por um pequeno segmento de três aminoácidos. Simulações de dinâmica molecular foram empregadas para gerar um conjunto de estruturas de partida com base na estrutura cristalográfica de CBD12 (PDB 3RB5). Aplicou-se um filtro para selecionar “snapshots” que concordavam minimamente com os RDCs. O ensemble obtido, MD-RDC, foi em seguida refinado usando dados de SAXS (MD-RDC-SAXS) (Figura dd1). CBD12 é um domínio de ligação a Ca^{2+} , e estudos anteriores, baseados apenas em medidas de RDCs, indicaram que CBD12 era flexível na forma Apo. A combinação de dinâmica molecular, com medidas de SAXS e RDCs, foi essencial para revelar que CBD12 experimenta um equilíbrio entre conformações abertas e fechadas na ausência de Ca^{2+} , embora passe a maior parte do tempo na conformação fechada (Figura dd1). A ligação de Ca^{2+} desloca o equilíbrio na direção de conformações abertas (Figura dd2). Esta observação possui implicações para o mecanismo de regulação alostérica da proteína completa, o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, uma vez que o domínio CBD12 é o principal sensor de Ca^{2+} deste trocador.

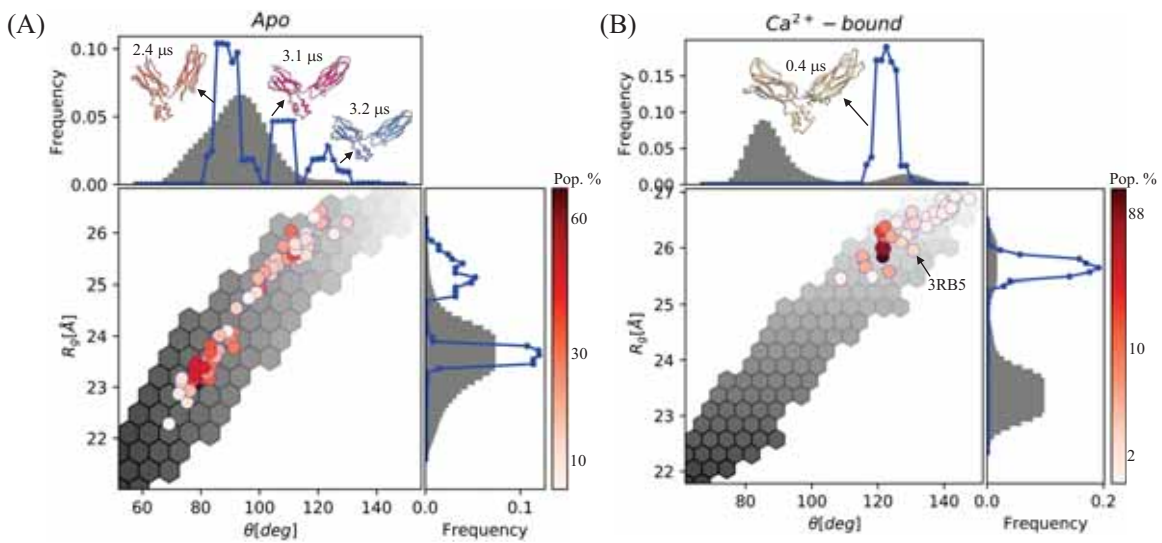


Figura dd1. Análise de um ensemble de conformações de CBD12 selecionadas a partir de medidas de RDCs e SAXS na ausência (A) e presença (B) de Ca^{2+} . Os gráficos mostram o raio de giro (R_g) em função do ângulo entre dois domínios (q) para os modelos de partida (cinza) e os modelos selecionados (em cores). A população dos modelos no ensemble selecionado é indicada pelas cores que variam de branco (0%) a preto (100%). Observa-se que CBD12 visita conformações caracterizadas por uma gama ampla de ângulos q , mas passa a maior parte do tempo em conformações fechadas ($R_g \sim 23 \text{ \AA}$ e $q \sim 80^\circ$). A estrutura ligada, na presença de Ca^{2+} , é essencialmente aberta ($R_g \sim 26.5 \text{ \AA}$ e $q \sim 130^\circ$).

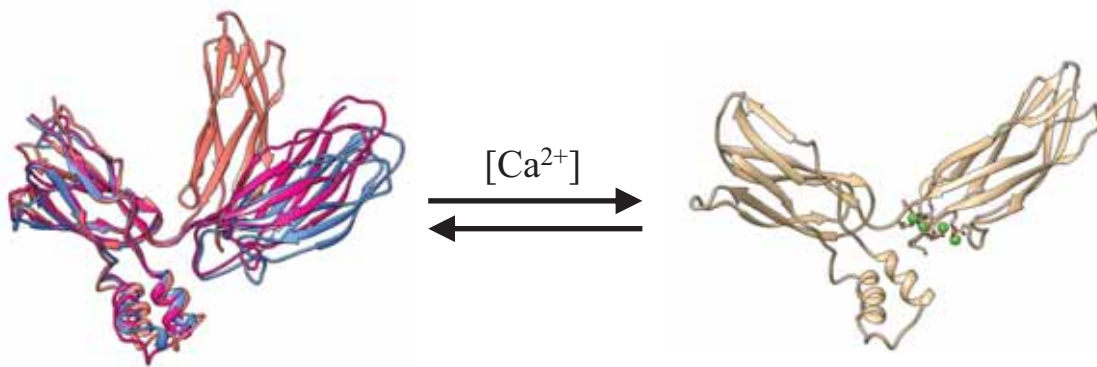


Figura dd2. Estruturas representativas do ensemble selecionado na ausência de Ca^{2+} (esquerda) e na presença (direita).

ee) Resultados com ênfase teórica

O grupo teórico que vem desenvolvendo pesquisa na área de Modelagem Molecular está realizando cálculos com Mecânica Quântica e simulações de Mecânica Molecular para vários sistemas com o objetivo de realizar desenvolvimento de métodos e algoritmos como também aplicações em diversos sistemas de interesse em várias áreas do INCT-FCx. Os professores envolvidos nessas pesquisas mais diretamente Kaline Coutinho, Sylvio Canuto, Thereza Soares e Hubert Stassen.

1. Desenvolvimento de modelos atomísticos para escovas moleculares como o objetivo de simular a adsorção e carreamento de ácidos nucleicos. Foram construídos modelos para PMETAC e DMAEMA, e estamos expandindo o repertório para outros polímeros com importância para adesão microbiana. Este trabalho é desenvolvido pela Profa. T. Soares com colaboradores experimentais, Prof. Madeleine Ramstedt (Umeå University, Suécia) e Julian Gautrot (QMUL, Inglaterra).
2. Identificação de um alvo molecular para compostos com atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Neste projeto, a Profa. T. Soares e colaboradores buscaram o alvo molecular de ação de uma série de compostos oxadiazóis demonstrados previamente possuir atividade larvicida pelo grupo colaborador experimental da Prof. Janaína Versiani (DQF, UFPE). Uma proteína alvo foi identificada, e recentemente obtivemos a estrutura cristalográfica da mesma em colaboração com o grupo do Prof. Rafael Guido (IFSC). Atualmente estamos realizando cálculos de energia livre para identificarmos os melhores inibidores, e iniciarmos novas síntese guiadas por estas simulações.
3. Desenvolvimento do programa Suave cujo principal objetivo é calcular propriedades estruturais dependentes da curvatura em qualquer tipo de superfície, embora neste momento o alvo tenha sido matéria macia. O programa necessita apenas de coordenadas atômicas, e partir das superfícies geradas estima vários parâmetros estruturais do sistema como área, espessura, volume, rugosidade, curvatura das bicamadas, etc.
4. Absorção de gases por líquidos iônicos desenvolvido pelo Prof. H. Stassen: Simulações por dinâmica molecular demonstraram a importância do ânion na fisiossorção do gás carbônico. Observou-se que ânions pequenos com vários sítios de coordenação (especialmente o tetrafluoroborato) favorecem a adsorção do gás carbônico. Os gases nitrogênio e metano não são adsorvidos pelos líquidos iônicos. Os estudos foram desenvolvidos parcialmente em colaboração com o INCT-Catálise (parte experimental). Estudos preliminares através da simulação por dinâmica molecular objetivando a fisiossorção do sulfeto de hidrogênio por líquidos iônicos indicam que esse gás apresenta boa afinidade com líquidos iônicos. O efeito do ânion parece semelhante a adsorção do gás carbônico.
5. Pares iônicos em solventes comuns desenvolvido pelo Prof. H. Stassen: Em colaboração com o INCT-Catálise (parte experimental, aqui RMN) e discussões valiosas com a Profa. Kaline Coutinho, do INCT-Fluidos Complexos, analisou-se a estrutura, constantes de associação, e o efeito de ligações de hidrogênio de pares iônicos isolados (contendo cátions imidazólicos) em diversos solventes comuns. Utilizou-se solventes com constante dielétrica crescente na sequência clorofórmio, diclorometano, acetona, DMSO, e água. As constantes de associação entre cátion e ânion seguem essa tendência com a exceção de

acetona que consegue estabilizar mais pares iônicos que o diclorometano. As simulações por dinâmica molecular também demonstram o efeito estabilizante da ligação de hidrogênio em pares iônicos em todos os solventes considerados.

6. Modelagem molecular desenvolvido pelos Profa. K. Coutinho e Prof. S. Canuto: foi dada continuidade na modelagem de interações entre as moléculas de interesse e seu ambiente de inserção (solvente, misturas, bicamadas lipídicas, etc) em colaboração com grupos experimentais do INCT-FCx e outros grupos da USP. Estudamos os processos óticos de absorção e emissão um fóton propriedades espectroscópicas como UV-vis, infravermelho e RMN, e propriedades estruturais de peptídeos em solução e nas proximidades de bicamadas lipídicas. Utilizamos os métodos teóricos tradicionais como os cálculos com mecânica quântica e as simulações computacionais com mecânica molecular (Dinâmica Molecular ou método Monte Carlo). Nos desenvolvimentos teóricos ressalta-se a utilização de Dinâmica Molecular com métodos de primeiros princípios, avançamos nas simulações de soluções em estados supercríticos, os cálculos de propriedades eletrônicas na proximidade do ponto crítico e de estados excitados de moléculas fotocromicas em proteínas.

Sumário dos resultados obtidos

- a) A combinação Sinvastatina / ezetimiba com clopidogrel ou ticagrelor foi associada com LDL menos oxidada; a sinvastatina / ezetimiba com ticagrelor reduziu o colesterol nas subfrações aterogênicas de LDL (partículas pequenas e densas); a rosuvastatina com ticagrelor foi a única combinação associada ao aumento no tamanho da LDL, i.e., aquelas menos aterogênicas. Os experimentos de SAXS mostraram que não houve modificação significativa da estrutura das LDLs com os diferentes tratamentos. Como conclusão principal, a qualidade das partículas de LDL foi influenciada pela estratégia farmacológica utilizada com antiagregante plaquetário / lipídico, com o ticagrelor sendo associado ao melhor desempenho com ambas as terapias redutoras de lipídeos.
- b) Nossos resultados no homing BM-MNC e rastreamento no modelo de BMT não mostraram uma diferença na migração ou enxerto de células de camundongos jovens ou velhos, a análise de hemograma tendendo à diferenciação em direção à linhagem mieloide em camundongos que receberam células de animais velhos. O homing celular pelo NIRF e o acompanhamento celular a longo prazo pelo BLI destacaram a relevância das nano partículas multimodais e combinam técnicas para avaliação.
- c) Foi evidenciado o potencial de aquecimento das SPIONAmine de 100nm com o maior valor de SAR (337.83 W/kg) quando submetidas a 300 Gauss com frequência de 551 kHz. Após a internalização eficiente dos SPIONAmine nas C6Luc e posterior aplicação da técnica de MHT foi possível determinar que a viabilidade celular foi de 31% em 44°C após aplicação de MHT por 40 min. Após análise dos resultados por BLI e citometria de

fluxo podemos concluir o potencial dos SPIONAmine baseado no SAR elevado quando aplicado na técnica de MHT no estudo *in vitro*.

- d) A avaliação da eficácia terapêutica das CTM marcadas com nano partículas associada à atividade física no modelo de isquemia cerebral focal se mostrou positivo quando é utilizado a terapia combinada e foi corroborada pela avaliação comportamental e técnicas de imagem.
- e) A análise do processo de magnetofecção *in vivo* por histologia se mostrou mais sensível que a IRM, evidenciando a presença de ferro no tumor após aplicação das NOF-Rhod pelas três vias utilizadas (local, caudal e carótida). Além disso, quando a administração foi feita via caudal, o campo magnético externo utilizado para direcionamento foi capaz de otimizar a agregação destas nano partículas na região do tumor. Tomados em conjunto, nossos resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficiência da utilização do campo magnético no direcionamento magnético das NOF-Rhod, sendo esta uma promissora ferramenta para futuras aplicações da técnica de magneto hipertermia.
- f) Foram desenvolvidos *softwares* computacionais aplicados a simulação molecular. Entre eles, desenvolvemos o programa Suave, um programa capaz de calcular e analisar propriedades dependentes da curvatura de superfícies macromoleculares e de interface.
- g) Observamos que os efeitos de superfícies estabilizam o parâmetro de ordem de inclinação nas camadas mais externas dos filmes acima da temperatura de transição Sm-C-Sm-A de bulk.
- h) Nossos resultados mostram que o TEDG exibe propriedades fluorescentes desejáveis, o que o torna um candidato promissor para uso em dispositivos eletrocromicos e ópticos, bem como na produção de filmes poliméricos para termometria óptica e aplicações em termografia.
- i) Investigamos a utilização dos pontos quânticos de carbono derivados do cloreto de dansila para gerar espécies de oxigênio reativo (ROS) mediante fotoexcitação, o que viabilizaria o uso do CD-DsCl como fotossensibilizadores em aplicações de terapia fotodinâmica. Usando azul de metileno como uma referência padrão, o rendimento quântico de geração de oxigênio singleto foi determinado, que por sua vez apresenta uma dependência linear com a intensidade de excitação.
- j) Quanto ao mecanismo de ação de peptídeos foi possível inferir, quando comparado com os resultados do vazamento de carboxifluoresceína, que há uma desestabilização da membrana seja pela formação de poros, seja por agregação do peptídeo na membrana quando as análises são realizadas em concentrações maiores de peptídeo que leva ao extravasamento do conteúdo interno (a carboxifluoresceína) nos três modelos de membranas estudados.
- k) O perfil térmico das membranas compostas de DPPC na ausência ou na presença de EBH revelou que a T_m da bicamada de DPPC na ausência do EBH foi 41,3 °C com um início

da transição em 38 °C e o final da transição em 43,4 °C. O aumento na concentração do EBH causou o alargamento e achatamento do pico de transição principal sem mudar significativamente a T_m da membrana de DPPC. O aumento na concentração do EBH causou o aumento da temperatura de transição de fase para valores acima de 50 °C indicando uma diminuição na fluidez destas membranas na presença do EBH.

- l) A dislipidemia e variações nos padrões de tensão de cisalhamento *in vivo*, afeta não apenas a modulação mecânica celular, como indicado pelas mudanças na organização do citoesqueleto de actina, mas também altera o tráfego de membrana das células do sistema vascular, o que provavelmente pode contribuir para a fragilidade endotelial e, portanto, para as etapas iniciais de desenvolvimento de aterosclerose.
- m) Mostramos que as membranas de nanofibras de acetato de celulose incorporadas ou não ao urucum apresentam bom potencial para o cultivo de células musculares cardíacas.
- n) Sobre os N-Cdots, resultados da fotoluminescência indicaram que o comportamento ácido-básico dos grupos superficiais promove mudanças nos estados de emissão de energia, com desvios para o azul e para o vermelho. Além disso, os N-Cdots apresentaram significativo rendimento quântico de fluorescência ($QY = 25\%$ para N - CdotR e $QY = 30\%$ para N - CdotB) e boa fotoestabilidade. O conjunto desses resultados demonstra que o pH é um parâmetro chave para monitorar a estabilidade coloidal e as propriedades ópticas dos N-Cdots, bem como suas potenciais aplicações tecnológicas.
- o) Síntese de nanofluidos compostos de nanopartículas magnéticas e nanopartículas fluorescentes que mantêm tanto propriedades magnéticas quanto fotoluminescentes sem perder a estabilidade de longo prazo, inclusive na presença de um campo magnético aplicado.
- p) Investigamos eritrócitos infectados com o parasito da malária, *Plasmodium falciparum*, em seus diferentes estágios de maturação intra-eritrocítica. As células vermelhas foram caracterizadas com materiais vítreos moles. Observamos um enrijecimento da membrana plasmática, que foi caracterizado por uma mudança de comportamento tipo-liquido para tipo-sólido nos eritrócitos ao longo dos estágios de maturação do parasito.
- q) Mostramos que o antibiótico levofloxacina interage fortemente com membranas lipídicas carregadas negativamente, criando domínios ricos de antibiótico coexistindo com domínios de lipídios puros.
- r) Em relação as escalas Gleason da Biópsia e do Anatomo-Patológico (câncer de próstata), os resultados do *Z-Scan* mostram que podemos separar os pacientes em dois grupos: valores de Gleason maiores ou menores que 6 para o Gleason da Biópsia e valores maiores ou menores que 7 para o Gleason do Anatomo-Patológico, entretanto não há diferença significativa dentro de cada grupo.

Sumário das atividades para o próximo período

- a) Pretende-se finalizar os estudos da adsorção de gases por líquidos iônicos (especialmente na fisiossorção do sulfeto de hidrogênio). Tendo em vista que muitos líquidos iônicos contêm umidade, o efeito da água na coordenação dos gases será investigado. A ativação de gás carbônico adsorvido representa um processo muito importante visando a química sustentável. Planeja-se desenhar cálculos quânticos de metal-organic-frameworks (MOFs) funcionalizados com nanopartículas metálicas e líquidos iônicos para avaliar essa potencialidade. Líquidos iônicos conseguem estabilizar enzimas em temperaturas elevadas. Essa propriedade possui muito interesse tecnológico em processos catalizados por enzimas, tais como produção de biodiesel, clivagem de celulose, entre outros. Projeta-se estudos computacionais com o objetivo de elucidar o efeito de líquidos iônicos na estrutura de proteínas iniciando com polipeptídeos pequenos com a melitina. Pretendemos finalizar as implementações computacionais do programa SUAVE para tratar superfícies fechadas de aglomerados moleculares que poderão ser utilizados em micelas, lipossomos e outros agregados moleculares diversos formados por moléculas orgânicas. Este programa terá aplicações na interface com grupos experimentais do INCT-FCx em sistemas biológicos e em cristais líquidos.
- b) Pretendemos utilizar modelos estatísticos elementares para estudar os diagramas de fases de cristais líquidos colestericos, com diferentes tipos de sistemas desordenados. Á iniciamos uma investigação de modelos estatísticos para cristais magnéticos com interações do tipo Dzialoshinskii-Moriya, que poderão servir de base para a investigação de cristais líquidos colestericos.
- c) Medidas de Z-Scan dos 20 pacientes de câncer de próstata restantes que não foram medida devido a limitação de uso dos laboratórios da UNIFESP devido a pandemia de COVID-19. Correlação dos resultados obtidos pelo Z-Scan com os valores de ALU. Realização de medidas de SAXS e de DLS polarizado em amostras de ccfDNA de amostras de pacientes oncológicos, doadores (sem histórico de câncer) e de diferentes linhagens de células tumorais e análise dos resultados, que como no item anterior foram interrompidas devido a limitação de uso dos laboratórios de pesquisa devido a pandemia.
- d) Pretendemos focar nas aplicações biológicas de proteínas sintéticas que estão sendo desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa. São objetivos específicos para o próximo período: Desenvolver e testar *in vitro* e *in vivo* uma vacina de DNA contra o vírus Zika; Desenvolver parâmetros peptídicos capazes de neutralizar a infecção pelo vírus Zika. Realizaremos ensaios *in vitro* e *in vivo*; Avaliar a capacidade diagnóstica de uma proteína sintética em distinguir as formas brandas e severas da infecção pelo vírus Zika, a partir de amostras de soro de pacientes; Desenvolver nano corpos sintéticos para detecção e neutralização do vírus SARS-CoV-2.
- e) Durante o próximo período vamos clonar diversos mutantes de cisteína de CBD12 com o objetivo de ligar uma sonda de spins (MTSL) e realizar medidas de relaxação paramagnética eletrônica (PRE). As medidas não puderam ser realizadas neste ano devido às restrições impostas pela pandemia de Covid19. Vamos finalizar um trabalho em que

estudamos por medidas de SAXS e de RMN mutantes de CBD12, com o objetivo de avaliar o efeito das mutações sobre a dinâmica da proteína. Pretendemos ainda, estudar por SAXS a estrutura em baixa resolução de uma proteína de membrana, o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ procariótico, em complexo com micelas de detergente.

- f) Para o próximo ano, temos como objetivos principais: a continuação e complementação de técnicas de elementos finitos para estudar cristais líquidos colestéricos confinados em diversas geometrias, como a esférica (incluindo agora hemisférios) e em micro-canais; a continuidade dos estudos sobre a fase *twist-bend* nemática, desenvolvendo propostas a partir do modelo *coarse grained*; o uso de técnicas matemáticas para tratar problemas de contorno em sistemas confinados, incluindo a obtenção de propriedades dielétricas em eletrólitos e espectroscopia de impedância e os efeitos de superfície e difusivos em meios confinados. Mais especificamente, pretendemos: Simular via elementos finitos colestéricos em geometrias esféricas, incluindo gotas e hemisférios, estudando sua dinâmica e a evolução dos defeitos, com diferentes passos e energias de ancoramento; Estudar a mudança de passo em hemisférios e micro-canais colestéricos; Concluir os estudos sobre dinâmica de relaxação dos colestéricos a partir da textura homeotrópica até a textura planar, tanto via elementos finitos; Criar modelos para fases novas e descrever via modelo *coarse-grained* a fase *twist-bend*; Modelar eletrólitos fracos com as técnicas de PNP e PNPA e realizar conexões com modelos circuitais. Em seguida, aplicar tais modelos a fases líquido-cristalinas moduladas; Estender o modelo de Poisson-Nernst-Planck ao caso das células eletrolíticas assimétricas (superfícies diferentes) na presença do fenômeno de adsorção, tendo em vista aplicações aos projetos de baterias mais eficientes, usando energias renováveis; Investigar os efeitos da adsorção nos elétrodos de uma célula eletrolítica capacitiva, destinada ao estudo do processo de dessalinização e estoque de energia; Estudar efeitos de coeficientes de difusão dependendo do espaço em sistemas limitados. Em particular, pretendemos estudar o problema da impedância nestes sistemas; Utilizar efeitos memória e equações cinéticas do tipo Langmuir e sem linearização para descrever o fenômeno de adsorção-dessorção; Investigar (e aplicar) equações cinéticas em células eletrolíticas na presença de bias governando o fenômeno de adsorção; Dar continuidade ao uso de técnicas de Machine Learning para identificação e caracterização de materiais líquido cristalinos.
- g) No ano de 2020 as pesquisas clinicas foram suspensas e o projeto o projeto Eficácia do probiótico (*lactobacillus reuteri*) como coadjuvante na terapia periodontal de manutenção em pacientes diabéticos foi interrompido. A linha de reparo ósseo com CEMP pode ter continuidade, por ser um projeto laboratorial, mas houve mudança na aluna que conduzira o estudo, sendo agora a mestranda Nicole Berton de Moura que está desenvolvendo o projeto “Efeito do Campo eletromagnético pulsado na reparação óssea em defeito critico na calota de ratos” que terá continuidade e finalização no próximo período. Também no próximo período será dada continuidade ao projeto, “O efeito do oxisterol 7-cetocolesterol (7-kc) como agente de indução osteogênica no reparo ósseo de defeito crítico em calota craniana de ratos” e será iniciado o projeto de fibrina rica em plaquetas injetável (i-prf) como sistema de liberação de antimicrobianos na doença periodontal.

- h) Estudos com amostras de pacientes com doença aterosclerótica: Uma vez que foi mostrado no modelo animal que a dislipidemia e variações nos padrões de tensão de cisalhamento afetam aspectos mecânicos das células da parede vascular, bem como o tráfego de membranas nessas células, aspectos essenciais para o reparo à processos de injúria na membrana celular, podendo influenciar na fragilidade do endotélio vascular, iremos avaliar a organização do citoesqueleto de actina e dispersão lisossomal em vasos de pacientes em diferentes estágio de desenvolvimento da placa aterosclerótica. Esses dados poderão auxiliar na compreensão da influência dessas mudanças mecânicas em células endoteliais e da parede do vaso ao longo do desenvolvimento da placa e estabelecimento da doença. Estudos com dispositivos de microfluídica para avaliação de alterações biomecâncios celulares no desenvolvimento da placa aterosclerótica: Uma vez finalizado o modelo numérico de design do dispositivo, passaremos a etapa de impressão, utilizando também a introdução de nanofibras de acetato de celulose, a qual fará a interface entre células endoteliais e a matriz de colágeno na reconstrução do vaso sanguíneo, dentro do dispositivo de microfluídica. Uma vez impresso, a simulação numérica será validada por mensuração do fluxo e forças de cisalhamento na PUC-Rio em colaboração com o Professor Mario Carvalho, utilizando a metodologia de Micro Particle Imaging Velocimetry (μ PIV ou microPIV), a qual é uma ferramenta utilizada em pesquisa fundamental em microfluídica e para caracterização e otimização de aplicações em ciências da vida, lab-on-a-chip, pesquisa biomédica, engenharia micro-química, entre outros. Tão logo a simulação seja validada, iniciaremos a otimização do plaqueamento das células endoteliais e matriz para a reconstrução de vaso no dispositivo de microfluídica. Ensaio de análises por microscopia ótica e eletrônica serão realizados para verificação da arquitetura da parede do “vaso”. Caracterização molecular e biomecânica de culturas 3D de células musculares em nanofibras de acetato de celulose: Em uma perspectiva biomimética, os tecidos musculares fabricados por engenharia de tecidos devem exibir propriedades estruturais do tipo nativo e, especificamente, conter miofibras densamente compactadas e uniformemente alinhadas ao longo de um volume de tecido relativamente grande. Assim, pretendemos caracterizar melhor as culturas 3D de cardiomíocitos desenvolvidas sobre substratos de acetato de celulose e estender o estudo para o desenvolvimento também de células musculares esqueléticas. Para isso será feita a análise morfológica e funcional, bem como de aspectos biomecânicos de contração dessas células, crescidas sobre substratos tridimensionais de nanofibras de acetato de celulose e incorporados ou não ao urucum. A adição do urucum visa aumentar o potencial de uso dessas nanofibras, uma vez que o extrato de urucum possui propriedades anti-bacterianas. Além disso, pretende-se otimizar o processo de colonização e crescimento dessas células para validação biológica de seu uso como substitutos biológicos para engenharia de tecidos.
- i) Para o próximo período nosso foco é a síntese de nanopartículas de ouro, prata e híbridas de prata-ferro, ouro-ferro e cobre-prata com o ácido aminolevulínico (ALA) e o hexaminolevulinato (HAL), utilizando fotorredução, uma rota verde e sustentável, e a avaliação do potencial de aplicação destas nanopartículas no tratamento e diagnóstico de doenças como o câncer, infecções bacterianas e a Covid-19. O ALA é um aminoácido endógeno não-proteico, o primeiro composto na via de síntese da protoporfirina IX (PpIX) que leva a síntese da heme. O metabolismo anormal da PpIX eritrocitária tem sido

observado em indivíduos com câncer, fazendo que o nível dessa substância se eleve. O ALA e seus derivados, têm sido armas importantes na terapêutica de câncer. Porfirinas são produzidas endogenamente em bactérias. Recentemente foi verificado que a glicoproteína superficial Spike do SARS-CoV-2, pode se ligar à porfirina, que aparece em concentração aumentada em pacientes com Covid-19 na fase aguda da doença. Nanopartículas recobertas com ALA e seus derivados ao acumularem-se em torno de células tumorais ou bactérias ou do vírus SARS-CoV-2 podem potencialmente destruí-los pela geração de compostos altamente reativos. Desta forma esses materiais se tornam grandes aliadas no diagnóstico e tratamento de doenças como o câncer, infecções bacterianas e Covid-19. Ao longo das últimas décadas, o rápido desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia tem promovido uma ampla aplicação de nanopartículas metálicas (NPMs) no campo da biomedicina, como bioimagem, biosensoramento, entrega de medicamentos, diagnósticos e terapias. As nanopartículas propostas neste estudo serão sintetizadas por fotorredução com lâmpada de Xenônio em meio aquoso e serão caracterizadas por UV-Vis e FTIR, potencial Zeta, índice de polidispersividade, imagem por microscopia eletrônica de transmissão e medidas de liberação de oxigênio singleto. O recobrimento das nanopartículas produzidas com peguilação, sílica e titânio também será avaliado em termos de melhorias na estabilidade, índices de polidispersividade e potencial terapêutico. A influência da carga, do tamanho, da composição e do revestimento das nanopartículas na internalização nos organismos será realizada a partir de modelos de biomembranas que mimetizam envelopes de vírus ou células humanas saudáveis e tumorais e bactérias. As monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett serão produzidos a partir de anfílicos insolúveis, tais como lipídios, formando uma monocamada na interface ar-água, puros ou misturados com proteínas de membrana. A interação das nanopartículas com a interface e com incidência de luz, simulando a terapia fotodinâmica, ou ultrassom, simulando a terapia sonodinâmica será investigada por meio de medidas tensiométricas, elétricas, reológicas, espectroscópicas e morfológicas.

- j) Peptídeos antiplasmódicos: Realizar medidas de ITC para derivados da Ang II em membranas modelos (POPC; POG ou combinação destes) no modo P/L. Testar as atividades de dois derivados da Angiotensina II: VIPF (linear) e CDRVYIHPFC (restrito com ponte de dissulfeto) com membranas miméticas de parasitas como parte da CSP e avaliar a seletividade pela membrana quando em contato com parte de proteína de merozoíta (sintética), via ITC. Peptídeos antimicrobianos Ocelatina: Avaliar o efeito dos peptídeos contra bactérias resistentes a antibióticos; Verificar o efeito dos peptídeos na morfologia celular de leveduras; Avaliar, *in vitro*, o efeito citotóxico e a atividade hemolítica dos peptídeos; Determinar a variação de calor envolvida na interação dos peptídeos com filmes de lipídeos de membrana; Verificar se a interação dos peptídeos com membranas provoca alterações nas propriedades de transição de fase de lipossomos, e também se os peptídeos são capazes de causar a formação de agregados com as membranas. Estabilidade de membranas aniônicas: Estudar a estabilidade após eletroporação de membranas assimétricas (contendo carga negativa em apenas uma das monocamadas) obtidas pelo método de transferência de fase. Estudar a estabilidade após eletroporação com pulsos de nanosegundos de GPMVs obtidas de células normais e cancerosas.

- k) Continuar os estudos da interação de peptídeos antimicrobianos com membranas de fosfolípidios utilizando peptídeos com novas estruturas sintetizados pelos nossos colaboradores da UNIFESP (Dra. Maria Juliano) e da Embrapa (Dr. Marcelo Bemquerer) e utilizando as técnicas existentes no IFUSP em colaboração com os Drs. Pedro L Oseliero Filho, Cristiano LP Oliveira. Vamos também continuar com a colaboração com a Dra. Kaline Coutinho para entender o mecanismo de ligação de peptídeos com esses modelos de membrana. Vamos também iniciar uma colaboração com o Dr. Fabio Herbst Florenzano para sintetizar uma serie de polímeros catiônicos que possam ser utilizados em superfícies diferentes com o objetivo de eliminar vírus e bactérias dessas superfícies. Em colaboração com s Dra. Deborah Schetchman do IQUSP vamos iniciar um projeto para estudar peptídeos penetradores de células (CPP) fusionados com peptídeos contra a dor (QYP) com modelos de membrana.
- l) Está em fase de finalização uma investigação do diagrama de fases de uma mistura de objetos intrinsecamente biaxiais e de objetos dipolares. Conseguimos determinar como a presença dos objetos dipolares ajuda a estabilizar as fases nemáticas, em especial a fase biaxial. Um primeiro artigo relatando essa investigação deve ser submetido para publicação nas próximas semanas. Iniciaremos uma investigação dos diagramas de fase de sistemas biaxiais contendo graus elásticos de liberdade, que dão conta de flutuações de forma que, esperamos possam modelar microscopicamente aspectos dos diagramas de fase experimentais que modelos mais simples não capturam. Em particular, esperamos obter fases isotrópicas não apenas em altas mas também em baixas temperaturas.
- m) Pretende-se estudar o estudo conformacional de peptídeos antivirais que mostraram atividade contra o SarsCoV-1 e que podem ser também ativos para o SarsCoV-2. Pretende-se estudar a hidrofobicidade dos fosfolípidos DPPE, DPPA, DPPI e DPPS usando modelos coarse grained e experimentos de coeficiente de partição água/octanol. Pretende-se calcular o segundo coeficiente do Virial para soluções aquosas de polímeros, nanopartículas e fosfolípidos.
- n) Síntese e caracterização de nanoadsorventes magnéticos à base de nanopartículas core-shell bimagnéticas do tipo $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcionalizadas com L-lisina e tripolifosfato, além de nano-híbridos de nitreto de carbono com $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; Estudos de adsorção de Mo, Cr, Cd, U, e resíduos farmacêuticos e de fotodegradação de corantes empregando nanoadsorventes magnéticos elaborados (influência do pH, tempo de contato, concentração de poluente e tamanho médio dos nanoadsorventes); Estudo da dependência do potencial zeta com a temperatura de fluidos magnéticos do tipo EDL estabilizados em meio básico.
- o) Pretendemos analisar a qualidade das LDLs de indivíduos que tiveram COVID-19 e se curaram, para avaliar eventuais sequelas. Os indivíduos serão do Hospital Universitário da USP. O número de indivíduos nesse estudo está avaliado em 100. As técnicas experimentais a serem utilizadas são SAXS, Varredura-Z, espectrofotometria e perfil lipídico com Lipoprint.

Mudanças nos objetivos propostos

Não houve mudanças.

Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto.

São Paulo, junho de 2021.