

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

EDUARDO FERREIRA COELHO JUNIOR

**SÍNTESE QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E
ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM MEIOS BIOMIMÉTICOS DE
GLICOPEPTÍDEO-TRIAZÓIS DERIVADOS DE HSP-1**

**DIAMANTINA-MG
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

**SÍNTESE QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E
ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM MEIOS BIOMIMÉTICOS DE
GLICOPEPTÍDEO-TRIAZÓIS DERIVADOS DE HSP-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Mestrando: Eduardo Ferreira Coelho Junior

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly

Coorientador: Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende

**DIAMANTINA
Novembro/2015**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

C672s

Coelho Junior, Eduardo Ferreira

Síntese química, avaliação do potencial biológico e estudos de interação com meios biomiméticos de glicopeptídeos-triazóis derivados de HSP-1 / Eduardo Ferreira Coelho Junior. – Diamantina, 2015.

87 p. : il.

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

Coorientador: Jarbas Magalhães Resende

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Glicopeptídeo-triazóis. 3. Reação click. 4. Interação peptídeo-membrana. 5. Síntese Química. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 547.2

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**SÍNTESE QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E
ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM MEIOS BIOMIMÉTICOS DE
GLICOPEPTÍDEO-TRIAZÓIS DERIVADOS DE HSP-1**

EDUARDO FERREIRA COELHO JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 27/11/2015

Prof. Dr. José Dias de Souza Filho- UFMG

Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer- EMBRAPA

Prof.Dr. Fernando Armini Roela- UFVJM

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly- UFVJM

Presidente

**DIAMANTINA
2015**

*" Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade."
Dalai Lama*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao grande criador do céu e da terra arquiteto do universo, pois sem ele não haveria nenhuma possibilidade de viver o teatro da vida e colher os frutos do amor e da razão. Aos meus pais Eduardo e Maria Aparecida por ter me ensinado os princípios da vida, e principalmente por ter sacrificado seus sonhos em prol da materialização dos meus, serei grato eternamente. Às minhas irmãs Tatiane e Elessandra pela torcida incontestável e especialmente por nunca ter deixado de acreditar em mim, sou muito grato por ter vocês duas em minha vida e principalmente por carregar esse DNA comigo. Gostaria também de agradecer ao meu cunhado Paulo pelos conselhos e pela grande amizade e agradecer pelo dinheiro depositado no período que a minha bolsa atrasou. Aos meus sobrinhos João Pedro e Rafael que vocês possam vencer os desafios inerentes do mundo globalizado através de uma boa educação que irão adquirir em um futuro breve.

À Liliane (meu anjo), minha companheira e quem esteve presente em cada momento durante o período desse trabalho e, além disso foi a luz na escolha desse desafio. Sem o seu carinho, amor e sua atenção nada disso seria materializado principalmente no período que resolvi ser professor voluntário na UFVJM, se não fosse você teria desistido, mas com seu apoio e incentivo consegui vencer essa batalha e espero um dia colher o fruto dessa grande experiência. Não poderia esquecer de agradecer as inúmeras orações de sua mãe (Maria Luiza) que foram importantíssimas ao longo dessa conquista.

Aos professores da Pós-Graduação em Química da UFVJM que contribuíram para minha formação e também aos professores Ângelo (UFJF), Jarbas (UFMG), Ricardo (UFMG), Vivian (UFVJM) e Helen (UFVJM) que tive o prazer de conhecê-los ao longo desse trabalho e que de alguma maneira ajudou na solidificação desse estudo.

Aos meus amigos Alexander (Jesus luz), Gustavo (secretário), Marcos, Mayara, Luiz Henrique (Tião), Carmindo (Borel), Edmilson (Edmota), Heber, Bruna, Rafinha, Filipão e principalmente aos meus amigos da República Bicho Preguiça em especial aos companheiros Febre, Dezim, Victor Hugo, Matheus, Leonardo (calouro) e João Paulo pelas inúmeras conversas científicas ou apenas projeções futurísticas, pois acredito que iremos mudar de alguma maneira a concepção de enfrentar as coisas desse mundo.

Gostaria de agradecer aos grupos de pesquisas LASEB da UFVJM que foi a minha segunda casa e LASEP-UFMG pela recepção durante a realização dos

experimentos, ao Lucas (UFMG) por ter ensinado cada passo da reação *click* e também à UFVJM pela concessão da bolsa de estudo e além disso, carregarei esse DNA acadêmico por toda a minha carreira.

E por fim, gostaria de agradecer três pessoas especiais que tive o prazer de trabalhar e conhecer nessa jornada acadêmica, ao Carlos Filipe por ter me ensinado cada detalhe durante os estudos realizados na UFMG, à Kelly que foi uma grande companheira na reta final do mestrado com os testes biológicos, se não fosse você estaria completamente perdido e com mais cabelos brancos e, por último não poderia deixar o meu humilde e eterno agradecimento ao Professor Rodrigo Verly que, com coragem, determinação, ética e compromisso, aceitou o desafio de me orientar no desenvolvimento desse trabalho e exerceu esse papel com bastante competência e dignidade.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURA E ACRÔNIMO.....	v
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO	xiv
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Carboidratos	3
2.2 Glicopeptídeos e Glicoproteínas.....	5
2.3 Reações de Glicosilação de Peptídeos.....	6
2.4 Compostos Heterocíclicos	10
2.5 Triazóis	12
2.5.1 Ciclização de fenil-hidrazonas.....	14
2.5.2 Adição de Enolato a Azidas.....	16
2.5.3 Reações do Tipo [2N+1N].....	18
2.5.4 Cicloadição 1,3-Dipolar.....	21
2.6 Reação de cicloadição 1,3 dipolar catalisada por cobre (Reação <i>Click</i>)	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Síntese do Peptídeo [PAG ¹]HSP-1	34
3.1.1 Preparação da Resina SPFS	35
3.1.2 Etapa de Acoplamento	36
3.1.3 Etapa de Desproteção.....	37
3.1.4 Glicosilação do Peptídeo [PAG ¹]HSP-1	37
3.1.5 Reação de Clivagem	39

3.2 Secagem das Amostras	40
3.3 Purificação do Peptídeo [PAG ¹]HSP-1 e dos Glicopeptídeo-Triazólicos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 por CLAE-FR.....	40
3.4 Análise por Espectrometria de Massa	41
3.5 Padronização das Soluções Estoque de HSP-1, [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1.....	41
3.6 Obtenção de Lipossomas	42
3.7 Medidas de Extravasamento de Carboxifluoresceína.....	44
3.7.1 Encapsulamento em Vesículas Unilamelares	44
3.7.2 Preparação da Coluna Sephadex G25	44
3.7.3 Medidas de Extravasamento das LUV's-CF	45
3.8 Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta	45
3.9 Experimentos de Espectroscopia de Dicroísmo Circular	46
3.10 Ensaios Biológicos	47
3.10.1 Testes Antimicrobianos	47
3.10.2 Teste Antifúngicos.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Síntese e Caracterização do Peptídeo [PAG ¹]HSP-1	49
4.2 Síntese dos Glicopeptídeo-Triazóis [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 via Reação <i>Click</i>	52
4.3 Caracterização e Purificação dos Glicopeptídeos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1.....	55
4.3 Testes Biológicos.....	61
4.4 Dicroísmo Circular (CD).....	63
4.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta.....	64
4.6 Extravasamento de Carboxi Fluoresceína (CF).....	69

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7. ANEXO	87

RESUMO

COELHO, E. F. JR; **Síntese Química, Avaliação do Potencial Biológico e Estudos de Interação com Meios Biomiméticos de Glicopeptídeo-Triazóis Derivados de HSP-1.** 2015, 87p. Dissertação em Química (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

O presente trabalho propõe a glicosilação do peptídeo antimicrobiano HSP-1, composto por 14 resíduos de aminoácidos e isolado originalmente da espécie *Hyla punctata* (PRATES *et al.*, 2004) empregando-se a síntese de peptídeos em fase sólida associada a reação de cicloadição catalisada por cobre (SHARPLESS *et al.*, 2002). Para isto, foi realizada a síntese do peptídeo HSP-1 propargilado ([PAG¹]HSP-1) através da metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) via estratégia Fmoc. Após a confirmação da obtenção do [PAG¹]HSP-1 por espectrometria de massa (MALDI-ToF), foi realizada a glicosilação com as inserções dos derivados azido acetilado de glicose e *N*-acetilglicosamina na presença de sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O) e de ascorbato de sódio como agente redutor para obtenção dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1. Os produtos das sínteses foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e também caracterizados por espectrometria de massa (MALDI-ToF), confirmando a formação regioseletiva dos glicopeptídeo-triazóis sem produção de subprodutos da glicosilação. Os estudos biológicos comparativos entre o peptídeo HSP-1 e de suas formas glicosiladas revelaram que as modificações químicas não alteraram significativamente a eficácia do HSP-1 contra agentes bacterianos. Entretanto, os testes antifúngicos demonstraram melhor atividade fungicida para os glicopeptídeos quando comparado ao peptídeo HSP-1.

Foram ainda realizados estudos conformacionais e de interação entre o peptídeo e os glicopeptídeos com vesículas fosfolipídicas de caráter zwitteriônico (POPC) e aniônico (POPC/POPG). Os estudos conformacionais empregando-se a técnica de Dicroísmo Circular (CD) revelaram menor teor de helicidade tanto em LUV's de POPC quanto de POPC/POPG para os glicopeptídeos em relação a HSP-1. Os estudos de interação foram realizados empregando-se as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (ζ) e extravasamento de carboxifluoresceína (CF). De uma maneira geral, verifica-se que a variação no diâmetro hidrodinâmico (ΔD_h) para vesículas

zwitteriônicas POPC e aniônicas POPC/POPG é maior para os glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em relação ao HSP-1. Por outro lado, a variação do potencial zeta tanto em vesículas zwitteriônicas quanto em vesículas predominantemente negativas causada por HSP-1 foi maior em comparação ao efeito causado pelas formas glicosiladas. E por fim, os resultados de extravasamento de carboxifluoresceína induzida por cada espécie (HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1) mostrou que a capacidade lítica dos glicopeptídeos é ligeiramente maior em ambos os meios biomiméticos quando comparados com o peptídeo HSP-1. Assim sendo, este trabalho mostrou que a presença do anel triazólico pode ser responsável pela maior atividade antifúngica dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em relação ao peptídeo HSP-1.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, glicopeptídeo-triazóis, reação *click*, e interação peptídeo-membrana.

ABSTRACT

COELHO, E. F. JR; **Chemical Synthesis, Biological Evaluation and Potential Interaction Studies with Biomimetic Means of Glycopeptide-Triazoles Derivatives HSP-1**. 2015, 87p. Dissertação em Química (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2015.

This work proposes the glycosylation of the antimicrobial peptide HSP-1, containing 14 amino acid residues and originally isolated from *Hyla punctata* species (PRATES *et al.*, 2004) by solid phase peptides synthesis associated with cycloaddition reaction copper catalyzed (SHARPLESS *et al.*, 2002). The synthesis of propargylated HSP-1 ([PAG¹] HSP-1) was carried out by solid phase peptide synthesis using Fmoc strategy and characterized by mass spectrometry (MALDI-ToF). In order to obtain the glycopeptide triazoles [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 and [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, azide derivatives acetylated glucose and *N*-acetylglucosamine were used in the presence of copper sulfate pentahydrate (CuSO₄ · 5H₂O) and sodium ascorbate as a reducing agent. The products were purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and characterized by mass spectrometry (MALDI-ToF), confirming the regioselective reaction without glycosylation secondary products.

Comparative studies among HSP-1 peptide and their glycosylated forms don't show significant changes in antibacterial assays. However, the antifungal tests have shown a significant increase in fungicidal activity for glycopeptides when compared to HSP-1 peptide.

Furthermore, it were carried out conformational and interaction studies among the peptide and glycopeptides with zwitterionic (POPC) and anionic (POPC/POPG) phospholipid vesicles. The circular dichroism (CD) spectra have revealed lower helicity to glycopeptides relative HSP-1 in both zwitterionic and anionic LUV's. Interaction studies were performed employing the dynamic light scattering (DLS), zeta potential and leakage carboxyfluorescein (CF) techniques. Summing up, the hydrodynamic diameter variation (ΔD_h) for zwitterionic and anionic vesicles is greater for glycopeptides [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 and [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 when compared with HSP-1. On the other hand, the zeta potential variation in zwitterionic or negative vesicles caused by HSP-1 was higher compared to the effect caused by glycosylated forms. Finally, the results of carboxyfluorescein leakage induced by each species (HSP-

1 [Glc-trz-G¹⁴] HSP-1 and [GlcNAc-trz-G¹⁴] HSP-1) showed a higher lytic capacity of glycopeptides in both media in relation to the HSP-1 peptide. Thus, it showed that the presence of triazole rings may be responsible for the higher antifungal activity of derivatives [Glc-trz-G¹⁴] HSP-1 and [GlcNAc trz-G¹⁴] HSP-1.

Keywords: Antimicrobial peptides, glycopeptides-triazoles, click reaction and peptide-membrane interaction.

LISTA DE ABREVIATURA E ACRÔNIMO

ATCC	Fabricante de cepas do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BOC	<i>t</i> -butiloxicarbonila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CF	Extravasamento de Carboxifluoresceína
CHCA	Ácido α -ciano-4 hidroxicinâmico
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
Cu(I)	Fonte de sais de cobre I
Cu(II)	Fonte de sais de cobre II
CUAAC	Cicloadição Alquino-Azida Catalisada por Cobre do inglês <i>azide-alkyne cycloaddition catalyzed by copper</i>
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
DIC	1,3-Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRV	Desidratação e Hidratação de Vesículas, do inglês <i>Dehydration Rehydration Vesicles</i>
ε	Absortividade Molar
E_{at}	Energia de ativação

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização <i>elektrospray</i>
eV	elétron-volt
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
HOBt	1-hidroxidobenzotriazol
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de mais alta energia, do inglês <i>highest occupied molecular orbital</i>
h	horas
IPA	2-propanol
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IUPAC-JCB	União Internacional de Química Pura e Aplicada e Comissão Conjunta de Nomenclatura Bioquímica, do inglês <i>Union of Pure and Applied Chemistry Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>
k_{obs}	Velocidade de liberação de carboxifluoresceína
λ	Comprimento de onda
LUMO	Orbital molecular desocupado de mais baixa energia, do inglês <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
LUV's	Vesículas unilamelares grandes, do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
m/z	Razão entre a massa e carga
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MFC	Concentração Fungicida Mínima
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MLV's	Vesículas Multilamelares, do inglês <i>Multi Lamellar Vesicles</i>

MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino) propanosulfônico
MQE	Quantificação de Ergosterol
MS	Espectrometria de Massa, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
NCCLS	Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico, do inglês <i>Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically</i>
NDA	Atividade Não Detectada
PDI	Índice de Poldispersão, do inglês <i>polydispersity index</i>
PIPE	Piperidina
θ	Elipsidade molar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotação por Minuto
RPMI	Meio de cultura
RPMI-1640	Meio de cultura com glutamina e indicador vermelho de fenol, sem bicarbonato
SAM	Monocamada Auto Organizada, do inglês <i>Self Assembly Monolayer</i>
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
SUV's	Vesículas Unilamelares Pequenas, do inglês <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
ToF	Tempo de vôo, do inglês <i>Time of Flight</i>
Tris	Tris-hidroxiaminometilmetano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das estruturas químicas da D-glicose e D-frutose.....	3
Figura 2. Esquema simplificado da formação da maltose	4
Figura 3. Representação da ligação <i>O</i> -glicosídica da β -Galactosil-(1 \rightarrow 3)- α - <i>N</i> -acetilgalactosaminil- Ser/Ther.....	6
Figura 4. Preparação de <i>O</i> -glicopeptídeos através da síntese de peptídeo em fase sólida.	7
Figura 5. Processo de β -eliminação que ocorre em meio básico.....	8
Figura 6. Preparação de glicopeptídeo-triazóis em síntese de peptídeos em fase sólida empregando-se Boc-glicoaaminotriazóis e R ₁ como unidade glicosídica.....	8
Figura 7. Ação de azóis na inibição da síntese do ergosterol alterando a composição da membrana celular.	9
Figura 8. Estrutura química do 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT).	10
Figura 9. Estrutura química de princípios ativos dos fármacos conhecidos.....	11
Figura 10. Estrutura química de heterociclos aromáticos azólicos.	12
Figura 11. Equilíbrio entre as estruturas isoméricas do 1,2,3-triazol.....	13
Figura 12. Equilíbrio tautomérico seguido de rearranjo de Dimroth.	14
Figura 13. Síntese de 1,2,3-triazóis a partir de bis-fenil-hidrazona.....	15
Figura 14. Formação de triazóis a partir da oxidação de uma fenil-osazona.	16
Figura 15. Preparação do 1,2,3- triazol por adição a um enolato.	17
Figura 16. Rota de preparação de triazóis a partir de quinolíνας e β -cetoésteres malônicos.....	18

Figura 17. Síntese de 1,2,3-triazóis a partir de diazomalonaldeído.....	19
Figura 18. Preparação 1,2,3-triazóis a partir de enaminona por transferência de diazo com tosilazida e mesilazida.	20
Figura 19. Estrutura química da isatina.	20
Figura 20. Formação do sistema triazólico via transferência de diazo derivado da isatina.	21
Figura 21. Representação dos possíveis estados de transição para reação de cicloadição [4+2] Diels-Alder.	22
Figura 22. Cicloadição entre 1,3-dipolo e o dipolarófilo formando um cicloaduto.	22
Figura 23. Estruturas de ressonância e os orbitais paralelos p_z representado em preto nas espécies 1,3-dipolar alil e propargil/alenil e orbital ortogonal em cinza referente ao ânion propagil/alenil.	23
Figura 24. Cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas.	24
Figura 25. Orbitais de fronteira de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar.....	25
Figura 26. Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre acilsilanos α,β insaturados.	26
Figura 27. Preparação de pseudonucleosídeos derivados do sistema 1,2,3-triazólico... ..	26
Figura 28. Esquema da reação de cicloadição entre alcino não-simétrico e azida na formação de produtos 1,4 e 1,5-dissubstituídos.	27
Figura 29. Reação de cicloadição 1,3-dipolar por sais de cobre (I).	28
Figura 30. Primeiro ciclo catalítico para a reação de cicloadição catalisada por cobre. ..	29
Figura 31. Mecanismo proposto para reação CuAAC envolvendo dois centros metálicos no estado de transição.....	30
Figura 32. Síntese de 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituído catalisado pelo complexo $CpRuCl(PPh_3)_2$	33

Figura 33. Estrutura química do suporte sólido (resina) utilizado para síntese do peptídeo [PAG ¹]HSP-1.....	34
Figura 34. Estrutura química dos ativadores do grupo carboxila DIC e HOBt.....	36
Figura 35. Estrutura dos derivados azido acetilado de glicose (2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1-desoxi- β - <i>D</i> -glicopiranoose) e <i>N</i> -acetilglicosamina (2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β - <i>D</i> -glicopiranoose).....	37
Figura 36. Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas.....	43
Figura 37. Reação de ninhidrina para detecção de amina primário (Teste de Kaiser)...	49
Figura 38. Espectro de Massa (EM-MALDI-ToF) do peptídeo [PAG ¹]HSP-1 bruto....	51
Figura 39. Perfil de CLAE-FR do peptídeo [PAG ¹]HSP-1 bruto	52
Figura 40. Reação de acompanhamento da glicosilação do peptídeo [PAG ¹]HSP-1 utilizando-se sulfato de cobre penta hidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O) na presença de ascorbato de sódio como agente redutor.....	54
Figura 41. Espectros de Massa (EM-MALDI-ToF) dos glicopeptídeo-triazóis sintetizados brutos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	56
Figura 42. Perfil de CLAE-FR dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	57
Figura 43. Perfil de CLAE-FR dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	59
Figura 44. Espectro de Massa (ESI) dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 após purificação em CLAE-FR	60
Figura 45. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 em LUV's POPC e POPC/POPG.....	64

Figura 46. Diâmetro hidrodinâmico de LUV's POPC e POPC/POPG em função da razão molar do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	65
Figura 47. Valores de Potencial Zeta do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazólicos Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 em LUV's POPC e POPC/POPG	67
Figura 48. Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de POPC com adição do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeos [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1..	70
Figura 49. Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de POPC/POPG com adição de diferentes concentrações de HSP-1, [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	71
Figura 50. Porcentagem de liberação de CF em função da razão molar do peptídeo HSP-1, [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 em LUV's de POPC e POPC/POPG	72
Figura 51. Razão de liberação de CF, K_{obs} , em função da razão molar de HSP-1, [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 em LUV's de POPC e POPC/POPG.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre azida e diferentes acetilenos não-simétrico	27
Tabela 2. Alguns exemplos de fontes catalítica de cobre para reação CuAAC	32
Tabela 3. Sequência primária para obtenção do peptídeo [PAG ¹]HSP-1.....	34
Tabela 4. Dados do acompanhamento da síntese do peptídeo [PAG ¹]HSP-1.....	50
Tabela 5. Atividade antimicrobiana do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 contra cepas bacterianas ATCC	61
Tabela 6. Atividade fungicida do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1 em <i>Candida sp</i> ATCC	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo para preparação da resina polimérica <i>Rink-amide</i>	35
Quadro 2. Protocolo de remoção do grupo Fmoc.....	36
Quadro 3. Relação entre os reagentes para etapa de acoplamento.	36
Quadro 4. Protocolo da reação <i>click</i> para os derivados azido acetilados catalisado por iodeto de cobre.....	38
Quadro 5. Protocolo da reação <i>click</i> para os derivados azido acetilados catalisado por sulfato de cobre penta hidratado na presença do agente redutor ascorbato de sódio.	39
Quadro 6. Protocolo de clivagem do peptídeo da resina sem a reação <i>click</i>	40

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

1. Coelho, E. F. Jr; Ortlieb, L. O; Verly, R. M; Resende, J. M; Bemquerer, M. P. **Estudo do Efeito da Carga e do Colesterol na Interação do Peptídeo LyeTx-I em Membranas Fosfolipídicas.** Resumo apresentado sob a forma oral no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas/MG, 2014.
2. Coelho, E. F. Jr; Ortlieb, L. O; Verly, R. M; Resende, J. M; Bemquerer, M. P. **Estudo do Efeito da Carga e do Colesterol na Interação do Peptídeo LyeTx-I em Membranas Fosfolipídicas.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no IV Semana de Integração: Ensino, Pesquisa e Extensão, Diamantina/MG, 2015.
3. Coelho, E. F. Jr; Verly, R. M; Guimarães, C. F. R; Bemquerer, M. P; Resende, J. M. **Synthesis and Characterization of Glycopeptidetriazole Derivate from Antimicrobial Peptide HSP-1.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu/PR, 2015.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A importância dos carboidratos como fonte de energia e componente estrutural da parede celular de diversos organismos é bastante reconhecida (NELSON *et al.*, 2014). Os carboidratos são também encontrados como constituintes de diversas proteínas (glicoproteínas), lipídeos (glicolipídeos) e peptídeos (glicopeptídeos) em ambientes intra e extracelulares, sendo denominados glicoconjugados (CRESPO, 2010; HORCH, 1997).

Nesse contexto, os glicopeptídeos têm sido alvos de estudos em diversas linhas de pesquisa devido à grande relevância em diversas condições fisiológicas e patológicas (RIBEIRO, 2011) e, processos sintéticos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de viabilizar e otimizar a obtenção de glicopeptídeos. Uma estratégia que pode ser empregada para glicosilação e possivelmente melhorar o perfil biológico de peptídeos naturais é a inserção de heterociclos de nitrogênio por reações de cicloadição 1,3 dipolar catalisada por cobre na síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) (CELENTANO *et al.*, 2012; ZENG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de métodos eficientes de síntese aliado as técnicas de caracterização, purificação, estudos conformacionais e de interação com meios biomiméticos, têm proporcionado a compreensão do comportamento dos glicopeptídeos uma nova perspectiva em busca de moléculas modificadas que no futuro sejam capazes de atuar eficientemente no combate às doenças disseminadas mundialmente.

Neste trabalho, o objetivo foi sintetizar glicopeptídeos derivados do peptídeo antimicrobiano HSP-1, composto por 14 resíduos de aminoácidos e isolado originalmente da espécie *Hyla punctata* (PRATES *et al.*, 2004), empregando-se a síntese de peptídeos em fase sólida associada a reação de cicloadição catalisada por cobre (SHARPLESS *et al.*, 2002). Para isto, foi proposta a síntese de HSP-1 propargilado [PAG¹]HSP-1 substituindo-se o resíduo de aminoácido de glicina da região *N*-terminal por um resíduo de aminoácido de propargilglicina, empregando-se a metodologia de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) via estratégia Fmoc. Em seguida, foi realizada a glicosilação via reação *click* com as inserções dos derivados azido acetilado de glicose e *N*-acetilglicosamina no intuito de obter os glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1.

Após a confirmação dos produtos obtidos por espectrometria de massa (MALDI-ToF) e da purificação por cromatografia reversa de alta eficiência (CLAE-FR), foi realizado estudo comparativo entre o peptídeo HSP-1 e suas formas glicosiladas [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 para ensaios biológicos (bactericida e fungicida), estudos conformacionais e de interação entre o peptídeo e os glicopeptídeos com vesículas fosfolipídicas de caráter zwitteriônico e aniônico empregando-se as técnicas de dicroísmo circular (CD); espalhamento de luz dinâmico (DLS); potencial zeta (ζ) e extravasamento de carboxifluoresceína (CF).

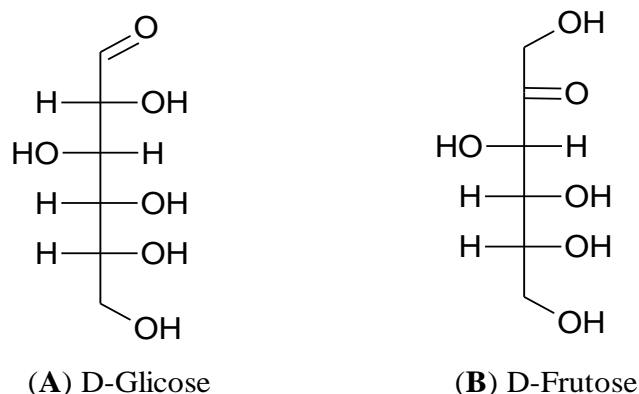
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carboidratos

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de CO₂ e H₂O em celulose e outros produtos vegetais (NELSON *et al.*, 2014). Essa abundância de carboidratos na natureza e também em diversas funções nos sistemas biológicos justificam a importância dos estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas (CAMPO, 2007). Entretanto, o interesse pelo estudo dos carboidratos como moléculas de reconhecimento celular iniciou-se por volta de 1968 (LIS, 1998). Antes disso, pouco foi pesquisado e divulgado, em grande parte devido à complexidade estrutural das moléculas e das inúmeras possibilidades de interligações dos carboidratos, o que dificultava o controle regio- e estereosseletivo nas reações de síntese e a caracterização estrutural dos produtos obtidos (LIS, 1998). Atualmente, com o avanços nos métodos de síntese orgânica e nas técnicas de análise espectrométrica, os carboidratos têm sido alvo de muitos estudos para viabilizar sua obtenção e elucidação estrutural e de suas propriedades biológicas e funcionais (CARVALHO, 2008; MDOWELL *et al.*, 2001).

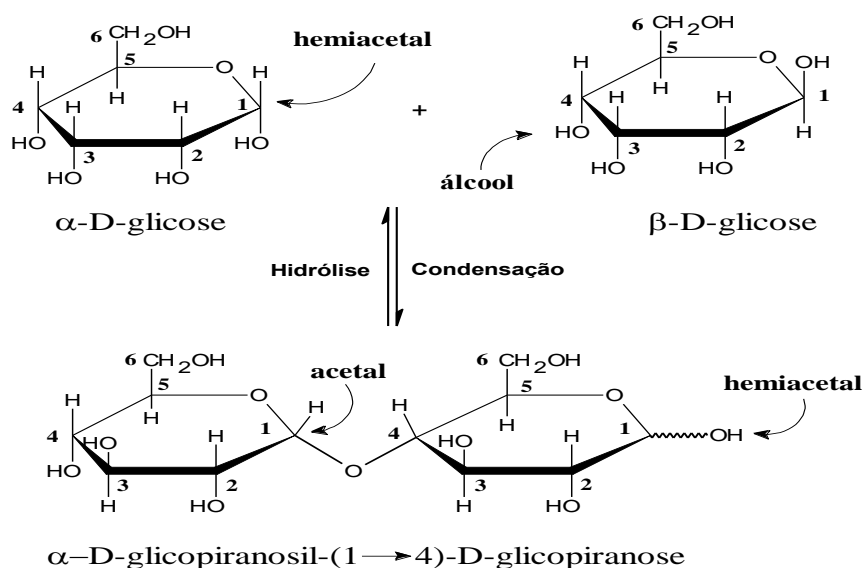
A **Figura 1** representa os dois monossacarídeos mais abundantes na natureza, os açúcares glicose (**A**) e a frutose (**B**) (NELSON *et al.*, 2014). Os monossacarídeos consistem somente de uma unidade de poliidroxialdeídos (aldose) ou poliidroxicetona (cetose), as quais podem ter de três a sete átomos de carbono.

Figura 1. Representação das estruturas químicas da D-glicose (**A**) e D-frutose (**B**), respectivamente um poliidroxialdeído e uma poliidroxicetona.



Um dissacarídeo é formado a partir de dois monossacarídeos unidos covalentemente entre si por uma ligação *O*-glicosídica. A **Figura 2**, representa a condensação de duas moléculas de *D*-glicose para formação da maltose, que ocorre pela reação da hidroxila do carbono C4 de uma glicose com o carbono C1 do grupo hemiacetal de outra, resultando na formação de uma ligação *O*-glicosídica e eliminação de uma molécula de água.

Figura 2. Esquema simplificado da formação da maltose. A molécula de maltose, conserva um hemiacetal redutor no C-1 não envolvido na ligação glicosídica. Como a mutarrotação interconverte as formas α e β do hemiacetal, as ligações nesta posição algumas vezes são representadas por linhas onduladas, como mostrado aqui, para indicar que a estrutura pode ser α quanto β .



Os carboidratos podem ser encontrados ainda na forma de oligômeros, principalmente como componentes de biopolímeros. Nas células podem existir em diversas formas, como por exemplo, lipopolissacarídeos, ácidos nucleicos, glicoproteínas e glicopeptídeos (NELSON *et al.*, 2014). Na maioria dos casos, os carboidratos estão covalentemente ligados às proteínas, lipídeos ou peptídeos, cujas moléculas são denominadas de glicoproteínas, glicolipídeos ou glicopeptídeos, frequentemente biologicamente ativas (MDOWELL *et al.*, 2001).

Os glicopeptídeos e as glicoproteínas naturais desempenham um papel importante em vários processos biológicos devido aos seus efeitos bioquímicos e fisiológicos (CAMPO, 2007). O crescente interesse mundial por essas moléculas tornou-se altamente difundido e atinge a cada ano um nível elevado de pesquisa sobre a

sua estrutura, o seu funcionamento em processos celulares, como por exemplo, reconhecimento e adesão celular, transporte intracelular e intercelular de produtos genéticos, além do estudo no controle de permeabilidade de membranas celulares (CARVALHO, 2013). Por outro lado, a compreensão da modificação de peptídeos e proteínas devido às glicosilações é muito menos difundida, embora aproximadamente metade das moléculas de proteínas de origem humana serem glicosiladas (APWEILER *et al.*, 1999).

2.2 Glicopeptídeos e Glicoproteínas

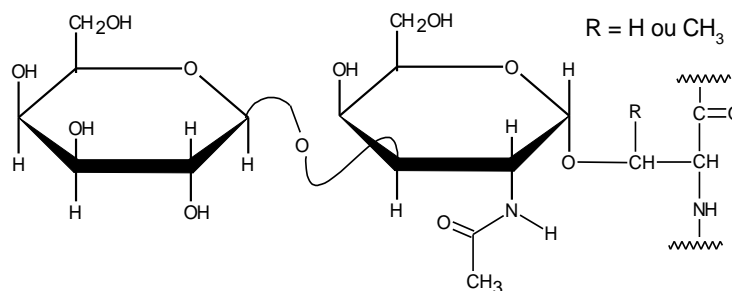
A descoberta de que as células continham resíduos de açúcares ancorados à sua membrana celular na forma de glicoproteínas ou glicolipídeos, e que sua modificação ou extinção acarretava alterações em funções celulares, promoveu um rápido interesse em uma nova área conhecida por glicobiologia (GABIUS, 1998). Essas moléculas contêm um domínio de carboidratos e outro peptídico ou proteico, e na maioria das ocorrências são marcadores em comunicações celulares, determinando fatores como virulência microbiana, inflamação e resposta imunológica (SHARMA, 2011; LASKY, 1995; SHARON, 1995). No caso das glicoproteínas são variantes maiores, que contêm mais de 50 aminoácidos por carboidrato (CAMPO, 2007). O carboidrato ligado à cadeia peptídica ou proteica pode ser um monossacarídeo ou oligossacarídeo, podendo conter até cerca de 20 unidades de monossacarídeos (TAYLOR, 1996).

A glicosilação é um dos mecanismos mais comuns de modificação pós-traducional de peptídeos e proteínas, que alteram suas estruturas e afetam suas estabilidades conformacionais e funções químicas e biológicas, como por exemplo a resistência à proteólise e biosseletividade (TEIXEIRA, 2010). A natureza e extensão das reações de glicosilação possibilitam um elevado grau de diversidade de glicofórmos (peptídicos e proteicos) devido à variabilidade de carboidratos e aminoácidos passíveis de serem glicosilados (WIEDERSCHAIN, 2013; WONG, 2003).

A ligação essencial em qualquer glicopeptídeo ou glicoproteína é uma ligação covalente entre um centro anomérico de um mono ou oligossacarídeo e a cadeia lateral de um α -aminoácido da cadeia peptídica (GABIUS, 1998). Dessa forma, tais moléculas podem ser classificadas em relação à ligação do carboidrato com a funcionalidade do aminoácido (CAMPO, 2007). Um *O*-glicopeptídeo, (**Figura 3**, p.6) envolve o

dissacarídeo central β -galactosil-(1-3)- α -N-acetilgalactosamina ao grupo OH do aminoácido serina (Ser) ou treonina (Thr) (VOET *et al.*, 2008)

Figura 3. Representação da ligação *O*-glicosídica da β -Galactosil-(1 \rightarrow 3)- α -N-acetilgalactosaminil- Ser/Thr.



As *N*-glicoproteínas apresentam a unidade de açúcar ligada ao átomo de nitrogênio referente a cadeia lateral do resíduo de aminoácido da asparagina (Asn), enquanto os carboidratos da *O*-glicoproteínas encontram-se ligados a resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) (SPIRO, 2002). Menos comuns são as *N*-glicoproteínas ligadas através da cadeia lateral de resíduos de arginina (Arg) e *O*-glicoproteínas ligadas pela cadeia lateral de resíduos de hidroxilisina, 4-hidroxiprolina e tirosina. Algumas *C*-glicoproteínas, *S*-glicoproteínas e *P*-glicoproteínas também são conhecidas (LEPENIES, 2010). Estudos recentes mostram selênio-glicopeptídeos em ratos na forma de selenocisteína (SeCys) ou selenometionina (SeMet), mas seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente compreendido (ANAN *et al.*, 2011). Dentre as glicoproteínas descritas anteriormente, as *N*-glicoproteínas são os mais abundantes na natureza (APWEILER *et al.*, 1999) e apresentam uma grande diversidade estrutural e funcional, sendo assim, as primeiras na ordem de importância biológica.

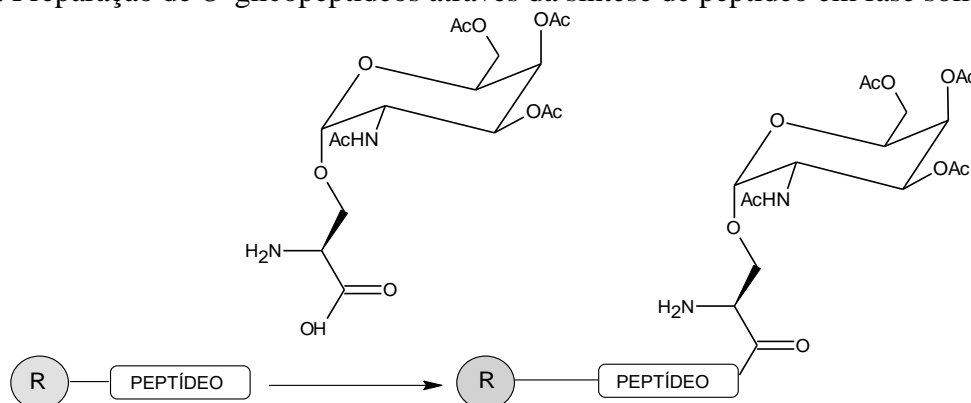
Os glicopeptídeos em sistemas biológicos são de suma importância, entretanto, a quantidade desses compostos obtidos de fontes naturais é bastante limitada (DE CAMPOS, 2011). Dessa forma, nos últimos anos o desenvolvimento de métodos sintéticos tornou-se fundamental nos estudos de glicopeptídeos (MDOWELL *et al.*, 2001).

2.3 Reações de Glicosilação de Peptídeos

A metodologia mais simples e confiável para a preparação de um determinado glicopeptídeo é através de adaptações na síntese de peptídeos em fase sólida (BERA,

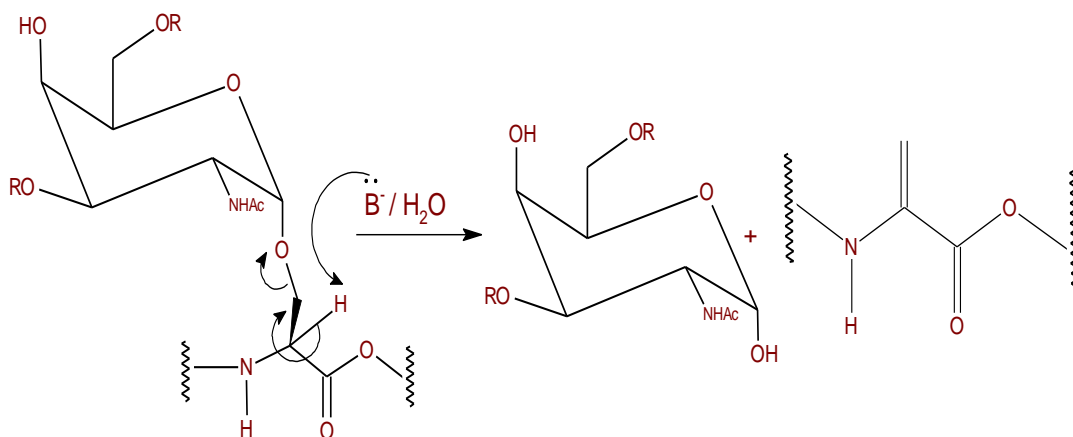
2010; KADALBAJOO *et al.*, 2007; MDOWELL *et al.*, 2001) e normalmente projetam-se sínteses de glicopeptídeos menores, com no máximo 50 resíduos de aminoácidos (BERA, 2010; MDOWELL *et al.*, 2001). Um grande número de *O*-glicopeptídeos para desenvolvimento de vacinas contra o câncer têm sido preparado por incorporação de um *O*-monômero pré-sintetizado de glicosilserinaacetilada fazendo uso da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida (GALONIC, 2007).

Figura 4. Preparação de *O*-glicopeptídeos através da síntese de peptídeo em fase sólida.



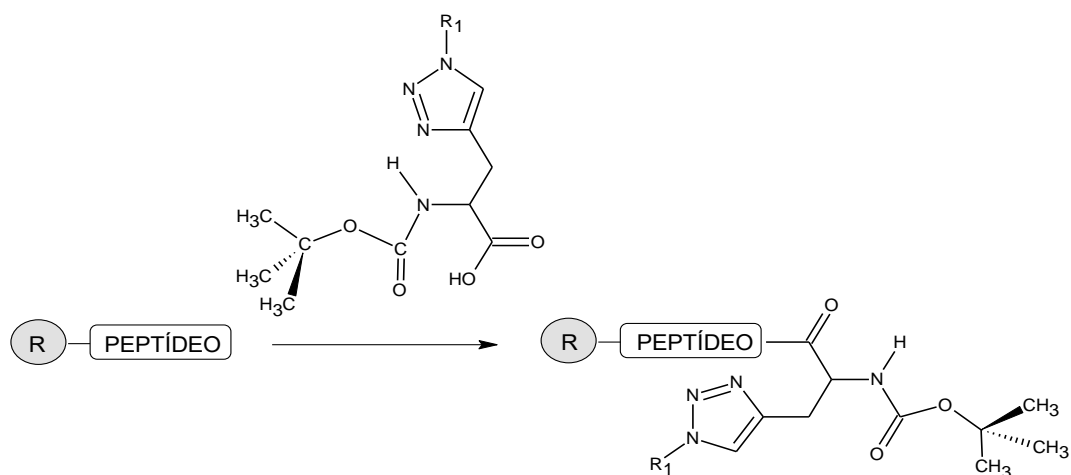
No entanto, alguns problemas podem surgir na aplicação de meio ácido na síntese de resíduos de aminoácidos *O*-glicosilados, como ocorre pela estratégia Boc, a qual emprega o grupo *t*-butoxicarbonila (Boc) como protetor temporário do grupo α -amino. Nessa técnica a liberação do *O*-glicopeptídeos da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeia laterais são conduzidas também em meio ácido, porém em condições mais agressivas como, por exemplo, fluoreto de hidrogênio anidro. Inicialmente, este método é adequado apenas para fragmentos glicosilados pequenos, pois o impedimento estérico é suficientemente grande para a produção de oligossacarídeos, resultando em rendimentos muito baixos. Além disso, as condições de reação necessárias para as etapas de desproteção final de *O*-glicopeptídeos devem ser cuidadosamente ajustadas de modo a evitar β -eliminação indesejável (WRIGHT, 1984) (Figura 5, p.8).

Figura 5. Processo de β -eliminação que ocorre em meio básico.



Devido à labilidade da ligação glicosídica, um método bastante empregado para a síntese de glicopeptídeos envolve a preparação prévia de glicoaminotriazóis, derivados de α -aminoácidos protegidos com o grupo Boc, para emprego na síntese de peptídeos em fase sólida - SPFS (**Figura 6**).

Figura 6. Preparação de glicopeptídeo-triazóis em síntese de peptídeos em fase sólida empregando-se Boc-glicoaminotriazóis e R_1 como unidade glicosídica.



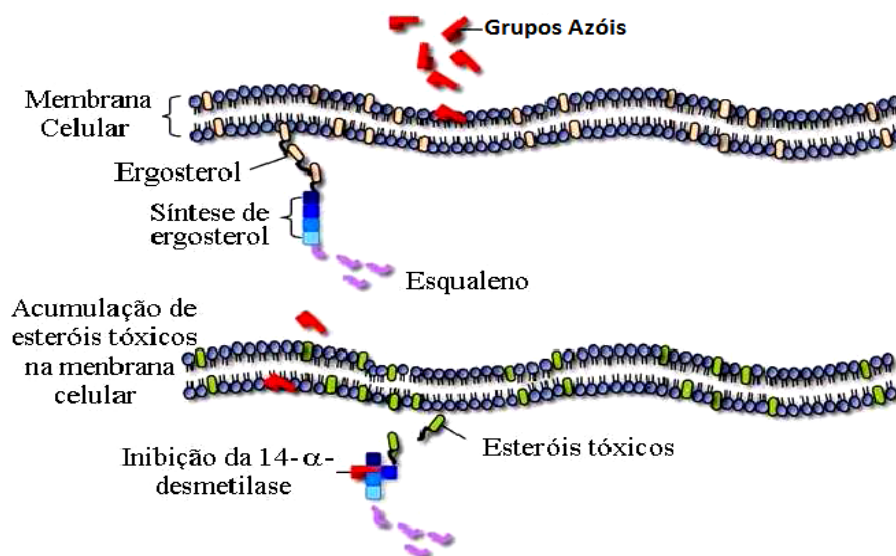
Entretanto, a metodologia mais eficaz desenvolvida até o momento para preparação de glicopeptídeos envolve a combinação da síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) via estratégia 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) acoplada a reações de cicloadição para obtenção de derivados de carboidratos triazólicos. Esse tipo de reação envolve derivados de aminoácidos contendo alcinos terminais e azidas orgânicas

previamente ligados a unidades de açúcares (BERA, 2010; ZHANG *et al.*, 2009; COIN, 2007).

A inserção da unidade triazol proporciona alguns benefícios, como por exemplo, não ser clivado por hidrólise química ou enzimática e ser relativamente resistente à degradação metabólica e proteolítica (ARAGÃO *et al.*, 2010). A estratégia de substituição da ligação glicosídica direta à cadeia lateral de um α -aminoácido pela ligação mediada por um anel triazólico também está sendo explorada na literatura por melhorar o perfil biológico (atividade bacteriana e fungicida) de peptídeos com a inserção de heterocíclicos de nitrogênio (CELENTANO *et al.*, 2012).

Os derivados azólicos (imidazóis e triazóis) são compostos que possuem amplo espectro, agindo na maioria das leveduras e fungos filamentosos por interferir na biossíntese de ergosterol e inibir a enzima *lanosterol-1,4- α -desmetilase* através da quelação com o átomo de ferro envolvido no citocromo P-450, impedindo que esse exerça sua ação catalítica (BEHR, 2003; GEORGOPAPADAKOU, 1998) (**Figura 7**).

Figura 7. Ação de azóis na inibição da síntese do ergosterol alterando a composição da membrana celular. Extraída e adaptada (LUPETTI *et al.*, 2002).

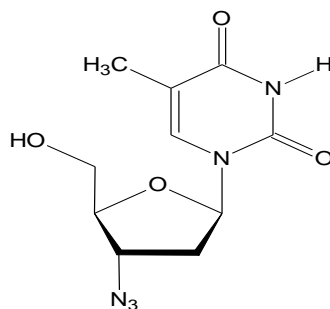


A diminuição da formação do ergosterol eleva o nível de lanosterol e outros esteróis tóxicos que interferem na estrutura da membrana plasmática, tornando-a mais vulnerável (BEHR, 2003; GEORGOPAPADAKOU, 1998; BENNETT, 1995). A seguir será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre compostos heterocíclicos de nitrogênio e os principais métodos de síntese.

2.4 Compostos Heterocíclicos

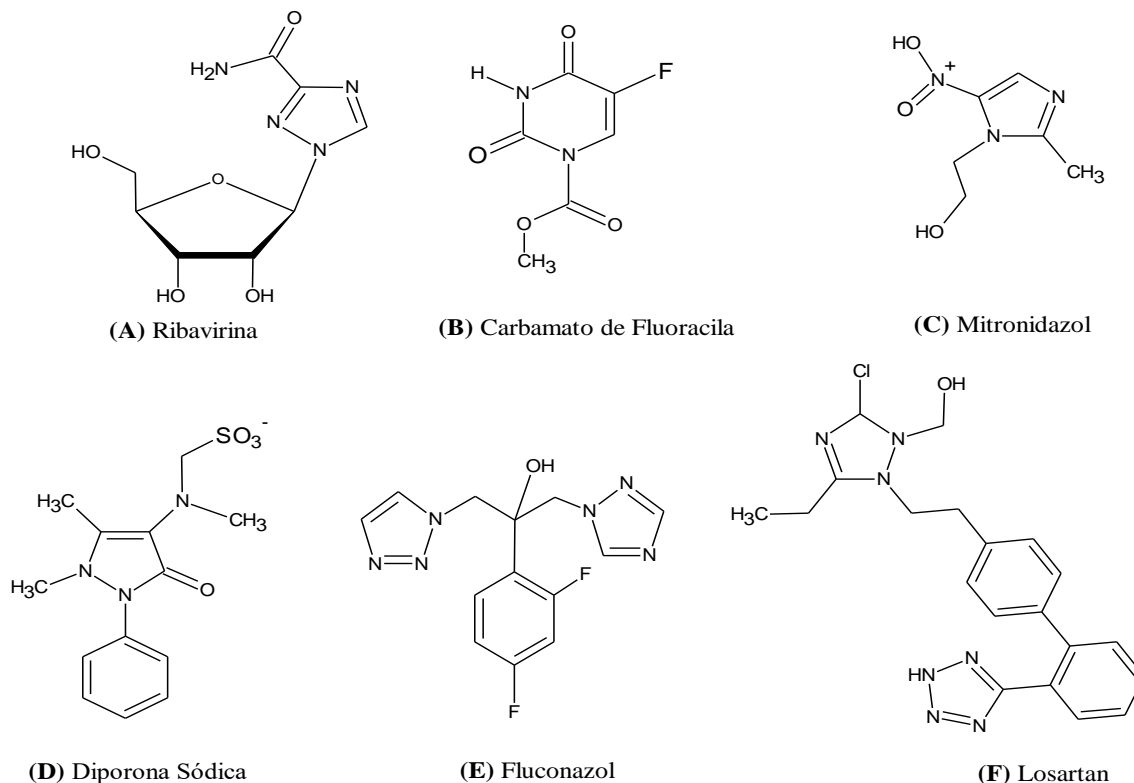
Os compostos heterocíclicos representam aproximadamente metade de todos os compostos conhecidos atualmente. Sua importância é incontestável não apenas pela abundância, mas também por possuir um vasto campo de aplicações em produtos terapêuticos (CANDUZINI, 2012). Um fator que reforça a crescente importância de substâncias heterocíclicas é a notoriedade da aplicação de alguns representantes desta categoria no combate às doenças fatais disseminadas mundialmente (CANDUZINI, 2012). A **Figura 8**, representa a estrutura do fármaco AZT (3-azido-3-deoxitimidina) que é um dos compostos heterocíclicos mais conhecidos que inibe o vírus da imunodeficiência humana (HIV) causador da AIDS e o contágio por *Pneumocystis carinii* que é um micro-organismo que pode residir inofensivamente nos pulmões dos indivíduos normais (HERDEWJIN, 1987).

Figura 8. Estrutura química do 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT).

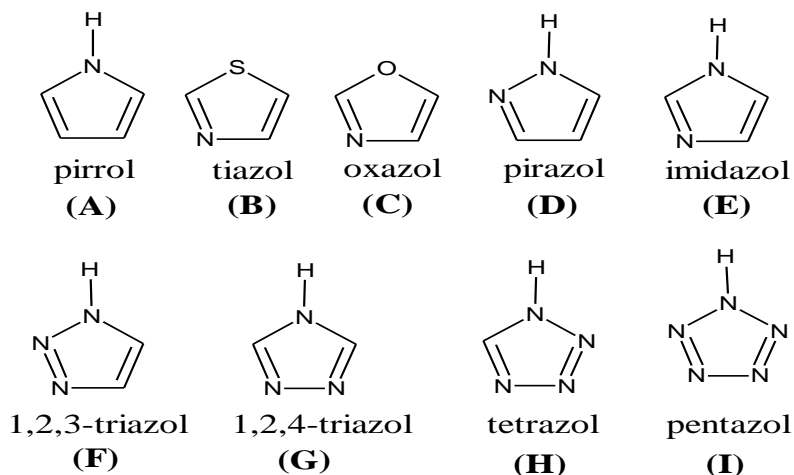


Dentro do universo de compostos heterocíclicos, podemos destacar substâncias heterocíclicas aromáticas, dentre as quais muitas já são empregadas como princípio ativos de fármacos de atividades farmacológicas diversificadas. A **Figura 9** (p.11), apresenta algumas estruturas químicas dessas moléculas com atividades como antiviral (ribavirina[®], **A**); antitumoral (carbamato de fluoracila, **B**); antiprotozoária (metronidazol[®], **C**); anti- inflamatório e analgésica (dipirona sódica, **D**); antifúngica (fluconazol[®], **E**) e anti-hipertensivo (Losartan[®], **F**) (MELO *et al.*, 2006).

Figura 9. Estrutura química de princípios ativos dos fármacos conhecidos.



Substâncias heterocíclicas aromáticas nitrogenadas podem ser classificadas de diferentes formas. Anéis de cinco membros, contendo um ou mais átomos de nitrogênio, pertencem à classe de substâncias denominadas genericamente de azol (**Figura 10**, p.12) sendo que o mais simples deles é o pirrol (**A**). Mesmo os compostos heterocíclicos de cinco membros contendo átomos de enxofre ou oxigênio, adicionalmente a um átomo de nitrogênio, recebem a denominação de azol, sendo chamados, respectivamente, de tiazol (**B**) e oxazol (**C**) (DE SOUZA *et al.*, 2005). As substâncias mais simples da classe dos heterocíclicos aromáticos contendo dois átomos de nitrogênio são derivadas do anel pirazol (**D**) e imidazol (**E**); enquanto que com três átomos de nitrogênio podem se dividir em estruturas isoméricas de 1,2,3-triazol (**F**) e 1,2,4-triazol (**G**); e aquelas com quatro e cinco átomos de nitrogênio derivam dos anéis tetrazol (**H**) e pentazol (**I**), respectivamente.

Figura 10. Estrutura química de heterociclos aromáticos azólicos.

Dentre os sistemas heterocíclicos mais estudados encontram-se os triazóis (1,2,3 ou 1,2,4-triazol), que têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, podendo atuar como fármacos (**Figura 9A e 9E**, p.11), inibidores de corrosão (toliltriazol) e produtos agroquímicos (difeconazol) (MELO *et al.*, 2006). Todos os triazóis são de origem sintética e não há relatos na literatura até o momento, de que estes heterocíclicos tenham sido encontrados na natureza (SHARMA, 2011; MELO *et al.*, 2006; HUDSON, 1992).

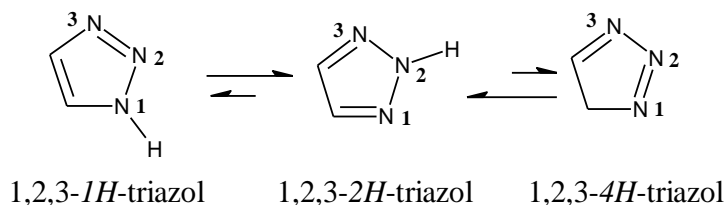
Nessa revisão bibliográfica serão discutidos somente as metodologias sintéticas dos heterociclos aromáticos nitrogenados de três membros (triazóis), com ênfase na reação de cicloadição 1,3-dipolar. Essa metodologia foi empregada na obtenção do [1,2,3]-triazol para a formação dos glicopeptídeostriazóis.

2.5 Triazóis

O sexteto aromático nos triazóis é formado por 4 elétrons π e o par de elétrons não ligante do nitrogênio sp^2 (EICHER, 2003), o qual possui baixa massa molar referente ao sexteto aromático e uma alta densidade eletrônica (WANG *et al.*, 2011). Em relação às propriedades físico-químicas dos triazóis podemos ressaltar o seu comportamento anfótero, que permite ao anel atuar como um ácido fraco ou uma base fraca dependendo do meio (MELO *et al.*, 2006; SHINTANI, 2003) e sua reatividade tanto em reações de alquilação e acilação como também em reações de substituição eletrofílica (CONTE, 2005).

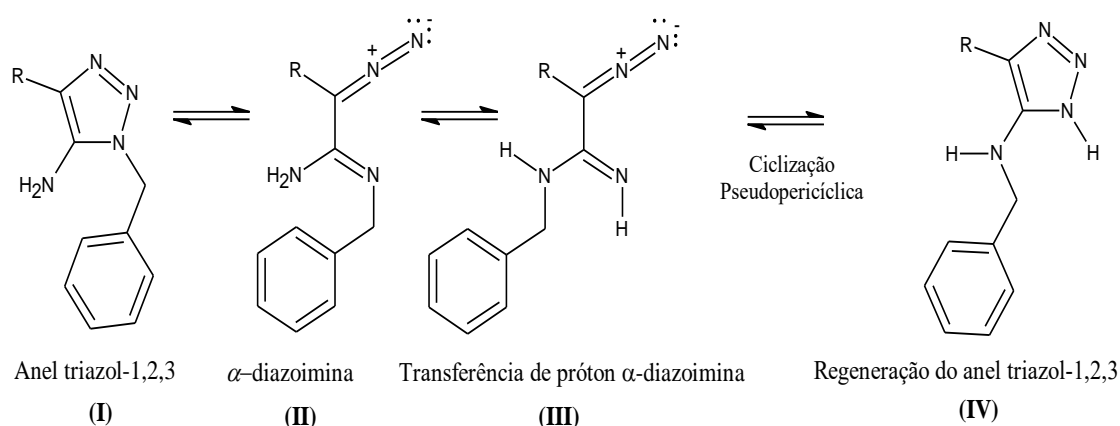
Os triazóis são subclassificados ainda como vicinais (1,2,3-triazóis, **Figura 10F**, p.12), ou como triazóis simétricos (1,2,4-triazóis, **Figura 10G**, p.12) sendo que os não substituídos no átomo de nitrogênio podem coexistirem em três estruturas tautoméricas em um equilíbrio conforme apresentado na **Figura 11** (FERREIRA *et al.*, 1999).

Figura 11. Equilíbrio entre as estruturas isoméricas do 1,2,3-triazol.



As medidas de momento dipolo em benzeno a temperatura de 25°C indicam que, cerca de três quartos das espécies em equilíbrio está no sentido do triazol simétrico 1,2,3-2*H*-triazol (**Figura 11**) e a estrutura 1,2,4-4*H*-triazol não apresenta aromaticidade e raramente é descrito na literatura (MELO *et al.*, 2006; WAMHOFF *et al.*, 1997).

Os triazóis quando apresentam em sua estrutura um substituinte no anel aromático no átomo de nitrogênio também apresentam tautomerismo de cadeia, nesse caso é chamado de rearranjo de Dimroth (DIMROTH, 1927), em homenagem ao pesquisador que idealizou estes estudos, mostrando que anéis 1,2,3-triazóis substituídos na posição 5 por grupos amino, diazometil, hidrazino e hidroxila podem rearranjar-se em outros triazóis (EL ASHRY *et al.*, 1999). Esta abordagem de Dimroth está baseada no fato de que em altas temperaturas (> 100°C) existe um equilíbrio tautomérico anelar (**Figura 12**, p.14) entre o anel 1,2,3-triazol (**I**) e a forma cíclica (**IV**), envolvendo intermediários acíclicos de α -diazioimina (**II** e **III**). A formação do anel triazólico neste caso, ocorre através de um processo de ciclização intramolecular da diazoimina seguida por transferência de próton, conhecido como pseudopericíclico, pois a reação envolve o rearranjo dos elétrons da ligação π e dos elétrons não ligantes do átomo de nitrogênio, regenerando o anel de 5 membros (BAKULEV, 1998).

Figura 12. Equilíbrio tautomérico seguido de rearranjo de Dimroth.

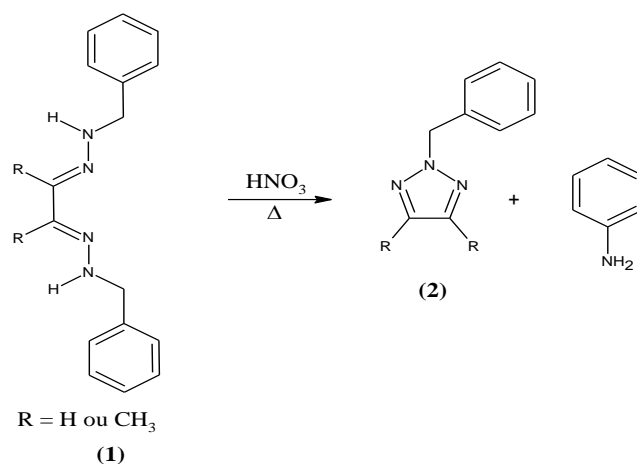
O equilíbrio tautomérico mostrado anteriormente é sensível à temperatura e ao solvente, porém em baixas temperaturas a forma cíclica, que é mais estável, é sempre favorecida (L' ABBÉ, 1984).

Esse grande interesse da sociedade científica no desenvolvimento de metodologias de síntese de triazóis tem crescido nos últimos anos, muito pelo fato dos triazóis não serem oriundos de nenhuma fonte natural (SHARMA, 2011; MELO *et al.*, 2006; HUDSON, 1992). Os principais métodos de preparação dos 1,2,3-triazóis estão representados a seguir, e envolvem basicamente quatro metodologias clássicas: oxidação de fenil-hidrazonas (PECHMANN, 1888); adição de enolato em azidas (DIMROTH, 1927); ciclização do tipo [2N+1N] (ARNOLD *et al.*, 1973) e cicloadição 1,3-dipolar (HUISGEN, 1968).

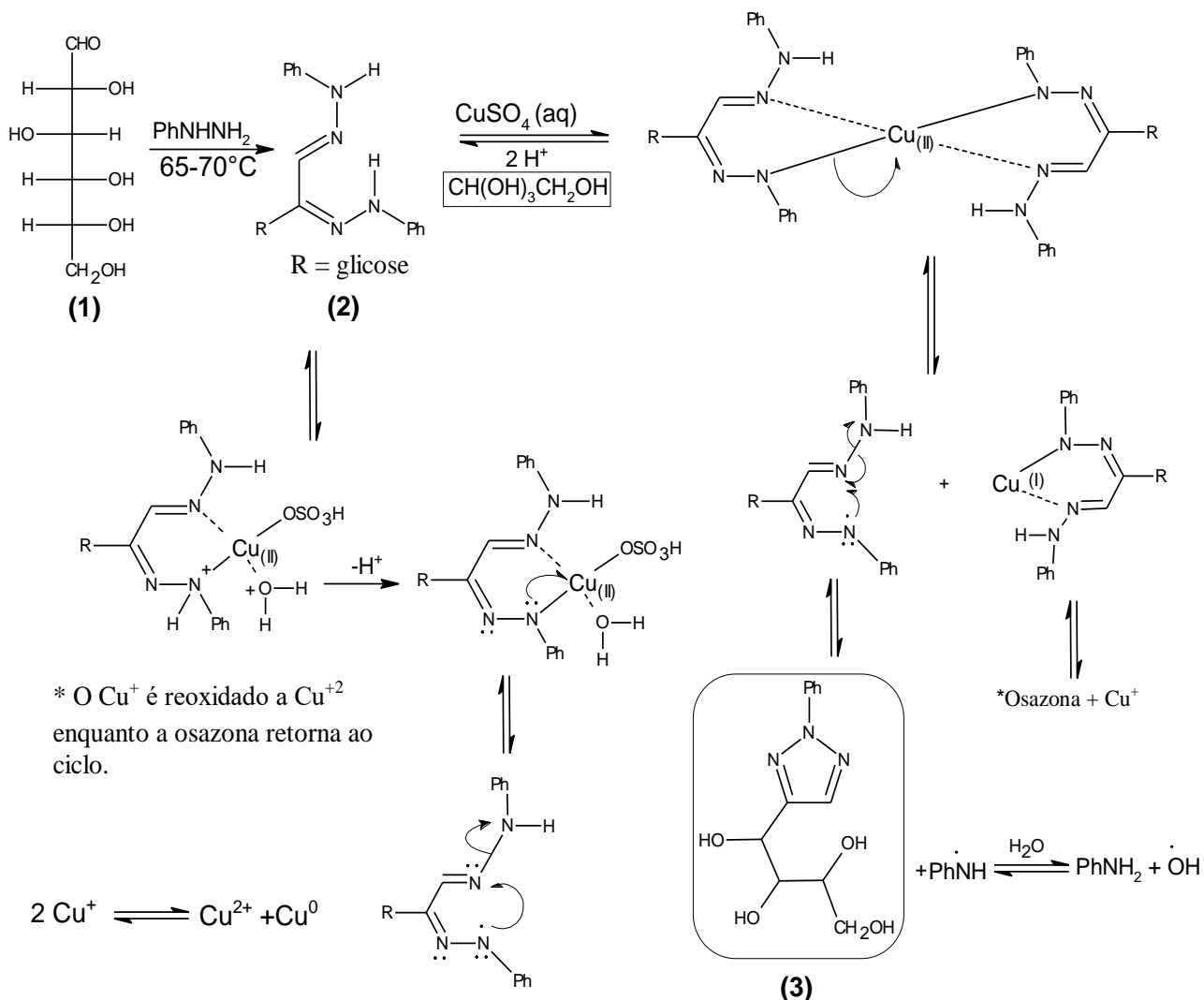
2.5.1 Ciclização de fenil-hidrazonas

A síntese pioneira de 1,2,3-triazóis foi a preparação de 2-aryl-1,2,3-2*H*-triazóis desenvolvida por Hans Von Pechmann, em 1888, que tratou as bis-fenil-hidrazonas (**1**) derivadas de compostos 1,2-dicarbonílicos com ácido nítrico (**Figura 13**, p.15) (PECHMANN, 1888). O trabalho também relata a utilização de derivados carbonílicos mistos de bis-oxima e fenil-hidrazona, para preparação de 1,2,3-triazóis com substituintes arílicos no nitrogênio da posição 2 (**2**).

Figura 13. Síntese de 1,2,3-triazóis a partir de bis-fenil-hidrazona.



Após a síntese do 1,2,3-triazóis desenvolvida por Pechmann, o primeiro estudo relatado na literatura para obtenção de triazóis a partir de carboidratos foi idealizada com base em estudos do químico alemão Hermann Emil Fischer na preparação de diversas fenil-osazonas para elucidação da configuração relativa dos monossacarídeos (FISCHER, 1889). Esse trabalho desenvolvido por Fischer com carboidratos na obtenção de triazóis rendeu-lhe o prêmio Nobel de Química em 1901 (MELO *et al.*, 2006). A reação envolve um carboidrato na presença de derivados de hidrazina, e é catalisada por cobre. A **Figura 14**, (p.16) apresenta o mecanismo da reação da glicose **(1)** na presença de fenilhidrazina (EL ASHRY *et al.*, 1999). Inicialmente há a formação de um intermediário 1,2-bis-hidrazona **(2)**, que em seguida reage com o sulfato de cobre formando um complexo osazona-Cu(II), o qual ocorre redução, fornecendo como produtos osotriazol **(3)**, anilina, osazona e cobre metálico (EL ASHRY *et al.*, 1999).

Figura 14. Formação de triazóis a partir da oxidação de uma fenil-osazona.

A formação de fenil-osazonas, além de representar um teste químico para caracterizar monossacarídeo que contém apenas um aldeído por molécula (aldoses), constitui-se em processo industrial de fácil execução, baixo custo para produção de diversos derivados triazólicos para indústria agroquímica de desenvolvimento de pesticidas (EL KHADEM *et al.*, 1998).

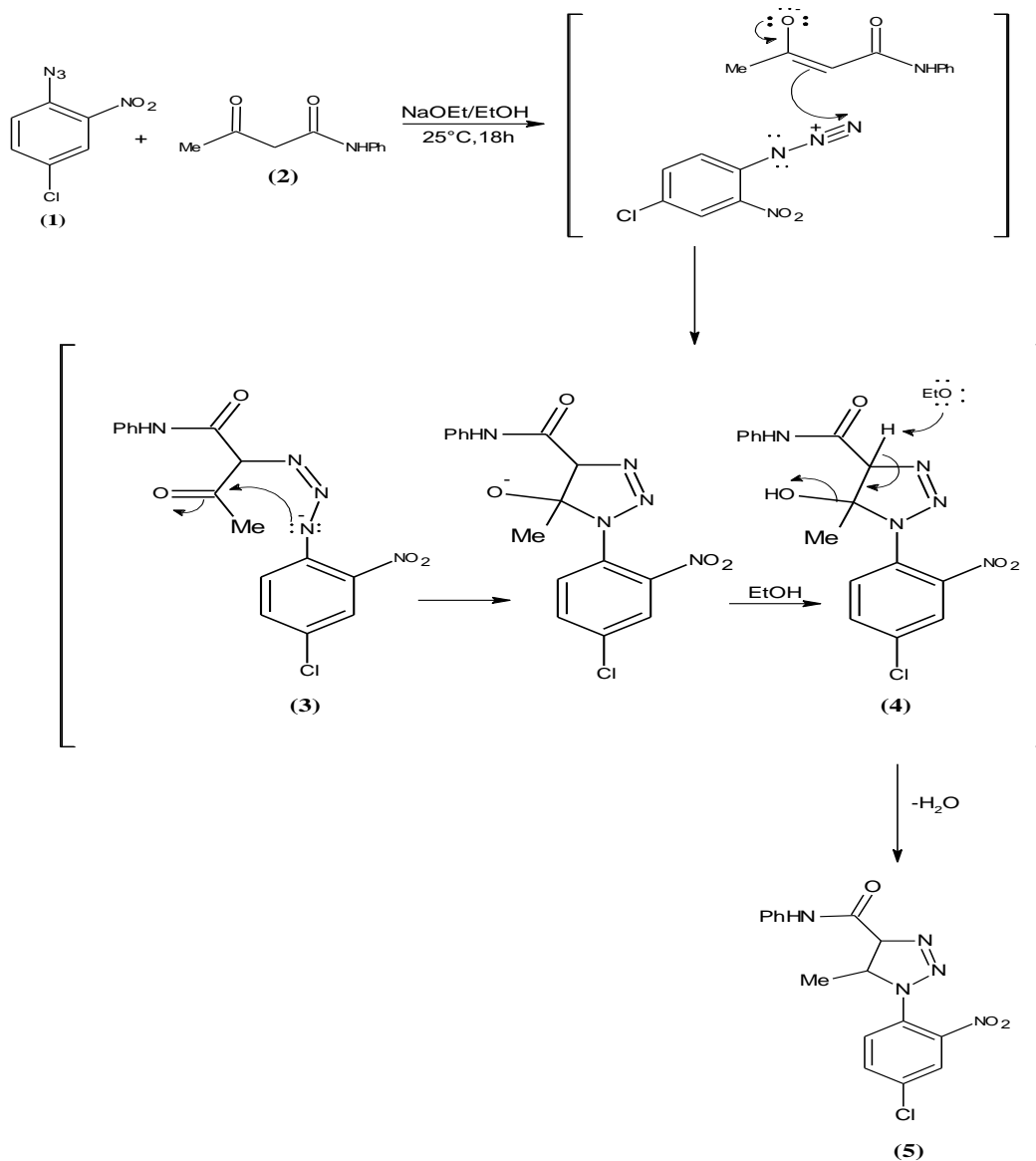
2.5.2 Adição de Enolato a Azidas

Dimroth mostrou que arilazidas reagem com substâncias contendo hidrogênios metilênicos ácidos (α -carbonílicos, ésteres malônicos, β -cetoésteres e β -dicetonas), adicionando diretamente três átomos de nitrogênio ao enolato (DIMROTH, 1904).

Um exemplo dessa reação está representado na **Figura 15**, (p.17). O composto 1,3-dicarbonilado (2) reage com aril azida (1) na presença da base forte como o etóxido

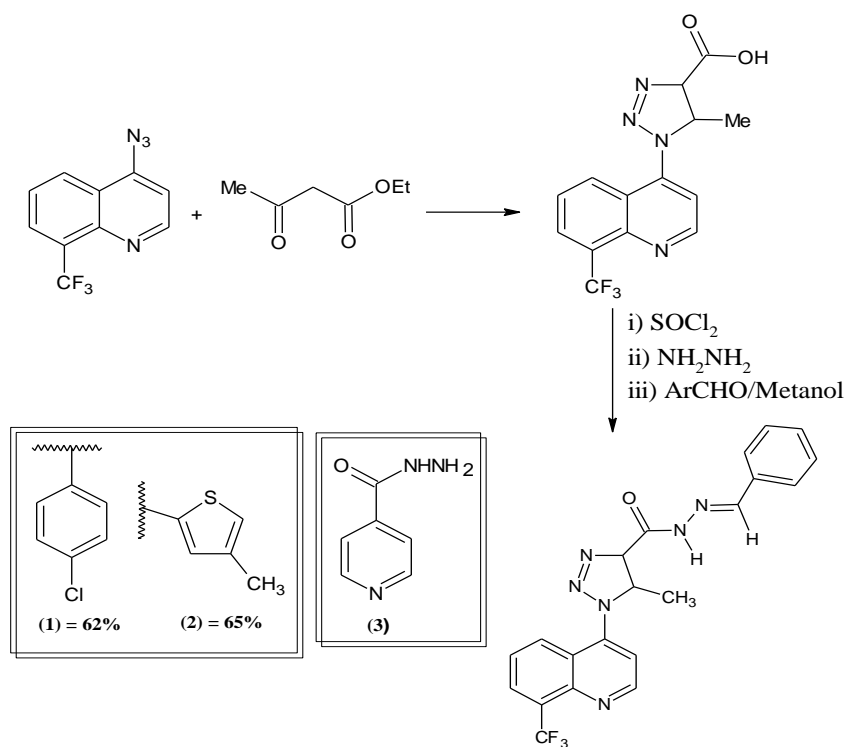
de sódio (NaOEt) formando os intermediários (**3 e 4**), que fornecerão o triazol (**5**) com um excelente rendimento de aproximadamente 80% (BIAGI, 1997).

Figura 15. Preparação do 1,2,3- triazol por adição a um enolato.



Recentemente, essa metodologia foi utilizada para preparação de quinolinas acopladas ao núcleo triazólico (HOLLA, 2005). A rota de preparação de quinolinas está representada na **Figura 16** (p.18). Neste trabalho os derivados quinolínicos (**1 e 2**) apresentaram elevada atividade tuberculostática *in vitro*, comparada ao fármaco comercial isoniazida® (**3**).

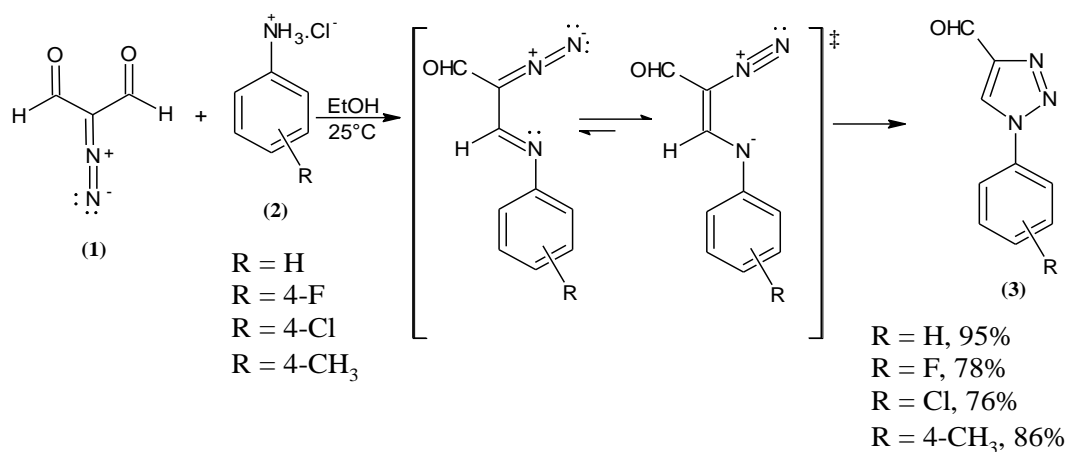
Figura 16. Rota de preparação de triazóis a partir de quinolinas e β -cetoésteres malônicos.



2.5.3 Reações do Tipo [2N+1N]

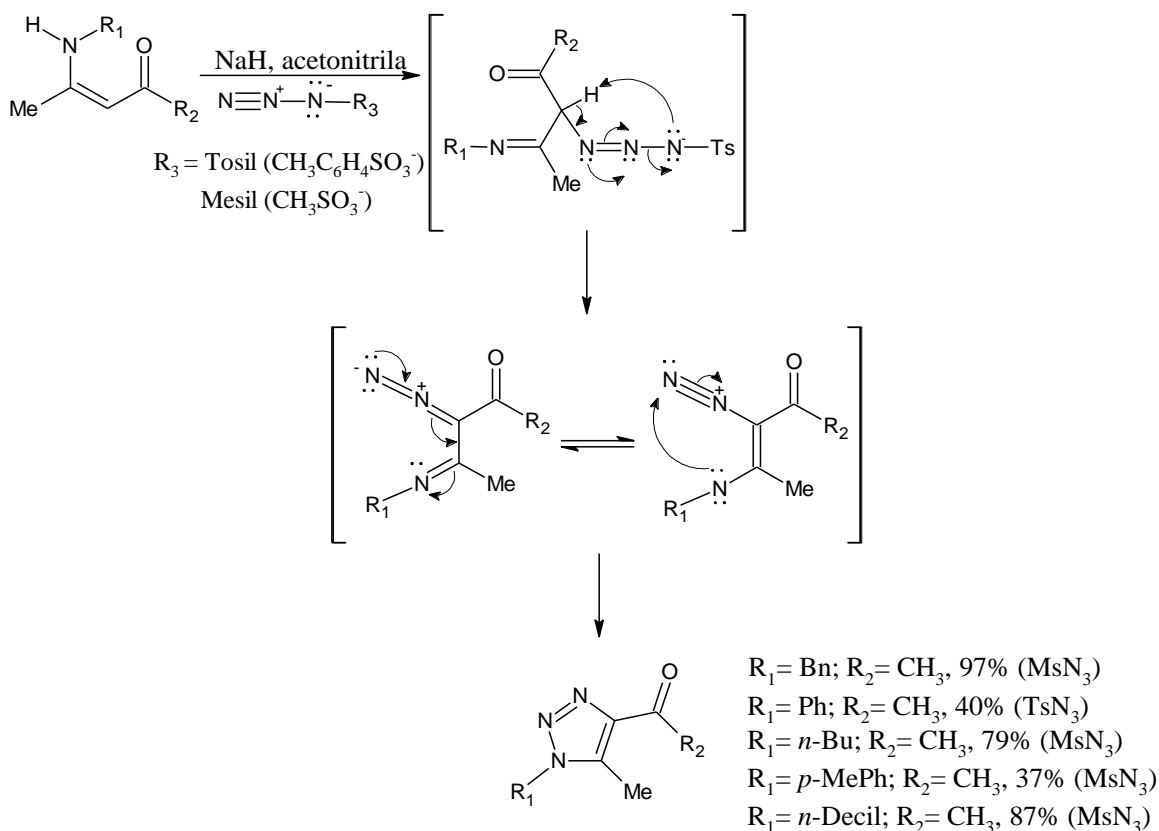
A primeira reação do tipo [2N+1N], descrita em 1973 por Arnold e colaboradores (ARNOLD *et al.*, 1973) envolve um composto α,α' -diazocarbonílico, o diazomalonaldeído e anilina ou cloridrato de anilina, levando à formação de 1,2,3-triazóis (Figura 17, p.19). Recentemente a reação foi realizada entre um diazomalonaldeído (1) com cloridratos de anilina adequadamente substituídos (2) em temperatura ambiente e *overnight*, apresentando maior rendimento quando o substituinte R é referente ao átomo de hidrogênio (COSTA, 2006).

Figura 17. Síntese de 1,2,3-triazóis a partir de diazomalonaldeído.



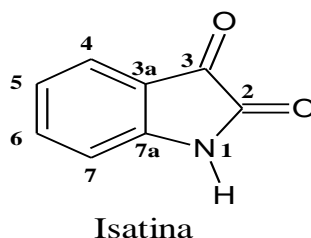
A metodologia [2N+1N] na reação entre enaminona e derivados diazo foi relatada por Ferreira e colaboradores para a síntese de 1,2,3-triazóis (FERREIRA *et al.*, 1997). Neste trabalho, o grupo diazo (2N) de tosilazida e mesilazida é transferido para uma enaminona (1N), previamente formada. O grupo mesilazida mostrou-se mais vantajoso para esta finalidade, por apresentar um baixo custo em sua preparação e o seu subproduto, a sulfonamida, ser facilmente removido da mistura reacional (**Figura 18**, p.20).

Figura 18. Preparação 1,2,3-triazóis a partir de enaminona por transferência de diazo com tosilazida e mesilazida.



Existem outros reagentes de transferência de derivados diazo que podem ser utilizados para a construção do anel triazólico, como por exemplo a isatina (**Figura 19**).

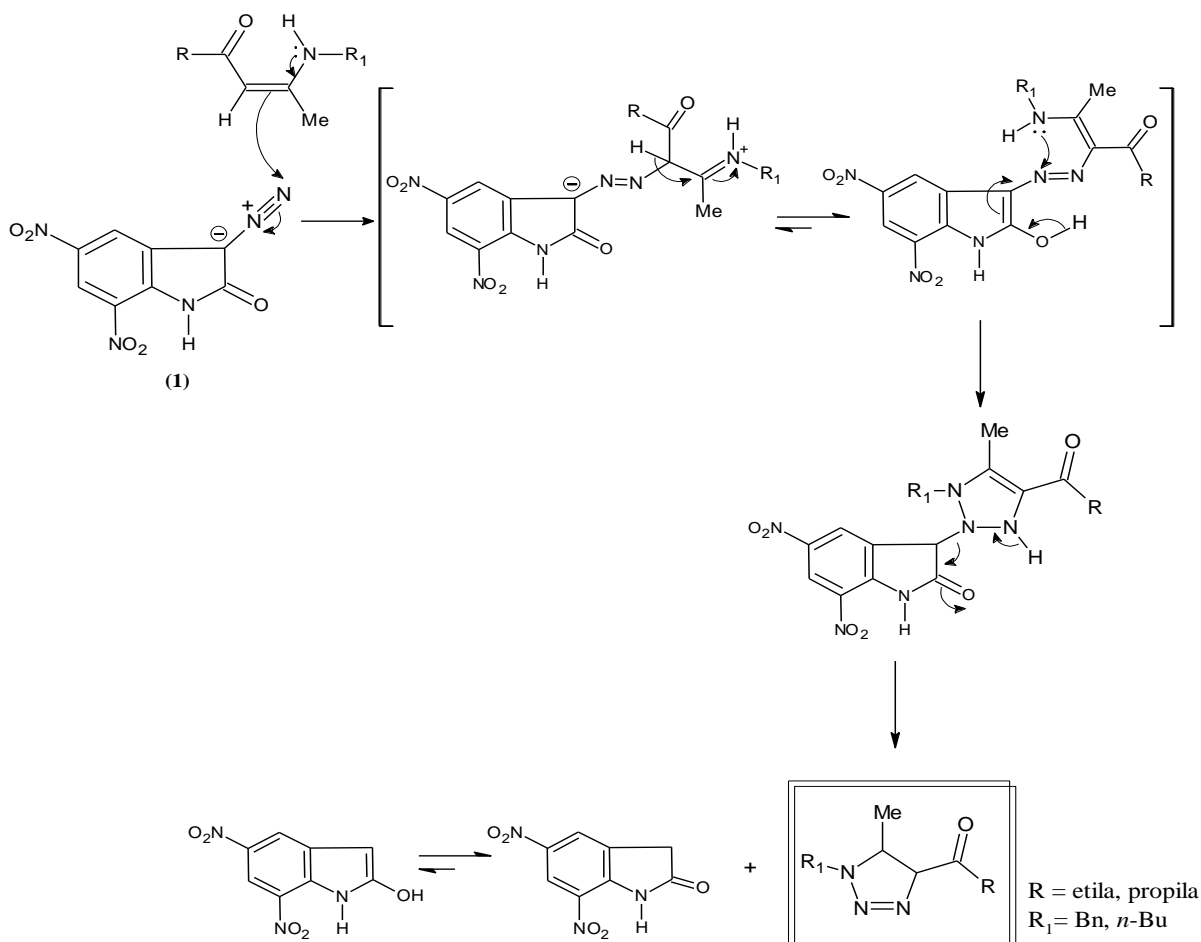
Figura 19. Estrutura química da isatina.



A molécula de isatina possui em seu núcleo indólico duas carbonilas vicinais de reatividade diferentes, uma cetônica [C-3] e outra amídica [C-2], um anel aromático que pode sofrer reação de substituição eletrofílica nas posições 5 e 7, além de um grupo NH passível de alquilação ou acilação, tornando esta substância um potencial alvo na

obtenção de substâncias bioativas (DA SILVA *et al.*, 2001). A **Figura 20**, por exemplo, envolve a preparação de 1,2,3-triazóis utilizando um diazo derivado da isatina (1) como reagente de transferência de grupo azido para obtenção de 1,2,3-triazóis (AUGUSTI, 1993).

Figura 20. Formação do sistema triazólico via transferência de diazo derivado da isatina.

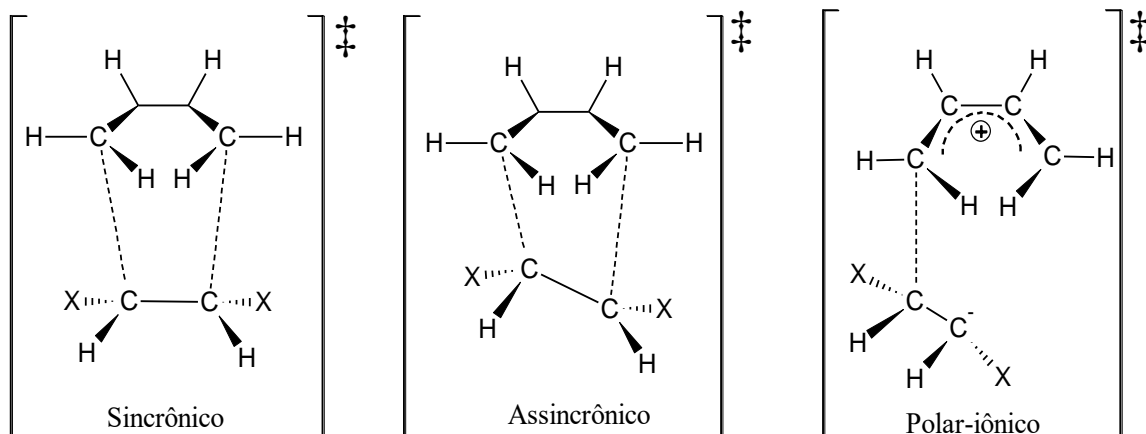


2.5.4 Cicloadição 1,3-Dipolar

Reações de cicloadição são aquelas que se procedem em uma única etapa, sem intermediários, por um único e exclusivo estado de transição (BROCKSOM *et al.*, 2010; HOWELL *et al.*, 2001). A reação de Diels-Alder é dita uma reação pericíclica (geometria cíclica no estado de transição) de cicloadição [4+2] entre um dieno conjugado com quatro elétrons π e um segundo componente alceno com dois elétrons π , chamado de dienófilo, em uma reação concertada (único estado de transição), mas provavelmente assincrônica, em uma relação suprafacial-suprafacial (BROCKSOM *et*

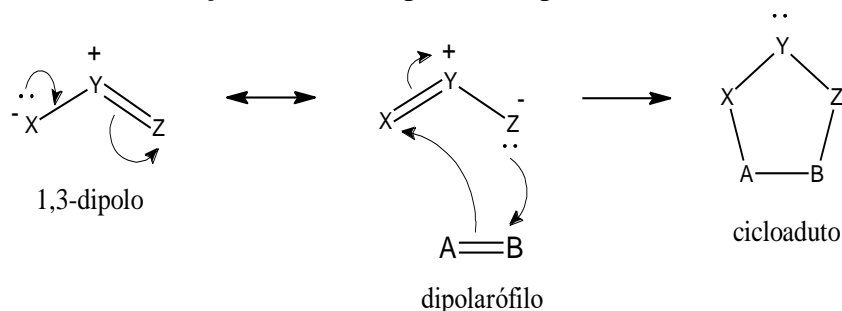
al., 2010). Entretanto, para algumas reações de cicloadição de Diels-Alder, em que o dieno e o dienófilo são fortemente polarizados, o mecanismo pode ser iônico e não pericíclico (**Figura 21**) (BROCKSON *et al.*, 2010).

Figura 21. Representação dos possíveis estados de transição para reação de cicloadição [4+2] Diels-Alder.



As reações de cicloadição 1,3-dipolar envolvem espécies 1,3-dipolares com sistemas de múltiplas ligações π (dipolarófilo) (PADWA, 1984). Desta forma, a cicloadição 1,3-dipolar é conhecida também como uma reação do tipo [3+2] por envolver 3 átomos da espécie 1,3-dipolar e 2 átomos do dipolarófilo que reagem entre si em um processo também concertado, envolvendo um estado de transição de seis elétrons, formando um cicloaduto (**Figura 22**) (GOTHELF, 1998).

Figura 22. Cicloadição entre 1,3-dipolo e o dipolarófilo formando um cicloaduto.

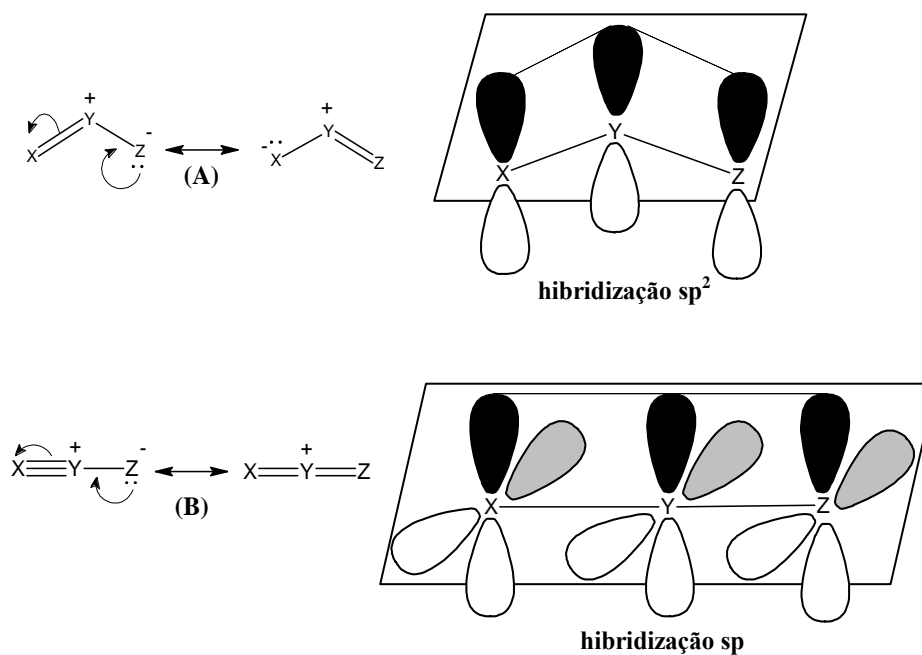


Na estrutura do 1,3-dipolo estão presentes quatro elétrons π distribuídos, através de seus orbitais p , por três átomos e apresentando estruturas de ressonância que indicam a localização da carga do dipolo (**Figura 23**, p.23). A classificação para os tipos de 1,3-dipolos pode ser dividida em duas estruturas isoeletrônicas: o ânion alil e o ânion propargil/alenil (GOTHELF, 1998). Ânions alílicos são caracterizados por apresentar

quatro elétrons π em três orbitais paralelos p_z perpendiculares ao plano do dipolo de geometria angular, cujo o átomo central, (**Figura 23A**), representado por **y**, pode ser nitrogênio, oxigênio ou enxofre, sendo que este possui hibridização sp^2 . (HOWELL, 2001).

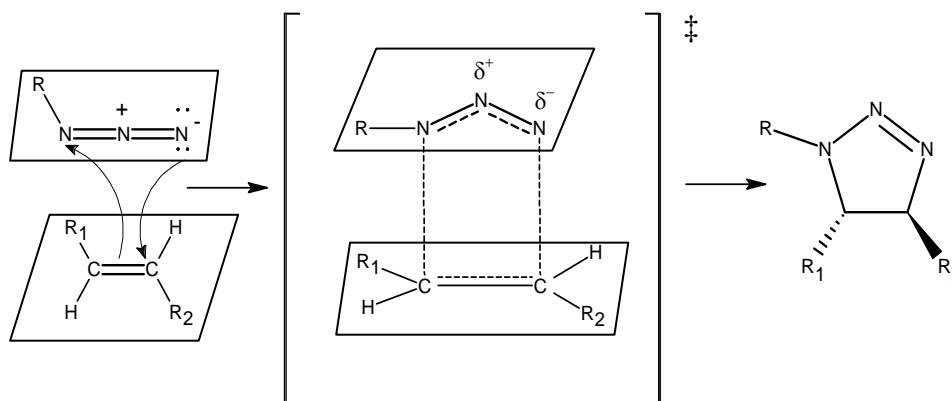
O ânion propargil/alenil abrange moléculas que apresentam um orbital π extra localizado no plano ortogonal ao orbital molecular (MO) no plano p_z . Assim sendo, em ânions propargil/alenil o átomo central (**Figura 23B**, representado por **y**) limita-se apenas ao átomo de nitrogênio, com hibridização sp e que confere uma geometria linear e esses ânions (GOTHELF, 1998).

Figura 23. Estruturas de ressonância e os orbitais paralelos p_z representado em preto nas espécies 1,3-dipolar alil (A) e propargil/alenil (B) e orbital ortogonal em cinza referente ao ânion propargil/alenil.



As reações do tipo 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas e alcinos terminais têm sido intensamente estudadas, tornando-se um dos métodos mais versáteis para a obtenção 1,2,3-triazóis (ZENG *et al.*, 2012; PELLISSIER, 2007). Este processo ocorre por um mecanismo concertado como descrito por Huisgen (HUISGEN, 1968), onde os reagentes interagem em planos paralelos conforme ilustrado (**Figura 24**, p.24) para a reação entre um dipolarófilo (alceno) e uma azida dipolar ($R-N_3$).

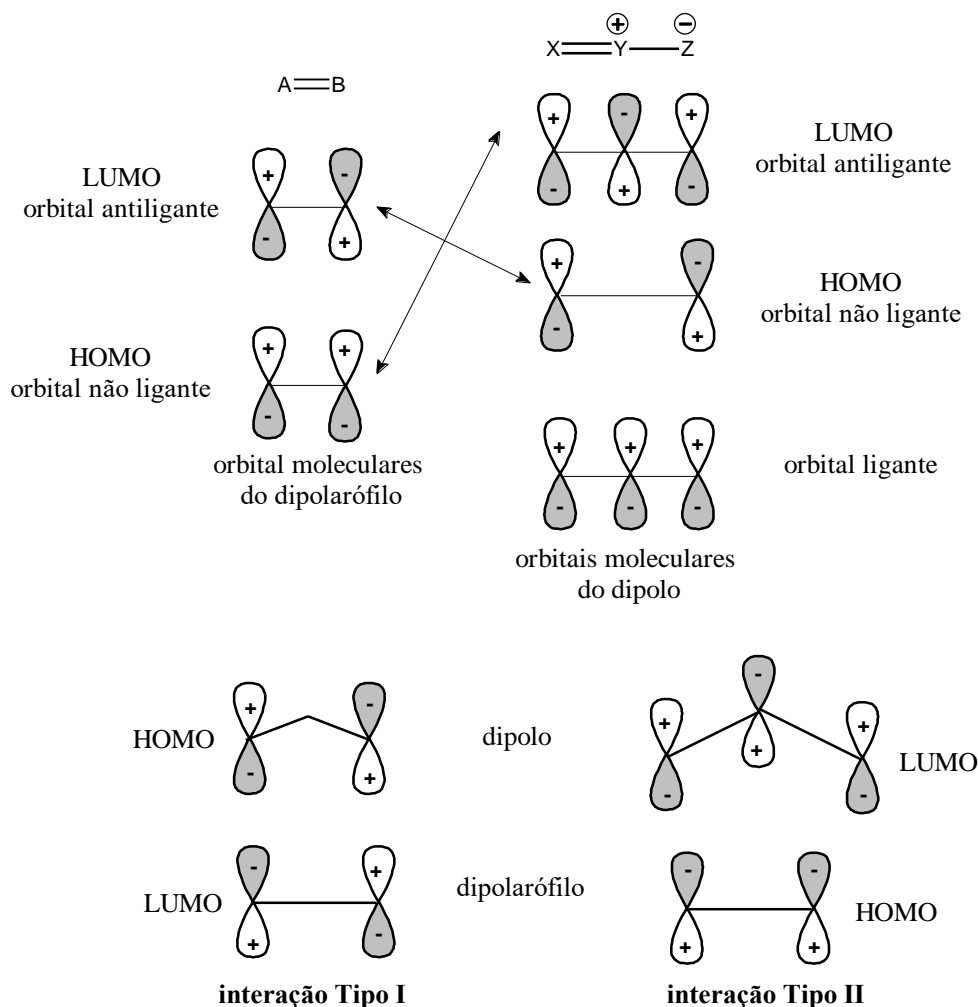
Figura 24. Cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas.



Sobre o mecanismo desta cicloadição 1,3-dipolar, vários dados experimentais são descritos na literatura, como a reversibilidade da adição, reação bimolecular com único estado de transição (velocidade dependente da concentração dipolarófilo e dipolo) e estereosseletividade nas adições a alquenos *cis* ou *trans* (PELLISSIER, 2007).

As interações entre os orbitais moleculares de fronteiras do dipolo e do dipolarófilo explicam as características descritas para as reações de cicloadição 1,3-dipolar. A teoria de orbital molecular de fronteira afirma que as interações mais importantes ocorrem entre o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) de um dos reagentes e o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) de outro reagente (HIMO, 2005). A maneira pela qual esses orbitais do dipolo e do dipolarófilo irão interagir dependerá da diferença de energia entre as possíveis combinações para os pares HOMO-LUMO das espécies envolvidas ($\text{HOMO}_{\text{dipolo}}\text{-LUMO}_{\text{dipolarófilo}}$; $\text{LUMO}_{\text{dipolo}}\text{-HOMO}_{\text{dipolarófilo}}$). A **Figura 25** (p.25), ilustra os orbitais de fronteiras e as possíveis interações entre dipolo e dipolarófilo em uma reação de cicloadição 1,3-dipolar.

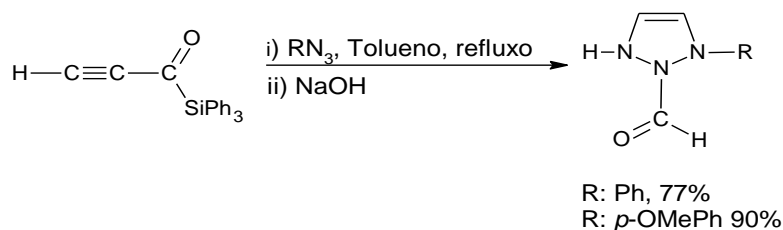
Figura 25. Orbitais de fronteira de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar. Extraída e adaptada (FLEMING, 2010).



A presença de grupos retiradores ou doadores de elétrons pode influenciar o predomínio de cada orbital molecular favorecendo o $LUMO_{\text{dipolarófilo}}$ e $HOMO_{\text{dipolo}}$, respectivamente. Em especial, a reação entre azida orgânica (1,3-dipolo) e um alcino terminal simétrico ou assimétrico (dipolarófilo) fornece [1,2,3]-triazóis (FLEMING, 2010; MELO *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 1999; GOTHELF, 1998).

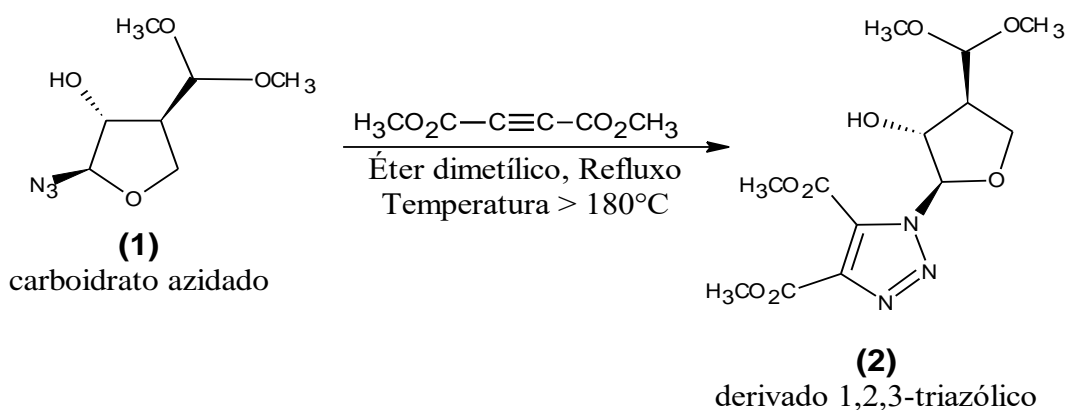
O uso de acetilenos simétricos é o ponto de partida para preparação de muitos outros derivados triazólicos (HUDSON, 1992). Normalmente, o derivado acetilênico simplesmente é aquecido juntamente com a azida, na presença ou ausência de solvente. As reações com acetilenos simétricos produzem apenas um isômero, em alto rendimento, em temperaturas acima de 180°C (ROMEIRO *et al.*, 1997). A reação de cicloadição 1,3-dipolar entre acilsilanos α,β -insaturados e azidas levou à obtenção de 1,2,3-triazóis apropriadamente funcionalizados, em bons rendimentos, conforme pode ser observado na reação apresentada na **Figura 26** (p.26) (ROMEIRO *et al.*, 1997).

Figura 26. Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre acilsilanos α,β insaturados.



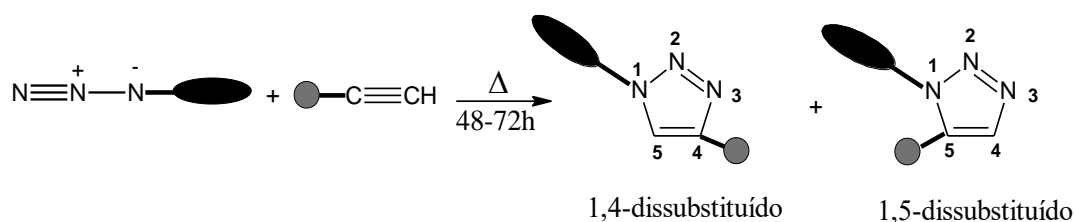
Outro exemplo recente sobre a utilização de acetiletos simétricos na construção do anel triazólico foi a preparação de pseudonucleosídeos com potencial atividade anti-HIV realizada diretamente sobre a azida como substituinte na cadeia do carboidrato no qual o grupo azida (**1**) encontra-se na posição anomérica do anel (**Figura 27**). As reações com acetilenos simétricos resultam apenas em um produto 1,2,3-triazólico (**2**) com rendimentos elevados (85%) (SHER *et al.*, 2007). As desvantagens nessa técnica estão associadas às altas temperaturas que exigem cuidados especiais na execução deste tipo de reação com vários casos de explosão relatados na literatura, além da variedades limitadas de alcinos simétricos disponíveis (PELLISSIER, 2007; MELO *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; DEGL'INNOCENTI *et al.*, 1995).

Figura 27. Preparação de pseudonucleosídeos derivados do sistema 1,2,3-triazólico.



O uso de um alcino assimétrico com azidas orgânicas exige aquecimento com um longo tempo (48-72 h) nas reações de cicloadição 1,3-dipolar levando à mistura de produtos isoméricos com uma regioseletividade baixa ou inexistente (HUDSON, 1992), resultando na formação de dois regioisômeros 1,4 e 1,5-dissubstituídos (**Figura 28**, p.27) (HOWELL, 2001).

Figura 28. Esquema da reação de cicloadição entre alcino não-simétrico e azida na formação de produtos 1,4 e 1,5-dissubstituídos.



A **Tabela 1** apresenta dados de rendimentos para a reação de cicloadição 1,3-dipolar empregando-se diferentes alcinos terminais e azidas orgânicas (HOWELL, 2001).

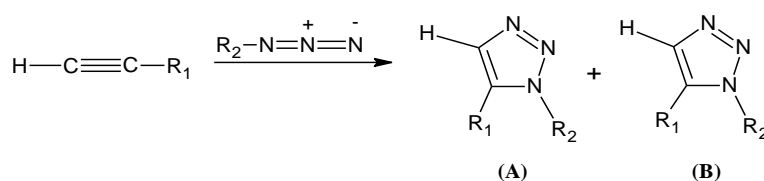
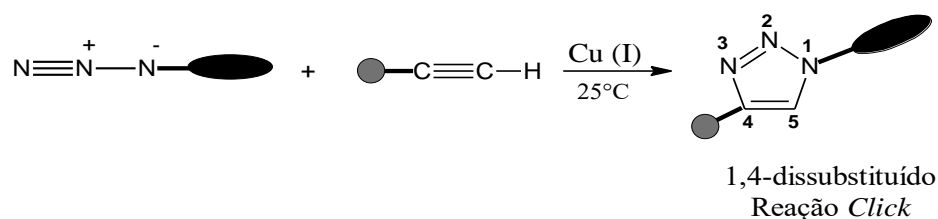


Tabela 1. Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre azida e diferentes acetilenos não-simétrico. Extraída e adaptada (SHARPLESS *et al.*, 2002)

Azida (R ₂)	Alquino (R ₁)	A %	B %
C ₅ H ₁₁ N ₃	Ph-C≡C-H	50	50
C ₅ H ₁₁ N ₃	H ₃ COOCH ₂ C-C≡C-H	30	70
PhN ₃	HOC-C≡C-H	75	25
PhN ₃	EtO-C≡C-H	13	87
TsN ₃	Ph ₂ N-C≡C-H	26	74

A baixa regioseletividade é devido à elevada energia de ativação (24-26 Kcal/mol) dessa reação associada à pequena diferença de energia dos orbitais de fronteiras HOMO dipolo e o LUMO dipolarófilo de alcinos assimétricos e azidas orgânicas (FLEMING, 2010; HOWELL, 2001). Para evitar este problema, foi desenvolvida uma reação catalisada por sais de cobre(I) (**Figura 29**, p.28) que une azidas orgânicas e alcinos terminais regioseletivamente para dar origem a 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos com velocidades e rendimentos relativamente superiores às cicloadições clássicas (SHARPLESS *et al.*, 2002).

Figura 29. Reação de cicloadição 1,3-dipolar por sais de cobre (I).



Sharpless e Meldal observaram que a catálise com cobre aumentava a velocidade da reação entre azidas e acetiletos terminais na ordem de 10^7 sem a necessidade de aquecimento com um tempo reacional muito menor em relação às cicloadições clássicas (MELDAL, 2008; SHARPLESS *et al.*, 2002). Além disso, a reação apresentava alta regioseletividade em condições mais brandas do que as desenvolvidas por Huisgen (WANG *et al.*, 2011; SHARPLESS *et al.*, 2002).

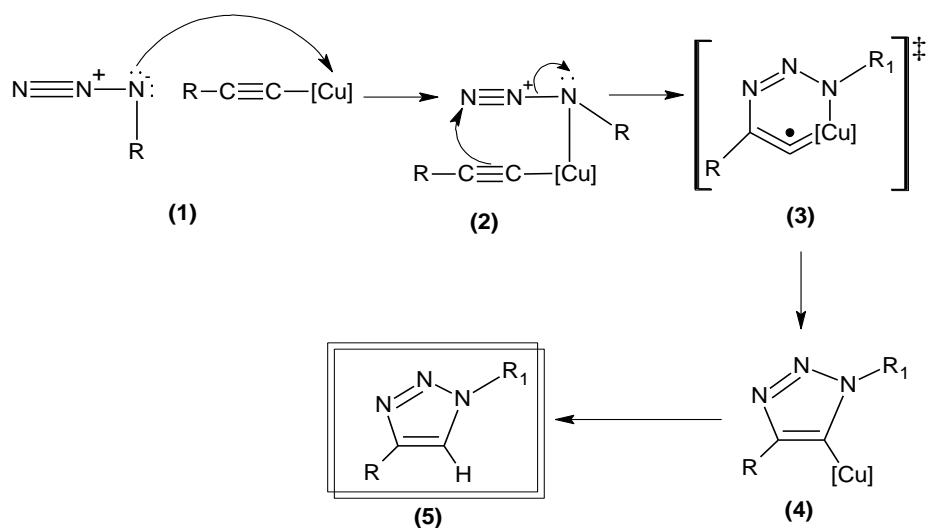
Essa metodologia de cicloadição alquino-azida catalisada por cobre (CUAAC) passou a ser amplamente utilizada nos grandes centros de pesquisas mundiais e é denominada como “*Click-Chemistry*” ou reação “*click*” (TOTOBENAZARA, 2015; WANG *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2006; MELDAL, 2008; SHARPLESS *et al.*, 2002).

2.6 Reação de cicloadição 1,3 dipolar catalisa por cobre (Reação *Click*)

Para ser caracterizada como “*click*” a reação deve ser rápida, estereoespecífica, não necessariamente enantiosseletiva, e caso ocorra formação de algum sub-produto, que estes possam ser removidos preferencialmente sem uso de cromatografia a fim de obter um único produto (FREITAS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; SHARPLESS *et al.*, 2005; SHARPLESS *et al.*, 2002).

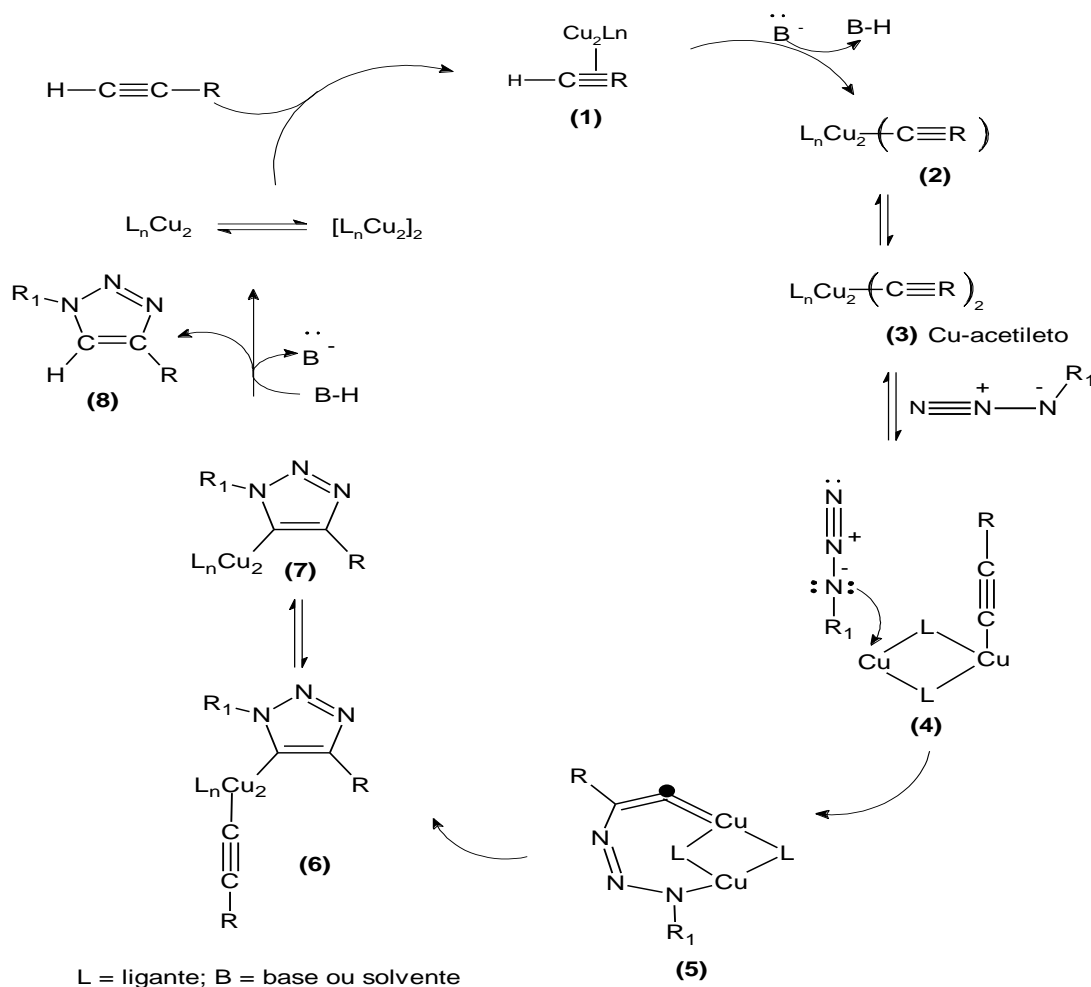
O primeiro estudo envolvendo aspectos mecanísticos sobre a reação *click* com a presença de cobre como catalisador foi na reação térmica de Huisgen para formação de 1,2,3-triazóis entre o propino e azida de metila como demonstrado na **Figura 30** (p.29) (SHARPLESS *et al.*, 2005). A presença de cobre, no entanto, transforma o mecanismo concertado em uma sequência de rápidas etapas envolvendo intermediários polares cujas estruturas definem a regioespecificidade da reação (HEIN, 2010).

Figura 30. Primeiro ciclo catalítico para a reação de cicloadição catalisada por cobre.



A presença de Cu(I) leva a formação inicial do acetileno do metal (1), que em seguida ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio sp^3 da azida, resultando na formação do intermediário (2). A ciclização ocorre devido ao ataque dos elétrons π do carbono β -vinilidênico do acetileno de Cu(I) ao nitrogênio eletrofílico terminal do grupo azida, com formação da primeira ligação carbono-nitrogênio e obtenção do metalociclo instável (3). Apesar de intrigante, as primeiras propostas mecanísticas envolvendo intermediários de cobre mononucleares defendem a existência deste metalociclo pouco comum (FOKIN *et al.*, 2013). A contração do anel resulta na formação do do triazolila de cobre (4), que após protonólise regenera a espécie catalítica inicial e determina a formação do 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (5). Embora este mecanismo simplificado esclareça as etapas elementares envolvendo formação e quebra de ligações, inúmeras considerações teóricas e experimentais obtidas até o momento discutem uma maior complexidade para esta reação envolvendo intermediários de cobre, pois este metal pode formar complexos polinucleares, bem como apresentar uma grande facilidade de troca de ligantes (HEIN, 2010; ARAGÃO *et al.*, 2010; MELDAL *et al.*, 2008; LUNDERBERG *et al.*, 2008;). Uma proposta mais detalhada e aceita atualmente está representada no ciclo catalítico da **Figura 31** (p.30).

Figura 31. Mecanismo proposto para reação CuAAC envolvendo dois centros metálicos no estado de transição. Extraída e adaptada (FOKIN *et al.*, 2013).



Estudos teóricos indicam que a complexação π entre o Cu(I) e o alcino terminal diminui o pK_a do hidrogênio acetilênico da ordem 10 unidades, o que possibilita a desprotonação em um sistema aquoso sem a necessidade de adicionar base forte (SHARPLESS *et al.*, 2005), facilitando assim a formação do acetileto de cobre (2 e 3). Existem várias discussões sobre a natureza deste intermediário e algumas evidências apontam estruturas contendo dois centros metálicos, um ou dois alcinos ligantes e outros ligantes mais lábeis que competem com a ligação com a azida (BOCK, 2006). Como citado anteriormente, após a formação do acetileto de cobre (2 e 3) ocorre a complexação com a azida, resultando no complexo azida-acetileto (4). Neste intermediário o cobre tem um efeito sinérgico nos sítios reativos, elevando o caráter eletrofílico do nitrogênio terminal da azida e o caráter nucleofílico do carbono β -vinilidênico, o que favorece a formação do metalociclo (5). Esta etapa é endotérmica e a responsável pela regioespecificidade da reação. A energia de ativação (E_{at}) calculada é

de aproximadamente 15 kcal mol^{-1} , menor do que a E_{at} para a reação não catalisada (cerca de 26 kcal mol^{-1}), o que justifica o significativo aumento da velocidade da reação quando comparado ao processo térmico (FOKIN *et al.*, 2013; MELDAL, 2008; SHARPLESS *et al.*, 2005). Embora o metalociclo tenha sido proposto em vários trabalhos com apenas uma espécie metálica (ROSTOVTSEV *et al.*, 2002; TORNOE *et al.*, 2002), diversos pesquisadores sugerem que a ciclização ocorra com dois centros metálicos (**5**) (ARAGÃO *et al.*, 2010; BINDER, 2008; PUNNA *et al.*, 2005; RODIONOV *et al.*, 2005). Em seguida, ocorre a contração do anel por uma associação transanular do par de elétrons não ligantes do N-1 com o orbital antiligante de C-5 fornecendo o triazolila de cobre (**6-7**), o qual pode ser isolado quando estão presentes grupos protetores volumosos nos substratos (HEIN, 2010). Na última etapa do mecanismo ocorre a protonação do intermediário triazolila de cobre (**6-7**) com a formação do produto final (**8**) e regeneração do catalisador. A protonação pode ocorrer por meio da interação com uma base protonada ou com o próprio solvente, porém a presença de outros eletrófilos pode levar à formação de 1,2,3-triazóis-1,4,5-trissubstituídos (FOKIN *et al.*, 2013).

A maior dificuldade de estabelecer a estrutura exata dos intermediários de cobre nessa reação deve-se à grande labilidade em formar complexos polinucleares, devido à grande facilidade de troca de ligantes, e as espécies organocobre coexistirem em equilíbrios muito rápidos, o que dificulta a determinação precisa do mecanismo da reação (SOARES, 2013). Por outro lado, é bastante coerente dizer que dinâmica particular do cobre é a responsável pela grande adaptabilidade da reação *click* a diferentes meios e fontes catalíticas.

A reação de cicloadição azida-acetileno catalisada por cobre (CUAAC) foi iniciada por Sharpless, entretanto, também foi estudada paralelamente por Meldal (MELDAL, 2008), que empregou como fonte de Cu(I), sais de Cu(II) na presença de agentes redutores para formação da espécie catalítica *in situ* (FREITAS *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2010; MELDAL, 2008). Atualmente, a escolha da fonte de cobre é feita com base nas especificidades de cada reação e são inúmeras as combinações que podem ser encontradas na literatura (TOTOBENAZARA, 2015; HEIN, 2010). Alguns exemplos de diferentes fontes de cobre para a realização do cicloadição CuAAC estão apresentados na **Tabela 2** (p.32).

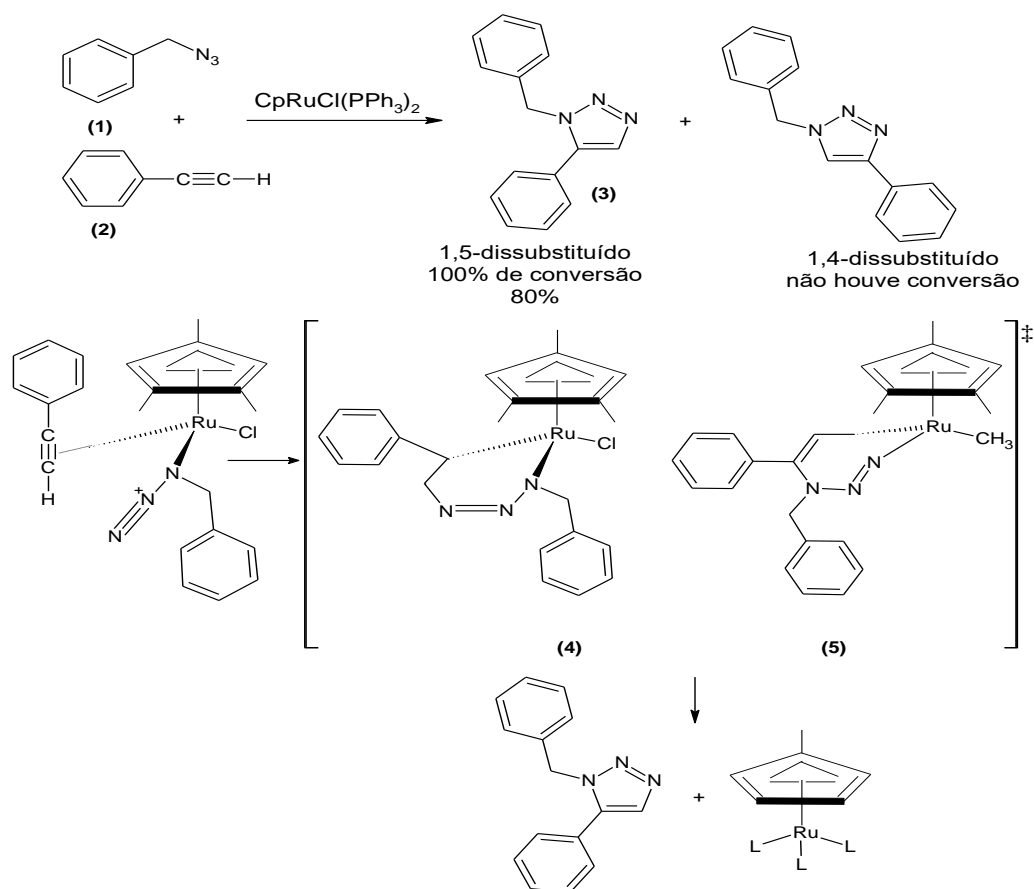
Tabela 2. Alguns exemplos de fontes catalítica de cobre para reação CuAAC. Extraída e adaptada (MELDAL, 2008)

Fonte metal	Redutor	Solvente	Base	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento (%)
CuI	Pd(OEt) ₃	água	DIPEA*	25	15-30	52-92
CuI	Pd(OEt) ₃	THF*	DIPEA*	25	16	75-99
CuSO ₄	Ascorbato de sódio	água/C ₄ H ₉ OH*	DIPEA*	25	12-24	82-94
CuSO ₄	Ascorbato de sódio	água/CH ₂ Cl ₂	DIPEA*	25	24	80-98
Cu(OAc) ₂	Ascorbato de sódio	C ₄ H ₉ OH*	DIPEA*	25	2	76-99
CuBr ₂	Ascorbato de sódio	DMSO*	C ₃ H ₉ N*	25	12	63-78
Cu(0)/Cu ₂ O	Ascorbato de sódio	tolueno	C ₃ H ₉ N*	25	2-4	87-95
CuOTf	N ₂	tolueno	C ₃ H ₉ N*	25	16	88-94
Cu/C	N ₂	tolueno	TEA*	60	2-4	92

C₃H₉N* = propilamina; C₄H₉OH* = álcool *terc*-butanol; DIPEA* = diisopropiletilamina; DMSO* = dimetilsulfóxido; TEA* = trietilolamina; THF* = tetrahydrofurano.

Além do cobre, outros metais já foram descritos como catalisadores para metodologia de síntese de triazóis. De forma similar, complexos de rutênio também catalisam este tipo de cicloadição, porém com regioseletividade oposta (FOKIN *et al.*, 2013; JOHANSSON *et al.*, 2011). Recentemente, a síntese do isômero 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituído de forma regioseletiva foi realizada a partir da reação entre benzilazida (**1**) e fenilacetileno (**2**) catalisada por sal de ciclopentadienila de rutênio CpRuCl(PP₃)₂ e forneceu o isômero 1,5-dissubstituído com 80% de rendimento (ZANG *et al.*, 2005). O mecanismo para formação de triazóis catalisado por rutênio(II) (**Figura 32**, p.33) ainda não está completamente elucidado, embora uma proposta para formação exclusiva do triazol 1,5-dissubstituído (**3**) indica a formação do complexo alcino-rutênio-azido (**4**) ou (**5**) (ZANG *et al.*, 2005).

Figura 32. Síntese de 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituído catalisado pelo complexo $\text{CpRuCl}(\text{PPh}_3)_2$. Extraído e adaptado (ZANG, 2005).



A reação *click* é uma importante ferramenta para a síntese e desenvolvimento de novos fármacos, pois possibilita modificações estruturais visando à melhoria das suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, podendo ainda funcionar como ligantes fazendo uma conexão entre duas ou mais substâncias de interesse (TOTOBENAZARA *et al.*, 2015; FOKIN *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2006).

Assim sendo, este trabalho propõe a obtenção de glicopeptídeo-triazóis via reação *click* adaptada ao método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), para obtenção de análogos glicosilados do peptídeo HSP-1, originalmente isolado da espécie *Hyla punctata* (PRATES *et al.*, 2004), com o objetivo de ampliar seu espectro de atividade biológica. A escolha do peptídeo HSP-1 deu-se a fatores como: moderada atividade antimicrobiana; cadeia peptídica linear composta por apenas 14 resíduos de aminoácidos e pela existência de dados conformacionais e estruturais já descritos na literatura (PRATES *et al.*, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do Peptídeo [PAG¹]HSP-1

Para a obtenção dos derivados de HSP-1 glicosilados, foi inicialmente proposta a síntese do peptídeo HSP-1 propargilado ([PAG¹]HSP-1), substituindo-se o resíduo de glicina da região *N*-terminal por um resíduo de propargilglicina. O peptídeo [PAG¹]HSP-1 apresenta em sua estrutura primária 14 resíduos de aminoácidos, cuja a sequência primária do peptídeo está apresentada na **Tabela 3**, no qual substituiu-se o resíduo de glicina da posição 1 (Gly-1) por um resíduo de propargilglicina (Pra-Gly-1).

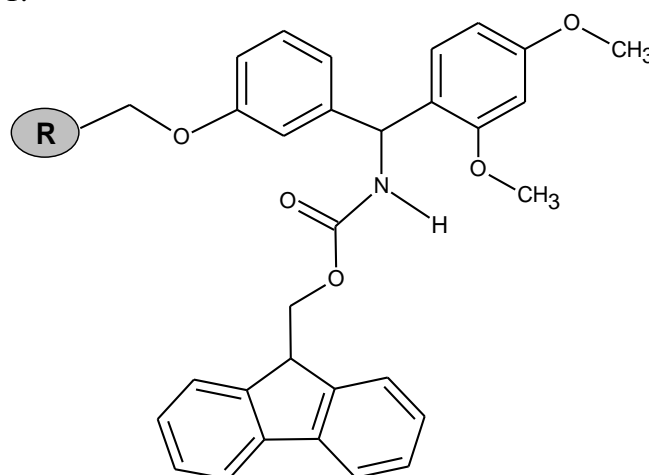
Tabela 3. Sequência primária para obtenção do peptídeo [PAG¹]HSP-1

Peptídeo	Sequência Primária de Aminoácidos
HSP-1	* GILDAIKAIKAAG -NH ₂

*resíduo de aminoácido a ser glicosilado destacado com asterisco e em negrito; NH₂ representa a amidação na região *C*-terminal do peptídeo.

O peptídeo [PAG¹]HSP-1 foi sintetizado manualmente, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida, via estratégia Fmoc (CHAN & WHITE, 2000). Foi empregada como suporte sólido a resina *Rink-Amide* fornecida pela *Iris Biotech* (Marktredwitz, Alemanha) com grau de substituição 0,63 mmol·g⁻¹ e que fornece, como produto final, o peptídeo amidado no grupamento *C*-terminal (**Figura 33**).

Figura 33. Estrutura química do suporte sólido (resina) utilizado para síntese do peptídeo [PAG¹]HSP-1.



Os derivados de aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo [PAG¹]HSP-1 foram: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys-(Boc)OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-PraGly-OH e suas estruturas encontram-se em **Anexo** (p. 87). Todos os aminoácidos foram obtidos da *Iris Biotech* (Marktredwitz, Alemanha). As pesagens foram feitas na balança analítica Shimadzu[®] ATX224 (Kyoto, Japão) com precisão de 0,0010 g.

As lavagens da resina após as etapas de acoplamento e desproteção, foram realizadas com *N,N'*-dimetilformamida (DMF) e álcool isopropílico (IPA), repetidas três vezes empregando-se os solventes alternadamente seguidas por uma lavagem final com diclorometano (DCM) conforme detalhado no **Quadro 1**. A agitação durante as etapas da síntese, tanto de [PAG¹]HSP-1 quanto à glicosilação, foi conduzida em aparelho Vórtex *Mixer Labnet International.Inc.* da marca Analítica[®] modelo VX-200 com velocidade 2000 RPM em modo contínuo.

Nas etapas de remoção do grupo Fmoc foram empregadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (30% v/v). O acompanhamento da síntese foi realizado após cada etapa de acoplamento e desproteção empregando-se o teste de *Kaiser*, também conhecido como teste de ninidrina. Esse teste é qualitativo e o resultado indica a presença de grupo amino primário livre (TROLL, 1953).

3.1.1 Preparação da Resina SPFS

Inicialmente foi pesada uma massa de 181 mg de resina *Rink-Amide* para obtenção de 150 mg do peptídeo bruto [PAG¹]HSP-1. Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido ao suporte polimérico, a resina foi previamente solvatada segundo o protocolo apresentado no **Quadro 1**.

Quadro 1. Protocolo para preparação da resina polimérica *Rink-amide*.

-
1. Transferir a resina pesada para um frasco de polipropileno adaptado com filtro poroso (seringa de 5 mL) para síntese do peptídeo;
 2. Adicionar quantidade de DCM suficiente para cobrir a resina (\approx 3 mL) no frasco;
 3. Deixar a resina em DCM por cerca de 10 minutos;
 4. Remover o DCM por filtração simples;
 5. Preencher o recipiente com DMF e, após 10 segundos, removê-lo por filtração;
 6. Repetir a etapa 5, porém com IPA;
 7. Repetir as etapas 5 e 6 mais duas vezes;
 8. Encerrar o processo com uma última lavagem com DCM.
-

A resina precisou ser previamente desprotegida para remoção do grupo protetor Fmoc, cujo o procedimento foi realizado empregando-se uma solução de 4-metilpiperidina (PIPE) em DMF 25% v/v, conforme descrito no **Quadro 2**.

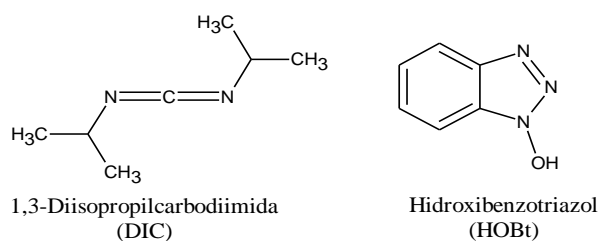
Quadro 2. Protocolo de remoção do grupo Fmoc.

1. Adicionar para a seringa de reação aproximadamente 2,5 mL de solução 25% (v/v) de PIPE em DMF;
2. Submeter o sistema à agitação por 5 min;
3. Remover a solução de PIPE do frasco de reação, por filtração;
4. Repetir as etapas 1, 2 e 3 duas vezes, com tempo de agitação de 10 min;
5. Preencher o recipiente com DMF e, após 10 segundos, removê-lo por filtração;
6. Repetir a etapa 5, porém com IPA;
7. Repetir as etapas 5 e 6 mais duas vezes;
8. Encerrar o processo com uma última lavagem com DCM;
9. Fazer o acompanhamento da desproteção com o teste de Kaiser.

3.1.2 Etapa de Acoplamento

A etapa de acoplamento consiste na formação de uma ligação amida e com a introdução de um novo resíduo de aminoácido ao peptídeo. Para isto, empregaram-se como agentes ativadores do grupo carboxila a 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC) e a 1-hidroxi-benzotriazola (HOBt) (**Figura 34**), solubilizados em uma mistura de DMF e DCM (1/1 v/v) para a formação de ésteres ativos a partir dos derivados de aminoácidos.

Figura 34. Estrutura química dos ativadores do grupo carboxila DIC e HOBt.



Os procedimentos experimentais desta etapa estão descritos no **Quadro 3**. A *N,N'*-dimetilformamida (DMF) empregada nas etapas de acoplamento foi destilada previamente a pressão reduzida (70°C), seguida por outra destilação fracionada.

Quadro 3. Relação entre os reagentes para etapa de acoplamento.

1. Pesar as quantidades de 3 eq Fmoc-Aminoácido e 3 eq HOBt e adicionar a um tubo Falcon de 50 mL;
2. Adicionar ao tubo Falcon 3 mL de DMF destilado até a total solubilização em seguida adicionar 3 eq Dic e homogeneizar;
3. Transferir a solução para um béquer de 50 mL;
4. Succionar a solução com a seringa de reação e deixar por 2,5 h em agitação constante no vórtex com velocidade de 2000 rpm.

Ao final dessa etapa, a solução contendo os ativadores foi removida por filtração simples. Em seguida, repetiram-se os itens **5**, **6**, **7** e **8** descritos no **Quadro 1** (p.35) para lavagem da resina e realizou-se o teste de *Kaiser* para acompanhamento da reação. Em caso de resultado negativo no teste, seguiu-se para a etapa de desproteção e, em seguida, para a etapa de acoplamento do próximo derivado de aminoácido.

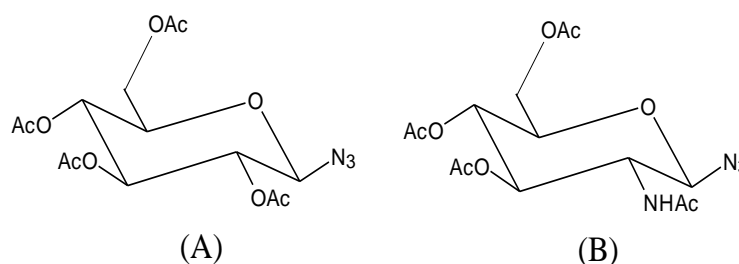
3.1.3 Etapa de Desproteção

Assim como a resina *Rink-amide*, todos os derivados de aminoácidos possuem os grupos α -amino devidamente protegidos com Fmoc, e após cada adição de um novo derivado de aminoácido da sequência primária, o peptídeo encontra-se novamente protegido no grupamento *N*-terminal. Da mesma forma que empregado para a resina, na remoção do grupo Fmoc dos derivados de aminoácidos repetiu-se o procedimento descrito no **Quadro 2** (p.36).

3.1.4 Glicosilação do Peptídeo [PAG¹]HSP-1

Após a desproteção do 13° resíduo Fmoc-Ile-OH da síntese, foi realizado o acoplamento do 14° resíduo de aminoácido substituindo-se o aminoácido original de glicina (Fmoc-Gly-OH) pelo derivado de propargilglicina (Fmoc-PraGly-OH) (**Anexo**, p.87). Após a inserção desse último resíduo de aminoácido, foram separados aproximadamente 15 mg da resina e transferidos para uma nova seringa de reação para realizar o procedimento de clivagem que será descrito no item **3.1.5** (p.39). O restante da resina foi utilizado para glicosilação do peptídeo HSP-1 propargilado [PAG¹]HSP-1 com os derivados azidos acetilados de glicose (2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -*D*-glicopiranosose) e *N*-acetilglicosamina (2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -*D*-glicopiranosose).

Figura 35. Estrutura dos derivados azido acetilado de glicose (A) (2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -*D*-glicopiranosose) e *N*-acetilglicosamina (B) (2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -*D*-glicopiranosose)



Os derivados azido foram cedidos pelo Prof. Ricardo José Alves, Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG, cujas sínteses estão descritas na literatura (FRANCO, 2015).

A nomenclatura adotada para os glicopeptídeo-triazóis seguiu as normas da *International Union of Pure and Applied Chemistry Joint Commission on Biochemical Nomenclature-IUPAC-JCBN* (IUPAC-JCBN, 1986). Na obtenção dos glicopeptídeo-triazóis derivados de glicose ([Glc-trz-G¹⁴]HSP-1) e *N*-acetilglicosamina ([GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1) ambos peracetilados, empregou-se 1 equivalente de peptídeo em mol, 1,8 equivalente do derivado azido em mol, 0,5 equivalente da fonte de cobre em mol e 0,6 equivalente de agente redutor em mol. Nesse trabalho, testaram-se duas fontes de cobre diferentes: (i) iodeto de cobre (I) (CuI) e (ii) sulfato de cobre (II) penta hidratado (CuSO₄.5H₂O) na presença do ascorbato de sódio como agente redutor. As glicosilações foram acompanhadas por análises cromatográficas em camada delgada (CCD) empregando-se sílica gel de granulação de 1,0 a 3,0 µm e solução eluente hexano/acetato de etila (40%/60% v/v) e revelados com iodo sólido.

Para a inserção dos derivados azido na peptidil-resina seguiu-se o protocolo do **Quadro 4 e 5** (p.39) com dois sistemas catalíticos de diferentes fontes de sais de cobre.

Quadro 4. Protocolo da reação *click* para os derivados azido acetilados catalisado por iodeto de cobre.

-
1. Transferir a quantidade pesada do peptidil-resina para um tubo de polipropileno adaptado com filtro poroso para filtração (seringa) de 3 mL;
 2. Pesar as quantidades de derivados azido e iodeto de cobre de acordo com as suas equivalências em mol. Transferir cada espécie para um tubo de porcelana separadamente;
 3. Solubilizar os derivados azido em 250 µL de THF e o iodeto de cobre em 100 µL de DIPEA;
 4. Adicionar primeiramente à seringa, contendo peptidil-resina, a solução de iodeto de cobre, deixando-se por último a solução de derivados azido;
 5. Submeter o sistema à agitação por no mínimo 48 h;
 6. Remover toda solução por filtração;
 7. Lavar a seringa de reação com uma solução de EDTA 5% por três vezes;
 8. Lavar com DMF, IPA e DCM uma vez.
-

Quadro 5. Protocolo da reação *click* para os derivados azido acetilados catalisado por sulfato de cobre penta hidratado na presença do agente redutor ascorbato de sódio.

1. Transferir a quantidade pesada do peptidil-resina para um tubo de polipropileno adaptado com filtro poroso para filtração (seringa) de 3 mL;
2. Pesar as quantidades de derivados azido, ascorbato de sódio e sulfato de cobre de acordo com as suas equivalências em mol. Transferir cada espécie para um tubo de porcelana separadamente;
3. Solubilizar os derivados azido em 250 μ L de THF e o ascorbato de sódio juntamente com o sulfato de cobre em 100 μ L de água Mili-Q[®] Ultrapura com resistividade de 18 M Ω a 25°C;
4. Adicionar primeiramente à seringa, contendo peptidil-resina, a solução de ascorbato de sódio, e em seguida a solução de sulfato de cobre penta hidratado, deixando-se por último a solução de derivados azido;
5. Submeter o sistema à agitação por no mínimo 48 h;
6. Remover toda solução por filtração;
7. Lavar a seringa de reação com uma solução de EDTA 5% por três vezes;
8. Lavar com DMF, IPA e DCM uma vez.

3.1.5 Reação de Clivagem

A reação de clivagem da peptidil-resina propargilado [PAG¹]HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 seguiu o protocolo apresentado no **Quadro 6** (p.40), com o emprego de solução de clivagem apropriada para a remoção simultânea do peptídeo da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais. A escolha da solução de clivagem e o tempo de reação dependem tanto da natureza química da resina, quanto da sequência peptídica. Grupos protetores de cadeias laterais diferentes requerem nucleófilos distintos para a neutralização dos carbocátions (terciários e secundários) gerados na clivagem, além de tempos reacionais também distintos para sua remoção completa (CHAN & WHITE, 2000). Assim sendo, de acordo com a sequência primária do peptídeo [PAG¹]HSP-1 e dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, foi estabelecida uma solução de clivagem contendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 4% de água Mili-Q[®] e 1% de triisopropilsilano (TIS) com tempo de reação de 1 hora e 20 minutos. A quantidade de peptidil-resina utilizada para clivagem foi de 15 mg e o volume total de solução de clivagem foi de 400 μ L. Após a clivagem obteve-se o peptídeo [PAG¹]HSP-1 e os glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 brutos e livres em solução.

Quadro 6. Protocolo de clivagem do peptídeo da resina sem a reação *click*.

1. Pesar a resina e transferir para um tubo de polipropileno (seringa) de 3mL;
2. Remover o grupo Fmoc (**Quadro 2**, p.36) e lavar a resina (**Quadro 1**, p.35) os itens **5, 6, 7 e 8**;
3. Secar a resina com fluxo de nitrogênio gasoso e adicionar uma solução de TFA (10-25 mL/g) contendo água Mili-Q® Ultrapura com resistividade de 18 MΩ a 25°C e TIS. Em seguida, submeter a mistura à agitação a temperatura ambiente por 1h e 20 min;
4. Remover a resina por filtração e lavar com 1mL TFA;
5. Remover o TFA do filtrado por aplicação de fluxo de nitrogênio gasoso e, então, adicionar cerca de 1 mL de éter diisopropílico previamente resfriado, para precipitação do peptídeo;
6. Remover o éter após centrifugação;
7. Repetir a etapa **5** (apenas adição do éter isopropílico) e **6** por mais quatro vezes;
8. Solubilizar o precipitado em água e liofilizar o peptídeo ao final.

3.2 Secagem das Amostras

Após a reação de clivagem das peptidil-resinas de [PAG¹]HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, as amostras já solubilizadas em água Mili-Q® Ultrapura com resistividade de 18 MΩ a 25°C, foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL e congelados em nitrogênio líquido e, em seguida foram liofilizadas no aparelho *Terroni*® (São Carlos, Brasil) modelo LS300 do Departamento de Farmácia Industrial da UFVJM com temperatura de trabalho de -57°C e com pressão de vácuo de 250 μHg.

3.3 Purificação do Peptídeo [PAG¹]HSP-1 e dos Glicopeptídeo-Triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 por CLAE-FR

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa CLAE-FR foi empregada para purificação do peptídeo [PAG¹]HSP-1 e dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1. Foram utilizados gradientes de dois eluentes: água ultrapurificada com resistividade de 18 MΩ a 25°C acidulada com 0,1% de TFA (Fase A) e acetonitrila grau UV/HPLC em TFA 0,08% (Fase B). Para a detecção, empregou-se detector de ultravioleta (UV) em $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 215 nm (210 - 215 nm - faixa de absorção do grupamento amido de ligações peptídicas). A purificação foi conduzida em escala semi-preparativa (injeção de 1 mL de amostra bruta a 1 mg.mL⁻¹ e fluxo de 2,5 mL.min⁻¹). A escala analítica (injeção de 20 μL de amostra bruta a 1 mg.mL⁻¹ e fluxo de

0,8 mL.min⁻¹) foi usada para a definição das condições da escala semi-preparativa. Todas as análises dos glicopeptídeos foram conduzidas à temperatura ambiente.

Na CLAE-FR foi utilizado o cromatógrafo *Varian* modelo *Pro Star* 315 (Walnut Creek, Estados Unidos) com detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star* 335, válvula de injeção marca *Rheodyne*, do Departamento de Química da FACET da UFVJM. Foram utilizadas as seguintes colunas: analítica *Vydac* C18 (250 x 4,6 mm), semi-preparativa *Waters mBondapakTM* C18 10mm 125 Å (7,8 X 300 mm) e *loops* de 20 µL e 1 mL, respectivamente. A água ultra-purificada foi obtida em aparelho da marca *Simplicity[®] UV Ultrapure (Type 1) Water* (Berlim, Alemanha) do Departamento de Química da FACET da UFVJM.

3.4 Análise por Espectrometria de Massa

O peptídeo [PAG¹]HSP-1 e os glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foram analisados por espectrometria de massa com ionização *electrospray* (ESI) e *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) em espectrômetros de massa LCMS-2020 da marca *Shimadzu Corporation Analytical & Measuring Instruments Division* do Departamento de Farmácia da UFVJM (Kyoto, Japão) e o MALDI-ToF/ToFMS (*Aplied Biosystem*, Estados Unidos) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, operando em modo positivo. Nas análises por ESI-Q-ToF as amostras foram diluídas em uma mistura de água ultra-purificada da marca *Gehaka* modelo *Master Systems P&D* e solução aquosa de acetonitrila (50% v/v), contendo 0,1% TFA e transferidas para uma seringa para injeção no equipamento a um fluxo de 2 µL.min⁻¹. Nas análises por MALDI-ToF/ToFMS as amostras diluídas em uma solução de ácido acético (0,1% v/v) e foram aplicadas juntamente com uma solução saturada de matriz do ácido α-ciano-4 hidroxicinâmico (CHCA) em uma placa de MALDI onde foram secas à temperatura ambiente.

3.5 Padronização das Soluções Estoque de HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1

As soluções de glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foram padronizadas para a obtenção dos estudos de interação com meios biomiméticos. Para isto, foi empregado o método empírico proposto por Murphy e Kies (MURPHY,

1960) para determinação teórica da absorptividade molar (ϵ) em λ 205 nm; λ 215 nm e λ 225 nm. O valor de ϵ é aplicado na lei de *Lambert-Beer* para determinação da concentração da amostra (Equação 1).

- Lei de *Lambert-Beer*

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

- Método de Murphy e Kie, envolvendo a Equação 2 a 4:

$$(A_{215} - A_{225}) \cdot 144 = k \quad (2)$$

$$(A_{205}) \cdot 31 = T \quad (3)$$

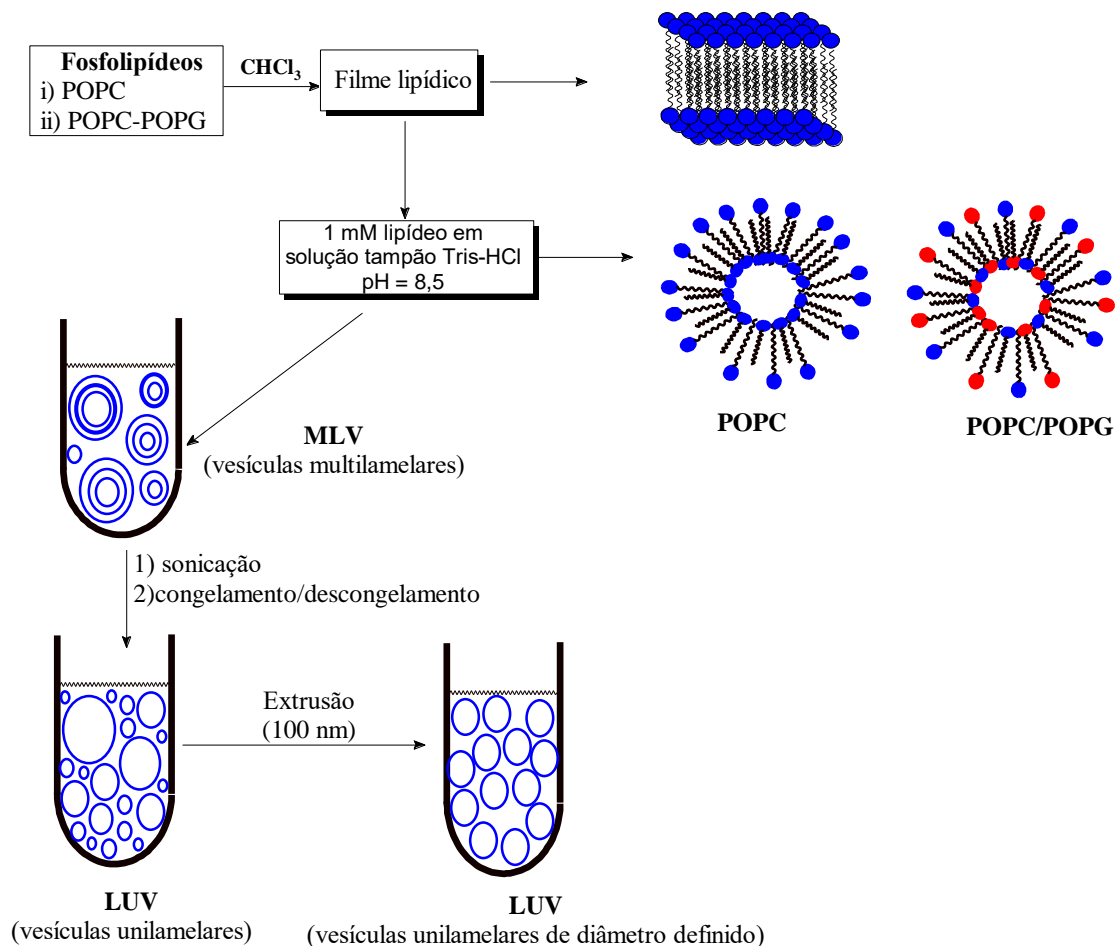
$$(k + T) / 2 = C \quad (4)$$

onde A é a absorvância da solução de peptídeo em λ 205 nm, λ 215 nm e λ 225 nm e C a concentração da amostra ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e b é o caminho ótico (1 cm).

3.6 Obtenção de Lipossomas

Os lipossomas foram preparados a partir de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG), ambos adquiridos da *Avanti[®] Polar Lipidics, Inc* (Alabaster, Estados Unidos) em solução tampão de Tris-HCl a $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8,5. Os lipossomas do tipo DRV “*Dehydration Rehydration Vesicles*”, de tamanho grande foram preparados de acordo com metodologia proposta por Kirby (KIRBY, 1984). Vesículas fosfolipídicas de POPC foram preparadas na concentração de 1 mM, enquanto, que vesículas de POPC/POPG na proporção de (3/1 mol/mol) foram preparadas na concentração de 1 mM ambas em volume total de solução tampão de 2 mL. A representação esquemática de todo o processo de preparação dos lipossomas está mostrada na **Figura 36** (p.43).

Figura 36. Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas. Extraída e adaptada (VERLY, 2010).



Em uma primeira etapa, um filme lipídico foi preparado por meio da solubilização dos lipídeos em clorofórmio e evaporação do solvente orgânico a 50°C , com auxílio de um evaporador rotatório (Labconco, Estados Unidos). O filme lipídico (bicamada fosfolípida) foi então hidratado com 2 mL de solução tampão de Tris-HCl (pH 8,5) para a formação de vesículas multilamelares (MLV's). Vesículas unilamelares grandes (LUVs) foram obtidas a partir de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho maria a 50°C por oito vezes das vesículas MLV's.

Vesículas unilamelares grandes (LUV's) de diâmetro definido (100 nm) foram obtidas por extrusão da suspensão de lipossoma do tipo DRV usando um extrusor *Avanti*[®] Polar Lipids, Inc. (Alabama, Estados Unidos). A extrusão foi realizada a

temperatura ambiente e com filtrações de membranas de policarbonato com poros de diâmetros de 100 nm da marca *Avanti*[®] *Polar Lipids, Inc.*

A qualidade das LUVs foi avaliada através da distribuição do tamanho das partículas por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e o efeito da estabilidade da dispersão coloidal por potencial zeta (ζ) empregando-se um analisador de partículas *Zetasizer nano ZS da Malvern modelo BI-900, Brookheaven* (Taiwan, China) do Departamento de Farmácia da UFVJM.

3.7 Medidas de Extravasamento de Carboxifluoresceína

3.7.1 Encapsulamento em Vesículas Unilamelares

Primeiramente foram preparadas as vesículas unilamelares pequenas (*SUV-Small Unilamellar Vesicles*) de POPC e POPC/POPG (3/1 mol/mol) na concentração de 5 mM de acordo com a metodologia descrita no item **3.6** (p.42), porém a hidratação foi realizada por uma solução tampão de Tris-HCl a 10 mmol.L⁻¹ em pH 8,5 contendo 5 mmol.L⁻¹ de carboxifluoresceína (CF) da marca *Sigma-Aldrich*[®].

A remoção da carboxifluoresceína livre presente na suspensão das LUV's foi realizada passando-se 1 mL da suspensão em uma coluna Sephadex[®]G25 (1,2 cm x 20 cm) da marca *Sigma-Aldrich*[®] com solução tampão de 10 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl contendo 100 mmol.L⁻¹ de NaCl em pH 8,5.

3.7.2 Preparação da Coluna Sephadex G25

Uma quantidade de 0,730 g de Sephadex[®] G25 e foi deixada por 24 horas sob agitação constante com barra magnética em um béquer de 10 mL (12 mL de tampão Tris-HCl a 10 mmol.L⁻¹ para cada 1 g de Sephadex[®] G25). A preparação da coluna Sephadex[®] G25 de 1,2 cm x 20 cm foi realizada transferindo-se a fase estacionária suspensa em tampão para uma seringa de penicilina de 5 mL, preenchendo-se com aproximadamente 2/5 do seu volume total.

3.7.3 Medidas de Extravasamento das LUV's-CF

Alíquotas de LUV's foram diluídas para 0,5 mM (volume total de 150 μL) e adicionadas aos poços de placas de Elisa estéril de poliestireno cristal transparente em fundo de 350 μL para fluorescência contendo 250 μL de solução total de análise. O aumento da fluorescência de CF em função do tempo a 25 °C foi medido continuamente no espectrofotômetro da marca *Spectra Max*[®] (Sunnyvale, Estados Unidos) do Departamento de Farmácia da UFVJM. Foram empregadas soluções estoques de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 a 0,076 mM com adição de volumes de 0, 25, 50, 75 e 100 μL . Ao final de cada experimento, a fluorescência total de CF foi determinada pela adição de solução 10% (m/v) de Triton X-100. A porcentagem de extravasamento de CF foi determinada utilizando a **Equação 5**, como descrito na literatura (ALVAREZ *et al.*, 2003).

$$\text{Vazamento (\%)} = \frac{I_{(t)} - I_0}{I_T - I_0} \cdot 100 \quad (5)$$

onde, $I_{(t)}$ é a intensidade de fluorescência no tempo (t), I_0 é a intensidade de fluorescência antes da adição dos glicopeptídeo-triazólicos e I_T é a intensidade de fluorescência após a adição de Triton X-100. A velocidade de liberação de CF, k_{obs} , foi calculada empregando-se ajuste exponencial dos dados de intensidade de fluorescência em função do tempo.

3.8 Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

O efeito dos glicopeptídeo-triazólicos no diâmetro e na carga de LUV's de POPC e POPC/POPG (3/1 mol/mol) foi avaliado por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ), em um analisador de partículas *Zetasizer nano ZS da Malvern* (Taiwan, China) no Departamento de Farmácia da UFVJM. Os experimentos foram realizados pela titulação de solução estoque dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 na concentração de 2 mmol.L⁻¹ com as LUV's de POPC na concentração de 1 mmol.L⁻¹ e POPC/POPG 1 mmol.L⁻¹ à temperatura ambiente com sucessivas injeções de 5 μL de solução estoque até atingir o valor máximo do índice de polidispersidade (PDI) de 0,3. Valores altos de índice de PDI (maiores que 0,3) indicam heterogeneidade populacional do diâmetro das partículas em

suspensão, podendo ser decorrente de agregação ou degradação das vesículas, enquanto que valores de PDI inferiores a 0,3 sugerem que a distribuição do diâmetro das partículas encontra-se em uma faixa populacional mais homogênea (MORA-HUERTAS *et al.*, 2009).

As soluções foram submetidas ao espalhamento de luz monocromática (10 mW Ne laser, λ 632,4 nm) e a intensidade de luz espalhada foi medida em um ângulo de espalhamento de 90°. As soluções de glicopeptídeos e lipossomas foram devidamente filtradas (filtros *Millipore* 0,45 μ m) para eliminar qualquer material particulado.

O efeito na carga e a estabilidade da dispersão coloidal de LUV's de POPC e POPC/POPG (3/1 mol/mol) com adição de glicopeptídeos foi avaliada por meio da mobilidade eletroforética usando *Zetasizer Nano ZS90* através de medidas do potencial zeta empregando-se faixa de medição entre 3,8 nm a 100 μ m de diâmetro com precisão 0,12 μ m.cm/Vs em temperatura de 25°C e fonte de luz He-Ne 633 nm de potência máxima 4 mW. As concentrações dos glicopeptídeo-triazólicos e as LUV's de POPC e POPC/POPG foram as mesmas descritas anteriormente para medidas espalhamento de luz dinâmico.

3.9 Experimentos de Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados utilizando-se um espectropolarímetro *Jasco* J-810, (Easton, Estados Unidos) acoplado a um sistema de controle de temperatura *Peltier* Jasco modelo PFD-425S, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os espectros foram obtidos a 25°C, na faixa λ de 190 a 260 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em oito varreduras para as vesículas POPC e POPC/POPG (3/1 mol/mol). Os glicopeptídeo-triazóis foram dissolvidos em água ultrapura com resistividade de 18 M Ω a 25°C, em uma solução estoque de 1 mg.mL⁻¹. Alíquotas de 15 μ L desse estoque foram usadas para obtenção do espectro, representando uma concentração de 0,05 mg.mL⁻¹ dos peptídeos. A concentração da solução estoque de POPC e POPC/POPG foi de 2 mM, entretanto, a concentração nas análises foi de 0,5 mM para ambos os meios e dos glicopeptídeos foi de 18 μ M.

3.10 Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados com o peptídeo HSP-1 em sua forma natural e comparada com os glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, respectivamente, a fim de verificar o efeito das alterações causados pela glicosilação em peptídeos naturais. Todos os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Análise Clínicas do Departamento de Farmácia da UFVJM.

3.10.1 Testes Antimicrobianos

A realização do teste antimicrobiano seguiu o método de referência dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico (NCCLS, 2003). Nesse teste utilizaram-se as cepas *Staphylococcus aureus* do fabricante *American Type Culture Collection* ATCC[®] 29313, *Streptococcus agalactiae* ATCC[®] 13813, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853[®] e *Escherichia coli* ATCC 25922[®].

As cepas foram selecionadas e isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura em placa de ágar. Tocou-se o topo de cada colônia com uma alça, transferindo-se os micro-organismos para um tubo contendo 4-5 mL de um meio de cultura adequado. Incubou-se a cultura em caldo *Mueller-Hinton*, a 35° C, até alcançar a turbidez de uma solução padrão *McFarland* de 0,5 (em geral, de duas a seis horas). Ajustou-se a turbidez da cultura em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão *McFarland* de 0,5, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de micro-organismos. Empregou-se um espectrômetro *Multileitora Spectramax Paradigm Molecular Devices*, (Sunnyvale, Estados Unidos) e as leituras foram realizadas em comprimento de onda λ 625 nm em placas de 96 poços estéril de poliestireno cristal transparente em fundo de 350 μ L. Utilizou-se um tubo de controle contendo caldo sem agente antimicrobiano para cada organismo testado.

As culturas foram incubadas por 12 horas na presença das amostras testadas (peptídeo HSP-1 e glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlyNAc-trz-G¹⁴]HSP-1) a 35°C e, como controle negativo, usou-se o fármaco cloranfenicol da marca *Sigma-Aldrich*[®] na concentração de 92,84 μ M. Todos os resultados foram

realizados em triplicatas e a concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pela menor concentração da substância testada que inibiu completamente o crescimento da cultura.

3.10.2 Teste Antifúngicos

A realização do teste antifúngico seguiu o método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica (NCCLS, 2002). Nesse teste utilizaram-se as cepas *Candida tropicalis* do fabricante *American Type Culture Collection* ATCC[®] 28707, *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 34135.

Para os testes de sensibilidade utilizou-se o meio sintético RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol). A solução tampão utilizada nesse teste foi o MOPS [ácido-3-(*N*-morfolino)propanosulfônico] (concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0).

A preparação dos inóculos, as cepas *C. tropicalis* ATCC[®] 28707, *Candida parapsilosis* ATCC[®] ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 34135 foram repicadas em tubos estéreis com ágar *Sabouraud* dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35 °C. O inóculo foi preparado escolhendo-se três colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm de cultura de 24 horas para espécies de *Candida* de 48 horas. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85 %). A suspensão resultante foi submetida a agitação em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro *Multileitora Spectramax Paradigm* (Molecular Devices), acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de *McFarland* 0,5 em comprimento de onda λ de 530 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. A suspensão de trabalho foi diluída 1:50 seguida de outra diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI-1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL em placas de 96 poços estéril de poliestireno cristal transparente em fundo de 350 μ L. As placas de culturas foram incubadas em 35°C por 48 horas na presença das amostras testadas em absorbância no comprimento de onda de 595 nm, e como controle utilizaram-se a anfotericina B *Sigma-Aldrich*[®] e 5-fluorocitosina *Sigma-Aldrich*[®]. O valor do MIC foi

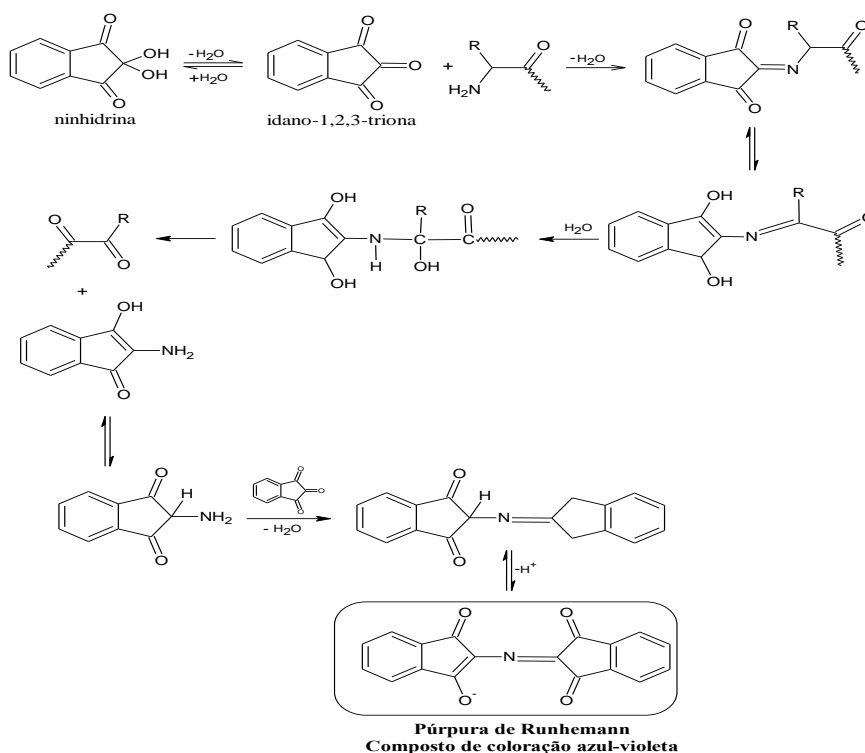
definido como a menor concentração em que se observa 50% da diminuição da turbidez do poço controle (isento de droga), e para realização do cálculo do MIC utilizou-se o *software Prism 5.0* com os testes realizados em triplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e Caracterização do Peptídeo [PAG¹]HSP-1

A síntese do peptídeo HSP-1 propargilado ([PAG¹]HSP-1) foi realizada manualmente empregando-se a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) via estratégia Fmoc, e após a obtenção da sequência primária desejada (**Tabela 3**, p.34) foi realizada a reação de cicloadição azida-acetileto catalisada por cobre (CuAAC) na peptidil-resina. Conforme descrito na metodologia, o acompanhamento da síntese de [PAG¹]HSP-1 foi realizado empregando-se o teste de *Kaiser* (TROLL, 1953) para detecção da presença de grupo amino livre do resíduo de aminoácido, o qual foi caracterizada pela coloração azulada da resina. A **Figura 37**, mostra as etapas da reação do grupo amino livre com a ninidrina resultando na formação da imina responsável pela coloração azulada identificada nos testes de *Kaiser*.

Figura 37. Reação de ninidrina para detecção de amina primário (Teste de Kaiser). Extraída e adaptada (VERLY, 2010).



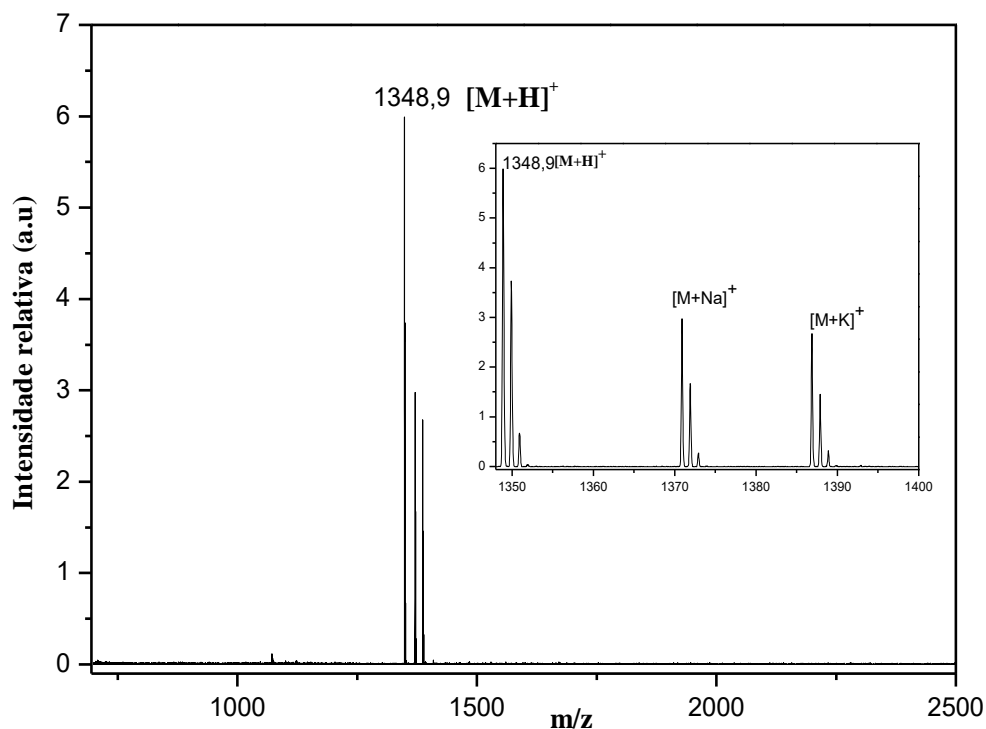
Dessa forma, ao final de cada etapa de acoplamento e também de desproteção do grupo amino (Positivo = indicativo da presença de grupo amino livre; Negativo = indicativo da ausência de grupo livre), foram realizados ensaios qualitativos cujos resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Dados do acompanhamento da síntese do peptídeo [PAG¹]HSP-1

Ordem de acoplamento	Derivado aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Gly-OH	4	3	Negativo	Positivo
2°	Fmoc-Ala-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
3°	Fmoc-Ala-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
4°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
5°	Fmoc-Ala-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
6°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
7°	Fmoc-Ala-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
8°	Fmoc-Lys(Boc)OH	3	2,5	Negativo	Positivo
9°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
10°	Fmoc-Ala-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
11°	Fmoc-Asp(OtBu)OH	3	2,5	Negativo	Positivo
12°	Fmoc-Leu-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
13°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	Negativo	Positivo
14°	Fmoc-Pra-Gly-OH	3	2,5	Negativo	-----

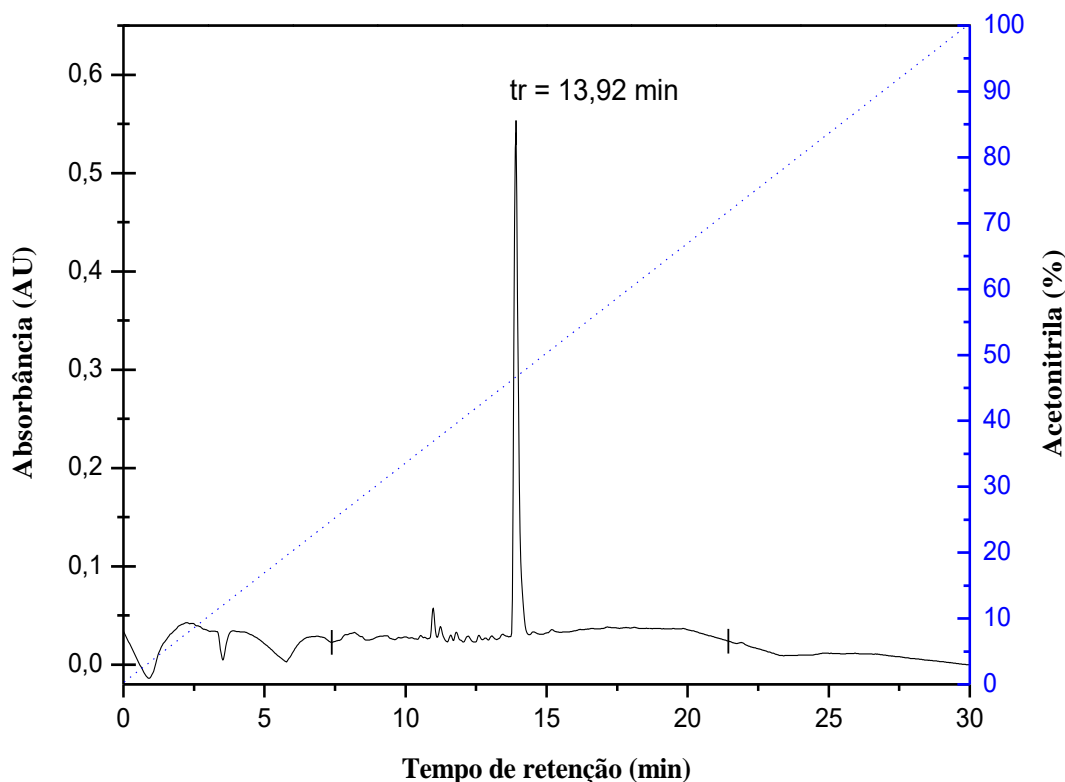
No primeiro acoplamento do derivado do resíduo de aminoácido, utilizou-se um excesso de 4 vezes em mol do aminoácido em relação aos ativadores e um tempo de reação superior em relação aos demais acoplamentos, Tais condições foram planejadas para garantir maior eficiência no acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido ao suporte polimérico (resina). Após a adição do último resíduo de aminoácido (Pra-Gly-OH) uma pequena quantidade de resina (aproximadamente 15 mg) foi separada e o peptídeo removido da fase sólida.

Uma amostra do produto bruto da síntese foi analisada por EM-MALDI-ToF e o resultado está apresentado na **Figura 38** (p.51) onde é possível observar a presença do pico devido a íons $[M+H]^+$ de m/z 1348,9 Da, correspondendo ao peptídeo HSP-1 propargilado protonado.

Figura 38. Espectro de Massa (EM-MALDI-ToF) do peptídeo [PAG¹]HSP-1 bruto.

A amostra bruta de [PAG¹]HSP-1 foi então analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FR) para verificar a qualidade da síntese. No perfil cromatográfico analítico de HSP-1 propargilado (**Figura 39**, p. 52) observa-se um pico proeminente correspondente a um produto com tempo de retenção (t_r) de 13,92 minutos, o qual foi recolhido e analisado posteriormente por espectrometria de massa e confirmou ser referente ao peptídeo [PAG¹]HSP-1.

Figura 39. Perfil de CLAE-FR do peptídeo [PAG¹]HSP-1 bruto. Amostra injetada (20 μL de amostra a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em coluna analítica C18 Vydac 218TP510 (250 x 4,6 mm) equilibrada com solução de TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1 % em fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A linha tracejada em azul representa a variação da concentração de acetonitrila em relação ao tempo em minutos. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 215 nm.



4.2 Síntese dos Glicopeptídeo-Triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 via Reação Click

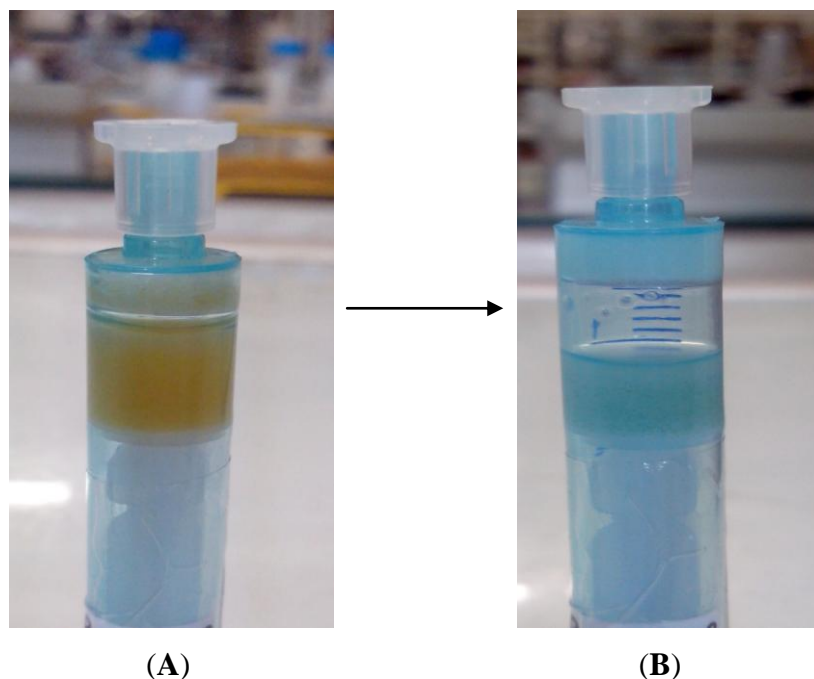
Após a confirmação da obtenção do peptídeo [PAG¹⁴]HSP-1 por espectrometria de massa, foi realizada a glicosilação da peptidil-resina no alcino terminal do resíduo de propargilglicina da região *N*-terminal, para as inserções dos derivados azido acetilados de glicose e *N*-acetilglicosamina. Esta etapa foi testada com dois sistemas catalíticos de diferentes fontes de sais de cobre via reação *click* para obtenção dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1.

O primeiro sistema catalítico testado na glicosilação do peptídeo [PAG¹]HSP-1 foi o iodeto de cobre (CuI) em diisopropiletilamina (DIPEA), o qual fornece diretamente para a reação a espécie catalítica Cu(I) sem a necessidade de agentes redutores (TOTOBENAZARA *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2010). No início da

reação a peptidil-resina apresentou coloração amarelada na solução devida à adição dos derivados azido acetilados de glicose e *N*-acetilglicosamina. O acompanhamento dessa etapa foi realizado por análises de cromatografia em camada delgada (CCD) com diferentes tempos reacionais, afim de monitorar o consumo dos derivados azido na reação. A primeira análise, realizada após 2 horas de reação, revelou que não houve consumo de açúcar do meio reacional e a peptidil-resina manteve sua coloração amarela. Após 4 horas de reação também não foi constatado nenhum consumo significativo do derivado azido no meio reacional. Mesmo após 24 horas de reação não foi detectado o consumo de derivado azido. Contudo, foi observada a formação de pequenos aglomerados no meio reacional de coloração azul escuro junto à peptidil-resina, podendo estar associada à formação de complexos estáveis de cobre (Cu_2I_3^- , Cu_4I_5^- , Cu_5I_6^- e Cu_6I_7^-) (FREITAS *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2010). Alguns fatores podem justificar a baixa atividade catalítica do iodeto de cobre na reação *click*, tais como, baixa solubilidade em meio aquoso (TORNOE *et al.*, 2002) e à grande facilidade de oxidação do Cu(I) a Cu(II) no decorrer da reação (ARAGÃO *et al.*, 2010; KOLB, 2003). Diante disso, foi empregado outro sistema catalítico na glicosilação do peptídeo [PAG¹]HSP-1 utilizando-se sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) na presença de ascorbato de sódio como agente redutor, conforme descrito no item **3.1.4**, (p.37).

No início da reação a peptidil-resina também apresentou coloração amarelada devido à presença dos derivados azido acetilados de glicose e *N*-acetilglicosamina no meio reacional (**Figura 40A**, p.54). Após 8 horas de reação foi possível verificar qualitativamente o consumo dos derivados azido no meio reacional. Passadas 30 horas, foi possível constatar a descoloração completa na peptidil-resina (**Figura 40B**, p.54), possivelmente devido ao consumo elevado dos derivados azido, o que foi confirmado pelas análises de CCD que não revelaram presença de açúcares no meio reacional.

Figura 40. Reação de acompanhamento da glicosilação do peptídeo [PAG¹]HSP-1 utilizando-se sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O) na presença de ascorbato de sódio como agente redutor. Início da reação *click* (A) e após 30h de reação (B).



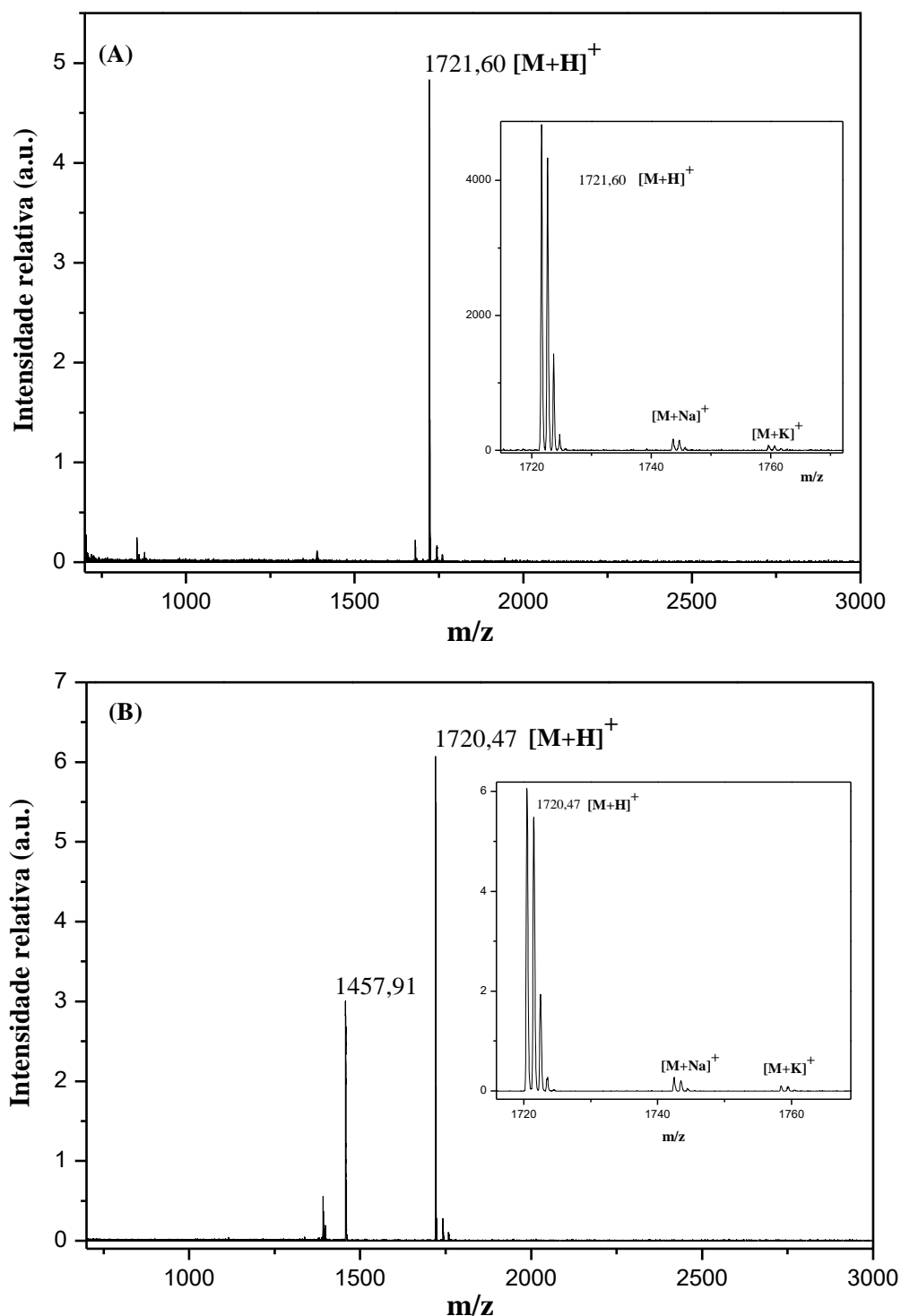
Para a confirmação da reação *click* entre o peptídeo [PAG¹]HSP-1 e os derivados azido acetilado (glicose e *N*-acetilglicosamina) mediada por sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O) na presença de ascorbato de sódio para obtenção de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foram realizadas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FR) e de espectrometria de massa (MALDI-ToF) conforme descritos no item a seguir.

4.3 Caracterização e Purificação dos Glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1

Após a etapa de adição dos derivados azido via reação *click*, a peptidil-resina contendo os glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foi submetida à etapa de clivagem fornecendo os glicopeptídeo-triazóis brutos, cujas amostras foram posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.

Na **Figura 41** (p.56), estão apresentados os espectros obtidos por EM-MALDI-ToF das amostras da síntese de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1. Na **Figura 41A** é possível observar a presença do pico devido ao íon [M+H]⁺ de m/z 1721,60 Da para o [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 acompanhado de seus adutos de sódio e potássio. Da mesma forma, na **Figura 41B** pode-se verificar a presença de um pico devido ao íon [M+H]⁺ 1720,47 Da que corresponde ao glicopeptídeo [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1. É possível também verificar outro íon [M+H]⁺ de massa 1457,91 Da devido a um subproduto da síntese ou mesmo contaminante presente na placa de MALDI.

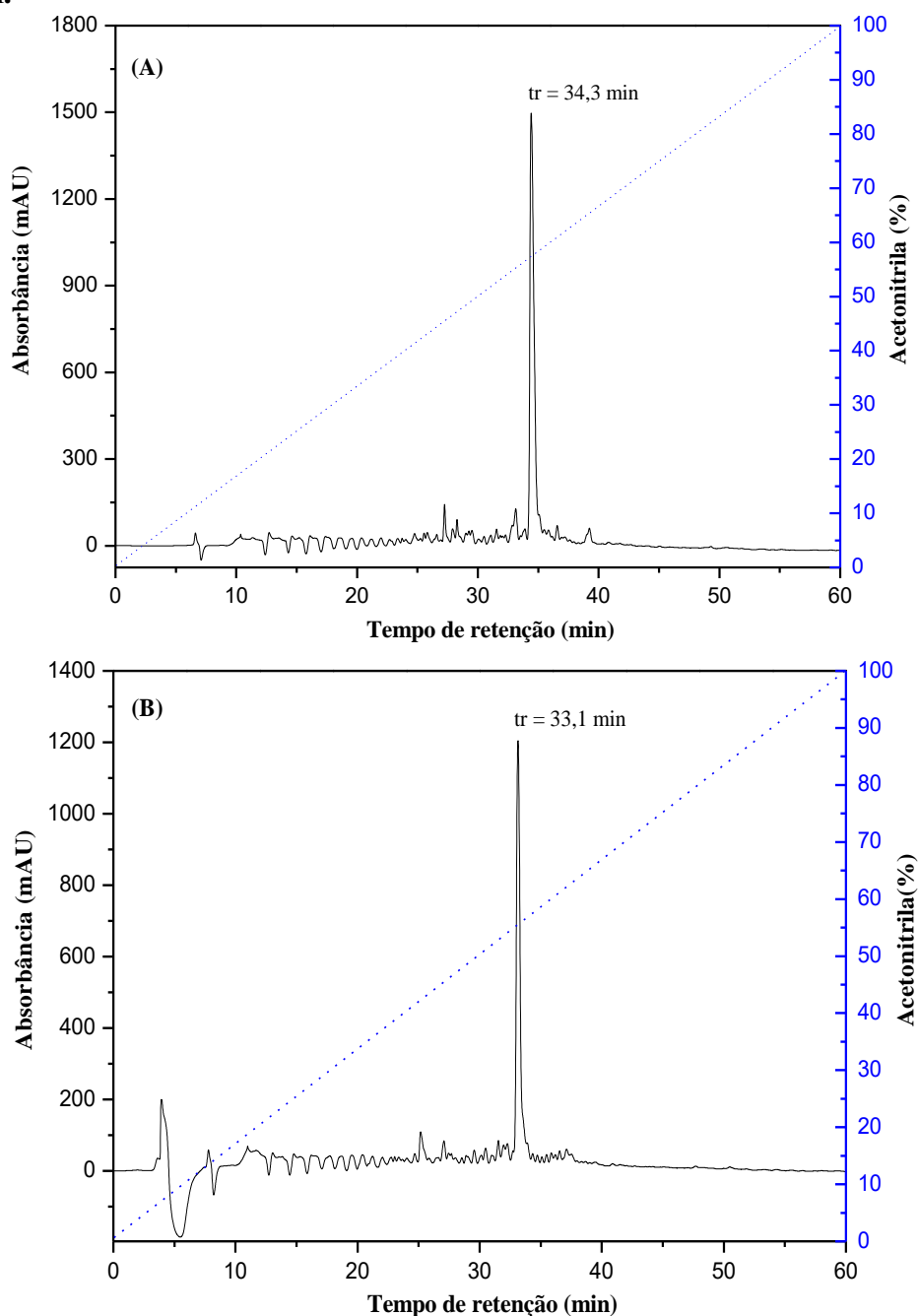
Figura 41. Espectros de Massa (EM-MALDI-ToF) dos glicopeptídeo-triazóis sintetizados brutos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 em (A) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em (B).



Após a confirmação da obtenção dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, as amostras brutas foram analisadas por CLAE-FR, afim de verificar a qualidade da síntese. Na **Figura 42** (p.57), estão apresentados, respectivamente, os perfis cromatográficos analíticos de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e

[GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, nos quais podem-se notar picos proeminentes correspondentes a produtos com o tempo de retenção (tr) de 34,3 minutos para o [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**Figura 42A**) e (tr) de 33,1 minutos referente ao [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**Figura 42B**).

Figura 42. Perfil de CLAE-FR dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**A**) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**B**). Amostra injetada (20 μ L de amostra bruta a 1 mg.mL⁻¹) em coluna analítica C18 Vydac 218TP510 (250 x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1%. Eluição: solução de Acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. A linha tracejada em azul representa a variação da concentração de acetonitrila em relação ao tempo em minutos. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 215 nm.

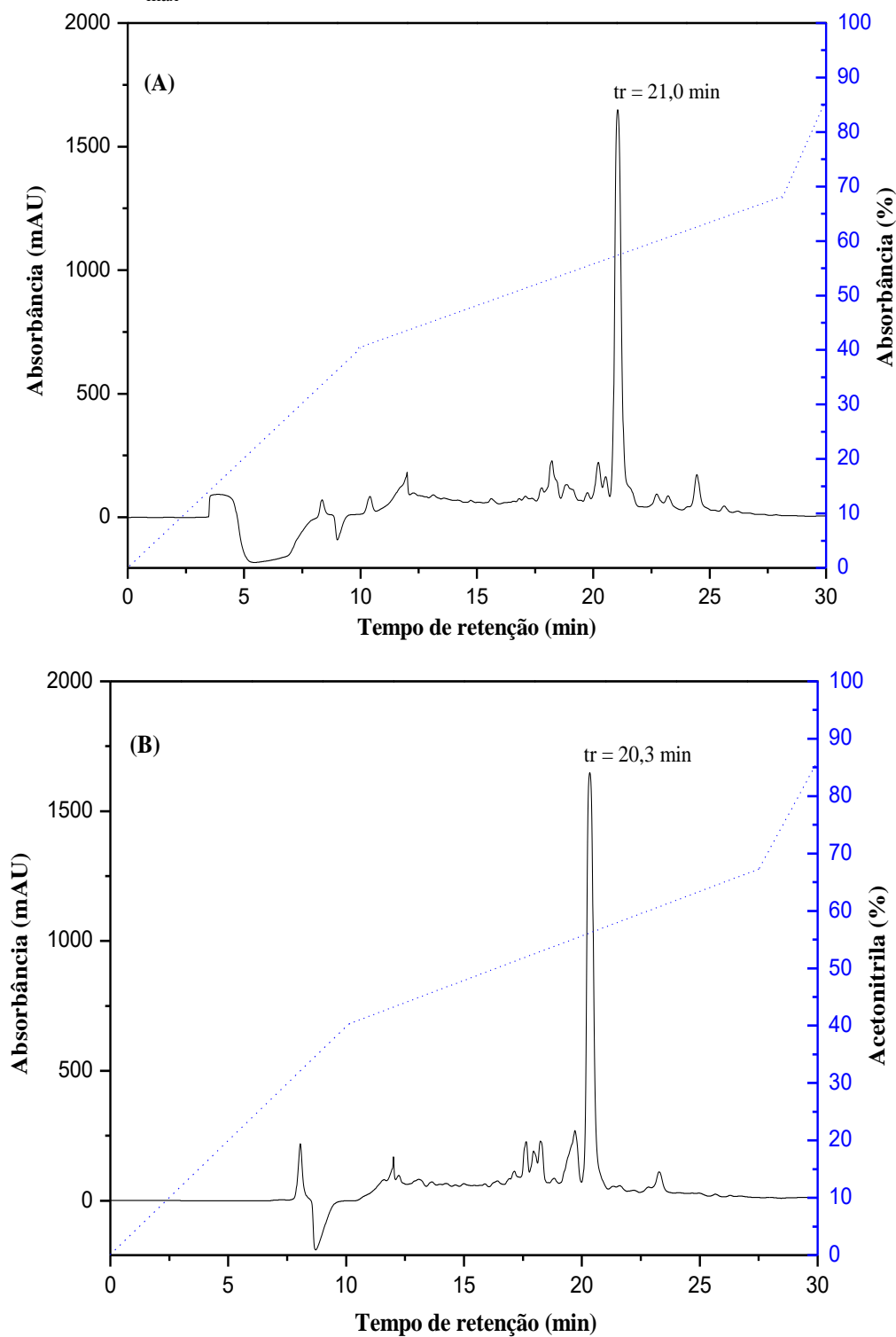


De acordo com as análises cromatográficas, é possível verificar que a reação de cicloadição 1,3 dipolar envolvendo o peptídeo HSP-1 propargilado ([PAG¹]HSP-1) com derivados azido acetilados (glicose e *N*-acetilglicosamina) na presença do sistema catalítico Cu(II)/ascorbato de sódio apresentou elevada regioseletividade, resultando na formação exclusiva dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 não sendo observadas formação significativa de outras glicofomas.

A alternativa do uso de sais estáveis de Cu(II) em relação as fontes de Cu(I) fornece algumas vantagens consideráveis, tais como, a não interferência do oxigênio atmosférico, a possibilidade de utilização de solução aquosa no meio reacional, uma vez que o sulfato de cobre e o ascorbato de sódio são hidrossolúveis, o agente redutor exerce o papel de manter a concentração necessária de Cu(I) *in situ* ativo na reação, eliminando a necessidade de atmosfera inerte e, evitando assim, excesso de Cu(I) no processo. Por fim, ao fato de não necessitar aquecimento, o que diminui a formação de complexos estáveis de cobre de difícil remoção (TOTOBENAZARA *et al.*, 2015; CHAN *et al.*, 2004).

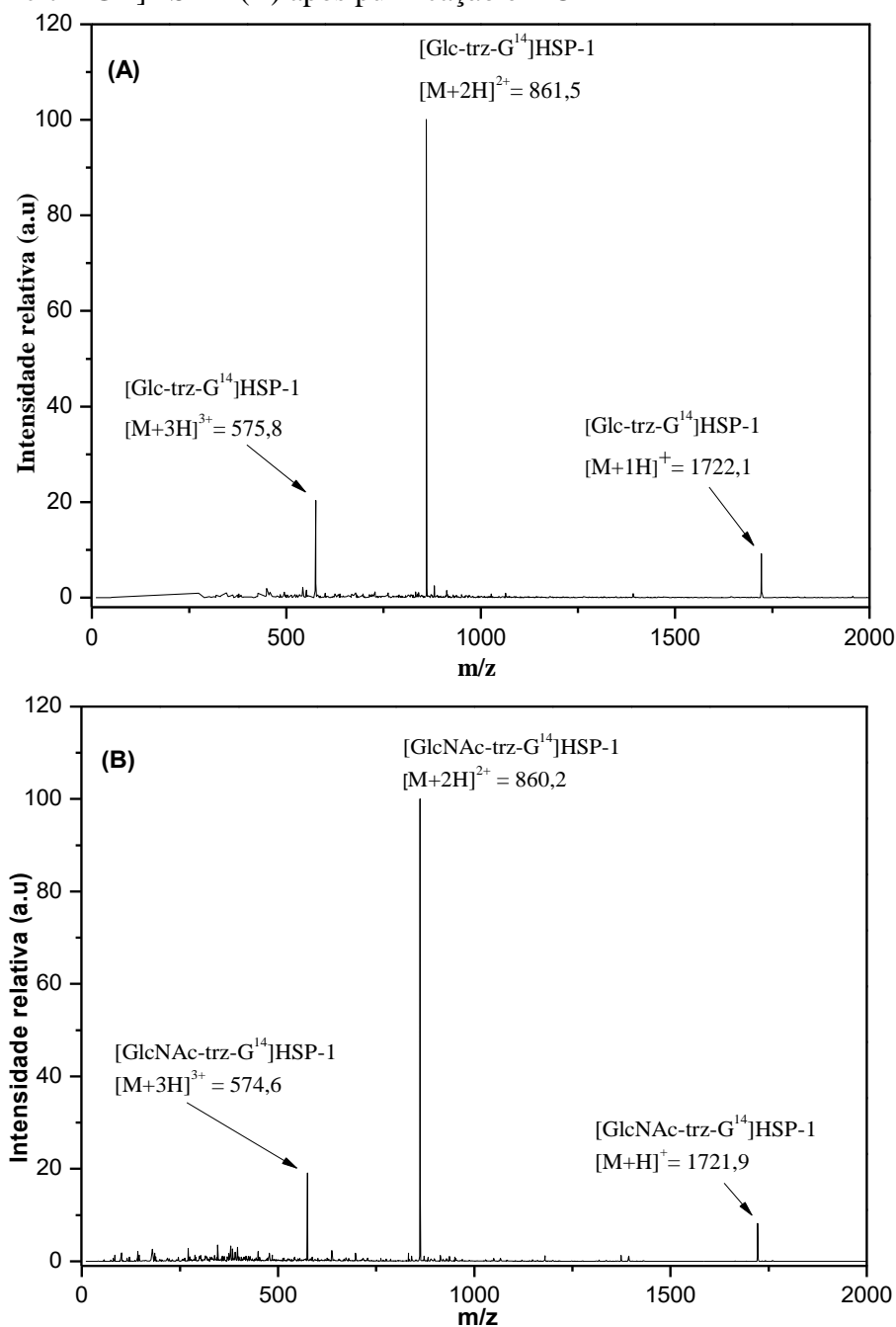
Após a análise das sínteses dos glicopeptídeo-triazóis, realizou-se a purificação por CLAE e os perfis cromatográficos semi-preparativos empregados na purificação de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 estão apresentados na **Figura 43** (p.59).

Figura 43. Perfil de CLAE-FR dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**A**) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (**B**). Amostra injetada (1 mL de amostra bruta a 1 mg.mL⁻¹) em coluna semi-preparativa *Waters mBondapakTM C18* 10 mm 125Å (7,8 X 300 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1%. Eluição: solução de Acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹. A linha tracejada em azul representa a variação da concentração de acetonitrila em relação ao tempo em minutos. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 215 nm.



Foram coletadas frações dos glicopeptídeo-triazóis referentes aos picos de tempo de retenção (t_r) 21,0 minutos para o $[\text{Glc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$ e tempo de retenção (t_r) 20,3 minutos para o $[\text{GlcNAc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$, que foram posteriormente liofilizadas e em seguida analisadas por espectrometria de massas. A **Figura 44**, apresenta as análises por espectrometria de massa por ionização *electrospray* (ESI) dos glicopeptídeo-triazóis $[\text{Glc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$ (A) e $[\text{GlcNAc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$ (B).

Figura 44. Espectro de Massa (ESI) dos glicopeptídeo-triazóis $[\text{Glc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$ (A) e $[\text{GlcNAc-trz-G}^{14}]\text{HSP-1}$ (B) após purificação em CLAE-FR



Na **Figura 44A** (p. 60) é possível observar a presença dos íons $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$ característicos do glicopeptídeo $[Glc-trz-G^{14}]HSP-1$ com m/z de 575,8; 861,5 e 1722,1 respectivamente. Da mesma forma, na **Figura 44B** (p. 60) pode-se verificar a presença de m/z 574,6; 860,2 e 1721,9 correspondem dos íons $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$ referente ao $[GlcNAc-trz-G^{14}]HSP-1$.

4.3 Testes Biológicos

Neste item serão apresentados os resultados dos estudos biológicos comparativos para avaliação da atividade bactericida e fungicida entre o peptídeo HSP-1 e os glicopeptídeos sintetizados. A amostra do peptídeo HSP-1 foi fornecida por Isabela Pereira Gomes (Gomes, 2015), mestranda do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM.

As atividades antimicrobianas do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis $[Glc-trz-G^{14}]HSP-1$ e $[GlcNAc-trz-G^{14}]HSP-1$ foram testadas em quatro cepas bacterianas e comparadas com o antibiótico cloranfenicol (*Sigma-Aldrich*[®]) e os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis $[Glc-trz-G^{14}]HSP-1$ e $[GlcNAc-trz-G^{14}]HSP-1$ contra cepas bacterianas ATCC

Micro-organismo	Gram	MIC (μM) ^a			
		HSP-1	$[Glc-trz-G^{14}]HSP-1$	$[GlcNAc-trz-G^{14}]HSP-1$	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29313	Positivo	188	176	NDA ^b	92,84
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	Positivo	NDA ^b	NDA ^b	NDA ^b	92,84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Negativo	94	88	85	92,84
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo	188	176	170	92,84

MIC (μM)^a, concentração mínima de peptídeo e glicopeptídeotriazólico necessária para inibição total do crescimento celular, em meio líquido. Estas análises foram realizadas de acordo com as recomendações do NCCLS (NCCLS, 2003).

NDA^b, atividade não detectada.

Os dados experimentais revelaram que no geral as modificações químicas realizadas com diferentes derivados azidos acetilados no peptídeo HSP-1 não alteram a eficácia do HSP-1 contra agentes bacterianos. Por outro lado, é possível notar uma maior atividade antifúngica dos glicopeptídeos conforme comprovado pelos dados apresentados na **Tabela 6**.

Os testes antifúngicos do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foram conduzidos em *Candida tropicalis* ATCC[®] 28707, *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 34135, sendo comparadas com os fármacos antifúngicos anfotericina B *Sigma-Aldrich*[®] e 5-Fluorocitosina *Sigma-Aldrich*[®].

Tabela 6. Atividade fungicida do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em *Candida sp* ATCC

Micro-organismo	MIC (µM) ^a / MFC ^b				
	HSP-1	[Glc-trz-G ¹⁴]HSP-1	[GlcNAc-trz-G ¹⁴]HSP-1	5-Fluorocitosina	Anfotericina
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	113,90	66,27	94,01	27,13	83,63
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	114,10	47,88	63,60	26,75	11,11
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	116,90	102,3	11,96	85,53	33,92

MIC^a, concentração mínima inibitória.

MFC^b, concentração fungicida mínima. Estas análises foram realizadas de acordo com as recomendações do NCCLS (NCCLS, 2002).

Os dados experimentais nos ensaios antifúngicos revelaram que houve uma melhor atividade fungicida para os glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 quando comparado ao peptídeo HSP-1. Esse maior potencial antifúngico dos glicopeptídeo-triazóis pode estar associado a dois fatores principais, a presença do anel triazólico em suas estruturas químicas e a perturbação da membrana celular. Muitos estudos descrevem o efeito inibitório que derivados azólicos exercem na biossíntese de ergosterol, que é o principal componente da membrana celular dos fungos, causando assim uma diminuição do seu crescimento (BEHR, 2003; LUPETTI *et al.*, 2002; GEORGIEV, 2000). A primeira etapa na síntese de ergosterol é a desmetilação do

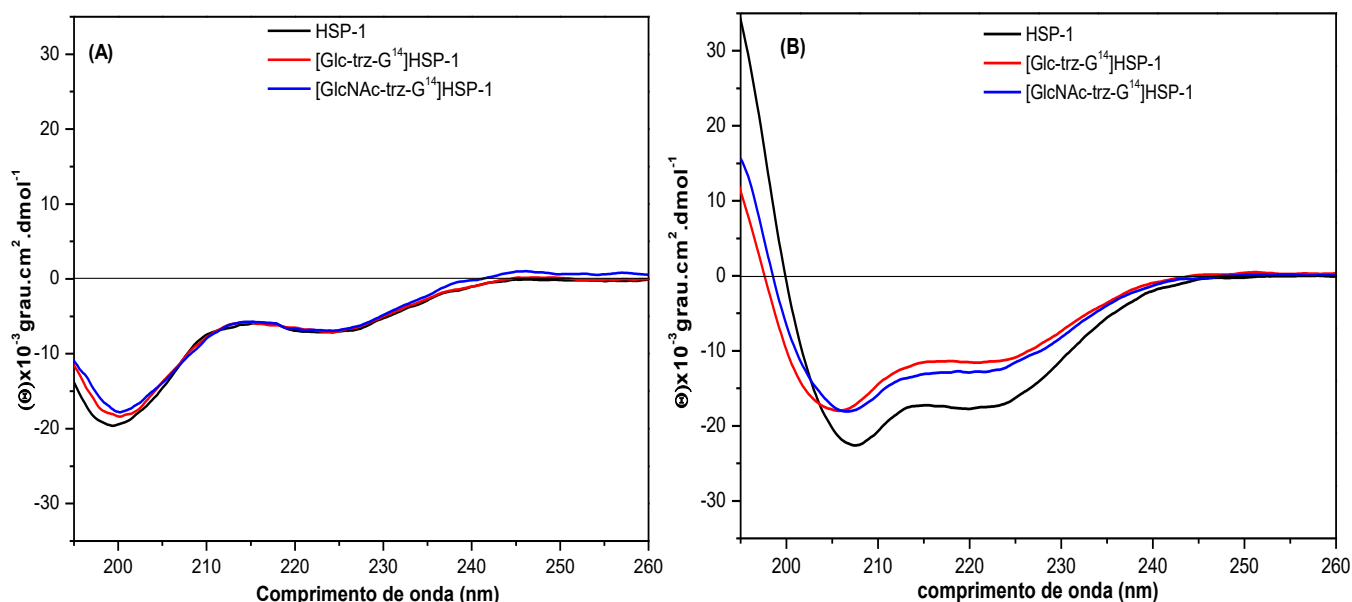
lanosterol por ação da enzima C-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450. Esta proteína, associada ao retículo endoplasmático é codificada pelo gene *ERG11* (ou *CYP51*), prejudicando a síntese do ergosterol na membrana plasmática e levando ao acúmulo de C-14- α -desmetilesteróis. Esse metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que os ergosteróis e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (BERGOLD, 2004; GEORGIEV, 2000).

Outro efeito que pode justificar a maior atividade antifúngica dos derivados glicosilados pode estar associado a alterações na permeabilidade da membrana através de formação de poros que causam o extravasamento dos componentes plasmáticos e morte celular do fungo (BEHR, 2003; LUPETTI *et al.*, 2002; SANGLARD, 2002; GEORGIEV, 2000). Neste sentido, foram propostos estudos comparativos de dicróismo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta (ζ) e extravasamento de carboxifluoresceína entre HSP-1 e os derivados glicosilados [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em vesículas fosfolipídicas zwitteriônicas e aniônicas.

4.4 Dicróismo Circular (CD)

Os resultados obtidos do estudo das preferências conformacionais referente ao peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em vesículas zwitteriônicas de POPC e predominantemente negativas de POPC/POPG (3:1) estão apresentados na **Figura 45** (p.64). Observa-se que em LUV's de POPC/POPG (0,5 mM) tanto HSP-1 quanto os glicopeptídeos apresentaram maior perfil de conformação helicoidal em relação ao perfil dos espectros em LUV's de POPC (0,5 mM).

Figura 45. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HSP-1 (38 μM) e dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (38 μM) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (38 μM) em LUV's POPC (0,5 mM) (A) e LUV's POPC/POPG (0,5 mM) (B).



O teor de helicidade calculado em LUV's de POPC para o peptídeo HSP-1 (H de 28 %) apresentou-se muito próximo ao calculado para [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (H de 25 %) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (H de 24 %). Contudo, esses valores de helicidade ainda são baixos para caracterizar uma conformação preferencial de α -hélice. Por outro lado, em vesículas aniônicas de POPC/POPG o conteúdo máximo de hélice calculado para o peptídeo HSP-1 foi de 78 %, enquanto que os valores de helicidade máxima calculada para os glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foram de 68% e 65%, respectivamente.

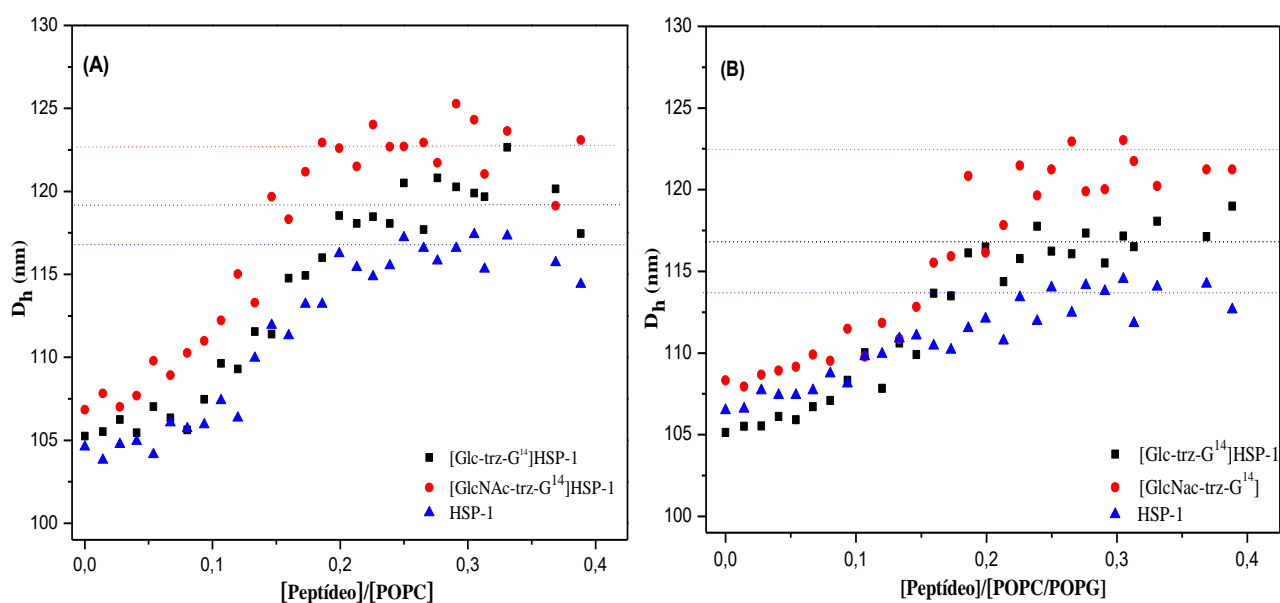
4.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica amplamente empregada para a determinação de distribuição de tamanho de partículas em suspensão (MENDOZA *et al.*, 2007). Nessa técnica a amostra é atravessada por um laser e a distribuição de tamanho das partículas é relacionada com a intensidade de luz espalhada (SOU, 2011; ZETASIZER, 2007; BOHREN, 1983). Atualmente, medidas de DLS têm sido empregadas também em estudos de interação peptídeo-membrana revelando que

moléculas de peptídeos ao interagir com vesículas fosfolipídicas unilamelares (LUV's) formam agregados supramoleculares que resultam na alteração de seus volumes (SOU, 2011; SILVA *et al.*, 2008; ABRUNHOSA *et al.*, 2007).

Dessa forma, neste trabalho foram preparadas vesículas fosfolipídicas de POPC e POPC/POPG (3/1 mol/mol) de 100 nm para a observação do comportamento do diâmetro hidrodinâmico (D_h) das LUV's frente à adição do peptídeo HSP-1 e de suas formas glicosiladas, cujos os resultados estão mostrados na **Figura 46**.

Figura 46. Diâmetro hidrodinâmico de LUV's POPC (1 mM) (A) e POPC/POPG (1 mM) (B) em função da razão molar do peptídeo HSP-1 (1 mM) e dos glicopeptídeo-triazólicos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (2 mM) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (2 mM). As linhas tracejadas representam o máximo de D_h alcançado pelas LUV's com adição de HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1.



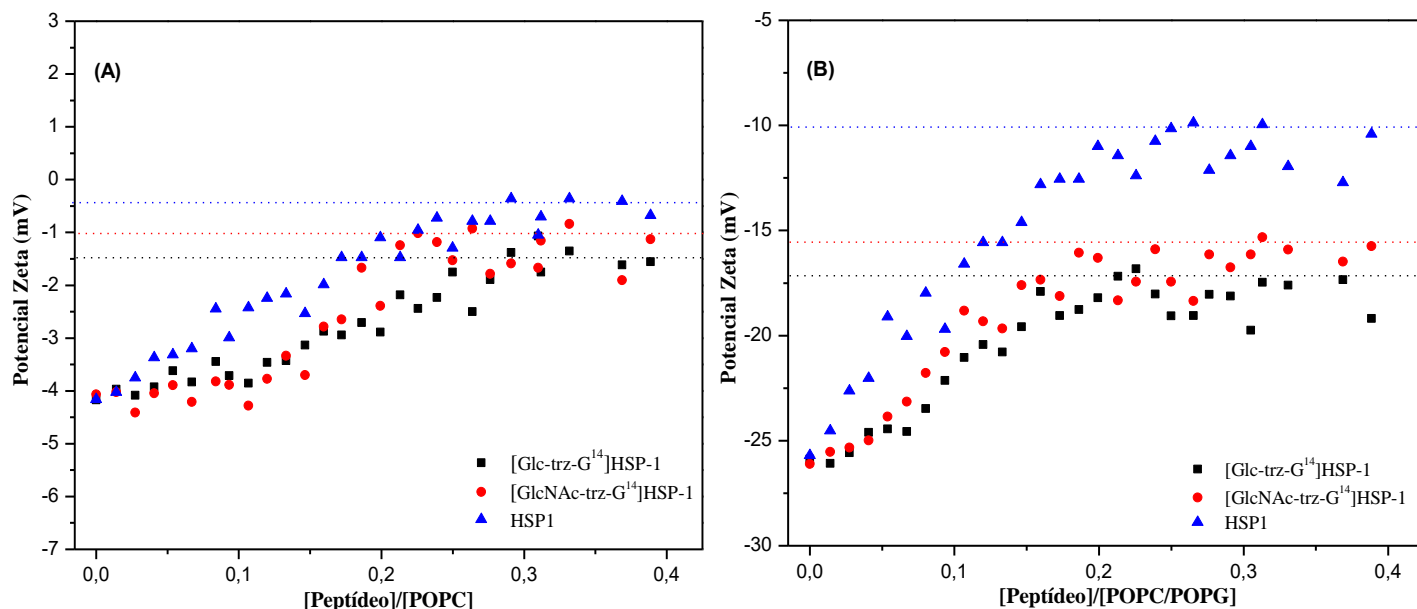
De uma maneira geral, é possível observar um aumento na variação do diâmetro hidrodinâmico (ΔD_h) tanto nas LUV's de POPC quanto em LUV's de POPC/POPG com a adição do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1. Na **Figura 46A**, nota-se que o aumento no D_h das LUV's de POPC ocorre até uma razão molar peptídeo/fosfolipídeo de aproximadamente 0,2, atingindo um D_h máximo de 125 nm, 122 nm e 117 nm após adição de [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e HSP-1, respectivamente. Dessa forma, verifica-se que a variação do diâmetro hidrodinâmico para vesículas zwitteriônicas de POPC é maior para [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (ΔD_h 15 nm) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (ΔD_h 16 nm) em relação ao peptídeo HSP-1 (ΔD_h 12 nm). Além disso, é importante destacar ainda que até uma

razão molar próxima a 0,1 a variação do D_h das vesículas de POPC causada pela adição de HSP-1 e dos glicopeptídeos é pequena, porém após esse valor o efeito no diâmetro hidrodinâmico das LUV's torna-se mais significativo. Este comportamento pode estar associado ao aumento da concentração de glicopeptídeo na superfície da membrana até atingir uma concentração crítica (razão molar $\approx 0,15$), a partir da qual as moléculas ligam-se uma as outras formando agregados que podem alterar o modo de interação com as LUV's e possibilitando uma maior perturbação na membrana, conseqüentemente, uma aumento mais significativo no D_h das LUV's (DATHE *et al.*, 2002; MATSUZAKI, 1999).

Pode-se notar também um aumento no D_h devido à adição de HSP-1 e glicopeptídeos em vesículas de POPC/POPG (3/1), embora esse mesmo efeito tenha sido ligeiramente inferior ao ocorrido em vesículas de POPC. Na **Figura 46B** (p.65) é possível constatar que o máximo de D_h alcançado pelas LUV's de POPC/POPG ocorre próximo à razão molar de 0,2 com adição dos glicopeptídeos (D_h máximo ≈ 122 nm para [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 e D_h máximo ≈ 118 nm para [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1) e 0,25 na adição de HSP-1 (D_h máximo de 114 nm). Além disso, é importante destacar que, assim como em vesículas zwitteriônicas, o ΔD_h alcançado para LUV's de POPC/POPG foi superior devido ao aumento da concentração de [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta D_h \approx 12$ nm) e [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta D_h \approx 14$ nm) em comparação com HSP-1 ($\Delta D_h \approx 8$ nm). Contudo, o efeito na variação do diâmetro das LUV's de POPC/POPG é sensivelmente diferente para o peptídeo HSP-1 em comparação com suas formas glicosiladas. Enquanto que com a adição de HSP-1 segue-se um aumento linear do D_h até alcançar seu valor máximo de 114 nm, na presença dos glicopeptídeos a variação de D_h é pequena até uma razão molar próxima a 0,1, tornando-se mais significativa após este valor.

Também foram avaliadas as alterações no potencial zeta das LUV's de POPC e POPC/POPG frente a adição de peptídeo e glicopeptídeos (**Figura 47**, p.67). Tal medida é um indicador útil da carga superficial de partículas e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e/ou emulsões coloidais, sendo também passível de ser empregado para estudos da interação peptídeo/membrana (KASZUBA *et al.*, 2010; WIMLEY, 2010).

Figura 47. Valores de Potencial Zeta do peptídeo HSP-1 (1 mM) e dos glicopeptídeos triazólicos Glc-trz-G¹⁴]HSP-1(1 mM) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (1 mM) em LUV's POPC (1 mM) (A) e LUV's POPC/POPG (1 mM) (B). As linhas tracejadas representam o máximo do potencial Zeta alcançado pelas LUV's com adição de HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1.



Verifica-se que em ambos os meios biomiméticos ocorre o aumento do potencial zeta (ζ) após adição de HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, embora a variação do potencial Zeta seja maior na presença de HSP-1. Este efeito deve-se às interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos resíduos de lisina (Lys-7 e Lys-11), presentes tanto na cadeia peptídica de HSP-1 quanto em suas formas glicosiladas, e as cargas negativas de grupamento fosfato presentes nos fosfolipídios (ABRUNHOSA, 2007; SANDERSON, 2005).

É possível notar que em vesículas zwitteriônicas após uma razão molar próxima a 0,3 não há alterações expressivas no potencial zeta com adição de peptídeo ou glicopeptídeo, ocasionando uma variação final muito próxima entre HSP-1 ($\Delta\zeta = 3,5$ mV) e os glicopeptídeos [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta\zeta = 3,0$ mV) e [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta\zeta = 2,6$ mV) (**Figura 47A**). Entretanto, percebe-se um comportamento distinto das LUV's de POPC na presença de HSP-1 em relação aos glicopeptídeos. Durante a adição HSP-1 o aumento do potencial zeta ocorre sempre de forma linear até a razão molar próxima a 0,3. Por outro lado, a variação do potencial zeta das LUV's é imperceptível devido a adição tanto de [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 quanto de [Glc-trz-

G¹⁴]HSP-1 até uma razão molar de aproximadamente 0,1 ao passo que após este valor o aumento do potencial zeta torna-se nitidamente significativo.

De forma similar, também verifica-se um aumento do Potencial Zeta das LUV's de POPC/POPG com adição de HSP-1 e de glicopeptídeos, embora neste meio atinja um patamar em razões molares de aproximadamente 0,25, inferior ao detectado em LUV's de POPC (**Figura 47B**, p.67). Novamente, é possível notar uma variação linear do potencial zeta das LUV's POPC/POPG devida à adição do peptídeo HSP-1, enquanto em relação aos glicopeptídeos, até a razão molar de $\approx 0,05$ a variação é muito pequena, após a qual o efeito se torna maior e a adição de glicopeptídeos resulta em uma variação acentuada do potencial zeta das vesículas de POPC/POPG. Este comportamento pode indicar um possível mecanismo similar a um tipo *Self Assembly Monolayer-SAM* (LUO *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2009), no qual as moléculas de glicopeptídeos tendem a auto-associar-se na superfície da membrana, formando agregados que levam à formação de poros na bicamada fosfolípida. Entretanto, a variação linear tanto no diâmetro quanto no potencial zeta das LUV's de POPC/POPG, decorrente da adição de HSP-1 (**Figura 46B**, p.65 e **47B**, p.67), pode estar associada a uma predominância de interações eletrostáticas do peptídeo com superfície dos lipossomas, conforme já foi observado para outros peptídeos como DDK (VERLY *et al.*, 2009; VERLY *et al.*, 2007) e BP100 (FREIRE *et al.*, 2011), os quais interagem preferencialmente de forma paralela com as superfícies de membranas fosfolípicas. Esta afirmação é condizente com os resultados obtidos por estudo estruturais de ressonância magnética nuclear (PRATES *et al.*, 2004) em meio biomimético, os quais mostraram que HSP-1 adota uma conformação α -hélice do resíduo 2 a 13 conferindo ao peptídeo uma estrutura anfipática, cujo os resíduos de Lys-7 e Lys-11 concentram-se na face polar da hélice, o que favoreceria a interação eletrostática com grupos fosfatos dos fosfolípidios, acumulando-se na superfície da bicamada similarmente a um mecanismo tipo *Carpete*. Além disso, a maior variação do potencial zeta para o peptídeo HSP-1 ($\Delta\zeta = 15$ mV) quando comparada aos glicopeptídeos [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta\zeta = 9$ mV) e [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 ($\Delta\zeta = 10$ mV) em LUV's POPC/POPG, demonstram para os glicopeptídeo-triazóis a menor interação eletrostática com as vesículas.

4.6 Extravasamento de Carboxi Fluoresceína (CF)

A atividade lítica do peptídeo HSP-1 e dos glicopeptídeo-triazóis [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 foi avaliada também em vesículas fosfolipídicas de POPC e POPC/POPG (3/1). Para isto, foram realizadas medidas de extravasamento de conteúdo aquoso de LUV's fosfolipídicas contendo o marcador químico carboxifluoresceína (CF), monitoradas pelo aumento da fluorescência decorrente da ruptura das membranas fosfolipídicas dos lipossomas (CARLINI *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2008). Neste estudo a taxa de extravasamento de CF das vesículas foi calculada pelo aumento da emissão de fluorescência em função do tempo, cujos resultados estão demonstrados na **Figura 48** (p.70) para vesículas de POPC e na **Figura 49** (p.71) para POPC/POPG (3/1 mol/mol).

Os resultados revelam que a adição de HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 promove o extravasamento de CF do interior das LUV's POPC e POPC/POPG, comprovando a capacidade de formação de poros tanto na bicamada fosfolipídicas de vesículas zwitteriônicas quanto em vesículas aniônicas.

Figura 48. Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de POPC (5 mM) com adição do peptídeo HSP-1 (400 μ M) (A) e dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) (B) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) (C).

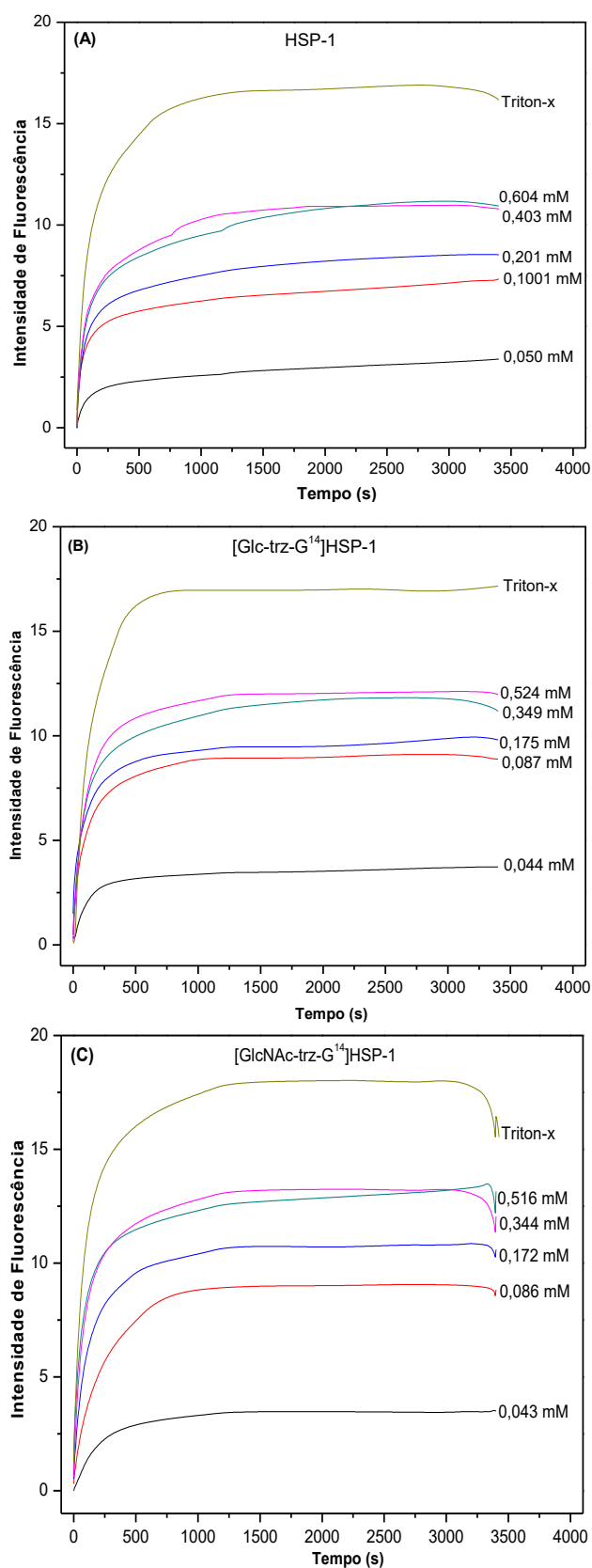
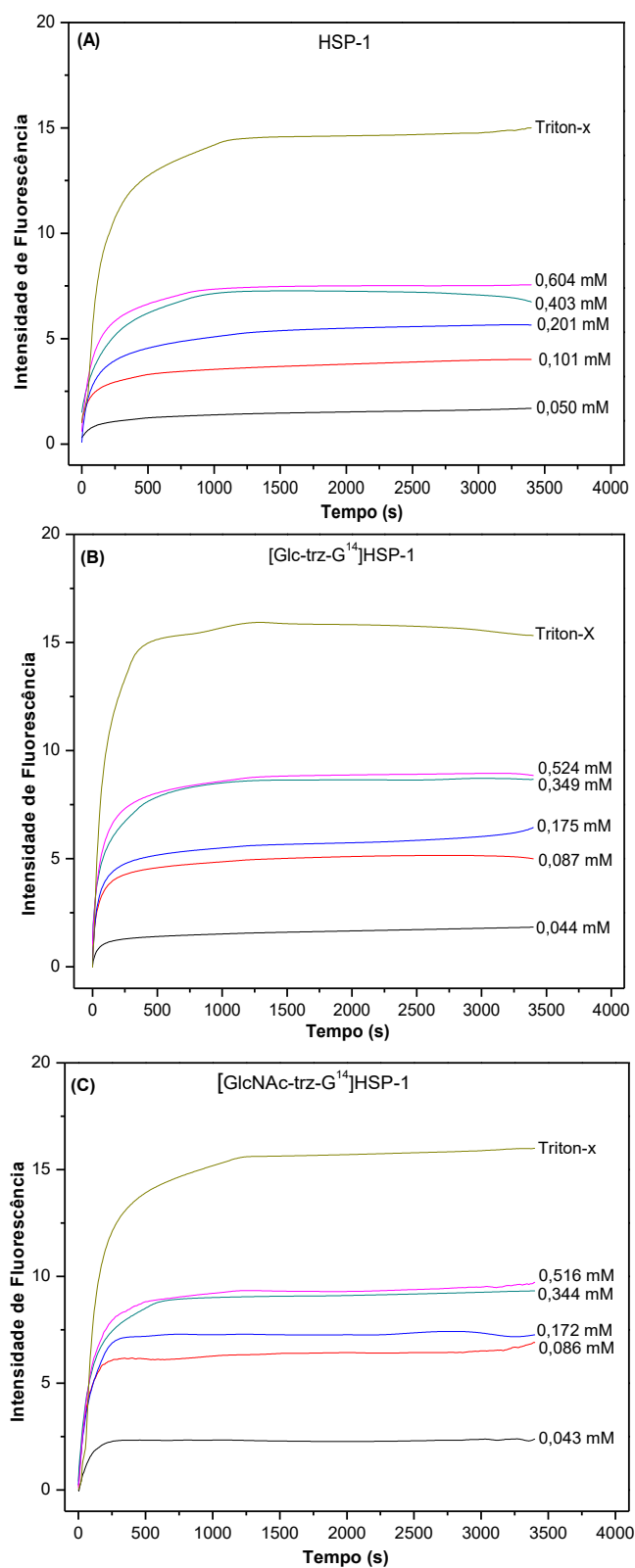
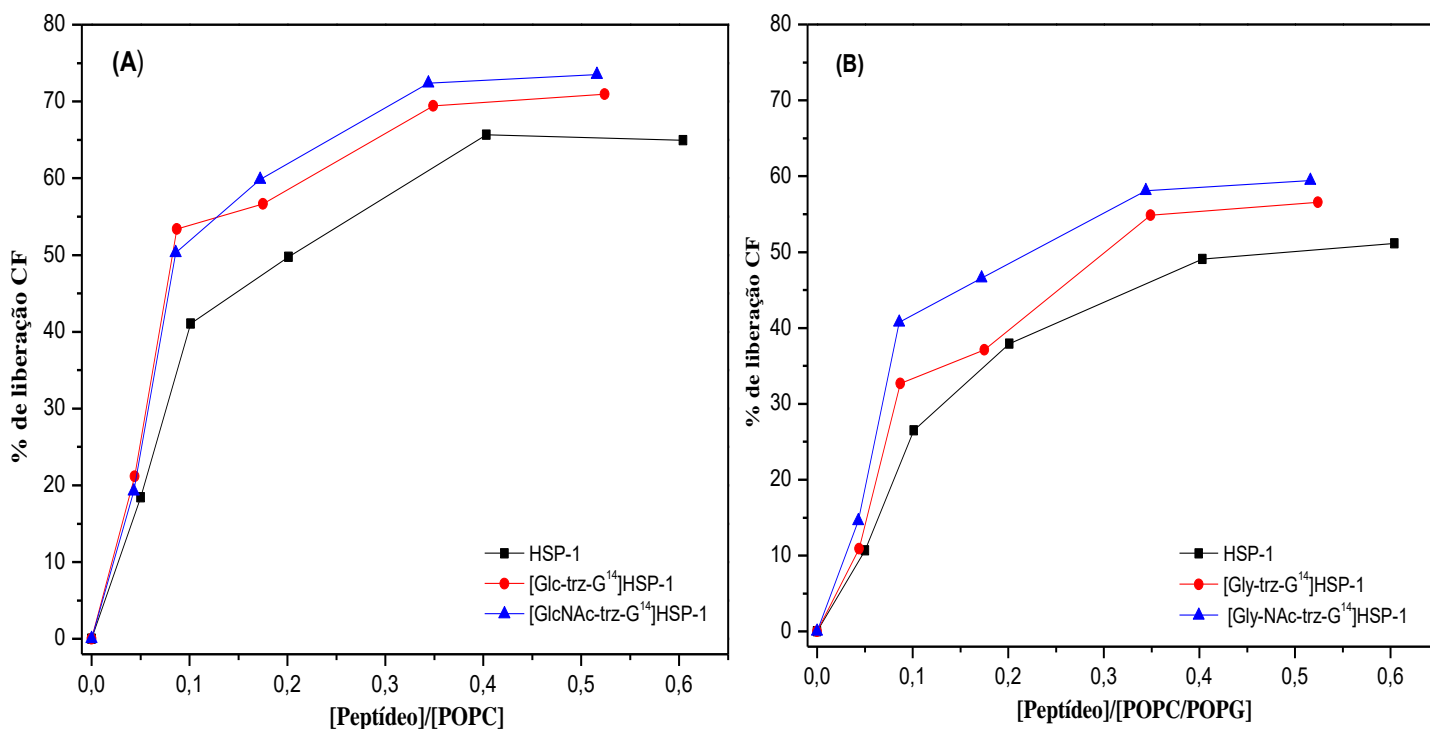


Figura 49. Curva da cinética da liberação de CF em LUV's de POPC/POPG (5 mM) com adição de diferentes concentrações de HSP-1 (400 μ M) (A), [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) (B) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) (C).



A partir desses resultados, foram construídos gráficos da porcentagem de liberação de CF em função da razão molar dos peptídeos HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 em vesículas de POPC e de POPC/POPG, apresentados na **Figura 50**.

Figura 50. Porcentagem de liberação de CF em função da razão molar do peptídeo HSP-1 (400 μ M), [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1(400 μ M) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1(400 μ M) em LUV's de POPC (5 mM) (A) e LUV's de POPC/POPG (5 mM) (B).

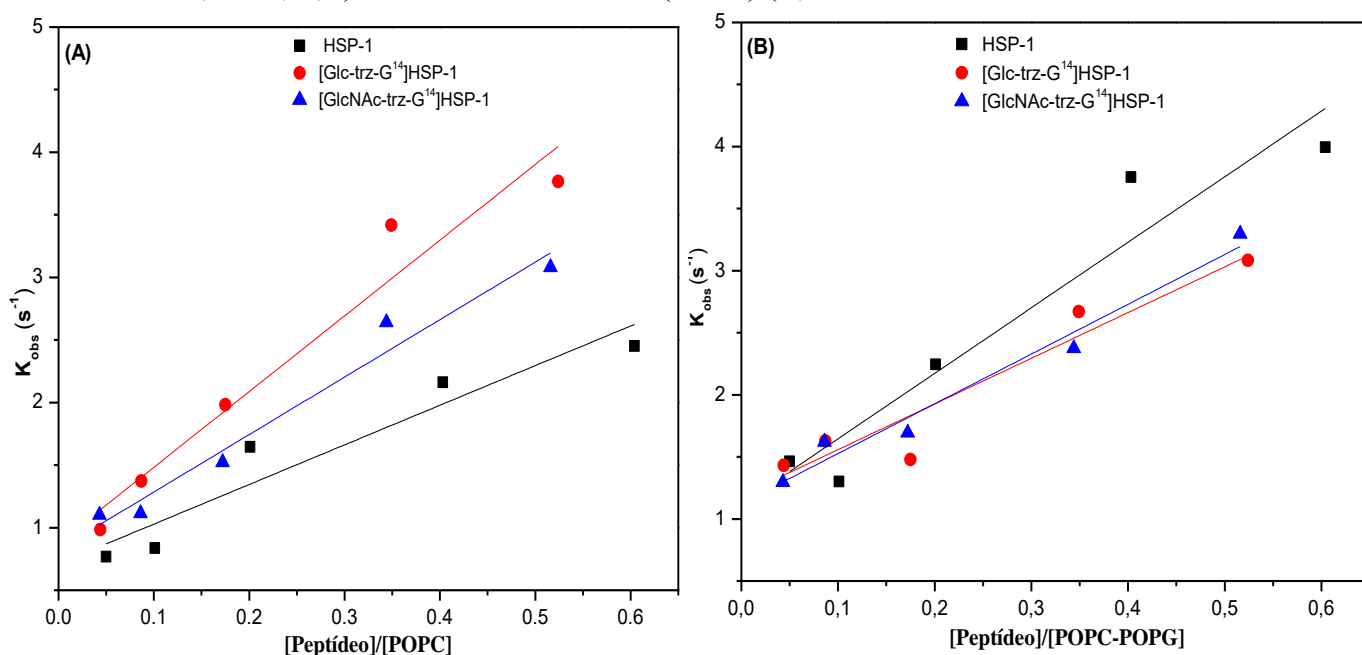


Pode-se observar que a liberação de CF induzida por cada espécie (HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1) é maior em vesículas de POPC quando comparadas às vesículas POPC/POPG. Estudos de extravasamento de CF para os peptídeos Maculatina, Citropina, e Aureína, também em vesículas de POPC e POPC/POPG, revelaram que a predominância de interações eletrostáticas peptídeo-membrana diminui a capacidade lítica do peptídeo em vesículas fosfolipídicas (AMBROGGIO *et al.*, 2005). Embora a diferença seja pequena, também é importante destacar que a porcentagem de liberação de CF tanto em vesículas de POPC quanto de POPC/POPG é maior na presença dos glicopeptídeos em relação à HSP-1. A partir da **Figura 50A** foi possível determinar uma porcentagem de liberação de CF de 74% devida à presença de [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, de 71% para [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e de 65% para o peptídeo HSP-1 em vesículas zwitteriônicas de POPC. A porcentagem de liberação de CF em vesículas aniônicas de POPC/POPG (**Figura 50B**) foi de 59% na

presença de [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, de 57% com adição de [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e de 50% na presença de HSP-1. Verifica-se assim, que glicosilação elevou, ainda que sutilmente, a capacidade lítica do peptídeo HSP-1, em acordo com os dados de DLS apresentados anteriormente (**Figura 46**, p.65), os quais revelaram maior perturbação na estrutura das LUV's causada pelas formas glicosiladas em relação a HSP-1. Tal comportamento pode ser justificado pela maior inserção das formas glicosiladas na bicamada lipídica, o que ocasionaria uma maior desorganização das estruturas dos lipossomas, enquanto que HSP-1 apresenta uma interação predominantemente eletrostática com a superfície das LUV's, em acordo com os dados apresentado no estudo do potencial zeta (**Figura 47**, p.67), cuja interação de HSP-1 resulta em uma maior alteração na carga superficial das LUV's do que os glicopeptídeos [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1.

O ajuste exponencial dos resultados da cinética de liberação de CF para cada experimento permitiu a obtenção das constantes de velocidade de extravasamento, k_{obs} , das diferentes concentrações de espécie HSP-1, [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1, conforme demonstrados na **Figura 51**. Todos os estudos definem que o aumento da razão molar peptídeo/fosfolípido determina um aumento no k_{obs} .

Figura 51. Razão de liberação de CF, K_{obs} , em função da razão molar de HSP-1 (400 μ M), [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 (400 μ M) em LUV's de POPC (5 mM) (A) e LUV's POPC/POPG (5 mM) (B).



Na **Figura 51A** (p.73) é possível observar uma maior cinética de extravasamento causada pelos glicopeptídeos em vesículas zwitteriônicas (ajuste linear com maior inclinação), sendo maior para [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1. Entretanto, em vesículas aniônicas (**Figura 51B**, p.73) o peptídeo HSP-1 resultou em uma maior cinética de extravasamento de CF, sendo possível observar uma maior inclinação para a curva referente ao peptídeo HSP-1 em relação aos glicopeptídeos, os quais apresentaram valores de inclinação muito similares nos ajustes lineares. A menor cinética dos glicopeptídeos em POPC/POPG, conforme observado nos dados de DLS e potencial zeta, deve-se principalmente à necessidade de uma concentração crítica de glicopeptídeos, a partir da qual ocorre uma perturbação na integridade das vesículas.

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada neste trabalho para a obtenção dos glicopeptídeos combinando síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) via estratégia Fmoc acoplada a reações de cicloadição 1,3-dipolar com sistema catalítico a partir do sulfato penta hidratado de cobre(II) (CuSO₄.5H₂O) na presença de ascorbato de sódio como agente redutor gerando espécie de Cu(I) *in situ* revelou ser viável e mostrou-se bastante eficiente. Os resultados de espectrometria de massa (MALDI-ToF e ESI) e as análises cromatográficas (CLAE-FR) revelaram que a glicosilação do peptídeo [PAG¹]HSP-1 com derivados azido acetilados (glicose e *N*-acetilglicoseamina) via reação *click* ocorreu com elevada regioseletividade, resultando na formação quase exclusiva dos glicopeptídeos [Glc-trz-G¹⁴]HSP-1 e [GlcNAc-trz-G¹⁴]HSP-1 não sendo observadas formação significativa de outras glicoformas.

Através dos ensaios biológicos, observou-se que as modificações químicas realizadas no peptídeo HSP-1 com diferentes derivados azido não alteram de forma significativa a eficácia de HSP-1 contra cepas bacterianas Gram Positivas e Negativas. Por outro lado, os ensaios antifúngicos realizados com *Candida sp*, revelaram que houve considerável melhora na atividade fungicida de HSP-1 com a glicosilação, podendo o efeito ser atribuído tanto à presença do anel triazólico em suas estruturas químicas, que pode estar exercendo um efeito inibitório na biossíntese do ergosterol, quanto a uma perturbação na membrana celular diminuindo seu crescimento celular.

Em suma, foi visto que os resultados comparativos do estudo de interação das moléculas com membranas de caráter zwitteriônico (POPC) e aniônico (POPC/POPG) (3/1) revelaram que o peptídeo HSP-1 causa uma maior variação no potencial zeta e menor efeito no tamanho das vesículas, decorrente da predominância de interações eletrostáticas. Consequentemente, a capacidade lítica foi menor para HSP-1 em comparação aos derivados glicosilados. Contudo, embora os glicopeptídeos também apresentem interações eletrostáticas em membranas fosfolipídicas, verifica-se um modo de ação distinto de HSP-1, no qual é necessária primeiramente uma concentração crítica de moléculas de glicopeptídeos para causar maior alteração na estrutura das LUV's. Como resultado disso, verificou-se uma menor taxa de extravasamento para os derivados glicosilados em relação a HSP-1.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, F. F.; GOMES, P.; TOMAZ, I.; PESSOA, J. C.; ANDREU, D.; BASTOS, M. Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. **Journal of Physical Chemistry B-Condensed Phase**, v. 109, n. 36, p. 17311-17319, 2007.

ALVAREZ, C. C. F.; SHIDA, C. S.; NOGUEIRA, L.V.; MARTINEZ, D.; TEJUCA, M.; PAZOS, I. F.; LANIO, M. E.; MENESTRINA, G.; LISSI, E. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces-Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 122, n. 1-2, p. 97-105, 2003.

AMBROGGIO, E. E. S. F.; BOWIE, J. H.; FIDELIO, G. D.; BAGATOLLI, L. A. Direct Visualization of Membrane Leakage Induced by the Antibiotic Peptides: Maculatin, Citropin, and Aurein. **Biophys. J**, v. 89, n. 3, p. 1874-1881, 2005.

ANAN, Y. K. S.; NORIYUKI, T.; SHINSUKE, O.Y. Speciation and identification of low molecular weight selenium compounds in the liver of sea turtles. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 80-85, 2011.

APWEILER, R.; HERMIAKOB, H.; SHARON, N. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1999. 1473(1): p. 4-8.1999.

APWEILER, R. H. H.; S, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 4-8, 1999.

ARAGÃO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron letters**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

ARNOLD, Z. S.; KRCHNAK, V. Synthetic Reaction of Dimethylformamide. **Chem. Commun**, v. 38, n. 9, p. 2633-2640, 1973.

AUGUSTI, R. K. Reactions of 3-Diazo-1,3-dihydro-2H-indol-2-one Derivatives with Enaminones. A Novel Synthesis of 1,2,3-Triazoles. **J.Org.Chem**, v. 58, n. 25, p. 7079-7083, 1993.

BAKULEV, V. A. F.; KAPPE, C. O. Pericyclic Versus Pseudopericyclic 1,5-Electrocyclization of Iminodiazomethanes. An ab Density Functional Theory Study. **J.Org.Chem**, v. 63, p. 5801-5805, 1998.

BEHR, J. B. Chitin synthase as an antifungal target: recent advances. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents**, v. 2, n. 2, p. 1-17, 2003.

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. In: Goodman & Gilman's As bases farmacológicas da terapêutica. **McGraw Hill**. 9. ed (trad). **Rio de Janeiro**, p. 864-875, 1995.

BERA, S.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Evaluation of amphiphilic aminoglycoside-peptide triazole conjugates as antibacterial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 10, p. 3031-3035, 2010.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. New antifunfungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BIAGI, G.; GIORGI, I.; LIVI, O.; MANERA, C.; SCARTONI, V.; BARILI, P. L. Synthesis of New 1,2,3-Triazol [1,2- α]benzotriazole Derivatives or Substitued 2,3-Benzo-1,3 α ,6,6 α -tetraazapentales. **J.Heterycly.Chem.**, v. 34, n. 3, p. 845-851, 1997.

BINDER, W. H.; SACHSENHOFER, R. **Macromol. Rapid Commun.**, v. 29, p. 952, 2008.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; MAARSEVEEN, J. H. **Eur. J. Org. Chem.** , p. 51, 2006.

BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. **Wiley-Interscience**, 1983.

BROCKSOM, T. J.; DONATONI, M. C.; ULIANA, M. P.; VIEIRA, Y. W. A reação de Diels-Alder no Início do Século XXI. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2211-2818, 2010.

CAMPO, V. L. Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento de fármacos inibidores de *trans*-sialidade de *Trypanosoma cruzi*. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CANDUZINI, H. A. Síntese e Funcionalização de 1,2,3-Triazóis via Reação de Cicloadição [3+2] de Azidas e Acetiletos Terminais. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Univerisidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012

CARLINI, C. R.; LOPEZ, F. C.; DOBROVOLSKA, O.; GUERRA, R. R.; MUSIANI, F.; UVERSKY, V. N. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and Fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **FEBS Journal**, v. 282, n. 6, p. 1043-1064, 2015.

CARVALHO, D. T. Síntese de Derivados de D-Galactose inibidores Potenciais de Interação Lectina-Carboidrato. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CARVALHO, I.; LEONETI, V. A.; CAMPO, V. L. Application of Cooper (I)-Catalysed azide/alkyne cycloaddition (CUAAC) 'Click-Chemistry' in Carbohydrate drug and Neoglycopolymers Synthesis. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

CARVALHO, L. A.; MACHINI, M. T. HEMOCIDINAS DERIVADAS DA HEMOGLOBINA: ESTRUTURAS, PROPRIEDADES E PERSPECTIVAS. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 1021-1029, 2013.

CELENTANO, V.; DIANA, D.; ROMANELLI, A.; FATTORUSSO, R. β -Hairpin Stabilization Through an Inter strand Triazole Bridgew. **Chemical Communications**, v. 48, p. 762-764, 2012.

CHAN, T. R.; HILGRAF, R.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. **Org.Lett**, v. 6, p. 2853-2855, 2004.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis**. 2000.

COIN, I.; BEYERMANN, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nature protocols**, v. 2, n. 12, p. 3247-3256, 2007.

CONTE, G. Síntese Regiosseletiva de Cristais Líquidos Quirais Contendo o Heterocíclo [1,2,3]-Triazol. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)** 2005. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

COSTA, M. S.; BOECHAT, N.; RANGEL, E. A.; SILVA, F. C.; SOUZA, A. M. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; JÚNIOR, I. N.; LOURENÇO, M. C. S.; WARDELL, S.; FERREIRA, V. F. Synthesis, Tuberculosis Inhibitory Activity, and SAR Study of N-Substituted-Phenyl-1,2,3-Triazole Derivatives. **Bioorg.Med.Chem**, v. 14, n. 24, p. 8644-8653, 2006.

CRESPO, R. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6469, 2010.

DA SILVA, J. M.; SIMON, J. G.; PINTO, A. C. **Chem.Soc.Rev.**, v. 12, p. 273-275, 2001.

DATHE, M.; MAYER, J.; BEYERMANN, M.; MAUL, B.; HOISCHEN, C.; BIENERT, M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. **Biochim. Biophys**, v. 2, p. 171-186, 2002.

DE CAMPOS, H. B. Seleno-carboidratos: síntese e avaliação preliminar da atividade biológica. 2011. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE OLIVEIRA, F. L. B. R., F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B. I.; DE FREITAS, R. P.; DOS SANTOS, L. J. A Reação "Click" na Síntese De 1, 2, 3-Triazóis: Aspectos Químicos e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

DE OLIVEIRA, M. R. P.; ALVES, T. R.; PINTO, P. H. S.; FERREIRA, L. R. L.; MOUSSATCHÉ, N.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. **Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids** v. 23, p. 735-736, 2004.

DE SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; MENDONÇA, J. S.; COSTA, M.; REBELLO, F. R. **Quim.Nova**, v. 28, p. 77, 2005.

DEGL'INNOCENTI, A.; SCAFATO, P.; CAPPERUCCI, A.; BARTOLETTI, L.; MORDINI, A.; REGINATO, G. **Tetrahedron Lett**, v. 36, p. 9031, 1995.

DIMROTH, O.; MICHAELIS, W. **Ann.**, p. 335-346, 1904.

DIMROTH, O.; MICHAELIS, W. Intramolecular Rearrangement of 5-amino-4-Iminomethyl-1,2,3-Triazoles. **Ann.**, v. 459, p. 39-46, 1927.

DOS SANTOS, M. P.; MIRANDA, M. A.; COSTA, S. T. B.; KONNO, K.; RUGGIERO, J. R.; PROCOPIO, J.; RUGGIERO, N. J. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, the role of the amidated C- terminus. **J.Pept.Sci.**, v. 14, p. 661-669, 2008.

EICHER, T. H. S. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis and Applications. **Wiley-VCH**, 2003.

EL ASHRY, E. S. H.; EL KILANY, Y.; RASHED, N.; ASSAFIR, H. Dimroth Rearrangement: Translocation of Heteroatoms in Heterocyclic Rings and its Role in Ring Transformations of Heterocycles. **Adv.Heterocycl.Chem**, v. 75, p. 79-167, 1999.

EL KHADEM, H. S. **Carbohydrate research**, v. 313, n. 255, 1998.

FERREIRA, V. F.; ROMEIRO, G. A.; PEREIRA, L. O. R.; SOUZA, M. C. B.; CUNHA, A. C.; A new and Efficient Procedure for Preparing 1,2,3-Triazoles. **Tetrahedron letters**, v. 38, n. 29, p. 5103-5106, 1997.

FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos Contendo o Núcleo Triazólico: Métodos de Síntese, Reatividade e Atividade Biológica. **Bicca-eds**. 1999.

FISCHER, E. "Ueber aromatische Hydrazinverbindungen" (On aromatic hydrazine compounds). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 8, p. 589-594, 1889.

FLEMING, I. **Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions**. 2010.

FOKIN, V.V.; WORRELL, B. T.; MALIK, J. A. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, v. 340, p. 457-459, 2013.

FRANCO, L. L. Síntese de *N*-glicosilssulfonamidas e Aza-açúcares Derivados de *N*-Acetilglicosamina e *D*-Glicose Para o Estudo da Síntese de Pseudo-dissacarídeos, Inibidores Potenciais de Quitinases. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FREIRE, J. M.; DOMINGUES, M. M.; MATOS, J.; MELO, M. N.; VEIGA, A. S.; SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. **Eur Biophys. J**, v. 40, p. 481-487, 2011.

FREITAS, L. B. O.; RUELA, F. A.; FERREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P.; SANTOS, L. J. A Reação "click" na Síntese de 1,2,3-Triazóis: Aspectps Químicos e Aplicações. **Quim.Nova**. 34: 1791-1804 p. 2011.

GABIUS, H. J. The how and why of protein-carbohydrate interaction: a primer to theoretical concept and a guide to application in drug design. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 23, 1998.

GALONIC, D. P.; GIN, D.Y. Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1000-1007, 2007.

GEORGIEV, V. S. Membrane transporters and antifungal drug resistance. **Current Drug Targeting**, v. 1, n. 3, p. 261-284, 2000.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: mechamism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 547-557, 1998.

GOTHELF, K.V.; JORGENSEN, K. A. Asymmetric 1,3-dipolar Cycloaddition Reactions. **Chem.Rev**, v. 98, p. 863-909, 1998.

HEIN, J. E.; FOKIN, V.V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CUAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1302-1315, 2010.

HERDEWJIN, P.; BALZARINI, J.; DE CLERQ, E; PAUWELS, R.; BABA, M.; BRODER, S.; VANDERHAEGHE, H. J. **Med.Chem**, v. 30, p. 1270-1278, 1987.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTVTSEV, V.V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOLKIN, V.V. Cooper (I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DMF Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **J. Am. Chem. Soc**, v. 127, p. 210-216, 2005.

HOLLA, B. S.; MAHALINGA, M.; KARTHIKEYAN, M. S.; POOJARY, B.; AKBERALI, P. M.; KUMARI, N. S. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of some Substitued 1,2,3-Triazoles **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, n. 11, p. 1173-1178, 2005.

HORCH, M. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 76, p. 187, 1997.

HOWELL, S. J.; SPENDER, N.; PHILP, D. Recognition-Mediated Regiocontrol of a Dipolar Cycloaddition Reaction. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4945-4954, 2001.

HUDSON, J. **The history of chemistry**. 1992.

HUISGEN, R. S.; MOEBIUS, L. On the Mechanism of 1,3-dipolar Cycloadditions. **J.Org.Chem**, v. 33, p. 2285-2290, 1968.

IUPAC-JCBN. Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. **Eur. J. Biochem.**, v. 159, p. 1-6, 1986.

JOHANSSON, J. R.; LINCOLN, P.; NORD, B.; KANN, N. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 2355-2359, 2011.

KADALBAJOO, M.; PARK, J.; OPDAHL, A.; SUDA, H.; KITCHENS, C. A.; GARNO, J. C.; BATTEAS, J. D.; TARLOV, M. J.; DE SHONG, P. Synthesis and structural characterization of glucopyranosylamide films on gold. **Langmuir**, v. 23, n. 2, p. 700-707, 2007.

KASZUBA, M.; CORBETT, J.; WATSON, F. M.; JONES, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci** v. 368, p. 4439-4451, 2010.

KIRBY, C.; GREGORIANDS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Nature Biotechnology**, v. 2, n. 11, p. 979-984, 1984.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. **Drug Disc.Today**, v. 8, p. 1128-1137, 2003.

L' ABBÉ, G.; GELINNE, M.; TOPPET, S. Difference in Thermal Behavior Between 1-Alkyl-5-Methoxycarbonyldiazomethyl-Tetrazoles and 2-Alkyl-5-Methoxycarbonyldiazomethyl-Tetrazoles. **Chem.**, v. 27, n. 7, p. 2021-2027, 1984.

LAHMANN, M. Architectures of multivalent glycomimetics for probing carbohydrate-lectin interactions. In: (Ed.). **Glycoscience and Microbial Adhesion**: Springer, 2009. p.183-165. ISBN 3642013031.

LASKY, L. A. **Rev. Biochem.**, v. 64, p. 113-139, 1995.

LEPENIES, B.; SEEBERGER, P. H. The promise of glycomics, glycan arrays and carbohydrate-based vaccines. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 196-207, 2010.

LIN, Y. C.; YU, B. Y.; LIN, W. C.; LEE, S. H.; KUO, C. H.; SHYUE, J. J. Tailoring the surface potential of gold with self-assembled monolayers with functional groups. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, p. 126-130, 2009.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LIU, Y.; ZHANG, L.; WAN, J.; LI, Y.; XU, Y.; PAN, Y. Design and synthesis of cyclo[-Arg-Gly-Asp-Ψ (triazole)- Gly-Xaa-] peptide analogues by click chemistry. **Tetrahedron**, v. 64, p. 10728-10734, 2008.

LUO, S.; CHEN, L.; XIBO, T.; SUN, F.; ZHOU, X.R. Role of peptide self-assembly in antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 21, p. 530-539, 2015.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine** 8, v. 2, p. 76-81, 2002.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and Tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1462, p. 1-10, 1999.

MDOWELL, P.; AFFAS, Z.; REYNOLDS, C.; HOLDEN, M. T. G.; WOOD, S. J.; SAINT, S.; COCKAYNE, A.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R.; BYCROFT, B.W. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum sensing system of *Staphylococcus aureus*. **Molecular microbiology**, v. 41, n. 2, p. 503-512, 2001.

MELDAL, M.; TORNFE, C. W. **Chem.Rev**, v. 108, p. 2952, 2008.

MELO, J. O. F.; DONNICI, L. C.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, F. V.; DE SOUZA, M. C. B. V. Heterociclos 1,2,3-Triazólicos: Histórico, Métodos de Preparação, Aplicação e Atividades Farmacológicas. **Quim. Nova**. 29: 569-579 p. 2006.

MENDOZA, E. P.; MORENO, A.; CASTILLO, R. E.; OLIVA, J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 1, p. 8-15, 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Int. J. Pharm**, v. 385, p. 113-115, 2009.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on the spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 45, p. 382-384, 1960.

NCCLS. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Segunda Edição. **Norma M27-A2 do NCCLS** (ISBN 1-56238-469-4: 1989-19087 p. 2002.

NCCLS. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **NCCLS document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4): NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1898-19087 p. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. ed 6. 2014.

PADWA, A. **1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry**. 1984.

PECHMANN, H. V. W., **K. Ber**, p. 21-2992, 1888.

PEDERSEN, S. L.; SORENSEN, K. K.; JENSEN, K. J. Semi-automated microwave-assisted SPPS: Optimization of protocols and synthesis of difficult sequences. **Peptide Science**, v. 94, n. 2, p. 206-212, 2010.

- PELLISSIER, H. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions. **Tetrahedron** v. 63, p. 3235-3285 2007.
- PRATES, V. M.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. A.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH, C. JR. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **J.Biol.Chem**, v. 279, p. 13018-13026, 2004.
- PUNNA, S.; KUZELKA, J.; WANG, Q.; FINN, M.G. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 44, p. 2215, 2005.
- RIBEIRO, J. P. **Comptes Rendus Chimie** v. 14, p. 96, 2011.
- RODIONOV, V.O.; FOKIN, V.V.; FINN, M.G. **Angew. Chem.**, v. 44, p. 2210, 2005.
- ROMEIRO, G. A.; PEREIRA, L. O. R.; DE SOUZA, M. C.; CUNHA, V. F. A new and efficient procedure for preparing 1, 2, 3-triazoles. **Tetrahedron letters**, v. 38, n. 29, p. 5103-5106, 1997.
- ROSTOVTSEV, V.V.; GREEN, L.G.; FOKIN, V.V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I) catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie**, v. 114, n. 14, p. 2708-2711, 2002.
- SANDERSON, J. M. Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 201-212, 2005.
- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Curr.Opin.Microbiol** v. 5, p. 379-385, 2002.
- SHARMA, V.; BHATIA, R. Triazoles in Antifungal Therapy. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical**, v. 2, n. 2, p. 417-427, 2011.
- SHARON, N.; LIS, H. **Essays Biochem**, v. 30, p. 59-75, 1995.
- SHARPLESS, K. B.; HIMO, F.; LOWELL, T.; FOKIM, V.V.; ROSTOVTESEV, V.V.; NOODLEMAN, L. **J. Am. Chem. Soc**, v. 127, p. 210, 2005.
- SHARPLESS, K. B.; ROSTOVTSEV, V. V.; FOKIN, V.V. **Angew. Chem**, v. 114, p. 2708, 2002.
- SHER, M.; REINKEA, H.; LANGERA, P. Regioselective synthesis of 1-(2,2-dimethoxyethyl)-1,2,3-triazoles by copper(I)-catalyzed [3+2]cyclization of 2-azido-1,1-dimethoxyethane with alkynes. **Tetrahedron Letters** v. 48, p. 7923-7925, 2007.
- SHINTANI, R.; HINTANI, R.; FU, G. C. A new Copper-Catalyzed [3+2] Cycloaddition: Enantioselective Coupling of Terminal Alkynes with Azomethine Imines to Generate Five-Membered Nitrogen Heterocycle. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 10778-10779, 2003.

SILVA, L. P.; LEITE, J.; BRAND, G. D.; REGIS, W. B.; TEDESCO, A.C.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M.; BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy". **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, n. 3, p. 329-335, 2008.

SOARES, L. A. Cu/SiO₂: Um Versátil Catalisador Reciclável para a Síntese *One Pot* de Triazóis. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SOU, K. Electrostatics of carboxylated anionic vesicles for improving entrapment capacity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, p. 211-215, 2011.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, 2002.

SREEDHAR, B.; REDDY, P. S. **Synth. Commun.**, v. 37, p. 805, 2007.

STADMAN, T. C. **Rev. Biochem.**, v. 65, p.65-83, 1996.

SUN, S.; WU, P. **Phys. Chem.**, v. 114, p. 8331, 2010.

TAYLOR, J. R. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 276, p. 1957-1996, 1996.

TEIXEIRA, M. B. M. Síntese e Avaliação Biológica de Glicoditopiperazinas Relacionadas a Mucinas de Células Tumerais e Parasitárias. **Tese (Doutado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

TORNOE, C.W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M.T. **J.Org.Chem**, v. 67, p. 3057-3064, 2002.

TOTOBENAZARA, J.; BURKE, A. J. New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 22, p. 2853-2859, 2015.

TROLL, W.; CANNAN, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 200, n. 2, p. 803-811, 1953.

VERLY, R. M. Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)**. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

VERLY, R. M.; DE MORAES, C. M.; RESENDE, J. M.; AISENBREY, C.; VALENTE, A. P.; PILÓ-VELOSO, D.; BEMQUERER, M. P.; ALMEIDA, F. C. L. Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by

Multidimensional Solution and Oriented ^{15}N and ^{31}P Solid-State NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal** v. 96, p. 2194-2203, 2009.

VERLY, R. M.; RODRIGUES, M. A.; DAGHASTANLI, K. R. P.; DENADAI, A. M. L.; CUCCOVIA, I. M.; BLOCH, C.; FRÉZARD, F.; SANTORO, M. M.; PILÓ-VELOSO, D.; BEMQUERER, M. P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 15-24, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C.W.; JOHN, W. S. Applied Food Protein Chemistry. **Fundamentals of Biochemistry**, p. 11-21, 2008.

WAMHOFF, W.; KATRITZKY, A. R.; EICHER, T.; HAUPTMANN, S. Em Comprehensive Heterocyclic Chemistry. **Academic Press**, p. 318, 1997.

WANG, K.; BI, X.; XING, S.; FANG, Z.; MING, X.; ZHANG, Q.; LIU, Q. **Green Chemistry**, v. 13, p. 562-565, 2011.

WEI, M.H.; WU, D.; SUN, R.; SHENG, S. R. **J.Chem.Res**, v. 422, 2013.

WIEDERSCHAIN, G. Y. **Biochemistry**, v. 78, p. 877-900, 2013.

WIMLEY, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **ACS Chem. Biol.**, 2010.

WONG, C. H. Carbohydrate-based Drug Discovery. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.**, 2003.

WRIGHT, C. D.; BOWIE, J.U.; NELSON, R.D. Influence of yeast mannan on release of myeloperoxidase by human neutrophils: determination of structural features of mannan required for formation of myeloperoxidase-mannan-neutrophil complexes. **Infection and immunity**, v. 43, n. 2, p. 467-471, 1984.

ZANG, L.; CHEN, X.; XUE, P.; SUN, H.H.Y.; WILLIAMS, I.A.D. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. **J. Am. Chem. Soc**, v. 127, n. 46, p. 15998-15999, 2005.

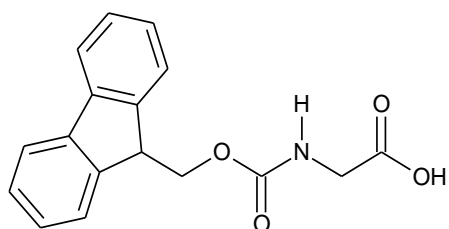
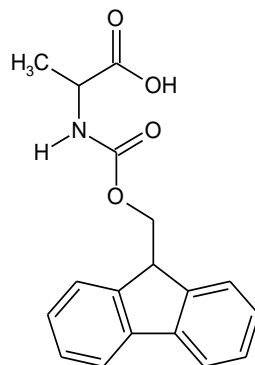
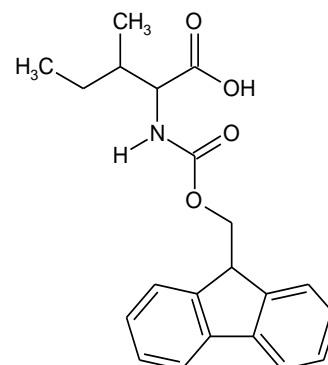
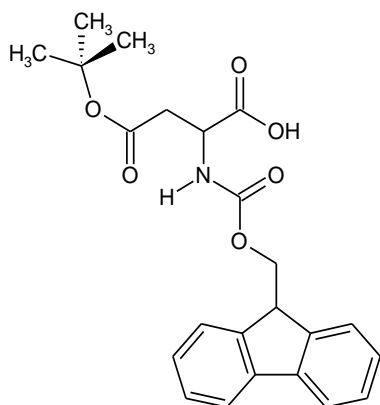
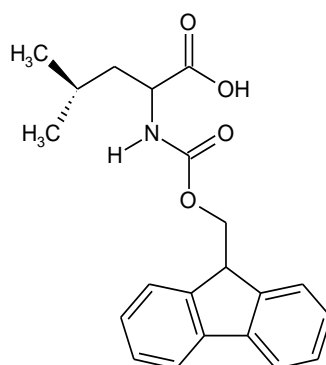
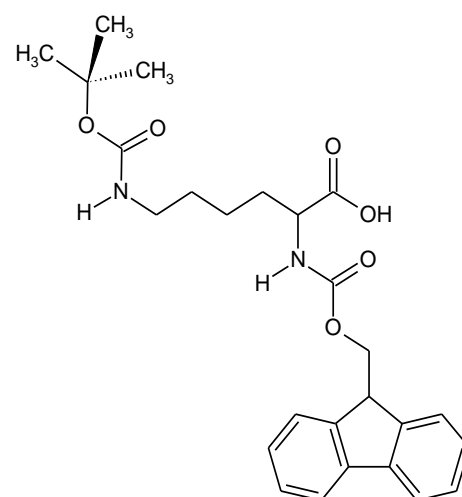
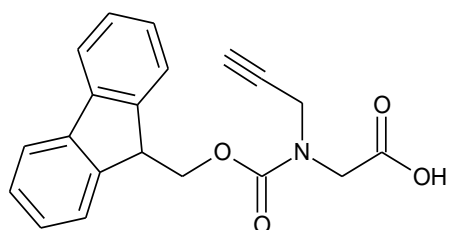
ZENG, Q.; SAHA, S.; LEE, L. A.; BARNHILL, H.; OXSHER, J.; DREHER, T.; WANG, Q. Chemoselective Modification of Turnip Yellow Mosaic Virus by Cu(I) Catalyzed Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction and Its Application in Cell Binding. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, p. 58-66, 2011.

ZENG, Q.; SAHA, S.; LEE, L.A.; BARNHILL, H.; OXSHER, J.; DREHER, T.; WANG, Q. A Potentially Valuable Advance in The Synthesis of Carbohydrate- Based Anticancer Vaccines Through Extended Cycloaddition Chemistry. **The Journal of Physical Chemistry** v. 71, p. 8244-8249, 2012.

ZETASIZER. **Malvern Instruments Nano User Manual**. Worcestershire 2007.

ZHANG, Z.; JEFF, G.; YU, Y. Y.; RAN, X.; JOSEPH, A.; LOO, S. U.; CHIHUEY, W.; PETER, G. S. A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins. **Science** 303-371 p. 2009.

7. ANEXO

Fmoc-Gly-OH (**G**)Fmoc-Ala-OH (**A**)Fmoc-Ile-OH (**I**)Fmoc-Asp(otBu)-OH (**D**)Fmoc-Leu-OH (**L**)Fmoc-Lys(Boc)-OH (**K**)Fmoc-PraGly-OH (**PG**)