

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Luiz Eduardo Silva Marinho**

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DO MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOTRIAZOL-  
PEPTÍDEOS**

**Diamantina – MG**

**2018**



**Luiz Eduardo Silva Marinho**

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DO MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOTRIAZOL-  
PEPTÍDEOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção de título de Mestre em Química

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

**Diamantina – MG**

**2018**

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

M338e Marinho, Luiz Eduardo Silva.  
Estudos biofísicos do mecanismo de ação de glicotriazol-peptídeos / Luiz Eduardo Silva Marinho.- Diamantina, 2018.  
98 p. : il., tabs.

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Doenças. 2. Farmacologia. 3. Fungos Patogênicos. I. Verly, Rodrigo Moreira. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

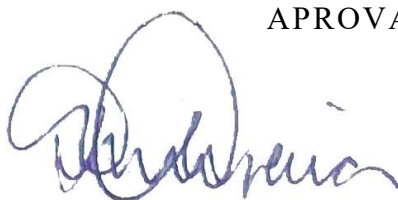
**CDD 616.969**

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DO MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOTRIAZOL-  
PEPTÍDEOS**

**LUIZ EDUARDO SILVA MARINHO**

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 / 04 / 2018



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. PATRÍCIA MACHADO DE OLIVEIRA – UFVJM



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. VIVIAN MACHADO BENASSI – UFVJM

Prof(a). Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY – UFVJM  
Presidente

DIAMANTINA  
2018



## AGRADECIMENTOS

É engraçado pensar que cada vida é uma história diferente que em algum momento se conecta com a vida de outro, talvez não sejamos o que somos em nossas vidas se riscarmos cada pessoa que passou por ela, mesmo que por algum instante.

Jamais poderia deixar de mencionar aqui alguns nomes, afinal isso é um agradecimento, e por mais que cada pessoa tenha sua importância, algumas tem o dom de se sobressair. Não posso em momento algum da minha vida deixar de agradecer aos meus pais, afinal além de me propiciarem a vida eles foram as pessoas que mais se esforçaram para que eu pudesse seguir o meu sonho, se hoje estou aqui, é graças aos seus esforços, obrigado Pai e Mãe.

Alguns dizem que ter irmã é uma coisa muito chata, em alguns momentos é fácil concordar, afinal quem mais tem o poder de lhe irritar neste mundo? Mas ainda sim, tolo é aquele que não é capaz de reconhecer a alegria em ter uma irmã, te motiva de um jeito único e podemos sempre contar com ela. Além de lhe agradecer pelo seu jeito de me empurrar para a frente e estar sempre presente, também preciso lhe agradecer por outras alegrias indiretas na vida, um cunhado que considero como irmão, e dois sobrinhos maravilhosos que amo muito, além de mais um que está por vir, do qual não duvido que também amarei.

Não posso deixar de mencionar aqui minha esposa, muitos anos de relacionamento, sempre ao meu lado, nos momentos tristes e felizes, talvez não saiba, mas lhe admiro muito pela pessoa que você é obrigado por estar sempre comigo, sinto que dizer te amo é pouco perto do que realmente sinto, mas é o que sei dizer.

Não seguirei o padrão dos agradecimentos convencionais, tomo a liberdade que essa parte nos dá e a junto a minha epígrafe. Ainda neste parágrafo deixo um agradecimento geral para cada professor, companheiro e colega de sala que me acompanharam nos últimos dois anos, por mais curto que tenha sido nosso convívio saibam que cada discussão, conversa e ensinamento estarão sempre em minha mente pelos caminhos que passarei, o apoio de vocês também foi algo importante.

Acho que nunca consegui transformar colegas em amigos tão rápido, a coisa fluiu quase que automática, obrigado a todos os colegas do LASEB, Gabriele, Lúcio, Lívia, Mainara, Carol e Kelton, pelo apoio, companheirismo, discussões e amizade.

Não poderia deixar de ressaltar três pessoas, que querendo ou não, são os responsáveis por eu estar apto a defender o meu mestrado. Primeiramente ao Victor,

grande professor, amigo e pessoa, sempre tentando se fazer presente e ajudar no que pode. Passamos muitos perrengues com os espectros de RMN, e acho que se não fosse você não teria conseguido, obrigado meu amigo.

Eu iria lhe pirraçar, juro que eu pensei em não mencionar, mas Talita, é bem difícil não realçar aqui do apoio na qualificação, o susto que levei quando o Rodrigo me pediu um texto de qualificação nos moldes da dissertação, faltando menos de 40 dias, tenho certeza que você também levou, se ela saiu no curto período que foi é graças a você. Obrigado por ser essa grande amiga e grande pessoa, não deveria, mas... obrigado por sempre ficar no meu pé, e saiba que da mesma forma que eu pude contar com você, pode contar comigo.

Por fim ao Rodrigo, sinceramente aqui não tenho o que dizer, afinal o que quer que eu escreva não será suficiente, aprendi muito com você e não posso lhe negar admiração, mais do que um orientador, um amigo e um verdadeiro mestre. Confesso que hoje você se tornou para mim um exemplo de como ser um grande professor/pesquisador.

Como disse, isso também seria uma epígrafe, então encerro citando Neil deGrasse Tyson, com algumas regras para a vida: (1) Questione a autoridade, (2) Nenhuma ideia é verdadeira só porque alguém diz que é, incluindo eu, (3) Pense por si próprio, questione a si próprio, (4) Não acredite em algo só porque quer acreditar, acreditar em algo não o torna verdadeiro, (5) Teste ideias pelas evidências adquiridas, pela observação e experimentação, (6) Se uma ideia prevalecente falhar num teste bem desenvolvido, está errada, supere, (7) Siga as evidências onde quer que elas levem, se não houver evidências, evite julgamento, (8) E talvez a regra mais importante de todas seja; Lembre-se, você pode estar errado.



## RESUMO

O uso de azóis para o combate de doenças causadas por fungos deu-se no final dos anos 60 com a introdução de dois medicamentos: o miconazole e o clotrimazole (Sheehan *et al.*, 1999). Entre os azóis uma importante classe recebe destaque, os triazóis, que apresentam uma diversificada aplicação farmacológica, podendo ser utilizados no tratamento de doenças superficiais, assim como em infecções sistêmicas (Sheehan *et al.*, 1999). Apesar do uso amplo e eficiente desses fármacos, estudos entre as décadas de 80 e 90 demonstraram o desenvolvimento de resistência a esses medicamentos por fungos como *Candida albicans* e *Paracoccidioidomycose brasiliensis* (Casalinuovo *et al.*, 2004). Contudo, além do uso como agentes microbicidas, essas moléculas mostram-se bastante atrativas devido à viabilidade em conectar dois fármacos e produzir uma nova molécula biofuncional (Petrova *et al.*, 2015). Ainda tratando de agentes microbicidas, os peptídeos antimicrobianos mostram-se uma eficiente alternativa à substituição de antibióticos convencionais, devido a sua alta seletividade e baixa toxicidade farmacológica (Ferreira *et al.*, 2015). O peptídeo antimicrobiano HSP1, isolado do anuro *Hyla punctata* é constituído por 14 resíduos de aminoácido (GILDAIKAIKAAG) e apresenta moderada atividade antimicrobiana (Prates *et al.*, 2004b). No entanto, estudos recentes mostraram que alterações estruturais nesse peptídeo elevaram consideravelmente a sua atividade antifúngica frente às culturas do gênero *Candida* (Junior *et al.*, 2017a). Neste trabalho foram sintetizados os análogos do HSP1 substituídos com unidades glicotriazólicas para estudos do efeito da presença do substituinte no modo de interação do peptídeo HSP1 com meios biomiméticos de membranas celulares.

Os estudos biofísicos de RMN, CD e ITC mostraram que a inserção das estruturas e glicotriazólicas não alteraram significativamente a estrutura helicoidal dos derivados glicotriazol de HSP1, contudo propiciam melhor interação do peptídeo pela inserção das unidades sacarídeas na interface das membranas fosfolipídicas. Além disso, foi possível verificar neste trabalho que a presença da unidade glicotriazol causou efeito significativo na degradação do ergosterol. Neste sentido, além de causar maior perturbação da bicamada fosfolipídica, devido à maior interação, a unidade glicotriazol atuou na degradação de um dos componentes fundamentais da membranas de fungos.

**Palavras-chave:** Peptídeo antimicrobiano, glicotriazol-peptídeo, atividade antifúngica.



## ABSTRACT

The use of azoids against infectious diseases caused by fungi has been started from 1960s with the introduction of the two drugs, miconazole and clotrimazole (Sheehan *et al.*, 1999). Between this class of molecules the triazoles can be highlighted, as present a diverse pharmacological application and may be used in the treatment of superficial diseases as well as in systematic infections (Sheehan *et al.*, 1999). Despite the wide and efficient use of these drugs, several studies has demonstrated the development of resistance to these drugs by fungi such as *Candida albicans* and *Paracoccidioidomycosis brasiliensis* (Casalinuovo *et al.*, 2004). Nevertheless, apart from the use as microbial agents, these molecules prove to be highly attractive due to the feasibility of connecting two drugs and producing new biofunctional molecules (Petrova *et al.*, 2015). Still dealing with microbial agents, antimicrobial peptides are an efficient alternative to substitution of conventional antibiotics mainly due to the high selectivity and low pharmacological toxicity (Ferreira *et al.*, 2015). The antimicrobial peptide HSP1, isolated from *Hyla punctata* anuran is composed by 14 amino acid residues (GILDAIKAIKAAG) presenting moderated antimicrobial activity (Prates *et al.*, 2004). However, recent studies have shown that structural changes in this peptide have considerably increased its antifungal activity against cultures of the genre *Candida* (Junior *et al.*, 2017). In this work, the analogs [trz-G1] HSP1, [p-Glc-trz-G1] HSP1 and [p-GlcNac-trz-G1] HSP1 were synthesized for studies of the effect caused in the peptide-membrane interaction by addition of glycotriazol moiety in the HPS1 structure.

The biophysical studies of NMR, CD and ITC revealed that although the insertion of glycotriazol moiety did not changes the helical structure of the HSP1, allow a greater peptide-membrane interaction by insertion of saccharidic units in the interface of the phospholipid bilayer. In addition, it was possible to verify that the presence of glycotriazole presents a significant effect on ergosterol degradation. In this regard, besides arise the peptide-membrane interaction, which in turn results in a membrane disruption, the presence of glycotriazol moiety also operates in the degradation of fundamental components of the fungi membrane composition.

**Key words:** *Antimicrobial peptide, glicotriazolic-peptide, antifungal activity.*



## Lista de ilustrações

<b>Figura 1:</b> Representação das estruturas substituintes dos análogos do HSP1 .....	3
<b>Figura 2:</b> Representação da estrutura terciária de peptídeos antimicrobianos. ....	5
<b>Figura 3:</b> Projeção helicoidal dos peptídeos antimicrobianos melitina e magainina. ....	6
<b>Figura 4:</b> Representação de modelos interação peptídeo-membrana. ....	7
<b>Figura 5:</b> Representação modelo de resistência bacteriano a partir da alteração da carga superficial da membrana. ....	9
<b>Figura 6:</b> Representação da ligação glicosídica (em verde) da N-acetilgalactosamina com a cadeia lateral da asparagina, Asn, (N-ligados) e serina, Ser, (O-ligados). ....	11
<b>Figura 7:</b> Esquema da síntese de peptídeo em fase sólida via estratégia Fmoc. ....	14
<b>Figura 8:</b> (A) Esquema da reação de cicloadição térmica 1,3-dipolar, envolvendo um grupo azida e alcino substituídos. (B) Estruturas de heterocíclicos azólicos aromáticos. ....	15
<b>Figura 9:</b> Esquema da reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por sais de cobre .....	16
<b>Figura 10:</b> Em (A), a representação das estruturas de ressonância do grupo azida e, em (B), o heterocíclico metálico proposto no primeiro mecanismo da reação “click”. ....	16
<b>Figura 11:</b> Mecanismo de reação para obtenção de derivados 1,2,3-triazol. ....	17
<b>Figura 12:</b> Padrões de espectros de Dicroísmo Circular para proteínas e peptídeos.....	18
<b>Figura 13:</b> Padrão termodinâmico de curvas endotérmica e exotérmica obtidas pela técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica. ....	19
<b>Figura 14:</b> Espectro 1D da ciclosporina. ....	20
<b>Figura 15:</b> Mapa de contorno <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY do peptídeo ciclosporina.....	21
<b>Figura 16:</b> Representação da estrutura química de um fragmento peptídico contendo resíduo de treonina e valina. ....	22
<b>Figura 17:</b> Exemplo do mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY para determinação de sistema de spins de um dipeptídeo. ....	23
<b>Figura 18:</b> Exemplo do mapa de contornos NOESY para o dipeptídeo. ....	24
<b>Figura 19:</b> Representação dos nOes de estrutura em α-hélice. ....	24
<b>Figura 20:</b> Estruturas dos principais fosfolipídios presentes na membrana celular com cadeias de ácido graxos de 1-Palmitoil-2-oleil-sn-glicero.....	25
<b>Figura 21:</b> Representação (A) das estruturas de DPC e SDS (B) e forma e tamanho das vesículas unilamelares. ....	27
<b>Figura 22:</b> Estruturas dos aminoácidos glicina e propargilglicina. ....	33
<b>Figura 23:</b> Representação das estruturas (A) da resina Rink <sup>®</sup> amida, (B) HOBT e (C) DIC.....	33

<b>Figura 24:</b> Esquema de reação da ativação do grupo carboxila para acoplamento do resíduo de aminoácido.....	34
<b>Figura 25:</b> Esquema de síntese para obtenção dos glicotriazol-peptídeo e triazol-peptídeo derivados do [Pra <sup>1</sup> ]HSP1.....	37
<b>Figura 26:</b> Perfil de CLAE da amostra bruta da síntese dos peptídeos (A) HSP1, (B) [Pra <sup>1</sup> ]HSP1 e (C) [trz-G <sup>1</sup> ]HSP1.....	44
<b>Figura 27:</b> Ionogramas MALDI-ToF/ToF obtidos no modo positivo para amostras brutas de (A) HSP1, (B) [Pra <sup>1</sup> ]HSP1, (C) [trz-G <sup>1</sup> ]HSP1, (D) [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 e (E) [p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1.....	45
<b>Figura 28:</b> Espectros unidimensionais <sup>1</sup> H dos peptídeos [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em azul, [p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em vermelho e [trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em preto, ampliação da região amídica, em solução de TFE (v/v).....	47
<b>Figura 29:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY parcial do [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	50
<b>Figura 30:</b> Representação da estrutura glicotriazol e sua nomenclatura definida.....	50
<b>Figura 31:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY parcial dos peptídeos (A) [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 e (B) [p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	51
Ampliação da região características de hidrogênios de açúcares.....	51
<b>Figura 32:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY parcial do [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	52
<b>Figura 33:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY parcial do [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 e [p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	54
<b>Figura 34:</b> Ampliação na região Ca e Ha do mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-HSQC editado para o [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	55
<b>Figura 35:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-HSQC editado parcial para o [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	56
<b>Figura 36:</b> Mapa de contornos sf- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HMQC parcial do [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	56
<b>Figura 37:</b> Projeção da estrutura tridimensional prévia do (A) [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 e (B) HSP1.....	57
<b>Figura 38:</b> Espectros unidimensionais <sup>1</sup> H dos peptídeos [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em azul e [p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em vermelho, ampliação da região amídica, em solução de SDS 500 mM.....	58
<b>Figura 39:</b> Mapa de contornos <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY parcial do [p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de SDS 500 mM.....	59

<b>Figura 40:</b> Mapa de contornos $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de SDS 500 mM. ....	59
<b>Figura 41:</b> Mapa de contornos $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial dos peptídeos (A) [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 e (B) [p-GlcNac-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de SDS 500 mM. ....	60
Ampliação da região características de hidrogênios de açúcares. ....	60
<b>Figura 42:</b> Mapa de contornos $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de SDS 500 mM. ....	61
<b>Figura 43:</b> Mapas de contornos $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de SDS 500 mM. ....	62
<b>Figura 44:</b> Estrutura tridimensional do peptídeo [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 em (A) solução de TFE 30% (v/v) (B) e em presença de meio micelar de SDS. ....	63
<b>Figura 45:</b> Espectros de CD obtidos em (A) solução de TFE 30% (v/v) e (B) micelas de SDS na concentração de 200 mM. ....	64
<b>Figura 47:</b> Isotermas de titulação calorimétrica para os peptídeos HSP1 e [trz- $G^1$ ]HSP1 em POPC:POPG (3:1) em tampão tris-HCl em pH 8,5. ....	66
<b>Figura 48:</b> Isotermas de titulação calorimétrica para os peptídeos [p-Glc-trz- $G^1$ ]HSP1 e [p-GlcNac-trz- $G^1$ ]HSP1 em POPC:POPG(3:1) em tampão tris-HCl em pH 8,5. ....	67
<b>Figura 46:</b> Dados da taxa de degradação de ergosterol por peptídeo. ....	69
<b>Anexo 1:</b> Estrutura dos vinte aminoácidos essenciais. ....	83
<b>Anexo 2:</b> Esquema representativo dos sistemas de spins com os respectivos deslocamentos químicos característicos para os diferentes resíduos de aminoácidos. ....	84
<b>Anexo 3:</b> Mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do [p-GlcNac-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de TFE 30%. ....	85
<b>Anexo 4:</b> Mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do [p-GlcNac-trz- $G^1$ ]HSP1 em solução de TFE 30%. ....	85





## Lista de tabelas

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do HSP1.....	2
Tabela 2: Soluções utilizadas para o teste de Kaiser.....	35
Tabela 3: Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN para os peptídeos [ <i>p</i> -Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1, e [ <i>p</i> -GlcNac-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em soluções de TFE 30% v(v) e 200 mM de SDS.....	41
Tabela 4: Condições e acompanhamento da síntese do HSP1 e [Pra <sup>1</sup> ]HSP1 .....	43
Tabela 5: Conteúdo helicoidal calculado para os peptídeos HSP1, [trz-G <sup>1</sup> ]HSP1, [ <i>p</i> -Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 e [ <i>p</i> -GlcNac-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em soluções de TFE 30% (v/v) e micelas 200 mM de SDS....	65
Anexo 5: Tabela de deslocamento químico dos resíduos de aminoácido de 1 a 13 do peptídeo [ <i>p</i> -Glc-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).....	86
Anexo 6: Tabela de deslocamento químico dos resíduos de aminoácido de 1 a 13 do peptídeo [ <i>p</i> -GlcNac-trz-G <sup>1</sup> ]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v). .....	87



**Lista de abreviaturas e siglas**

- Ac.** – Ácido
- Boc** – *t*-butoxicarbolina
- CD** – Dicroísmo circular
- CHCA** – ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CMC** – Concentração micelar crítica
- DCM** – Diclorometano
- DHB** – 2,5-dihidroxibenzeno
- DIC** - diisopropilcarbodiimida
- DIPEA** – *N,N*-diisopropiletilamina
- DMF** – Dimetilformamida
- DPC** – Dodecilsulfocolina
- Fmoc** – 9-fluorenilmetoxicarbonila
- GalNAc** – *N*-acetilgalactosamina
- GUV** – Vesículas unilamelares gigantes, do inglês *Giant unilamellar vesicle*
- HBTU** – hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
- HMQC** – Espectroscopia de correlação heteronuclear múltiplo quantum, do inglês *Heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy*
- HSQC** – Espectroscopia de correlação heteronuclear simples quantum, do inglês *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*
- IPA** – Álcool isopropílico
- LUV** – Vesículas unilamelares grandes, do inglês *Large unilamellar vesicle*
- nOe** – Correlação de efeito *Overhouse* nuclear
- NOESY** – Espectroscopia de efeito *Overshouse* nuclear, do inglês *Nuclear Overshouse spectroscopy*
- PAM** – Peptídeo(s) antimicrobiano(s)
- PC** – Fosfatidilcolina
- PE** – Fosfatidiletanolamina
- PG** – Fosfatidilglicerol
- p*-GlcNac-trz** – *per-O-acetilado-N*-acetilglicosamina-triazol
- p*-Glc-trz** – *per-O-acetilado-N*-acetilglicose-triazol
- PI** – Fosfatidilinositol

**PS** – Fosfatidilserina

**RMN** – Ressonância magnética nuclear

**SDS** – Dodecilsulfato de sódio

**SPFS** – Síntese peptídica em fase sólida

**SUV** – Vesículas unilamelares pequenas, do inglês *Small unilamellar vesicle*

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**TFE** – 2,2,2-Trifluoroetanol

**THF** - Tetraidrofurano

**TOCSY** – Espectroscopia de correlação total, do inglês *Total correlation spectroscopy*

**trz** – Triazol

**Lista de símbolos**

$\text{Å}$  – Ångström

$B_0$  – Campo magnético indutivo

$I$  – Número de *spin*

$\Delta H$  – Variação de entalpia

$\Delta S$  – Variação de entropia

$\Delta G$  – Variação da energia livre de Gibbs

$K$  – Constante de afinidade/partição

$H$  – Helicidade molar



## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	5
2.1.1 Resistência microbiana.....	8
2.1.2 Modificação Estrutural de Peptídeos.....	10
2.1.3 Glicopeptídeos.....	11
2.2 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA.....	13
2.2.1 Reação “ <i>click</i> ” para obtenção de glicopeptídeo-triazóis.....	15
2.3 ESTUDOS DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO-MEMBRANA.....	18
2.3.1 RMN no Estudo de Peptídeos .....	20
2.3.2 Meios Biomiméticos de Membrana .....	25
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
4.1. MATERIAIS E REAGENTES .....	31
4.2. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS .....	33
4.2.1. Síntese dos Análogos do Peptídeo HSP1 .....	36
4.3. CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA SÍNTESE.....	37
4.4. PREPARO DAS VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS UNILAMELARES.....	38
4.5. DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	39
4.6. DEGRADAÇÃO DE ERGOSTEROL .....	39
4.7. CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) .....	40
4.8. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) EM SOLUÇÃO.....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO HSP1 E ANÁLOGOS .....	43
5.2 ESTUDOS ESTRUTURAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM SOLUÇÃO	47

5.2.1 Meio biomimético de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) .....	47
5.2.2 Meio Biomimético de SDS .....	58
5.3 DICROÍSMO CIRCULAR (CD) .....	64
5.4 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) .....	65
5.4 DEGRADAÇÃO DE ERGOSTEROL .....	68
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>8 ANEXOS</b> .....	<b>83</b>
8.1 FIGURAS E TABELAS .....	83



## 1 Introdução

Todos os anos um grande número de pessoas são infectadas por doenças causadas por fungos, tendo uma grande contribuição para o índice de mortalidade (Müller *et al.*, 2017). Atualmente, os principais medicamentos utilizados no combate desses patógenos são aqueles cuja constituição baseia-se em derivados de triazóis. O principal fármaco antifúngico presente no mercado é o Fluconazol, apresentando em sua constituição dois anéis triazóis, e presente no mercado desde a década de 60 (Casalnuovo *et al.*, 2004). No entanto, apesar de sua eficácia, tem sido relatado resistência ao combate de fungos do gênero *Candida* desde o seu emprego terapêutico (Georgopapadakou e Tkacz, 1995). Estudos com foco no desenvolvimento de fármacos para o combate de doenças causadas por fungo ainda são muito escassos, tornando medicamentos já estabelecidos há décadas como o Fluconazol, ainda líderes de mercado (Müller *et al.*, 2017).

Os peptídeos antimicrobianos têm surgido como uma alternativa a esses agentes antifúngicos e outros antibacterianos mostrando-se bastante efetivos no combate a esses patógenos, revelando resultados ainda mais eficientes do que os fármacos de controle (Matejuk *et al.*, 2010). Diferentemente de antibióticos convencionais, que atuam em alvos específicos da célula bacteriana, os peptídeos interagem diretamente com a membrana bacteriana, causando sua ruptura e resultando na morte celular. Neste sentido, tais moléculas são mais resistentes ao desenvolvimento da resistência bacteriana e têm se tornado alvos de interesse de estudos (Lakshminarayanan *et al.*, 2014).

Essas biomoléculas ainda podem ser modificadas estruturalmente para ampliar seu potencial terapêutico, como por exemplo, a adição de unidades sacarídeas para obtenção de glicopeptídeos. O peptídeo HSP1, isolado do anuro *Hyla punctata*, é constituído por 14 resíduos de aminoácidos (GILDAIKAIKAAG) e demonstra baixa atividade antimicrobiana (Prates *et al.*, 2004). Esse peptídeo apresenta em sua estrutura dois resíduos de lisina e um resíduo de aspartato, o que confere uma carga líquida de +1. Apesar de catiônico, a carga líquida é inferior àquela encontrada em peptídeos que apresentam boa atividade antimicrobiana, estes variando geralmente entre +2 a +9 (Travkova *et al.*, 2017). Além disso, os outros onze resíduos de aminoácidos são apolares, ressaltando as características hidrofóbicas da estrutura.

Provavelmente, essas características são as responsáveis pela baixa atividade desse peptídeo, dificultando um primeiro contato peptídeo-membrana. No entanto, um estudo recente apontou que a inserção de cadeias sacarídeas em sua estrutura, foram capazes de

elevar o potencial antifúngico dessa molécula (TAB. 1) frente à culturas do gênero *Candida* (Junior *et al.*, 2017). No entanto, a contribuição da unidade sacarídea e do grupo triazol para a atividade antifúngica não está clara. Tendo em vista que os triazóis já são importantes agentes antifúngicos atuando diretamente no bloqueio da biossíntese do ergosterol (Kathiravan *et al.*, 2012). Foi possível observar que apenas a inserção do anel triazólico já havia sido capaz de elevar a atividade antifúngica do peptídeo.

**Tabela 1:** Atividade antimicrobiana do HSP1.

Linhagens Bacterianas	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>				
	HSP1-NH <sub>2</sub>	[trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	[p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	[p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	188	185	170	155	93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94	95	80	76	93
<i>Escherichia coli</i>	188	185	170	155	93
<i>Candida spp.</i>	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> /MFC <sup>b</sup>				
	HSP1-NH <sub>2</sub>	[trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	[p-Glc-trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	[p-GlcNAc-trz-G <sup>1</sup> ] HSP1-NH <sub>2</sub>	5-fluorocitosina
<i>Candida tropicalis</i>	149,90	80,50	46,27	44,01	27,13
<i>Candida parapsilosis</i>	138,10	75,70	29,88	33,60	26,75
<i>Candida krusei</i>	136,90	65,60	22,30	11,96	85,53

MIC<sup>a</sup> = Concentração inibitória mínima

MFC<sup>b</sup> = Concentração fungicida mínima

Fonte: Adaptado de Júnior *et al.*, 2017.

A glicosilação de peptídeos e proteínas apresenta um papel fundamental na estrutura e na estabilidade térmica dessas moléculas (Siegal *et al.*, 1981). Além disso, foi verificado que a glicosilação de peptídeos naturais pode aumentar a sua solubilidade, evitar a degradação enzimática, elevar o potencial biológico e propriedades farmacocinéticas (Sinclair e Elliott, 2005). Somado a isto, compostos heterocíclicos como os triazóis são comumente utilizados no preparo e uso de diversos fármacos sendo importantes elementos para potencialização dos mesmos (Melo *et al.*, 2006). Essas estruturas atuam diretamente na inibição da biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana celular dos fungos e importante biorregulador da fluidez da membrana, da simetria e da integridade destes organismos (Kathiravan *et al.*, 2012). Capacidade essa relacionada à afinidade dessas estruturas com a enzima esterol 14 $\alpha$ -demetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (Casalinuovo *et al.*, 2004).

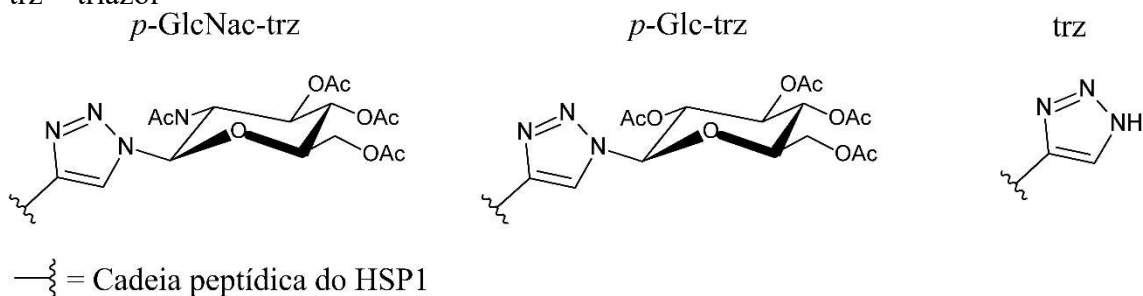
Os derivados glicotriazólicos (FIG. 1) do peptídeo HSP1 foram sintetizados a partir da reação de cicloadição [3+2] entre carboidratos azida e alcino terminal. A caracterização estrutural revelou que a reação “click” para síntese dos peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> é altamente regioseletiva, não havendo formação significativa de outras glicofomas. Os estudos biofísicos realizados até o momento (Junior *et al.*, 2017) sugerem um efeito sinérgico do anel triazol e dos açúcares no aumento da interação e inibição da biossíntese do ergosterol. Entretanto, ainda são necessários estudos estruturais, de interação e biológicos para uma melhor compreensão do papel do carboidrato e do grupo triazol nas alterações na atividade antifúngica.

**Figura 1:** Representação das estruturas substituintes dos análogos do HSP1

*p*-GlcNac-trz = *per*-*O*-acetilado-*N*-acetilglicosamina-triazol

*p*-Glc-trz = *per*-*O*-acetilado-*N*-acetilglicose-triazol

trz = triazol



Neste contexto, o presente trabalho apresenta a síntese dos glicotriazol-peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e do triazol-peptídeo [Trz-G<sup>1</sup>]HSP1 através da síntese em fase sólida via estratégia Fmoc conjugada a reação de cicloadição com azida de açúcares. As moléculas obtidas foram empregadas em estudos estruturais por RMN na presença de meios biomiméticos de SDS e solução de TFE, assim como estudos termodinâmicos por ITC, empregando-se vesículas fosfolipídicas de POPC:POPG (3:1) como ambientes de membrana. Além disso, foi avaliada a capacidade de oxidação do ergosterol pelos peptídeos obtidos, tendo por objetivo verificar se a capacidade antifúngica desses peptídeos está relacionada à sua capacidade de inibição da síntese do ergosterol ou degradação do ergosterol presente na parede celular. De posse dos resultados aqui demonstrados, o trabalho busca uma abordagem a respeito da relação estrutura e reatividade dos glicotriazol-peptídeos que permita descrever o modo de ação dessas moléculas frente a micro-organismos patogênicos como fungos e bactérias.



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Peptídeos Antimicrobianos

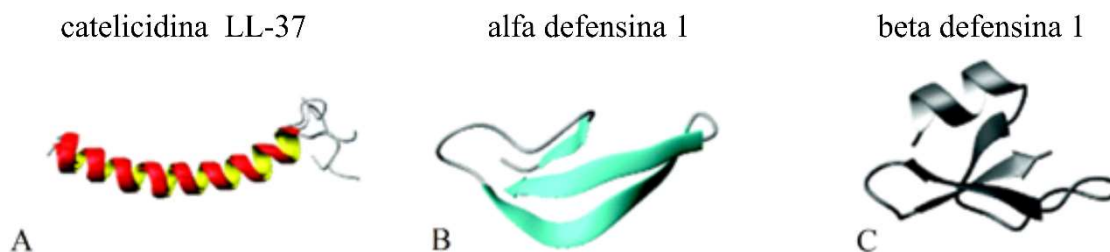
Constituídos, em média, por 10 a 50 resíduos de aminoácidos, os peptídeos antimicrobianos (PAM) são uma importante parte do sistema imune inato, atuando contra bactérias, fungos, parasitas e vírus (Diamond *et al.*, 2009). Essas moléculas são isoladas dos mais diversos organismos vivos, dentre eles: mamíferos, plantas e anfíbios (Jenssen *et al.*, 2006). Devido às suas propriedades farmacossinérgicas, estudos avaliam variadas sequências peptídicas, extraídas de diferentes espécies, como antibióticos alternativos (Bradley Scott Perrin *et al.*, 2014; Rahnamaeian *et al.*, 2015; Verly *et al.*, 2017).

O modo de ação desses peptídeos vai desde a interação e desorganização da membrana bacteriana até a sua inserção e interação com alvos intracelulares de bactérias (Kosikowska e Lesner, 2016). A ação na membrana celular pode resultar em diversos danos ao micro-organismo, tais como: (1) aumento ou redução da espessura devido à incorporação do peptídeo na membrana; (2) formação de poros levando ao aumento do influxo ou efluxo no interior da célula; (3) ancoramento do peptídeo à camada externa, alterando a carga superficial líquida; (4) micelação de partes da membrana provocando lise celular (Nguyen *et al.*, 2011).

A interação de peptídeos antimicrobianos com as membranas fosfolipídicas de células bacterianas estão, em grande parte, relacionados a conformação adotada pelo peptídeo, comumente  $\alpha$ -hélice e/ou  $\beta$ -folha (FIG. 2) (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

**Figura 2:** Representação da estrutura terciária de peptídeos antimicrobianos. (A)  $\alpha$ -hélice da catelicidina LL-37, em (B)  $\beta$ -folha da alfa defensina 1 e (C) estrutura terciária da beta defensina 1 contendo as conformações de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha.

Fonte: Adaptado de Wang, 2013.

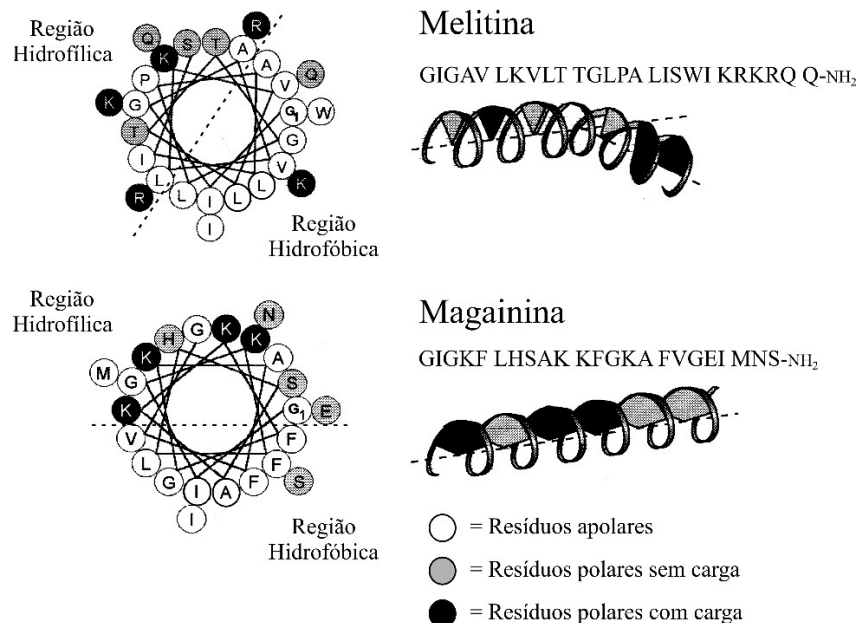


Normalmente, peptídeos antimicrobianos apresentam conformação desenovelada quando encontram-se em solução aquosa. Entretanto, em contato com a membrana

celular, ocorrem mudanças conformacionais dos PAM, resultando em uma melhor separação das porções hidrofóbicas e hidrofílicas (FIG. 3), formando assim uma estrutura anfipática que permite maior interação com a bicamada fosfolipídica (Dathe e Wieprecht, 1999). A grande maioria dos PAM é catiônica, ou seja, possui carga líquida positiva devido a predominância de resíduos de lisina, arginina e histidina em suas porções hidrofílicas. Tal característica também é fundamental para uma atração eletrostática com a camada externa da membrana bacteriana, predominantemente negativa (Bechinger *et al.*, 2004; Auer e Weibel, 2017). Juntamente a isto, são otimizadas as interações da face hidrofóbica do peptídeo com a região interna da bicamada fosfolipídica (Galdiero *et al.*, 2013) Assim, há uma melhora na capacidade de permeabilização do peptídeo na membrana celular e por consequência a desorganização da mesma, resultando na morte celular.

**Figura 3:** Projeção helicoidal dos peptídeos antimicrobianos melitina e magainina. Os desenhos ainda apresentam a projeção do eixo das hélices anfipáticas, onde o tracejado divide as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas das estruturas.

Fonte: Adaptado de Dathe e Wieprecht, 1999.



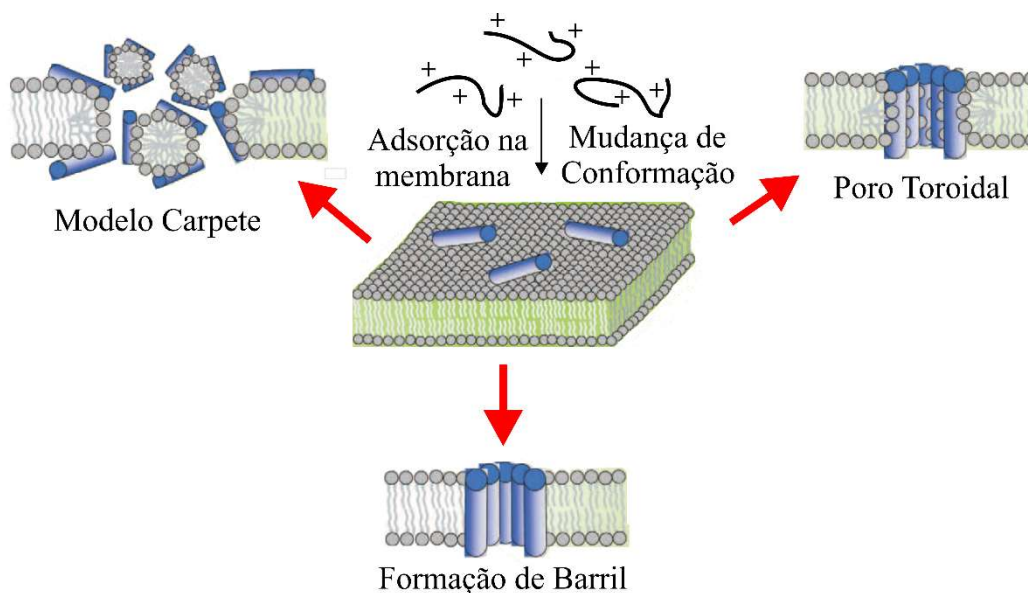
No entanto, como peptídeos são macromoléculas compostas por diversos resíduos de aminoácidos, esses não ficam distribuídos totalmente de forma homogênea pela estrutura, sendo comum encontrar alguns resíduos polares na região hidrofóbica, ou vice-versa (Dathe e Wieprecht, 1999). A hidrofobicidade é definida de acordo com o número de resíduos hidrofóbicos (apolares) presentes na sequência, tendo relação direta com a capacidade de penetração do peptídeo na membrana. A hidrofilicidade, por sua vez, está

relacionada com o número de resíduos hidrofílicos (polares) presentes na sequência, estes podendo ou não apresentar carga, sendo responsável pelas interações eletrostáticas e ancoramento dos PAM na membrana (Yeaman e Yount, 2003; Mojsoska *et al.*, 2015).

Diversos modelos de interação peptídeo-membrana são apresentados por Nguyen *et al.*, (2011), como poro toroidal, barril e tapete. A inserção perpendicular dos PAM pode ser caracterizada como interações por poro toroidal e barril. No poro toroidal, o peptídeo insere-se na bicamada fosfolipídica, ocasionando a formação de pequenos poros na membrana e aumentando a fluidez da célula. O barril não é muito diferente, porém são peptídeos agrupados levando a formação de um único grande poro. O tapete, por sua vez, são interações paralelas com a membrana, onde, posteriormente, o peptídeo começa a formar micelas em torno da estrutura fosfolipídica. Essas micelas deixam “buracos” na membrana, ocasionando a perda do controle osmótico pela célula. A FIG. 4 apresenta um esquema desses mecanismos de atuação de peptídeos em membranas procarióticas.

**Figura 4:** Representação de modelos interação peptídeo-membrana.

Fonte: Adaptado de Nguyen *et al.*, 2011.



Por outro lado, as células eucarióticas, como a de mamíferos, apresentam carga líquida nula, ou seja, uma membrana com caráter zwitteriônico. Por conta disso, há pouca interação eletrostática dessas células com os PAM. Esse tipo de mecanismo de ação faz com que os PAM sejam bastante seletivos e apresentem baixa toxicidade a essas células (Guilhelmelli *et al.*, 2013), e baixíssimas taxas de hemólise, que, muitas vezes, ocorrem

em concentrações muito maiores do que as necessárias para a atividade antibacteriana (Mojsoska *et al.*, 2015).

### 2.1.1 Resistência microbiana

As bactérias podem adquirir resistência a partir de alterações no DNA, podendo ocorrer através de uma mutação a partir de uma indução do meio ou falha na reprodução, ou uma adaptação a partir da assimilação de um DNA externo que contém genes de resistência (Bradford, 2001). Resultando, assim, em diferentes mecanismos de resistência, sendo os mais comuns: (1) alteração de permeabilidade, (2) alteração do sítio de ação e (3) bomba de efluxo.

A permeabilidade da membrana de bactérias Gram-negativas consiste na presença de uma proteína especial, a porina (Tortora *et al.*, 2012). Modificações nessa proteína podem acarretar no desenvolvimento de resistência microbiana, devido a exclusão de alvos específicos de ligação dos fármacos (Nikaido, 1994).

Outro mecanismo de resistência bacteriana está relacionado à alteração de sítios ativos aos antibióticos. Muitos agentes terapêuticos atuam ligando-se em regiões específicas de moléculas alvo para exercerem a sua função antimicrobiana, desse modo, algumas bactérias, a partir de modificações no DNA, são capazes de codificarem proteínas que inativam ou alteram a região de ligação desses medicamentos, tornando a célula menos suscetível a esses agente microbicidas (Rice, 2006).

A bomba de efluxo também consiste na produção de proteínas para inibirem a atividade do fármaco, no entanto, diferente da alteração nos sítios de ligação, essas moléculas ligam-se diretamente ao fármaco levando-os para fora da célula (Delmar *et al.*, 2014).

Embora menos, micro-organismos desenvolvem resistência também aos PAM após modificações estruturais na membrana celular. No caso de bactérias Gram-negativas tem-se a incorporação de estruturas 4-aminoarabinose a um importante lipídio da parede celular, já para as Gram-positivas possuema incorporação de lisilfosfatidilglicerol aos ácidos teicóicos presentes na membrana, reduzindo assim o seu caráter aniônico (Andersson *et al.*, 2016). Como a atividade dos peptídeos está associada à sua capacidade de interagir com a membrana microbiana, logo, essa alteração da carga superficial

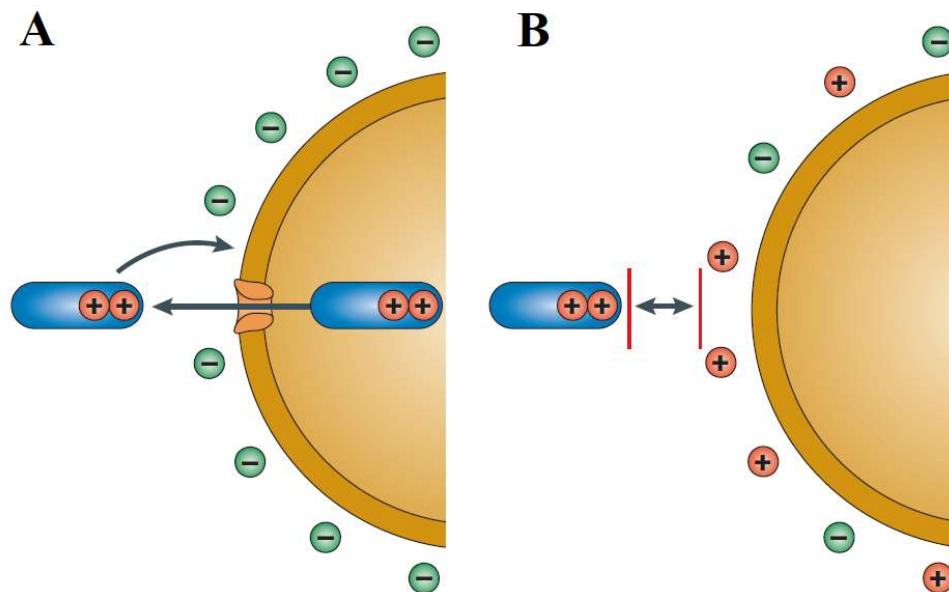


enfraquece as interações eletrostáticas, que no caso dos peptídeos catiônicos são o principal meio de contato peptídeo-membrana (FIG. 5) (Peschel e Sahl, 2006).

**Figura 5:** Representação do modelo de resistência bacteriano a partir da alteração da carga superficial da membrana.

(A) Membrana aniônica e interação com peptídeo antimicrobiano catiônico, (B) Desenvolvimento de resistência a partir da alteração da carga superficial.

Fonte: Adaptado de Peschel e Sahl, 2006.



Os fungos apresentam mecanismos de resistência bastante semelhantes ao das bactérias, no entanto, por possuírem membrana zwitteriônica são menos seletivos aos PAM de caráter catiônicos (Zasloff, 2002). No entanto, os medicamentos antifúngicos mais comuns diferem-se do mecanismo de ação dos antibacterianos, tendo como principal foco a inibição da síntese do ergosterol, principal esterol constituinte da membrana celular desses organismos (Kathiravan *et al.*, 2012).

A grande maioria das células eucarióticas tem como um dos principais constituintes da membrana celular os esteróis. Essas moléculas apresentam como principal função regular a fluidez da célula e garantir a rigidez da membrana inibindo a lise celular (Tortora *et al.*, 2012). Os fármacos usados no combate a doenças causadas por fungos atuam inibindo a atividade da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dimetilase (CYP51), reduzindo drasticamente a produção do ergosterol na célula. Consequentemente, são formados poros na membrana plasmática que leva a um desequilíbrio do processo homeostático da célula, causando morte celular (Aher *et al.*, 2009). Como forma de resistência, alguns fungos modificam a rota biosintética do ergosterol, alterando sítios de ligações ou produzindo

proteínas bomba de efluxo que expulsam os agentes antimicrobianos (Thomas *et al.*, 2013).

Os PAM apesar do potencial antimicrobiano, apresentam algumas limitações como agentes terapêuticos, principalmente devido à suscetibilidade a processos metabólicos, como proteólise (Moradi *et al.*, 2016). No entanto, diferentes estratégias vêm sendo exploradas para reduzir essas limitações e contornar o desenvolvimento de resistência frente a agentes antimicrobianos, entre elas a modificação estrutural de peptídeos antimicrobianos (Ferreira *et al.*, 2015; Paradis-Bas *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Modificação Estrutural de Peptídeos

As principais metodologias utilizadas em modificações estruturais de peptídeos consistem na substituição de resíduos da cadeia principal ou na adição de moléculas bioativas na estrutura peptídica (Schmidtchen *et al.*, 2014). Essas alterações buscam modificar as propriedades físico-químicas dessas biomoléculas, de modo a elevar o seu potencial antimicrobiano. Os estudos da relação estrutura-atividade realizados para o peptídeo esculetina-1a, mostraram que a substituição de alguns resíduos para aumentar a estabilidade da estrutura secundária, foi capaz de elevar consideravelmente seu potencial farmacológico (Biondi *et al.*, 2016).

Assim como a substituição de resíduos, a adição de moléculas bioativas em cadeias peptídicas tem se mostrado uma boa alternativa. A adição de anéis de cumarina ao peptídeo Ubiquidina (UBI) apontaram uma maior seletividade e atividade quando comparadas a estrutura original do UBI (Ferreira *et al.*, 2015).

Alterações estruturais também podem representar uma boa estratégia contra os mecanismos de resistência de bactérias e fungos. Dentre as muitas possibilidades é possível destacar a inserção de unidades sacarídeas às cadeias peptídicas (Zeng *et al.*, 2016).

A introdução de carboidratos ou glicosilação em peptídeos é bastante vantajosa devido a diversos fatores, tais como: (1) o aumento da especificidade e biodistribuição; (2) a melhor capacidade de permeabilização em membranas; (3) o aumento da estabilidade metabólica; (4) a melhor ligação com receptores; (5) funcionam como grupo protetor de cadeia lateral; (6) além da modificação das propriedades físico-químicas dos peptídeos, por exemplo maior solubilidade e menor formação de agregados (Moradi *et*

*al.*, 2016). Além disso, essas estruturas são encontradas naturalmente nos organismos vivos, dificultando assim o desenvolvimento de resistência pelos patógenos.

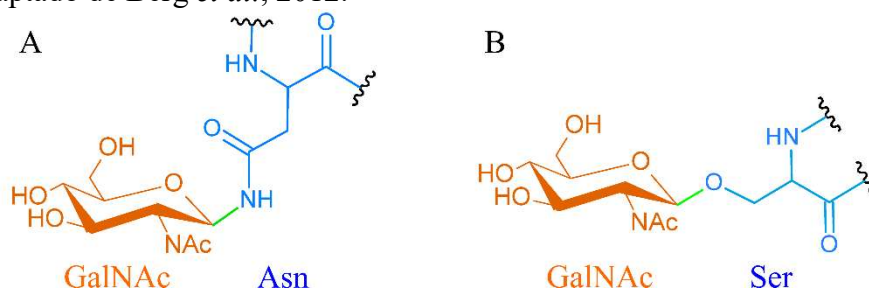
### 2.1.3 Glicopeptídeos

Naturalmente, glicopeptídeos e glicoproteínas são encontrados na membrana citoplasmática de seres vivos (Crucho *et al.*, 2015). Desempenham importantes papéis biológicos, desde funções básicas até mais complexas, auxiliando processos de: (1) secreção; (2) segmentação celular que ocorre após a fecundação; (3) comunicação intercelular; (4) resposta imune; (5) transporte de nutrientes e (6) são componentes estruturais da membrana (Pratt e Bertozzi, 2005).

Essas biomoléculas podem ser constituídas por uma ou mais cadeias de açúcares ligados a uma cadeia polipeptídica. Nos organismos, a glicosilação ocorre através de um processo enzimático, o qual promove a formação de uma ligação covalente entre o carbono anomérico (carbono hemiacetal) de uma unidade sacarídea e a cadeia lateral de aminoácidos como asparagina, serina ou treonina (Berg *et al.*, 2012; Crucho *et al.*, 2015). Em glicopeptídeos, a glicosilação (FIG. 6) frequentemente ocorre através da reação entre o nitrogênio amídico da cadeia lateral do resíduo de asparagina (*N*-glicosilados), ou o átomo de oxigênio da cadeia lateral da serina ou treonina (*O*-glicosilados), com o carbono anomérico da cadeia sacarídea (Nelson e Cox, 2014).

**Figura 6:** Representação da ligação glicosídica (em verde) da *N*-acetilgalactosamina com a cadeia lateral da asparagina, Asn, (*N*-ligados) e serina, Ser, (*O*-ligados).

Fonte: Adaptado de Berg *et al.*, 2012.



Devido à variabilidade da composição e do tamanho das cadeias peptídicas, juntamente à diversidade estrutural dos carboidratos, diferentes formas glicosiladas (glicofomas) podem ser originadas (Berg *et al.*, 2012; Wiederschain, 2013).

Assim como os PAM, os glicopeptídeos não possuem um mecanismo de ação definido, ou seja, não apresentam alvos celulares específicos. No entanto, a presença

destes açúcares atenua a capacidade de interação com a membrana, incluindo outros componentes celulares, como a parede e alguns receptores específicos (Wiederschain, 2013; Olsufyeva e Tevyashova, 2017). Por exemplo, foi notado que alguns desses peptídeos como a vancomicina, ligam-se aos precursores do peptideoglicanos inibindo sua síntese (Bi *et al.*, 2015). Os peptideoglicanos são formados pelos açúcares *N*-acetilmurânico e *N*-acetilglucosamina, ligados à aminoácidos. A estrutura dos peptideoglicanos confere rigidez à parede celular de bactérias, assim protegendo a membrana da lise celular (Tortora *et al.*, 2012). Além dessas características, os açúcares podem ser utilizados como “âncoras” que são facilmente reconhecidas por diversos constituintes da membrana. Dessa forma, podem funcionar como sinalizadores, permitindo que fármacos em potencial, porém de difícil reconhecimento pela célula, possam ser ligados em sua cadeia (Zeng *et al.*, 2016).

Diante dessa diversidade de atividades, os glicopeptídeos tornaram-se interessantes para o desenvolvimento de novas estruturas com potencial farmacológico (Crucho *et al.*, 2015). Neste contexto, métodos de síntese em laboratório vêm sendo desenvolvido para promover a glicosilação de peptídeos bioativos (Moradi *et al.*, 2016). As ligações glicosídicas são sensíveis às condições ácidas e básicas, no entanto, a preparação de glicopeptídeos pode ser conduzida através da síntese em fase sólida em conjunto com a reação “click” de forma simples e confiável (Mdownell *et al.*, 2001; Bardin *et al.*, 2004). A síntese em fase sólida tem se mostrado uma das melhores alternativas para a obtenção de peptídeos, além de ser uma técnica já consolidada possui um excelente custo benefício devido a seus altos rendimentos quando comparada a outras técnicas (Jensen, 2013).

## 2.2 Síntese Peptídica em Fase Sólida

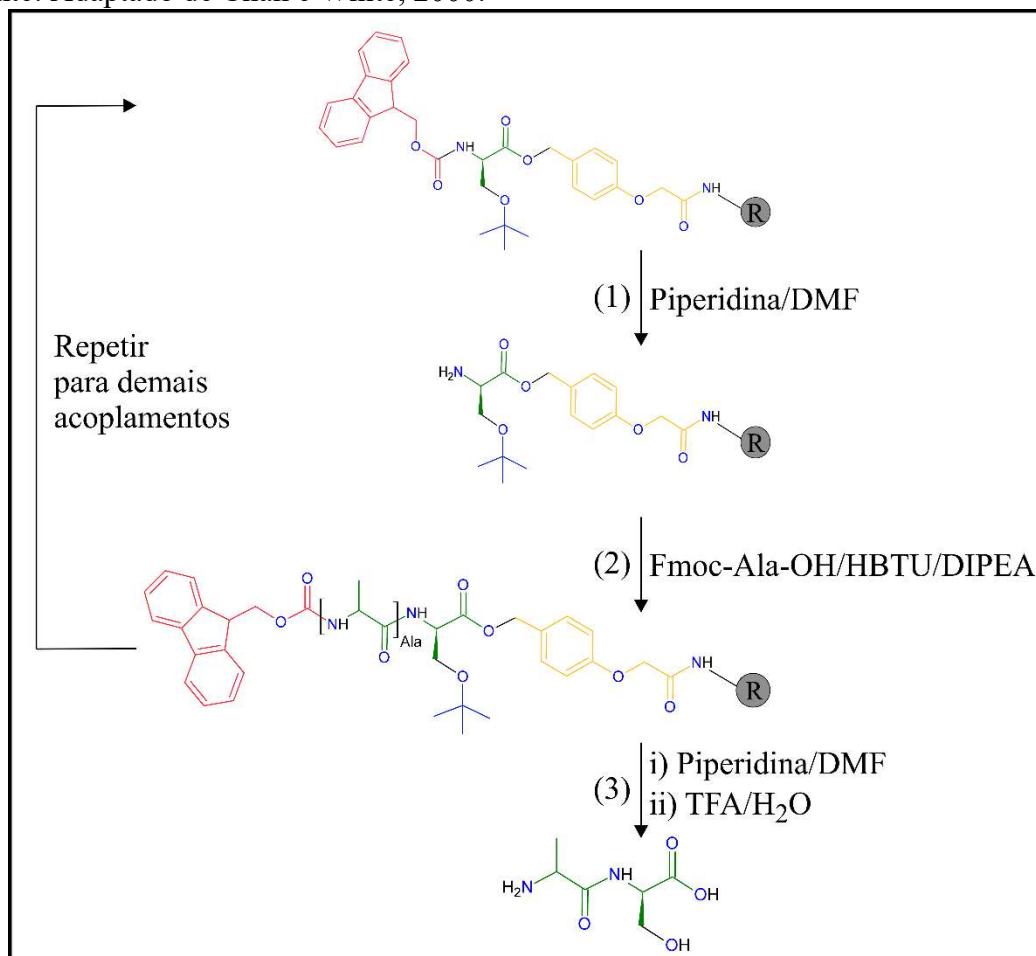
A síntese peptídica em fase sólida (SPFS) foi uma técnica inserida em 1963 por Merrifield. A SPFS utiliza um suporte polimérico sólido, insolúvel e funcionalizado com grupos ligantes (Coin *et al.*, 2007). Esses grupos ligantes variam de acordo com cada tipo de estratégia empregada, sendo duas delas as mais difundidas. Em ambas, todos os derivados de aminoácidos envolvidos na síntese possuem o seu grupo amino protegido. Em ambas as estratégias o nome é derivado do grupo protetor empregado, implicando em suas diferenças, sendo eles: o *t*-butoxicarbolina (Boc) ou 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc). Para o grupo protetor Boc, as condições de reação para promover a desproteção necessitam de meios ácidos, enquanto o Fmoc, são empregadas condições básicas (Jensen, 2013).

Nos últimos anos a síntese via estratégia Fmoc tornou-se mais difundida devido à uma série de fatores, como a fácil automatização do processo, a não exigência do uso de reagentes corrosivos, como o ácido trifluoroacético (TFA) empregado nas etapas de desproteção da estratégia Boc. Além disso, na etapa de desproteção do Fmoc são formados grupos fluorenos de elevada absorção na região do ultravioleta, o que pode ser utilizado no monitoramento da síntese (Behrendt *et al.*, 2015).

A SPFS via estratégia Fmoc consiste em uma sequência de etapas envolvendo acoplamentos, desproteção e clivagem (FIG. 7 p 14). Na primeira etapa da reação (1) chamada desproteção, o grupo protetor Fmoc é removido em meio básico com uma solução de piperidina. Na segunda etapa da reação (2), conhecida com etapa de acoplamento, o derivado de aminoácido ativado por catalisadores carbodiimidás e derivados de ésteres é inserido na cadeia desprotegida anteriormente. As etapas (1) e (2) são repetidas até a obtenção de toda a sequência peptídica desejada. Ao final da síntese, é realizada a terceira etapa da reação (3) denominada de clivagem. Na etapa de clivagem, ocorre a última desproteção do grupo Fmoc da peptidil-resina e, finalmente, é realizada a remoção dos grupos protetores de cadeia lateral e clivagem da ligação peptídeo-resina em meio ácido, liberando o peptídeo em solução (Chan e White, 2000).

**Figura 7:** Esquema da síntese de peptídeo em fase sólida via estratégia Fmoc. O grupo ligante da resina está realçado em amarelo, os resíduos de aminoácido em verde e o grupo protetor Fmoc em vermelho.

Fonte: Adaptado de Chan e White, 2000.



Uma das dificuldades na SPFS está associada a formação de agregados à medida que a cadeia polipeptídica aumenta. Isso porque, o aumento da extensão da cadeia peptídica permite a aproximação espacial entre elas na peptidil-resina, e consequentemente, possibilitando o empacotamento dessas biomoléculas por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Como resultado, tem-se a formação desses agregados, que por sua vez, geram impedimentos estéricos que dificultam o acoplamento de novos derivados de aminoácidos à cadeia peptídica (Behrendt *et al.*, 2015; Paradis-Bas *et al.*, 2016). Contudo, alterações das metodologias clássicas como o emprego de solventes com maior capacidade de solvatação ou a adição de sais e detergentes podem diminuir a formação de agregados (Paradis-Bas *et al.*, 2016).

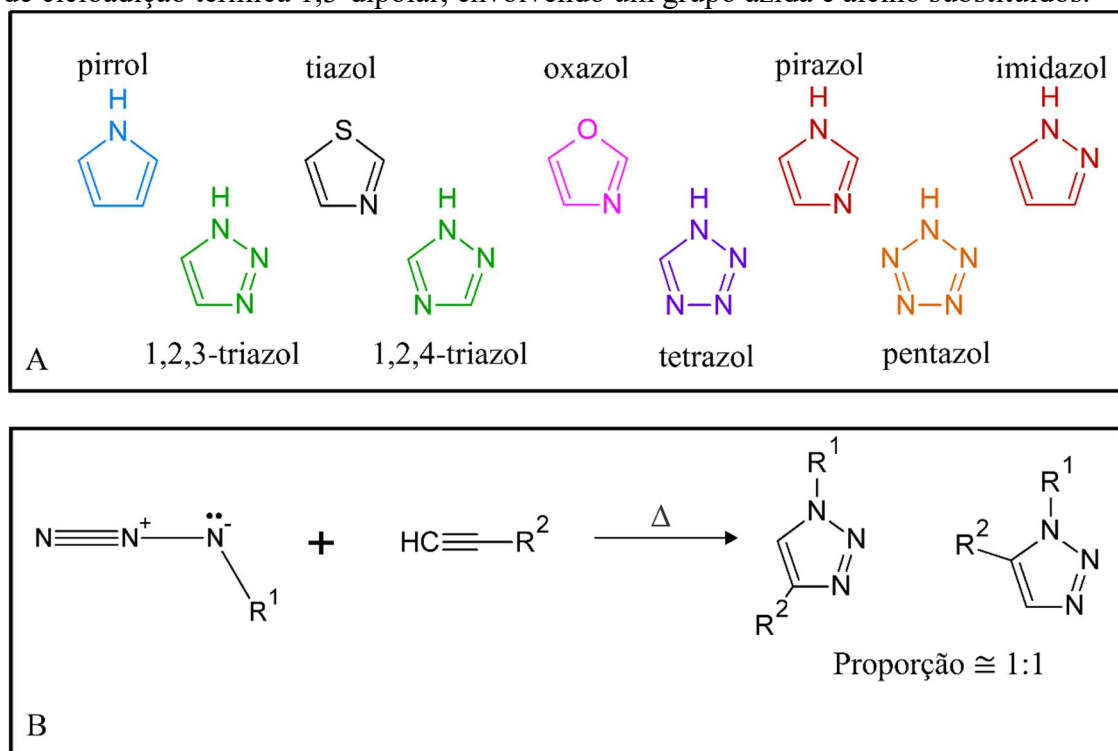
Uma das grandes vantagens da SPFS é a possibilidade de associação com outras metodologias de síntese química, permitindo assim a realização de alterações estruturais tanto dos grupamentos *N*- e *C*-terminais quanto nas cadeias laterais dos resíduos de

aminoácidos (Butler *et al.*, 2014). Uma das formas mais seguras e com elevada regioseletividade para a glicosilação de peptídeos consiste na reação de formação de derivados de 1,2,3-triazóis envolvendo uma azida de açúcar e um alcino terminal presente na cadeia peptídica, em uma reação “click” (Mdowell *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Reação “click” para obtenção de glicopeptídeo-triazóis

Os azóis (FIG. 8A) são compostos heterocíclicos que podem ser divididos em cinco classes de acordo com o número de nitrogênios: azol, diazol, triazol, tetrazol e pentazol (Melo *et al.*, 2006). Os triazóis, são compostos heterocíclicos de cinco membros contendo três átomos de nitrogênio. A classe dos triazóis recebe destaque, introduzidos como fármacos no final da década de 60, devido à excelente atividade antifúngica (Sheehan *et al.*, 1999). Apesar de não serem encontrados naturalmente, essas moléculas conseguem ser metabolizadas por diversos organismos, de modo a serem degradadas e eliminadas da corrente sanguínea (Melo *et al.*, 2006; Petrova *et al.*, 2015).

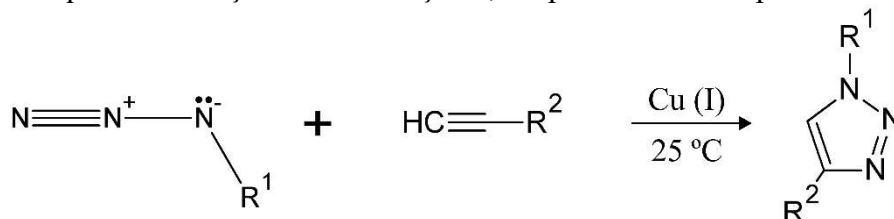
**Figura 8:** (A) Estruturas de heterocíclicos azólicos aromáticos. (B) Esquema da reação de cicloadição térmica 1,3-dipolar, envolvendo um grupo azida e alcino substituídos.



Michael, em 1893, sintetizou os primeiros triazóis utilizando a técnica de cicloadição térmica 1,3-dipolar entre um grupo azida e um alcino (FIG. 8B) (Freitas *et*

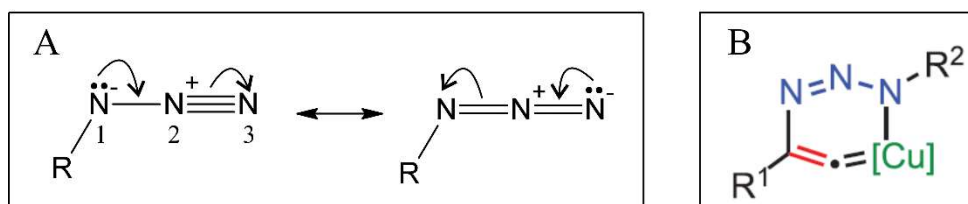
*al.*, 2011). Contudo, derivados de triazóis dissustituídos podem ser sintetizados atualmente de forma mais eficiente empregando-se a reação “click” (Petrova *et al.*, 2015). Essa metodologia consiste na reação entre uma azida e um grupo alcino terminal, catalisada por sais de cobre (I). Como resultado, tem-se a obtenção de um ciclo 1,2,3-triazol 1,4-dissustituído, sendo caracterizada como uma reação de cicloadição [4+2] (FIG. 9) (Melo *et al.*, 2006).

**Figura 9:** Esquema da reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por sais de cobre



Essa reação foi introduzida pela primeira vez em 2002 por Sharpless e Fokin como uma alternativa ao modelo clássico de cicloadição térmica, tendo como primeira proposta mecanística a participação de um único átomo de cobre como agente catalisador (Rostovtsev *et al.*, 2002). Contudo, a total elucidação desse mecanismo enfrentou as dificuldades envolvidas nos estudos das propriedades catalíticas do cobre, como equilíbrios envolvendo espécies intermediárias bastante reativas. Inicialmente, foi sugerida a formação de um heterociclo metálico de seis membros altamente instável (FIG. 10B).

**Figura 10:** Em (A), a representação das estruturas de ressonância do grupo azida e, em (B), o heterocíclico metálico proposto no primeiro mecanismo da reação “click”.



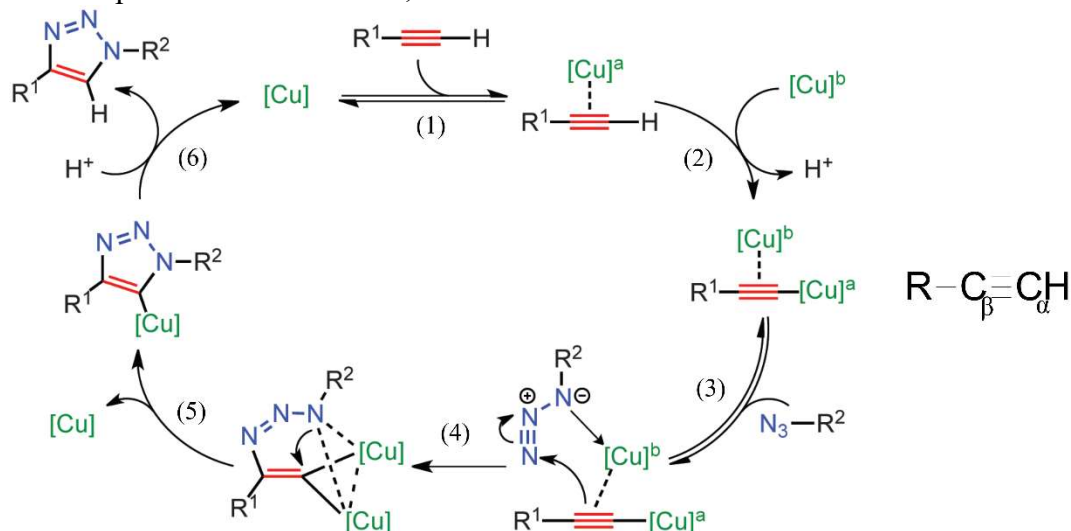
No entanto, pesquisas recentes apontaram evidências experimentais da presença de intermediários de cobre polinuclear (FIG. 11 p. 17) (Worrell *et al.*, 2013). Essa nova proposta mostra um agente catalisador composto por dois átomos de cobre. Na etapa (1) da reação, há a aproximação de um átomo de cobre (I) ([Cu]<sup>a</sup>) à nuvem eletrônica da ligação tripla do alcino em um compartilhamento de elétrons π-Cu. Na segunda etapa (2), com a interação, ocorre a aproximação de um segundo átomo de cobre ([Cu]<sup>b</sup>), elevando a acidez e a substituição do H metínico. Conseqüentemente, há a formação da ligação C-



$[\text{Cu}]^a$ , originando um complexo acetileno do metal (2). Alcinos, no geral, são ricos em elétrons, atuando como bons nucleófilos. Em contrapartida, devido à ressonância dos elétrons  $\pi$  em azidas (FIG. 10A p 16), na reação N-3 reage como um centro eletrofílico e N-1 como um centro nucleofílico. Desta forma, na etapa (3) da reação, ocorre um ataque nucleofílico ao N-3 pelo carbono  $\beta$  do alcino de modo a se obter a primeira ligação C-N. Na etapa (4) da reação, há a formação de um complexo devido às interações dipolares entre os dois átomos de cobre e o nitrogênio N-1. O intenso compartilhamento de elétrons desse complexo eleva o caráter eletrofílico do carbono  $\alpha$ . Na etapa (5) da reação, ocorre o ataque nucleofílico do N-1 ao carbono  $\alpha$ , juntamente com a saída do primeiro átomo de cobre (I), resultando assim no produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído metálico. Na última etapa (6) da reação, ocorre a regeneração do cobre ( $[\text{Cu}(\text{I})]$ ) e captura do  $\text{H}^+$  pelo anel triazólico (Rostovtsev *et al.*, 2002; Ahlquist e Fokin, 2007; Worrell *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2016).

**Figura 11:** Mecanismo de reação para obtenção de derivados 1,2,3-triazol.

Fonte: Adaptado de Worrell *et al.*, 2013



Uma aplicação importante para essa reação, e que vem ganhando foco, é a ligação covalente entre fármacos, possibilitando a formação de novas moléculas bifuncionais (Petrova *et al.*, 2015). O mesmo vem sendo empregado para conectar de forma estável unidades sacarídeas e cadeias peptídicas. A síntese de glicoconjugados eleva o potencial de aplicação dessas biomoléculas permitindo uma melhor interação com a membrana celular (Crucho *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de novas estratégias de síntese química de peptídeos e derivados modificados, possibilitam a obtenção dessas moléculas em grandes quantidades

e, conseqüentemente, a realização de estudos biofísicos diversificados visando a compreensão dos seus mecanismos de ação (Paradis-Bas *et al.*, 2016).

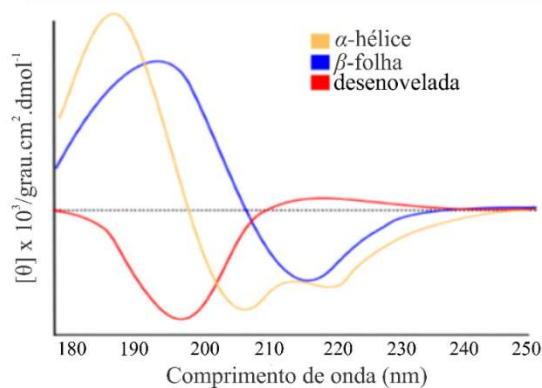
Muitas técnicas têm sido amplamente empregadas para estudos de modo de interação e de ação de biomoléculas. Para estudos estruturais, pode-se destacar análises conformacionais por dicroísmo circular (CD) e de estrutura de alta resolução por ressonância magnética nuclear (RMN) em solução, o qual permite a determinação de estruturas tridimensionais de peptídeos ao interagir com membranas. Nos estudos de interação, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) tem sido amplamente difundida, pois permite uma descrição termodinâmica da interação de biomoléculas com meios biomiméticos de membranas microbianas (Arias *et al.*, 2016).

### 2.3 Estudos de Interação Peptídeo-Membrana

Estudos biofísicos de interação peptídeo-membrana são fundamentais para o modo de ação de PAM, permitindo relacionar seus potenciais farmacológicos e toxicidade dessas moléculas (Dathe e Wieprecht, 1999). Como descrito anteriormente, parte da atividade do peptídeo está associada à sua conformação adotada frente à membrana bacteriana, e diversas técnicas podem ser utilizadas para verificar a estrutura peptídica, entre elas o Dicroísmo Circular (CD).

A técnica de CD permite verificar de forma rápida a conformação preferencial adotada por moléculas em diferentes meios, além disso através de conversões matemáticas é possível determinar o quanto essa conformação se estende por toda estrutura (Woody, 1995). Nesse tipo de experimento, estruturas secundárias de peptídeos como  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, apresentam um comportamento característico (FIG. 12) nos espectros de CD, tornando de fácil interpretação os dados obtidos (Woody, 1995).

**Figura 12:** Padrões de espectros de Dicroísmo Circular para proteínas e peptídeos.

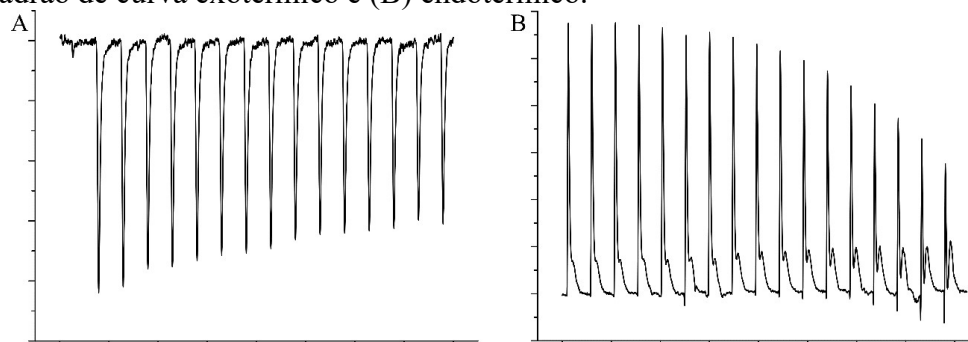


No caso de estruturas em  $\alpha$ -hélice o percentual de prevalência dessa conformação é denominado de conteúdo helicoidal, sendo possível observar variações em seu valor a partir de alterações nas concentrações de peptídeo, assim como do meio utilizado (Avitabile *et al.*, 2014). A partir disso é possível verificar a concentração mínima necessária para que a estrutura secundária seja formada, posteriormente sendo associada a capacidade de interação do peptídeo com a bicamada lipídica (Avitabile *et al.*, 2014). No entanto, outras técnicas são capazes de fornecer um estudo mais amplo de interação e fornecer maiores informações a respeito do sistema peptídeo-membrana. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é bastante sensível a variações endotérmicas e exotérmicas tornando-a uma poderosa ferramenta para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação (Seelig, 2004).

No caso de estudos com peptídeos a técnica consiste em microinjeções de vesículas fosfolipídicas em uma solução de peptídeo. O experimento resulta em uma isoterma (FIG. 13A) contendo as informações a respeito do fluxo de calor gerado no sistema para cada injeção, seja o processo endotérmico ou exotérmico (Seelig, 2004). A partir do padrão da curva termodinâmica obtida é possível determinar o tipo de interação prevalente do contato peptídeo-membrana. Peptídeos antimicrobianos catiônicos, cuja principal mecanismo de interação é eletrostático, apresentam curvas de padrão exotérmico (FIG 13A) (Wieprecht e Seelig, 2002). A medida em que aumenta a concentração de vesícula no meio a quantidade de peptídeo disponível para interagir diminui, de modo que ocorre a saturação da curva tendo ao final apenas o valor referente ao calor de diluição (Henriksen e Andresen, 2011). Peptídeos com interações hidrofóbicas prevalentes, no entanto, tem curvas de padrão termodinâmico endotérmicas (FIG. 13B), também levando a saturação a medida em que diminui a quantidade de peptídeo disponível (Wieprecht e Seelig, 2002).

**Figura 13:** Padrão termodinâmico de curvas endotérmica e exotérmica obtidas pela técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica.

(A) Padrão de curva exotérmico e (B) endotérmico.



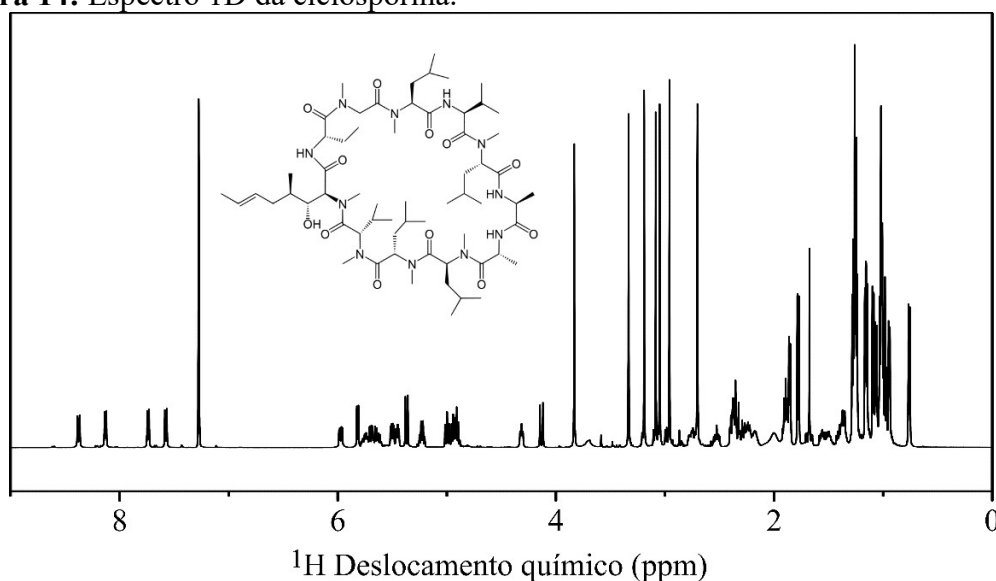
Como cada injeção ocorre sempre a uma mesma temperatura, tem-se ao final do processo uma isoterma de interação entre o peptídeo e as vesículas fosfolipídicas. Sabendo-se as concentrações das espécies envolvidas na interação, é possível mensurar a estequiometria ( $n$ ) do sistema, a variação de entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $\Delta S$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), e finalmente, a constante de interação ( $K$ ) peptídeo-membrana, através de ajustes matemáticos (Henriksen e Andresen, 2011).

Estudos mais detalhados e aprofundados utilizando os dados obtidos através da ITC juntamente com outras técnicas, ainda permitem verificar o perfil de interação de cada peptídeo, inclusive tornando possível diferenciar os padrões termodinâmicos envolvidos em interações do tipo poro toroidal e micelas (Henriksen e Andresen, 2011). Através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é possível complementar os dados obtidos pelas técnicas de ITC e CD, sendo possível realizar o estudo da relação estrutura e atividade dos PAM.

### 2.3.1 RMN no Estudo de Peptídeos

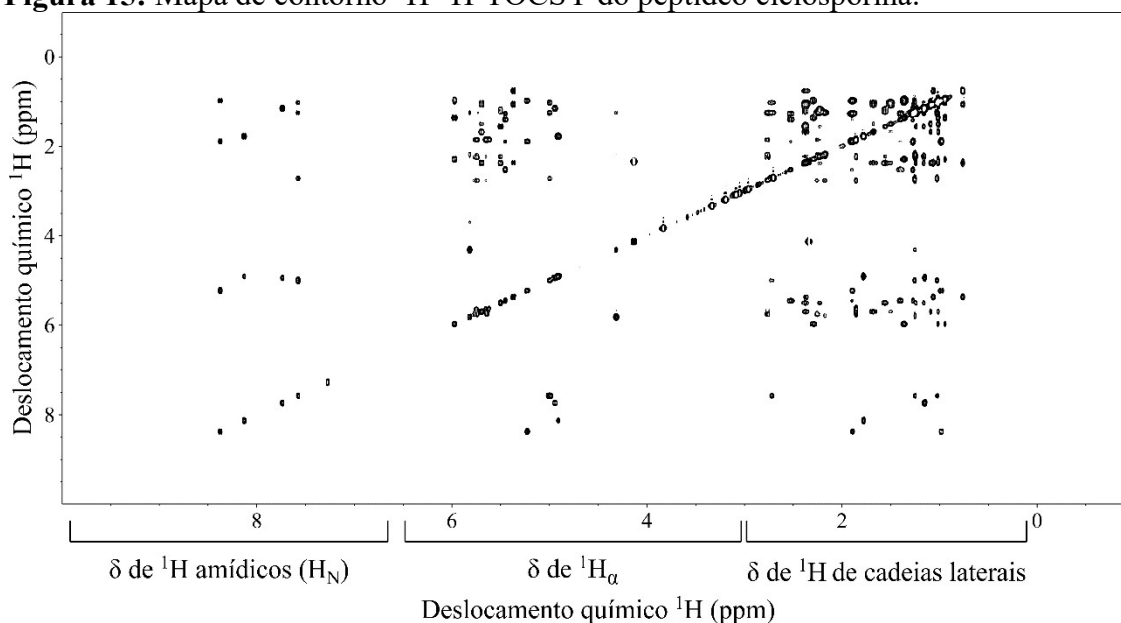
Os experimentos mais comuns utilizados em RMN em solução são os unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D). Experimentos 1D permitem visualizar os deslocamentos químicos de cada núcleo, sendo a primeira avaliação da estabilidade conformacional da molécula no meio estudado (Pavia *et al.*, 2009). A FIG.14 apresenta o espectro 1D da ciclosporina.

**Figura 14:** Espectro 1D da ciclosporina.



No caso de macromoléculas, como peptídeos, o uso do espectro 1D torna-se muito difícil devido à grande sobreposição de sinais (FIG. 14 p 20), deste modo, o uso de experimentos 2D permitem identificar as correlações entre os diferentes núcleos, facilitando o assinalamento referente a cada resíduo (Wüthrich, 1986). A FIG. 15 apresenta o mapa de contornos bidimensional TOCSY da ciclosporina.

**Figura 15:** Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY do peptídeo ciclosporina.

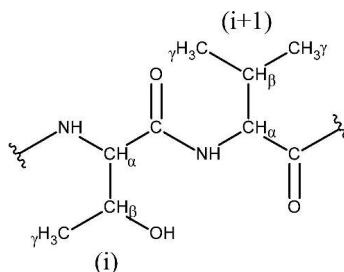


Analisando a FIG. 15 é possível notar a presença de sinais característicos em cada região, o que permite identificar os deslocamentos químicos de hidrogênios amídico, alfa e de cadeias laterais referentes a cada resíduo da cadeia peptídica. Outra vantagem dos experimentos bidimensionais é que além de poderem ser homonucleares (envolvendo núcleos de átomos iguais), também podem ser heteronucleares (envolvendo núcleos de átomos diferentes). No entanto, esses experimentos na realidade são tridimensionais (3D) e resultam em mapa de contornos. Isso porque o acoplamento entre cada núcleo e o seu vizinho ocorrem em magnitudes diferentes, de modo que além dos dados gerados no plano cartesiano também há informações de correlação associadas a intensidade (Claridge, 2009).

As técnicas 2D mais empregadas para determinação estrutural de peptídeos e proteínas são: espectroscopia de correlação total (TOCSY) (Delaglio *et al.*, 1995), espectroscopia de efeito *Overhauser* nuclear (NOESY) (Braun *et al.*, 1998), correlação heteronuclear múltiplo quantum (HMQC) (Braun *et al.*, 1998) e correlação heteronuclear simples quantum (HSQC) (Braun *et al.*, 1998). Para uma melhor compreensão os

exemplos das figuras de TOCSY e NOESY a seguir serão apresentados considerando o fragmento dipeptídico da FIG. 16.

**Figura 16:** Representação da estrutura química de um fragmento peptídico contendo resíduo de treonina e valina.

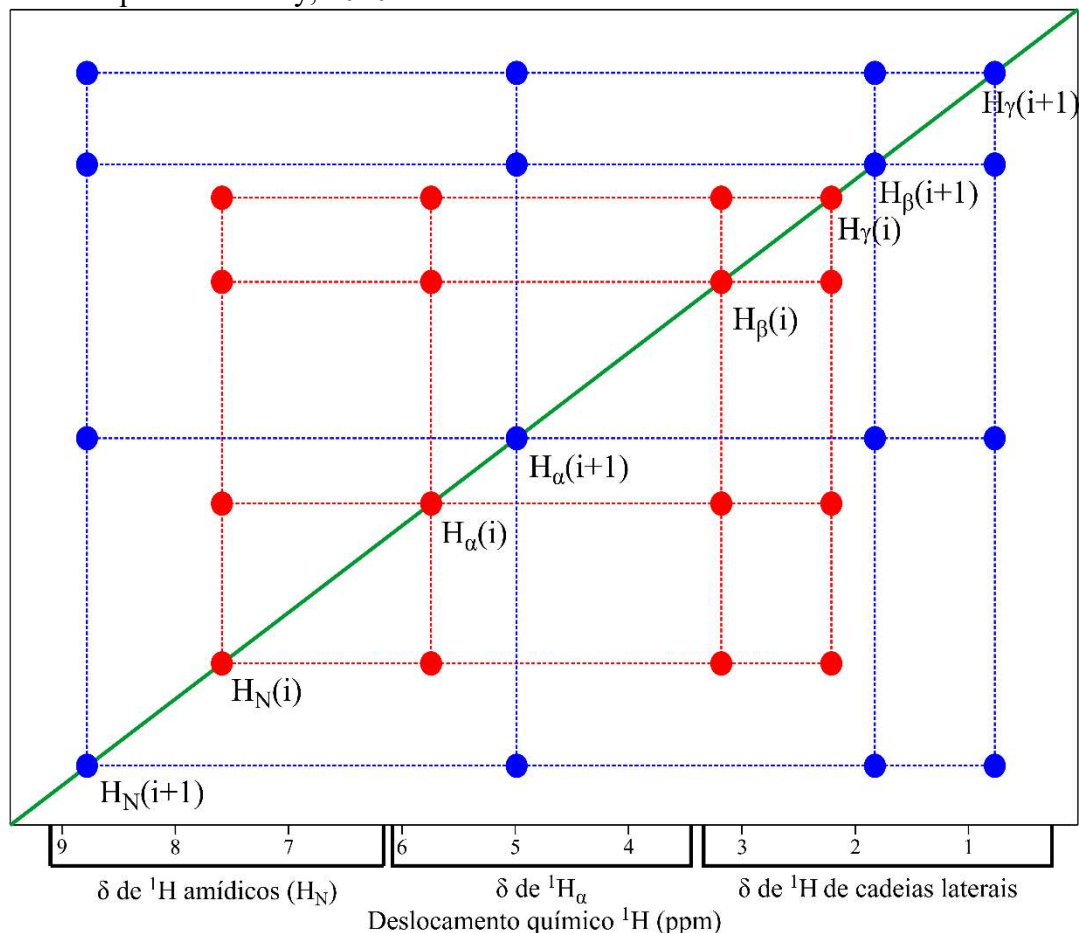


O TOCSY trata-se de um experimento homonuclear de  $^1\text{H}$ , sendo muito útil para a identificação de conectividades na molécula. A técnica consiste na transferência de magnetização entre dois núcleos através do acoplamento escalar, porém com certa restrição. Para que ocorra esse fenômeno é necessário que o núcleo vizinho seja um átomo hidrogenado. Na ausência de hidrogênio a transferência não ocorre de um núcleo para outro, gerando interrupções no sistema de correlações, também chamados sistemas de *spins*. Esses sistemas são muito importantes na elucidação de peptídeos, pois como os resíduos de aminoácidos são conectados por ligações amídicas (-NH-CO-), a transferência de magnetização ocorre apenas entre o hidrogênio amídico, carbono  $\alpha$  e cadeia lateral de cada resíduo (correlações intrarresiduais) (FIG. 17 p 23). Isto torna possível a identificação individual do sistema de *spin* de cada resíduo de aminoácido constituinte da cadeia peptídica (Wüthrich, 1986).

**Figura 17:** Exemplo do mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY para determinação de sistema de *spins* de um dipeptídeo.

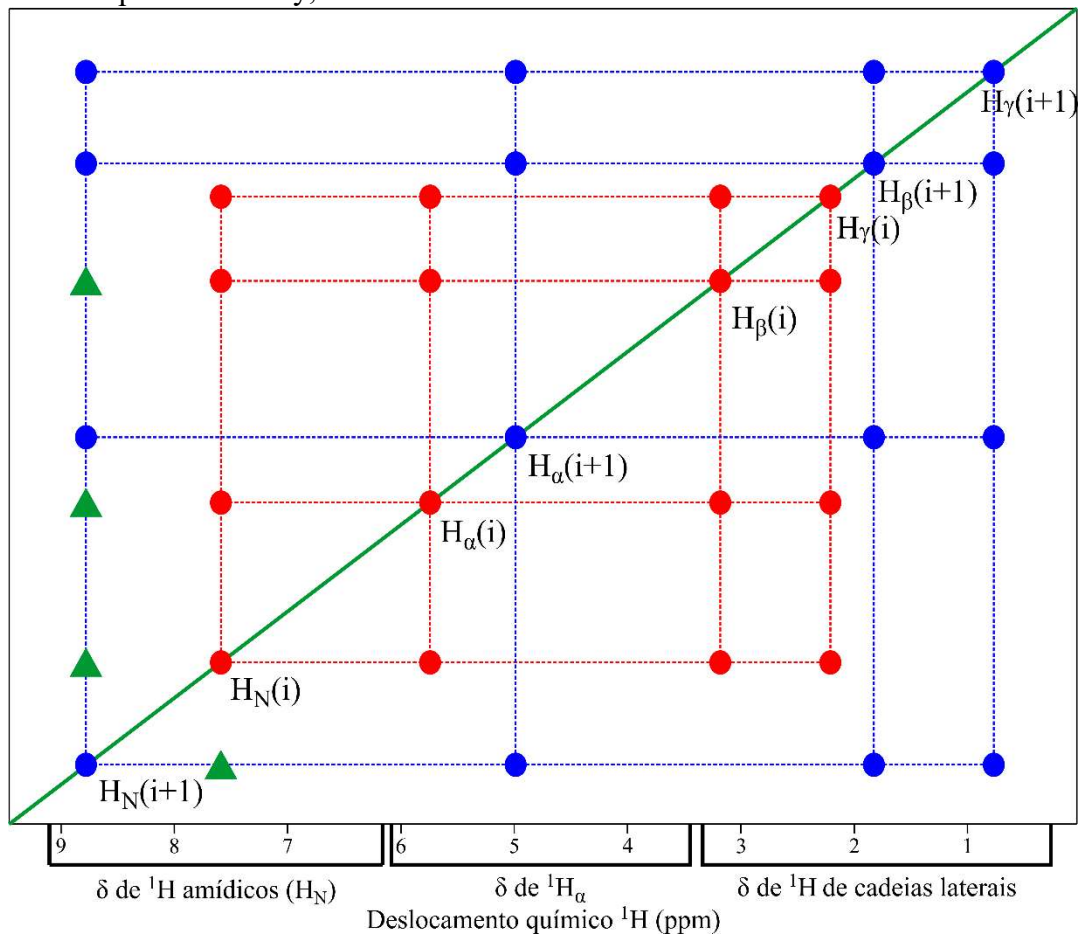
As correlações intraresiduais estão representadas pelos pontos azul da valina e vermelho da treonina.

Fonte: Adaptado de Verly, 2010.



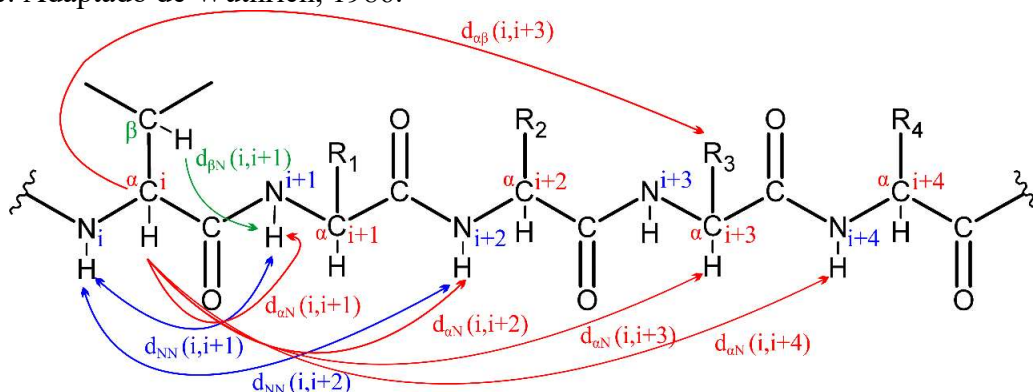
Já o experimento de NOESY (FIG. 18 p 24) resulta em um mapa de contorno cujas transferências de magnetização entre dois núcleos ocorrem através do espaço (acoplamento dipolar), desde que estejam a uma distância inferior a  $5\text{Å}$ . É comum que um experimento de NOESY tenha uma certa semelhança com o de TOCSY. Isso ocorre, pois, os núcleos envolvidos em acoplamento escalar também estão próximos no espaço, apresentando acoplamento dipolar. Contudo, como trata-se de uma transferência de magnetização espacial, esse experimento permite identificar torções na estrutura auxiliando assim, na elucidação da estrutura tridimensional adotada pela molécula. Peptídeos antimicrobianos que formam  $\alpha$ -hélice por exemplo, costumam apresentar correlações espaciais entre resíduos que estejam a dois ou três aminoácidos de distância na sequência primária (Wüthrich, 1986).

**Figura 18:** Exemplo do mapa de contornos NOESY para o dipeptídeo. Os pontos azul (valina) e vermelho (treonina) representam as correlações intraresiduais. Os triângulos verdes representam as correlações interresiduais. Fonte: Adaptado de Verly, 2010.



A FIG. 19 apresenta o padrão mais comum para correlações de  $\alpha$ -hélice. Através das correlações de nOes é possível determinar a sequência peptídica, isso porque essas moléculas apresentam correlações comuns, denominadas de sequenciais (Williamson, 1993).

**Figura 19:** Representação dos nOes de estrutura em  $\alpha$ -hélice. Em vermelho as linhas correspondentes as correções de  $H_\alpha$  e azul de  $H_N$ . Fonte: Adaptado de Wüthrich, 1986.



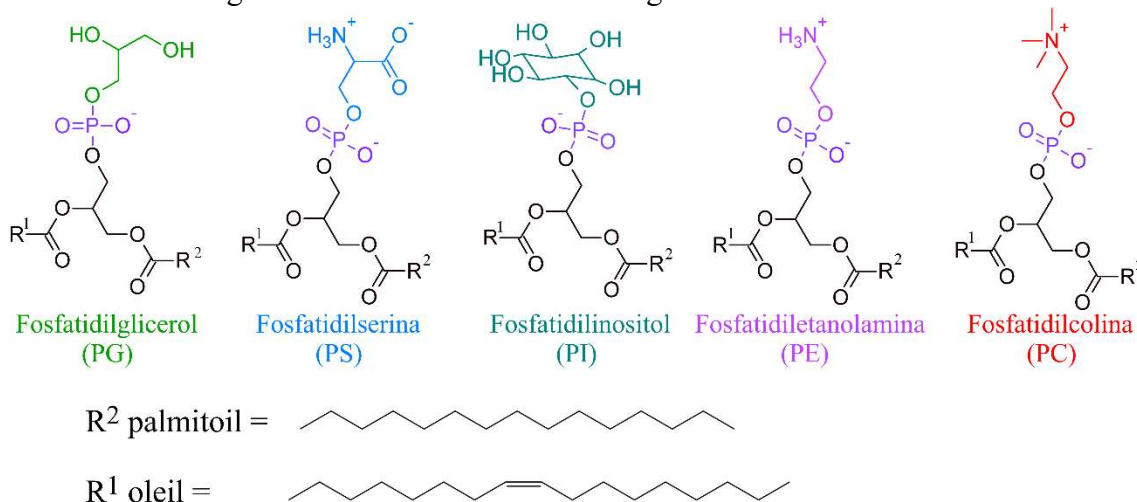


Além de acoplamentos H-H é possível identificar H-C e H-N através das técnicas de HMQC e HSQC, que consistem na transferência de magnetização entre heteroátomos via acoplamento escalar ( $J$ ). Essas técnicas são muito importantes, tendo os seus padrões de deslocamento utilizados nos cálculos estruturais. Além disso, auxiliam na resolução dos mapas de contorno TOCSY e NOESY, resolvendo ambiguidades entre núcleos que apresentam deslocamento químico iguais ou muito próximos. Utilizando-se desses experimentos, pode-se estudar as diferentes conformações assumidas pelos peptídeos em diferentes meios biomiméticos, verificando o seu mecanismo de ação antimicrobiano.

### 2.3.2 Meios Biomiméticos de Membrana

O principal constituinte de membranas celulares eucariotas e procariotas são os fosfolipídios (FIG. 20). Os fosfolipídios, no geral, são macromoléculas constituídas por um glicerol ligado a uma ou duas cadeias de ácido graxo e um ou dois grupos fosfatos, sendo que neste encontra-se um substituinte polar (FIG. 20). O grupo fosfato e seu substituinte são denominados de cabeça e encontram-se ligados a uma cadeia de ácido graxos, geralmente contendo de 8 a 22 átomo de carbono (Nelson e Cox, 2014). Essas moléculas se estruturam em agregados na forma de uma bicamada envoltória na célula funcionando como bioreguladores, distribuídos de forma assimétrica entre as camadas externas e internas (Boesze-Battaglia e Schimmel, 1997). Um dos fatores que diferencia as células eucariotas de procariotas consiste na distribuição e estrutura dos fosfolipídios.

**Figura 20:** Estruturas dos principais fosfolipídios presentes na membrana celular com cadeias de ácido graxos de 1-Palmitoil-2-oleil-sn-glicero.



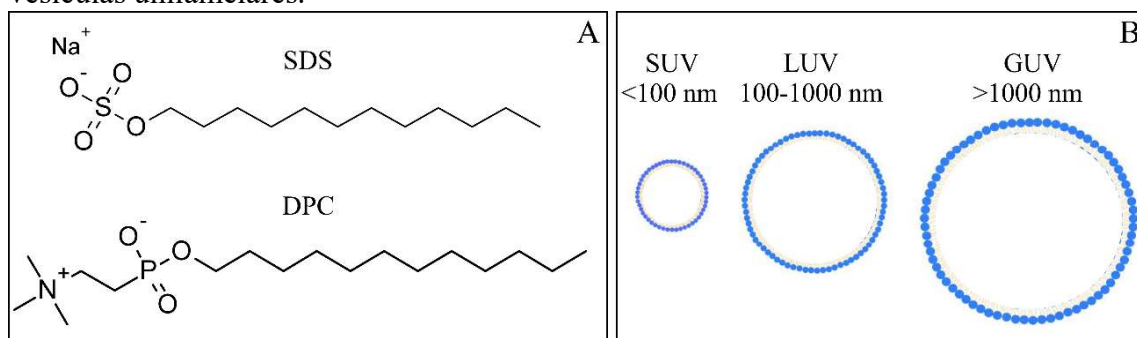
A membrana de células procariotas, como dito anteriormente, possui caráter aniônico, devido à presença de fosfatidilglicerol (PG), geralmente sendo o principal constituinte (Sohlenkamp e Geiger, 2015). Outro importante fosfolípido presente na membrana de bactérias é a fosfatidiletanolamina (PE), que em algumas espécies chega a apresentar maior abundância que o PG (Cronan, 2003). Já em membranas eucariotas, o principal constituinte é a fosfatidilcolina (PC), esse fosfolípido encontra-se distribuído por toda a camada externa e possui caráter zwitteriônico, apresentando carga superficial nula. Já na camada interna, é encontrado fosfatidilserina (PS), que tem caráter aniônico assim como o PG e a PE (Boesze-Battaglia e Schimmel, 1997).

Ainda em membranas eucariotas, o fosfatidilinositol também pode ser encontrado em abundância em algumas espécies de fungos, como a *Candida membranifaciens* (Turk *et al.*, 2004).

Assim como os peptídeos, essas moléculas apresentam caráter anfipático, tendo uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A região hidrofílica encontra-se na superfície da membrana, enquanto que a região hidrofóbica encontra-se na parte interna (Nelson e Cox, 2014). Desse modo, as cadeias apolares conseguem promover interações intermoleculares quando em solução aquosa, formando grandes agregados e originando a formação de vesículas. Isso permite a construção de sistemas experimentais bastante semelhante ao encontrado em membranas celulares, permitindo a sua caracterização (Nir *et al.*, 1983). De modo que a manipulação dessas moléculas para estudos de permeabilização da membrana torna possível a obtenção de dados em detalhes consideráveis (Gorbenko *et al.*, 2007).

Além dos meios vesiculares formados por fosfolípidios, detergentes também são empregados como meios biomiméticos de membrana. Essas estruturas são formadas a partir do uso de reagentes como dodecilsulfocolina (DPC) e dodecilsulfato de sódio (SDS) (FIG. 21A p 27), que também são constituídos por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. No entanto, essas moléculas não conseguem se associar de modo a formar vesículas, levando assim a construção de micelas (Khandelia e Kaznessis, 2005). Não obstante, para que haja a formação de vesículas e micelas é necessária uma concentração mínima dessas moléculas no meio, denominada de concentração micelar crítica (CMC). O CMC é o equilíbrio entre a forma monomérica e a forma micelar, variando de acordo com o tamanho da cauda e condições da solução, como temperatura, pH, força iônica, etc (Quina e Hinze, 1999). No caso de vesículas, essas estruturas podem ainda apresentar diferentes tamanhos, sendo elas GUV, LUV e SUV (FIG. 21B p 27).

**Figura 21:** Representação (A) das estruturas de DPC e SDS (B) e forma e tamanho das vesículas unilamelares.



Outra versatilidade dessas estruturas é a capacidade de formação de vesículas associadas com outros importantes constituintes da membrana, como os esteróis (Kan *et al.*, 1992). Esteróis são encontrados na membrana plasmática de seres eucarióticos, esses compostos são essenciais auxiliando no controle das funções e estrutura da célula (Dupont *et al.*, 2012). Esse tipo de formulação, incluindo por exemplo colesterol ou ergosterol na composição de vesícula fosfolipídica, aproxima os modelos biomiméticos dos ambientes de membrana de células de fungos e mamíferos (Clejan e Bittman, 1985).

O uso desses meios biomiméticos auxiliam os estudos biofísicos de mecanismo de ação de peptídeos e derivados bioativos, principalmente para os estudos estruturais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) (Brogden, 2005). Todas as técnicas apresentadas foram utilizadas neste trabalho para elucidação estrutural e compreensão dos mecanismos de ação do peptídeo HSP1 e análogos.



### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigação das alterações do potencial antifúngico dos peptídeos derivados do HSP1, provocadas pela adição das unidades de açúcares e do anel triazólico. Utilização de análises biofísicas e estruturais desses peptídeos, em meios biomiméticos, com foco na investigação da interação peptídeo-membrana.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Sintetizar o peptídeo antimicrobiano HSP1 e o seu análogo [Pra<sup>1</sup>]HSP1 pelo método de síntese peptídica em fase sólida (SPFS), via estratégia Fmoc;
- ❖ Realizar a reação “click” no peptídeo [Pra<sup>1</sup>]HSP1 na SPFS, para obtenção do [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 a partir da adição do anel triazólico, e obtenção dos análogos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 a partir da glicosilação;
- ❖ Purificar e caracterizar os glicotriazol-peptídeos e triazol-peptídeo sintéticos por CLAE e espectrometria de massas;
- ❖ Analisar as preferências conformacionais dos glicotriazol-peptídeos e triazol-peptídeo sintético por dicroísmo circular (CD);
- ❖ Realizar estudos estruturais e de interação por RMN em solução nos meios biomimético de SDS e solução de TFE;
- ❖ Estudar termodinamicamente a interação peptídeo-LUV no meio biomimético de POPC:POPG por ITC;
- ❖ Determinar o potencial de degradação de ergosterol dos glicotriazol-peptídeo e triazol-peptídeo, utilizando meio biomiméticos de POPC:POPG contendo 30% de ergosterol.



## 4. Metodologia

### 4.1. Materiais e Reagentes

Para síntese e purificação do peptídeo HSP1, [Pra<sup>1</sup>]HSP1, [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 foram utilizados:

- Fmoc-PraGly-OH - *Iris Biotech*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Ala-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Gly-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Ile-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Leu-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Ácido trifluoroacético (TFA) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Triisopropilsilano (TIS) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Álcool isopropílico (IPA) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Diclorometano (DCM) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- 4-metilpiperidina (PIPE) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Sulfato de cobre penta hidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Ascorbato de Sódio - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi-  $\beta$ -*D*-glicopiranosose (azido acetilado de glicose) e 2- acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2- dideoxi- $\beta$ -*D*-glicopiranosose (azido N-acetilado de glicose) - cedidos pelo Prof. Ricardo José Alves, Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG;
- Resina Fmoc Rink<sup>®</sup> amida, com grau de substituição 0,79 mmol.g<sup>-1</sup> - *NovaBiochem*<sup>®</sup>;
- Piridina - *Merck*<sup>®</sup>;
- Cianeto de potássio (KCN) - *Lafan Química Fina*<sup>®</sup>;
- Fenol - *Synth*<sup>®</sup>;

- Tetrahidrofurano (THF) - *Synth*<sup>®</sup>;
- Etanol - *Vetec*<sup>®</sup>;
- Ninidrina - *Vetec*<sup>®</sup>;
- Éter di-isopropílico - *Vetec*<sup>®</sup>;
- Água deionizada Milli-Q<sup>®</sup> Tipo 1;
- Acetonitrila grau UV-HPLC - *Isofar*<sup>®</sup>;
- Balança analítica - *Shimadzu*<sup>®</sup> modelo ATX 224;
- Agitador vórtex - *Biomixer*<sup>®</sup>;
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) - *Dinâmica Química Contemporânea*<sup>®</sup>;

Para o preparo dos meios biomiméticos e experimentos de oxidação, foram utilizados:

- 1 palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) - *Avanti*<sup>®</sup> *Polar Lipidics, Inc*<sup>®</sup>;
- 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (POPG) - *Avanti*<sup>®</sup> *Polar Lipidics, Inc*<sup>®</sup>;
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Etanol absoluto - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Ergosterol - *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- Cloreto de sódio (NaCl) - *Isofar*<sup>®</sup>;
- Clorofórmio - *Dinâmica Química Contemporânea*<sup>®</sup>;
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) - *Dinâmica Química Contemporânea*<sup>®</sup>;
- Fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) - *Dinâmica Química Contemporânea*<sup>®</sup>;
- Hidróxido de potássio (KOH) - *Dinâmica Química Contemporânea*<sup>®</sup>;
- Ultrassom - *ALT Sonic Clean*<sup>®</sup>;
- Hexano - *Synth*<sup>®</sup>;
- Água deionizada Milli-Q<sup>®</sup> Tipo 1;
- Espectrômetro Varian Cary 50 conc UV-Vis - *Varian*<sup>®</sup>.

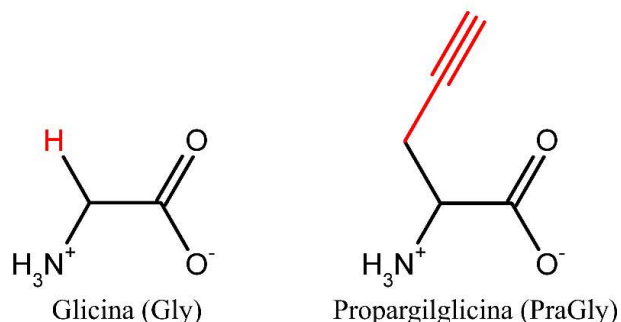


## 4.2. Síntese dos peptídeos

A síntese dos peptídeos HSP1 e [Pra<sup>1</sup>]HSP1 foi realizada manualmente em uma seringa de polipropileno de 5 mL, adaptada com filtro poroso. A metodologia utilizada foi a de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) via estratégia 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) (Chan e White, 2000). Todos os derivados de aminoácido empregados foram adquiridos com o grupamento amino protegido com Fmoc e suas cadeias laterais protegidas, quando reativas, com grupo protetor *t*-butoxicarbonila (Boc) ou *t*-butóxido (OtBu).

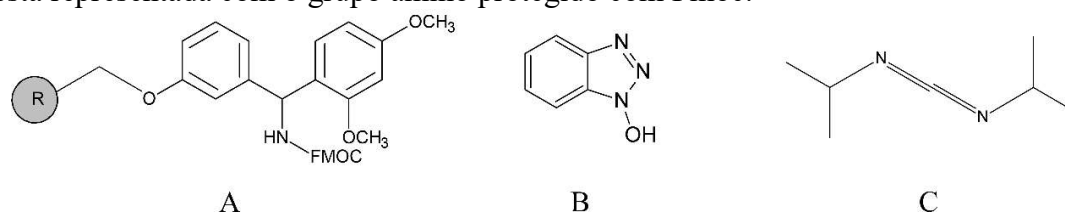
Para a síntese do análogo [Pra<sup>1</sup>]HSP1 foi substituído o primeiro resíduo (Gly-1) do HSP1 (GILDAIKAIKAAG) pelo resíduo de propargilglicina (PraGly) (FIG. 22). A substituição por um resíduo propargilado foi realizada para inserção de um alcino terminal, responsável pela reação com uma azida na reação “click” (ver detalhes no item 4.2.1, p. 36).

**Figura 22:** Estruturas dos aminoácidos glicina e propargilglicina. Em vermelho encontra-se destacada a cadeia lateral de cada um.



Como suporte sólido, foi utilizada a resina Fmoc Rink<sup>®</sup> amidada (FIG. 23A) com grau de substituição de 0,79 mmol.g<sup>-1</sup>. Essa resina é funcionalizada com grupo amino protegido com grupo Fmoc, fornecendo ao final da síntese o peptídeo amidado na região C-terminal. Dessa forma, a primeira etapa da síntese consistiu na desproteção (retirada do grupo protetor Fmoc), utilizando uma solução básica de PIPE em DMF (25% v/v).

**Figura 23:** Representação das estruturas (A) da resina Rink<sup>®</sup> amidada, (B) HOBT e (C) DIC. Onde “R” representa a cadeia polimérica da resina. A estrutura do grupo ligante da resina está representada com o grupo amino protegido com Fmoc.





gota da solução 3 (TAB. 2), a uma pequena amostragem de grãos da resina em tubos de ensaio.

**Tabela 2:** Soluções utilizadas para o teste de Kaiser.

Solução	Reagentes
<b>Solução 1</b>	Piridina 2% (v/v) em solução aquosa de KCN 1 mmol.L <sup>-1</sup>
<b>Solução 2</b>	Fenol 80% (m/v) em etanol
<b>Solução 3</b>	Ninidrina 5% (m/v) em piridina

Ao final da síntese do peptídeo HSP1 foi realizada a etapa de clivagem. A reação de clivagem em meio ácido consistiu na quebra da ligação entre o peptídeo e a resina na peptidil-resina, simultaneamente a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos protegidos. Cadeias peptídicas ligadas às resinas contendo grupos trialcóxibenzilamina, como no caso da Rink Amida, geralmente, são tratadas utilizando uma solução contendo 95% de TFA e com o tempo de reação variando entre 1 e 3 horas. Essas condições, também, são capazes de proporcionar a desproteção de cadeias laterais contendo grupos protetores como o OtBu e Boc presentes na lisina (Lys) e ácido aspártico (Asp) (Chan e White, 2000).

Durante esse processo, também são utilizados agentes nucleofílicos, isso porque durante a síntese são geradas espécies catiônicas advindas dos grupos protetores e ligantes da resina. Quando livres em solução essas moléculas podem reagir com as cadeias laterais reativas de aminoácidos como lisina, resultando em modificações estruturais do peptídeo. Por fim, ainda é necessária a adição de compostos alquilsilanos, quando há formação de cátions altamente estabilizados, como no caso de resinas do tipo Rink Amida, pois esses reagentes atuam como sequestradores de carbânions. Dessa forma, para o HSP1 foi preparada uma solução contendo 95% TFA, 2,5% água e 2,5% TIS. A seringa contendo a solução de clivagem foi submetida a agitação por 1,5 h (Chan e White, 2000).

Ao término da reação de clivagem, a solução ácida contendo peptídeo livre foi filtrada e evaporada com fluxo de nitrogênio gasoso. Posteriormente, precipitou-se o peptídeo pela adição de éter di-isopropílico (cerca de 5 mL), previamente resfriado (aproximadamente -5 °C). Nessa etapa, são separados os resíduos dos grupos protetores (porção apolar) do peptídeo por centrifugação (3200 rpm / 5 min), removendo-se o sobrenadante (etapa repetida 5 vezes). Em seguida, a amostra sólida do peptídeo foi solubilizada em água deionizada Milli-Q<sup>®</sup> Tipo 1. Para estoque dos peptídeos, as amostras solubilizadas foram liofilizadas em um equipamento Terroni LS3000<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) do departamento de farmácia da UFVJM e armazenadas a -18°C.

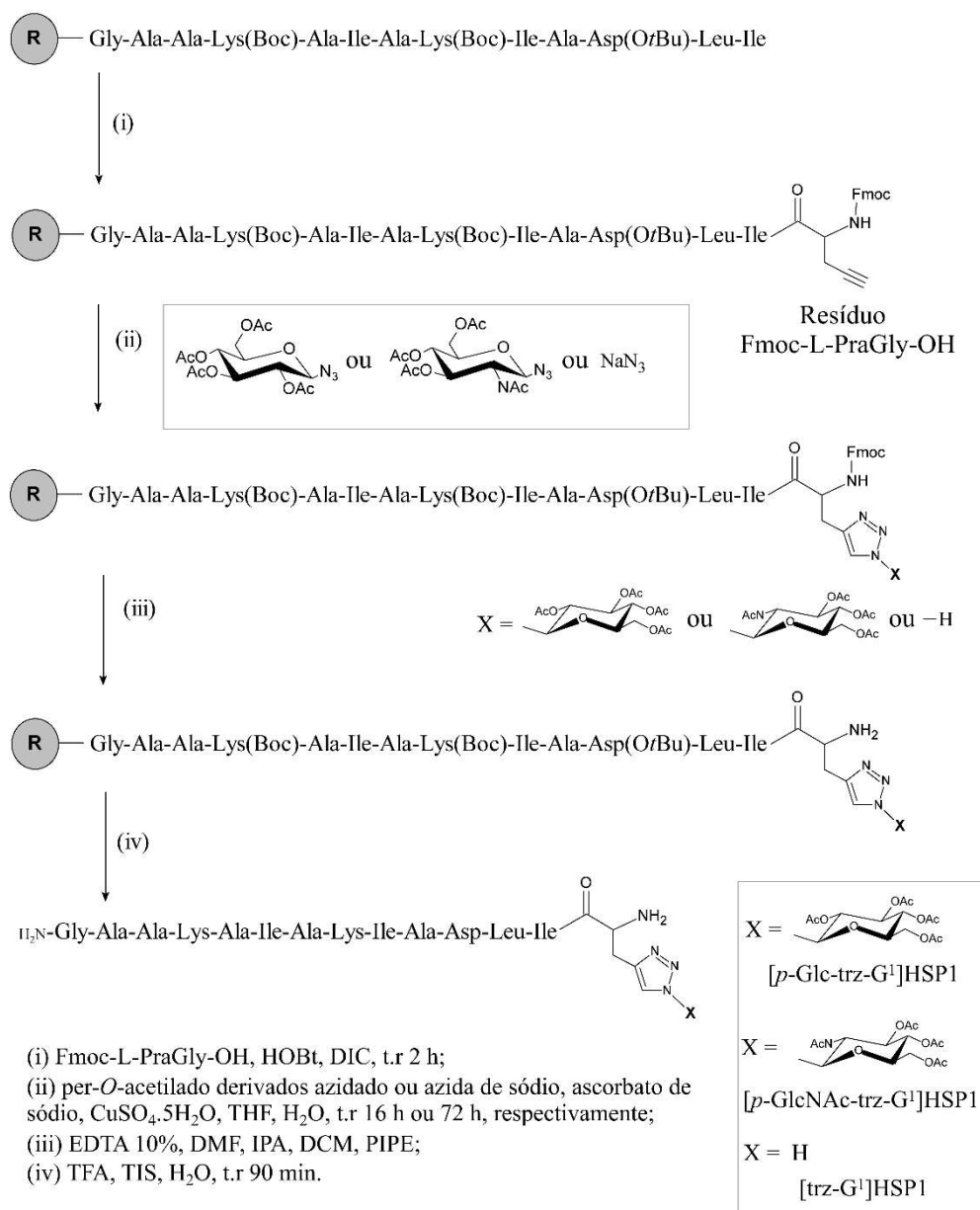
#### 4.2.1. Síntese dos Análogos do Peptídeo HSP1

A obtenção dos análogos de HSP1 foi realizada a partir da peptidil-resina do derivado [Pra<sup>1</sup>]HSP1. Para obtenção dos análogos [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1, foram utilizados azida de sódio, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -*D*-glicopiranosose e 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- $\beta$ -*D*-glicopiranosose, respectivamente. Foram empregados 1,0 equivalente em mol de peptídeo (peptidil-resina), 1,8 equivalente em mol do derivado azido, 0,5 equivalente em mol da fonte de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e 0,6 equivalente em mol do agente redutor (ascorbato de sódio). Ambos os açúcares 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)

Na síntese do análogo triazólico [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 os reagentes foram solubilizados em 300  $\mu$ L de água Milli-Q<sup>®</sup>. Para os análogos glicotriazólicos, o sulfato de cobre (II) e ascorbato de sódio foram solubilizados em água Milli-Q<sup>®</sup>, enquanto que os derivados azido de açúcares foram solubilizados em 450  $\mu$ L de THF. Os reagentes foram succionados para a seringa de reação, obedecendo a seguinte ordem: solução de sulfato de cobre (II), solução de ascorbato de sódio e solução de derivado azido. A reação do [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 foi mantida em agitação por 16 horas, enquanto que a reação dos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 foi mantida por 72 horas. Após esta etapa, foi feita a lavagem com cerca de 3 mL de solução aquosa 10% m/v de EDTA, sendo repetida por oito vezes. A lavagem seguinte foi feita da mesma forma que a realizada entre as etapas da síntese, ou seja, alternando os solventes DMF, IPA e DCM.

A FIG. 25 (p. 37) apresenta um esquema que descreve as etapas da metodologia empregada. A etapa (i) apresenta o acoplamento do resíduo propargilado de glicina ao restante da cadeia peptídica. A próxima etapa (ii) consiste na reação “click”, no qual o resíduo de propargilglicina, ainda protegido, tem acoplado ao seu grupamento alcino o anel triazólico com seus respectivos substituintes. A etapa (iii) se refere às lavagens após a reação “click”, seguida da desproteção do resíduo de PraGly. Por fim, foi realizado a clivagem e remoção dos grupos protetores de cadeia lateral, conforme descrito para o peptídeo HSP1 (item 4.2, p 33), para obtenção dos peptídeos análogos livres em solução.

**Figura 25:** Esquema de síntese para obtenção dos glicotriazol-peptídeo e triazol-peptídeo derivados do [Pra<sup>1</sup>]HSP1.



#### 4.3. Caracterização e Purificação dos produtos da síntese

Os peptídeos foram caracterizados por espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF em modo refletido, modelo *Autoflex Speed* da *Bruker Daltonics*<sup>®</sup>, equipado com *Laser Smart beamTM* operando em modo positivo e controlados pelo *software FlexControl 3.0* (*Bruker Daltonics*<sup>®</sup>), no laboratório do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os espectros foram obtidos no modo MS positivos e faixa de massa de 700 a 3500 Da e foram analisados no *software*

*FlexAnalysis* 3.0 (*Bruker Daltonics*<sup>®</sup>). A determinação da massa dos peptídeos ocorreu por meio do *software* *MMass*.

A análise dos peptídeos HSP1, [Pra<sup>1</sup>]HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 foi realizada na matriz CHCA. Para o preparo dessa matriz, dissolveu-se 5 mg de CHCA em 250 µL de acetonitrila, 200 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> e 50 µL de solução aquosa de TFA 3% v/v para obtenção de uma solução de CHCA 10 mg.mL<sup>-1</sup> (50 mmol.L<sup>-1</sup>).

Já para os peptídeos [p-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [p-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1, foi preparada uma matriz de DHB. Para o preparo, dissolveu-se 8 mg de DHB em 250 µL de acetonitrila, 200 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> e 50 µL de solução aquosa de TFA 3% v/v para obtenção de uma solução de DHB 10 mg.mL<sup>-1</sup> (50 mmol.L<sup>-1</sup>).

Em seguida, as amostras foram ressuspensas e adicionadas a matriz na proporção de 1:3 (peptídeo:solução) em volume. Todas as matrizes contendo os peptídeos foram aplicadas sobre a superfície de uma placa de aço (MTP *AnchorChip* 800/384, *Bruker Daltonics*<sup>®</sup>, *Billerica*, MA, EUA), previamente lavada com água Milli-Q<sup>®</sup>, metanol e álcool isopropílico.

Os peptídeos foram purificados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) *Varian*<sup>®</sup> (*Varian*, Inc.) modelo *Pro Star* 315 com detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star* 335 e válvula de injeção marca *Rheodyne*<sup>®</sup>, do departamento de química da UFVJM. Foi utilizada uma coluna analítica em fase reversa *Vydac*<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm) e *loop* de 1 mL. As fases móveis empregadas foram uma solução aquosa com TFA 0,1% (v/v) e solução de acetonitrila com TFA 0,8% (v/v).

#### 4.4. Preparo das Vesículas Fosfolipídicas Unilamelares

Para o preparo das vesículas fosfolipídicas unilamelares (LUVs) foi empregada a metodologia de desidratação/reidratação de vesículas (DRV) proposta por Kirby (Kirby e Gregoriadis, 1984). Inicialmente, o fosfolípido liofilizado foi solubilizado em 2 mL de clorofórmio, em seguida o solvente foi destilado em evaporador rotatório (60 °C) para obtenção do filme lipídico, sendo adicionado solução tampão em seguida. Foram utilizados três diferentes tamponantes, sendo eles: Tris-HCl 20 mM (NaCl 100 mM) em pH 8,5 Tris-HCl 20 mM (NaCl 100 mM) em pH 7,0 e fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0 para formação das vesículas multilamelares (MUVs). A fim de garantir a obtenção de vesículas unilamelares, foi realizado o congelamento em nitrogênio líquido e

descongelamento em banho-maria, com sonicação, à 40 °C por 3 minutos, sendo esse ciclo realizado por 8 vezes.

As vesículas unilamelares grandes (LUV) de caráter aniônico foram preparadas a partir de uma combinação dos fosfolipídios POPC e POPG na proporção (3:1). Já para as LUV contendo ergosterol, foi utilizada a mesma combinação de fosfolipídios e adicionado 30% de ergosterol em razão molar.

#### 4.5. Dicroísmo Circular (CD)

Estudos conformacionais foram realizados com os peptídeos HSP1, [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em solução de TFE e meio biomimético de SDS. Para isso, preparou-se soluções contendo 30% de TFE e 200 mM de SDS. O espectropolarímetro utilizado foi o JASCO<sup>®</sup> J-810, acoplado a um sistema de controle de temperatura *Peltier Jasco* modelo PFD-425S, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. As análises foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 100 µL e com 0,05 cm de caminho óptico, a 25 °C, com janela espectral de 190 a 260 nm. Foram acumuladas 5 varreduras para cada curva. O tratamento de dados e os cálculos de deconvolução para obtenção dos teores de estruturas secundárias foram realizados a partir dos *softwares Spectra Analysis<sup>®</sup>* e *CDpro<sup>®</sup>* (Sreerama e Woody, 2000).

#### 4.6. Degradação de Ergosterol

Os experimentos para avaliação do potencial de oxidação de ergosterol foram realizados com concentração de 200 µM dos peptídeos HSP1, [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1. O meio biomimético utilizado foi vesículas de POPC:POPG (3:1) 2 mM com 30% de ergosterol em mol. Após 18 h de agitação, os sistemas foram submetidos ao processo de extração de ergosterol por solução alcoólica de KOH 25% m/v com aquecimento em banho-maria à 85 °C, durante 2 horas. A solução alcoólica de KOH foi preparada a partir da diluição de 40 g de KOH em 35 mL de água deionizada Milli-Q<sup>®</sup>, etanol absoluto foi utilizado para completar o volume até 100 mL com (40% m/v), de modo a obter a concentração de 25% m/v no processo de extração (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999). Após o processo de extração, os sistemas foram resfriados em temperatura ambiente.

Posteriormente, outro processo de extração foi realizado adicionando-se 2 mL de hexano e centrifugando-se por 5 minutos a 3800 rpm, etapa repetida mais três vezes. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em tubos de ensaios, os quais foram posteriormente submetidos a aquecimento em rotoevaporador (70 °C) para total remoção do hexano. O ergosterol presente nos tubos de ensaio foi solubilizado em clorofórmio e transferido para um balão volumétrico de 5 mL. Uma curva padrão de ergosterol foi obtida a partir dos dados de absorção UV-Vis obtidos de um espectrômetro Varian Cary 50 conc UV-Vis, do Departamento de Química da UFVJM. As leituras foram realizadas em  $\lambda_{\text{max}}$  de 274 nm, com soluções estoques de ergosterol nas seguintes concentrações: 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Shaw e Jefferies, 1953). Os dados de absorbância foram analisados no *software OriginLab 8.5*.

#### 4.7. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

As análises de ITC foram realizadas em microcalorímetro VP-ITC da *Malvern*<sup>®</sup> (Malvern, Reino Unido), contendo o *software Microcal Origin*<sup>®</sup> 7.0 para tratamento dos dados, no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas da UFVJM. A calibração do equipamento foi realizada com água Milli-Q<sup>®</sup> tipo 1 e as soluções utilizadas foram degaseificadas em acessório *Microcal Thermovac*<sup>®</sup> da marca *Malvern*<sup>®</sup>.

Cada experimento consistiu de 49 injeções sucessivas de 5  $\mu\text{L}$  de LUV 10 mM em uma célula de reação contendo 1,4 mL de uma solução peptídica 100  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl pH 8,5, em intervalos de 240 s e tempo de injeção de 5 s. Afim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula calorimétrica, foi realizada uma primeira injeção de 1  $\mu\text{L}$ , sendo está descartada. Também foi realizado um experimento de titulação de LUV em solução tampão para obtenção do calor de diluição das vesículas, cujos os valores de cada injeção foram subtraídos das isotermas de titulação das LUV em solução de peptídeo.



#### 4.8. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em Solução

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro *Bruker*<sup>®</sup> *AVANCE III 500*, operando a frequência de 500,13 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H, a 125,75 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C e 50,68 MHz para o núcleo de <sup>15</sup>N. Esse equipamento contém o *software TopSpin 3.2 - Bruker BioSpin*<sup>®</sup> e pertence ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os espectros coletados foram de amostras contendo: 2 mM [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 ou [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1; 500 μM de SDS-*d*<sub>25</sub>; 10% (v/v) de D<sub>2</sub>O, padrão para o *lock* do equipamento; 1% (v/v) de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS), padrão interno da amostra. Todos dissolvidos em água acidificada (pH 4,0) para o volume final de 600 μL. Também foram preparadas soluções contendo 2 mM dos peptídeos dissolvidos em 420 μL de tampão fosfato (pH 7,0) e 180 μL de TFE-*d*<sub>2</sub>.

A TAB. 3 apresenta os parâmetros empregados nos experimentos de TOCSY, NOESY, HSQC e HMQC. Foram realizados experimentos unidimensionais de <sup>1</sup>H empregando-se a sequência de pulso *zg30* para homogeneização do campo (*shimming*), calibração de pulso e determinação do valor de frequência de irradiação do sinal da água (*o1*). Também foram realizados experimentos com supressão de sinal da água por *WATERGATE*, aplicando-se a sequência de pulso *zgesgp*. Os experimentos bidimensionais homonucleares de <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-TOCSY, <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY e heteronucleares <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC e *sofast* <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HMQC foram realizados usando uma sonda de banda larga inversa de tripla ressonância (TBI – *Triple Resonance Broadband Inverse*).

**Tabela 3:** Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN para os peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1, e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em soluções de TFE 30% v(v) e 200 mM de SDS.

	<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-TOCSY		<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-NOESY		<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC		sf- <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N-HMQC	
Sequência de Pulso (pulseprog)	mlevesgp		noesyegpph		hsqcedetgp		sfhmqcβgpph	
Número de Scans (ns)	88		50		128		220	
Scans Vazios (ds)	64		16		64		2048	
Tempo do Pulso	7,84 μs		7,84 μs		7,84 μs		7,84 μs	
Radiofrequência de 90° <sup>1</sup> H (p1)	7,84 μs		7,84 μs		7,84 μs		7,84 μs	
Tempo de Mistura	80 ms		120 ms		N/A		N/A	
Modo de Aquisição (FnMODE)	STATES-TPPI		STATES-TPPI		Echo-Antiecho		STATES-TPPI	
Dimensões	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
Janela Espectral (SW)	6002,4 Hz (12 ppm)	6002,4 Hz (12 ppm)	6001,6 Hz (12 ppm)	6001,6 Hz (12 ppm)	6009,6 Hz (12 ppm)	17607,4 Hz (140 ppm)	7002,8 Hz (14 ppm)	1773,9 Hz (35 ppm)
Número de Pontos no Domínio do Tempo (TD)	2048		512		2048		512	

Os dados obtidos foram processados com o *software* NMRPIPE® (Delaglio *et al.*, 1995), na plataforma *Linux*, distribuição Fedora versão 25. Os mapas de contorno foram assinalados no *software* NMRVIEW® versão 5.0.4 (Johnson e Blevins, 1994). Para o assinalamentos dos mapas de contornos TOCSY e NOESY, foi seguida a metodologia padrão de atribuição sequencial de peptídeos, a partir da correlações dos sinais de  $^1\text{H}$  intra e interresiduais da cadeia principal e lateral (Wüthrich, 1986). Os mapas de contorno heteronucleares,  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC e *sofast*  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMQC, foram utilizados para eliminar ambiguidades, assim como para obtenção dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ ,  $^{13}\text{C}_\beta$  e  $^{15}\text{N}$  amídico.

O cálculo das estruturas glicotriazol-peptídeo foi realizado em colaboração com o professor Elio Anthony Cino do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O Prof. Elio Cino, realizou o cálculo de 200 estruturas através do *software* de simulação *GROningen MACHine for Chemical Simulations* (GROMACS) juntamente com o pacote de dados *Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics* 36 (CHARMM36), os parâmetros dos grupos não proteicos foram obtidos através do *CHARMM General Force Field* (CGenFF) por inspeção manual. Para visualização das estruturas tridimensionais foram utilizados o *software Chimera* (versão 1.12).

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Síntese e Caracterização do Peptídeo HSP1 e Análogos

Os peptídeos HSP1 e [Pra<sup>1</sup>]HSP1 foram sintetizados manualmente seguindo a metodologia via estratégia Fmoc. O acompanhamento das sínteses foi realizado pelo teste de Kaiser após cada etapa de acoplamento e desproteção. Os resultados obtidos estão apresentados na TAB. 4, onde são apresentados o tempo de reação e excesso estequiométrico empregado em cada etapa de acoplamento.

**Tabela 4:** Condições e acompanhamento da síntese do HSP1 e [Pra<sup>1</sup>]HSP1. As letras “A” e “D” fazem referência a acoplamento e desproteção, respectivamente. O sinal negativo indica que não ocorreu a coloração dos grânulos e o positivo que houve coloração.

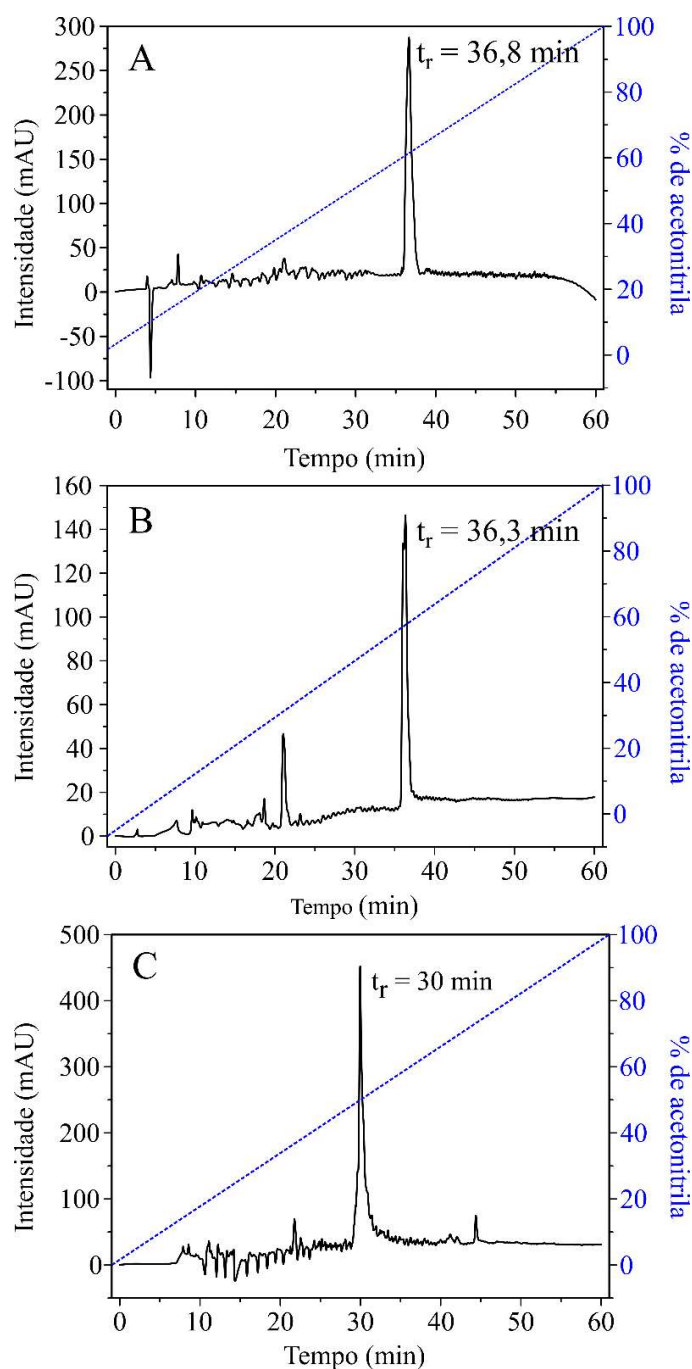
Acoplamento	Derivado de aminoácido HSP1	Derivado de aminoácido [Pra <sup>1</sup> ]HSP1	Excesso	Tempo de reação (h)	Resultado teste de Kaiser	
					(A)	(D)
1°	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Gly-OH	4	3	-	+
2°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
3°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
4°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
5°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
6°	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Ile-OH	3	2	-	+
7°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
8°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
9°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
10°	Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
11°	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	2	-	+
12°	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
13°	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Ile-OH	3	2	-	+
14°	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-PraGly-OH	3	2	-	+

O peptídeo [Pra<sup>1</sup>]HSP1 foi sintetizado como precursor dos derivados [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1. Para isto, os respectivos derivado azido (azida de sódio, azida de *p*-acetil-glicose e azida de *p*-acetil-glicosamina) foram utilizados

como descrito no Item 4.2.1 (p. 33) e apresentada na FIG. 25 (p 34). A FIG. 26 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE da amostra bruta da síntese dos peptídeos HSP1, [Pra<sup>1</sup>]HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1.

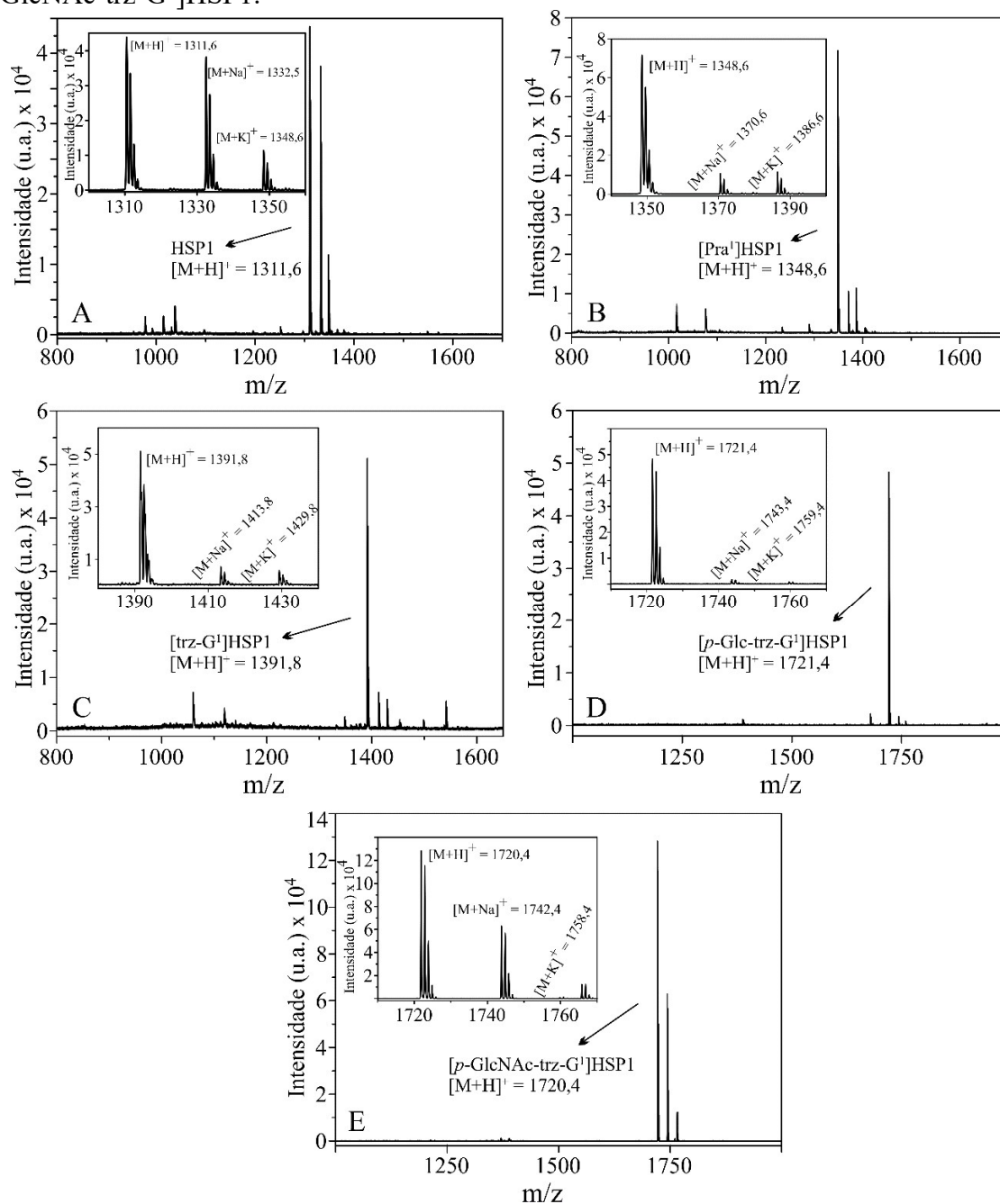
**Figura 26:** Perfil CLAE da amostra bruta da síntese dos peptídeos (A) HSP1, (B) [Pra<sup>1</sup>]HSP1 e (C) [trz-G<sup>1</sup>]HSP1.

Amostra injetada (100  $\mu\text{L}$  de uma solução 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em coluna C18 *Vydac*<sup>®</sup> 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) sendo o pH equilibrado com TFA. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em fluxo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A linha azul retrata a variação da concentração acetonitrila em porcentagem. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  214 nm.



Os cromatogramas indicam uma síntese eficiente, considerando um único sinal proeminente. No entanto, a purificação dos peptídeos [Pra<sup>1</sup>]HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 se fez necessária devido à presença de picos referentes a subprodutos da síntese. Para caracterização foram coletadas alíquotas das análises cromatográficas, com tempo de retenção de 36,8 min para o HSP1, 36,3 min para o [Pra<sup>1</sup>]HSP1 e 30 min [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, as quais foram posteriormente analisadas por espectrometria de massas em equipamento do tipo MALDI-ToF/ToF (FIG. 27).

**Figura 27:** Ionogramas MALDI-ToF/ToF obtidos no modo positivo para amostras brutas de (A) HSP1, (B) [Pra<sup>1</sup>]HSP1, (C) [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, (D) [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e (E) [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1.



A FIG. 27A (p. 45) confirma a obtenção do peptídeo HSP1 com massa teórica calculada de 1310,5 Da, sendo caracterizado pelos sinais correspondentes dos íons  $[M+H]^+$  em  $m/z$  1311,6 e seus adutos de sódio e potássio em  $m/z$  1332,5 e  $m/z$  1348,6, respectivamente. O  $[Pra^1]$ HSP1 possui massa teórica calculada de 1347,3 Da e os espectros de massa da FIG. 27B (p. 45) confirmam a sua obtenção, caracterizado pelos sinais correspondente aos íons  $[M+H]^+$  em  $m/z$  1348,6 e seus adutos de sódio e potássio em  $m/z$  1370,6 e  $m/z$  1386,6, respectivamente. O  $[trz-G^1]$ HSP1, por sua vez, apresenta massa teórica de 1390,7 Da, sendo confirmado pelos íons  $[M+H]^+$  em  $m/z$  1391,8 (FIG. 27C p. 45), assim como seus adutos de sódio e potássio em  $m/z$  1413,8 e  $m/z$  1429,8, respectivamente. Ainda foram analisadas amostras do  $[p-Glc-trz-G^1]$ HSP1 (FIG. 27D p. 45) e  $[p-GlcNAc-trz-G^1]$ HSP1 (FIG. 27E p. 45) de massas teóricas 1720,6 e 1719,4, respectivamente, sendo confirmadas pelos íons  $[M+H]^+$  em  $m/z$  1721,4 e 1720,4, assim como seus adutos de sódio em  $m/z$  1743,4 e  $m/z$  1742,4 e de potássio em  $m/z$  1759,4 e  $m/z$  1758,4. A partir desses resultados, é possível concluir que a SPFS se mostrou eficiente para obtenção do peptídeo  $[Pra^1]$ HSP1, assim como sua associação a reação “click” para o  $[trz-G^1]$ HSP1,  $[p-Glc-trz-G^1]$ HSP1 e  $[p-GlcNAc-trz-G^1]$ HSP1. Ainda foi possível observar uma conversão de praticamente todo o  $[Pra^1]$ HSP1 em seus derivados, devido à baixa intensidade de sinais  $m/z$  na FIG. 27C, 27D e 27E (p. 45) correspondentes a este peptídeo.

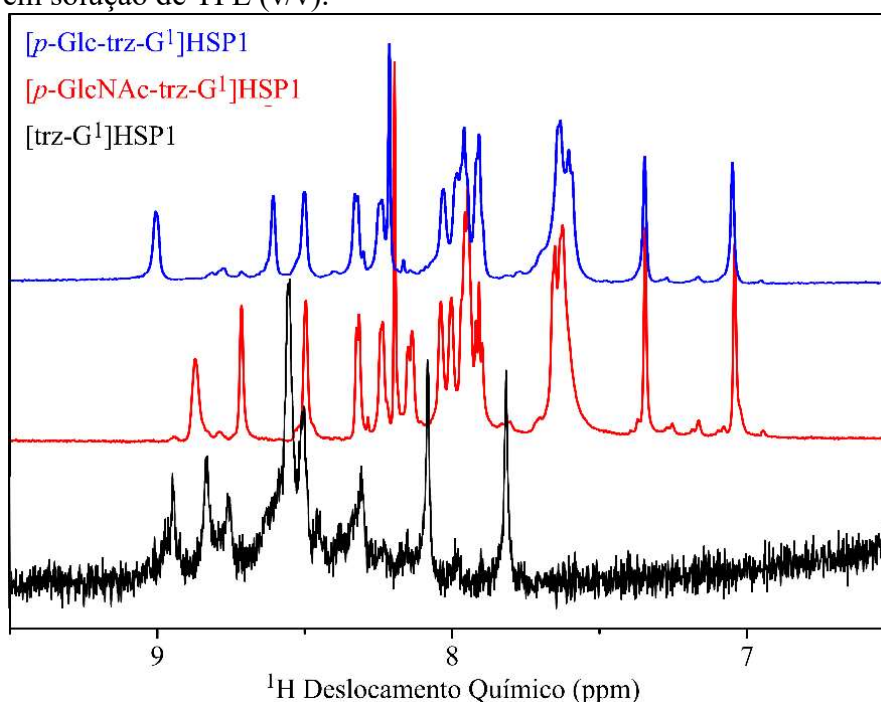
Após a caracterização dos peptídeos foram realizados experimentos para análises conformacionais e de interações peptídeo-membrana. Estudos estruturais, em TFE, foram realizados com os peptídeos  $[p-Glc-trz-G^1]$ HSP1 e  $[p-GlcNAc-trz-G^1]$ HSP1, afim de verificar a conformação adotada pelos PAM com estruturas glicotriazólicas inseridas na cadeia peptídica. A amostra dos peptídeos  $[p-Glc-trz-G^1]$ HSP1 e  $[p-GlcNAc-trz-G^1]$ HSP1 foram fornecidos por Eduardo Ferreira Coelho Junior provenientes do trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Junior, 2015).

## 5.2 Estudos Estruturais por Ressonância Magnética Nuclear em Solução

### 5.2.1 Meio biomimético de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)

A estrutura tridimensional dos peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 foi estudada no meio biomimético de TFE. O TFE foi escolhido por já ser estabelecido que este solvente favorece ligações de hidrogênio intramoleculares, induzindo o peptídeo a assumir uma conformação mais estável (Sonnichsen *et al.*, 1992). Além disso, também foi empregado este meio para comparação com a estrutura de HSP1 em TFE já publicada anteriormente (Prates *et al.*, 2004). Como os glicotriazol-peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 compartilham a mesma estrutura primária, diferenciando entre si apenas pela substituição de um oxigênio por nitrogênio na cadeia sacarídea (FIG. 15 p 21), era esperado que os sinais característicos dos resíduos de aminoácido fossem muito similares, conforme evidenciado pelos espectros unidimensionais de <sup>1</sup>H (FIG. 28). Por outro lado, verificou-se grande alargamento dos sinais de hidrogênio amídico do [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, o que indica elevada dinâmica conformacional para a cadeia peptídica, impossibilitando assim uma análise estrutural de alta resolução.

**Figura 28:** Espectros unidimensionais <sup>1</sup>H dos peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em azul, [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em vermelho e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em preto, ampliação da região amídica, em solução de TFE (v/v).



Desta forma, foram utilizados os mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC editado e  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC para atribuição completa dos sinais de ressonância de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  dos glicotriazol-peptídeos, seguindo a metodologia de Wüthrich (1986). Neste item, serão apresentados apenas os mapas de contorno do peptídeo [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1, enquanto que os do [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 encontram-se em anexo (Anexos 3 e 4). Entretanto, as interações em regiões características dos hidrogênios de açúcares serão apresentados para ambos os glicotriazol-peptídeos.

A análise inicial foi realizada com mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY, no qual foram observadas as correlações intrarresiduais de cada resíduo de aminoácido. Como cada resíduo de aminoácido apresenta um sistema característico de *spin*, também denominados padrão de TOCSY, foi possível a sua identificação dos diferentes tipos de resíduos de aminoácidos da sequência primária do peptídeo. O padrão de deslocamento químico dos núcleos de hidrogênio para os diferentes resíduos de aminoácidos está apresentado no diagrama do anexo 2 (p. 81). O resíduo de alanina (Ala), por exemplo, pôde facilmente ser identificado, apresentando correlações na região amídica de  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\beta$ . Além disso, por possuir em sua cadeia lateral apenas um grupo metila, o deslocamento químico ( $\delta$ ) do  $\text{H}_\beta$  geralmente ocorre em valor menor quando comparado a maioria dos  $\text{H}_\beta$  de outros resíduos de aminoácidos, sendo registrado no TOCSY em  $\delta = 1,5$  ppm. O resíduo do ácido aspártico, assim como o da alanina, possuem apenas correlações entre  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\beta$ , no entanto, como o  $\text{C}_\beta$  está ligado a um grupo carboxila que é retirador de densidade eletrônica, ocorre um maior deslocamento químico deste núcleo e consequentemente também do núcleo de  $\text{H}_\beta$ , que para este peptídeo foi identificado em  $\delta = 2,89$  ppm.

Por outro lado, resíduos de lisina (Lys) possuem cadeia lateral mais extensas e apresentam correlações entre  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\alpha$ ,  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\beta$ ,  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\gamma$ ,  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\delta$  e  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\epsilon$ . As correlações  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\epsilon$  são mais difíceis de serem observadas, devido ao maior número de ligação entre os dois núcleos, o que faz com que o acoplamento escalar ( $^7J$ ) seja menor e mais difícil de ser detectado. Contudo, as correlações  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\beta$ ,  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\gamma$  e  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\delta$  apresentam deslocamento próximo, pois o grupo amino presente na cadeia lateral também exerce efeito indutivo na molécula, assim como os grupos da cadeia principal. Como resultado, há uma pequena variação de ambiente químico para esses núcleos, que geralmente registram deslocamentos de  $\text{H}_\beta$ ,  $\text{H}_\gamma$  e  $\text{H}_\delta$  próximos à 1,75 ppm, 1,48 ppm e 1,62 ppm, respectivamente (Wang, 2008).



Os resíduos de isoleucina (Ile) e leucina (Leu) por sua vez, apresentam correlações intrarresiduais de  $H_N-H_\alpha$ ,  $H_N-H_\beta$ ,  $H_N-H_\gamma$  e  $H_N-H_\delta$ . No entanto, devido à similaridade estrutural, diferindo-se apenas na posição de um grupo metila ( $CH_3$ ), os deslocamentos dos seus núcleos são muito semelhantes. Sendo assim, é muito difícil identifica-los apenas pela análise do mapa de contornos TOCSY, sendo necessário uma análise em conjunto com o mapa de contornos NOESY, onde a partir das correlações interresiduais é possível sanar essas ambiguidades (Williamson, 1993).

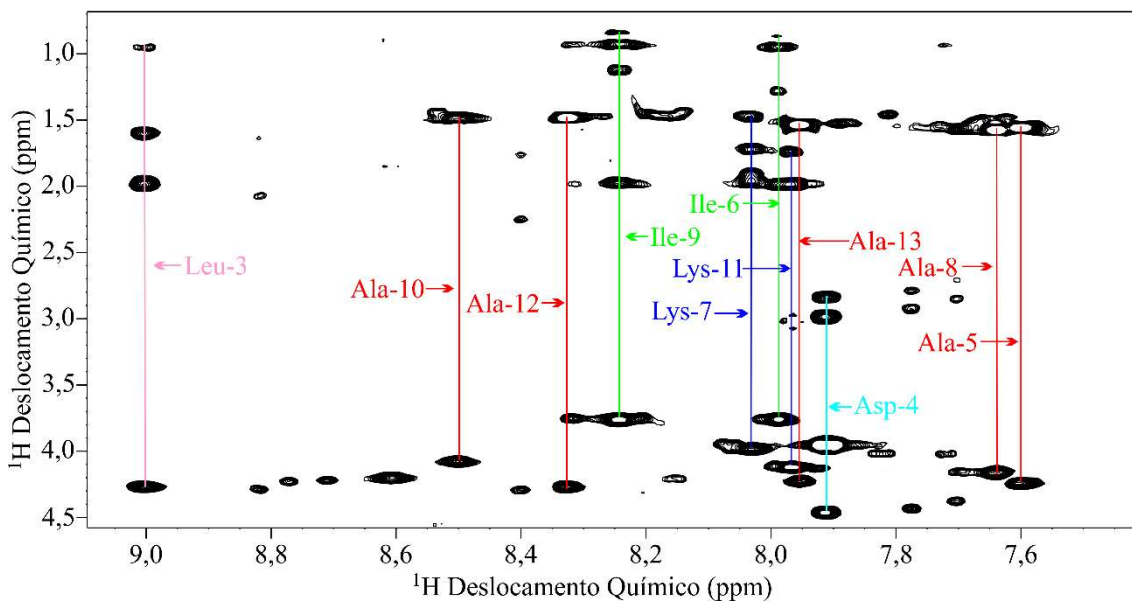
Com base nessas informações, foi realizado o assinalamento completo dos mapas de contornos de  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  para identificação dos resíduos de aminoácidos de suas estruturas primárias. Foi possível identificar praticamente todos os resíduos, com exceção daqueles presentes nas extremidades *N*-terminal (resíduo de Gly-1 contendo o substituinte glicotriazol  $[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly1}$  e Ile-2) e *C*-terminal (Gly-14). Esses resíduos, por se situarem nas extremidades da cadeia peptídica apresentam maior mobilidade conformacional e, com isso, os ambientes químicos não são bem definidos, tornando de difícil interpretação suas correlações (Mielke e Krishnan, 2009). Além disso, não há um deslocamento químico definido para o resíduo de Gly-1 contendo a unidade glicotriazol, fazendo com que seja possível apenas a especulação dos deslocamentos químicos de seus núcleos. Assim sendo, tanto os núcleos  $^1\text{H}$  do anel triazólico e  $^1\text{H}$  do carbono  $sp^2$  ligado a glicina não foram identificados. Como a núcleo de hidrogênio do anel triazólico também não possui nenhum vizinho hidrogenado, não há transferência de magnetização desse núcleo para outro de hidrogênio. Consequentemente, não foram verificadas correlações interresiduais referentes ao resíduo de  $[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly1}$ .

A FIG. 29 (p 50) apresenta o mapa de contorno  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}\text{-TOCSY}$  com ampliação da região amídica, na qual são observados os sinais característicos da correlação de  $H_N$  com  $H_\alpha$  e hidrogênios de cadeia lateral interresidual para os resíduos de aminoácidos alanina, isoleucina, leucina e lisina..

**Figura 29:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

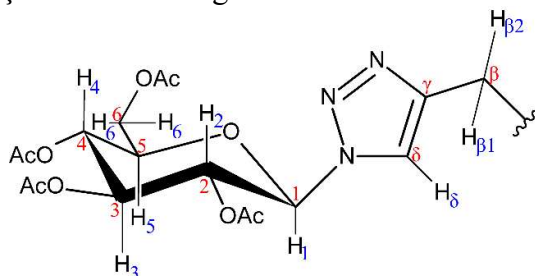
Ampliação da região amídica. Sendo representadas as correlações do resíduo de alanina (em vermelho), de isoleucina (em verde), de leucina (em rosa) e de lisina (em azul).

$[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly - Ile - Leu - Asp - Ala - Ile - Lys - Ala - Ile - Ala - Lys - Ala - Ala - Gly}$   
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



A identificação do sistema de *spin* do açúcar (FIG. 31 p. 51) também foi feita utilizando o mapa de contornos TOCSY. Os carboidratos também apresentam deslocamentos químicos característicos, cujos os sinais de hidrogênios encontram-se na região de  $\delta$  entre 4 e 6 ppm (Bubb, 2003). Estruturas como a glicotriazólica, são pouco convencionais e, portanto, não apresentando muitos dados na literatura. Para facilitar a análise dos dados de RMN, nesse trabalho foi utilizada a nomenclatura para as atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da unidade glicotriazol (FIG. 30).

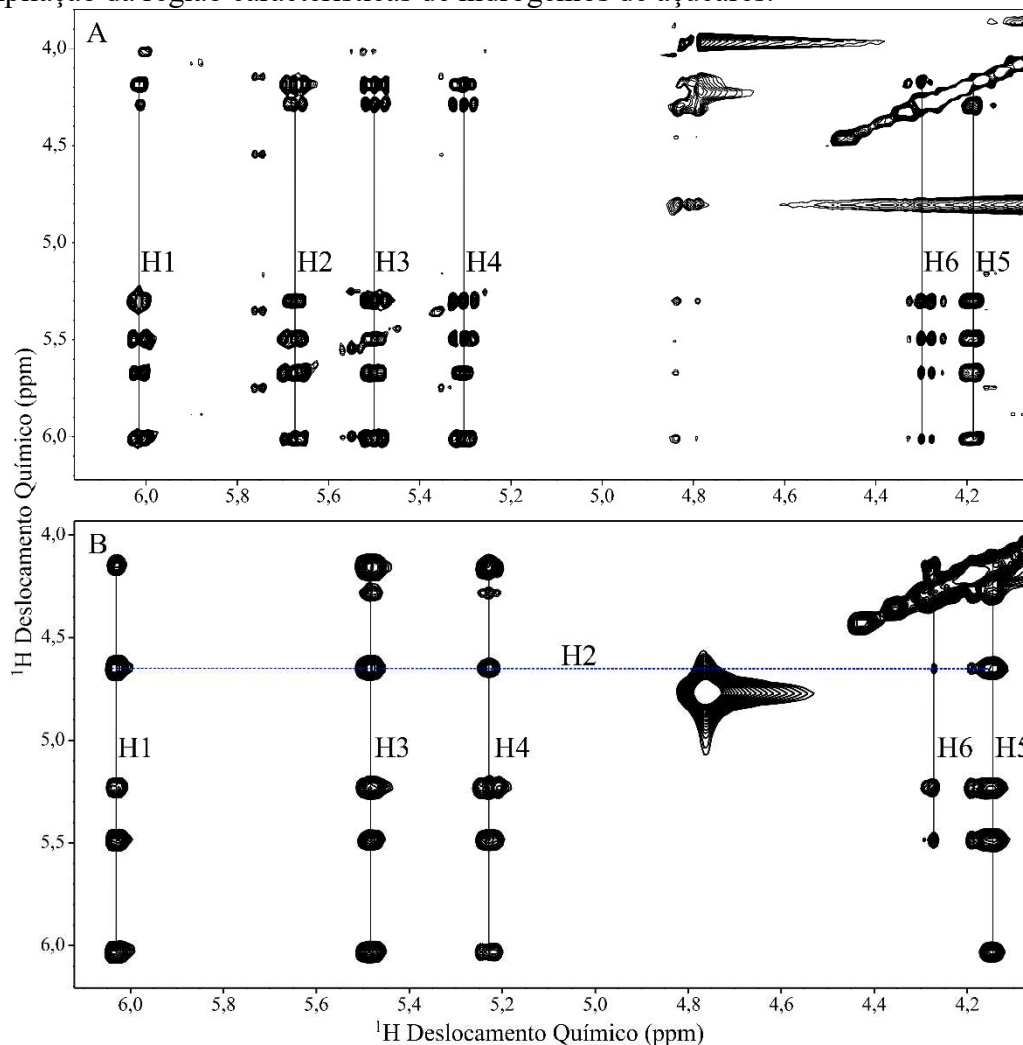
**Figura 30:** Representação da estrutura glicotriazol e sua nomenclatura definida.



Para isso, a estrutura glicotriazólica foi dividida em duas partes. Na primeira, considerando o anel triazol e o grupo metilênico (CH<sub>2</sub>) como uma extensão da cadeia lateral do resíduo de Gly-1. Portanto, os carbonos sequencias denominados de C<sub>β</sub>, C<sub>γ</sub> e

C $\delta$ . Na segunda, para a estrutura do açúcar, iniciou-se do carbono anomérico (C1) e considerou-se os demais sequenciais de acordo com a ordem crescente (C2, C3, C4, C5 e C6).

**Figura 31:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial dos peptídeos (A) [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e (B) [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v). Ampliação da região características de hidrogênios de açúcares.



Comparando-se os deslocamentos químicos de [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP, a partir da análise da FIG. 31 verifica-se pouca variação no deslocamento químico dos hidrogênios das unidades sacarídeas, com exceção do H2, como apresentado na tabela do anexo 6 (p 87). Isso comprova que essas estruturas realmente compartilham de ambientes químicos muito semelhantes, assim como apontado anteriormente. No entanto, os sinais correspondentes ao núcleo H2 no espectro de TOCSY e NOESY para o [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 não foram observados, sendo identificado, pela presença de sinais de correlação TOCSY de todos os outros núcleos do sacarídeo em  $\delta = 4,65$  ppm,

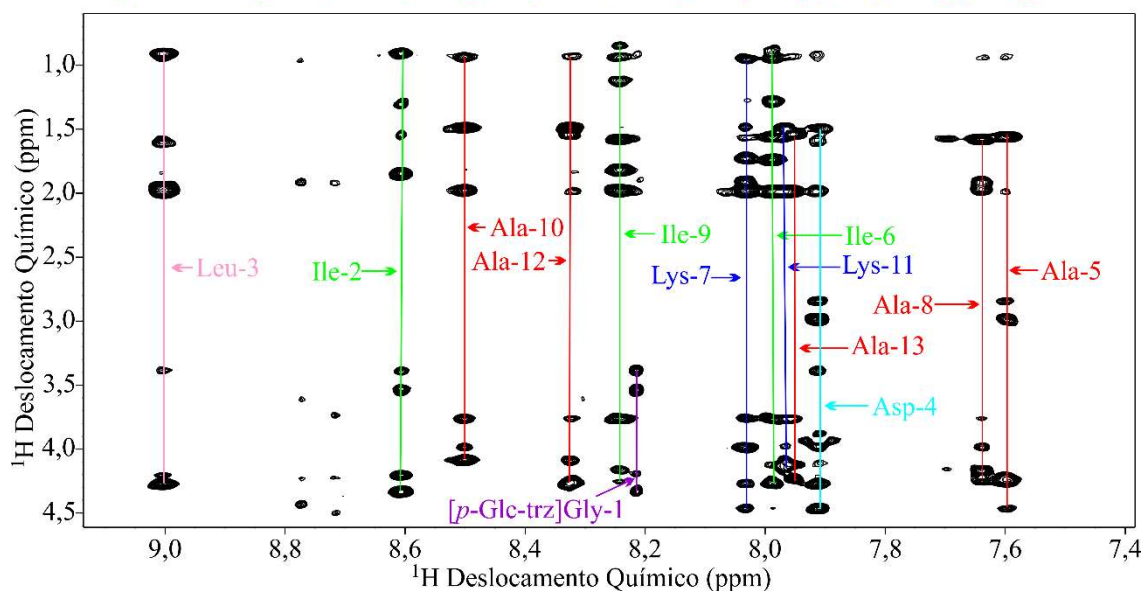
sinal este que foi considerado correspondente ao núcleo de H2. Essa diferença de deslocamento químico era prevista, já que o nitrogênio é um átomo menos eletronegativo do que o oxigênio, exercendo assim menor efeito indutivo sobre o H2. Conseqüentemente, este núcleo apresenta menor deslocamento químico quando comparado na estrutura do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$ . A linha tracejada em azul da FIG. 31B (p 51) aponta as correlações TOCSY dos núcleos de H1, H3, H4, H5 e H6 com o núcleo de H2.

O mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY, no qual são observados acoplamento dipolares através do espaço, foi empregado para identificação dos vizinhos de cada resíduo de aminoácido a partir das correlações de nOes interresiduais. Dessa forma, foi possível o sequenciamento da estrutura primária do peptídeo e a diferenciação de resíduos do mesmo tipo na cadeia peptídica. Neste trabalho, a atribuição foi iniciada pelo ácido aspártico (Asp-4), que além de possuir apenas um resíduo, também apresenta sinais característicos de  $\text{H}_\beta$ .

**Figura 32:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

Ampliação na região amídica, destacando os sistemas de spin dos resíduos de ácido aspártico (em ciano), alanina (em vermelho), de propargilglicina (em roxo), de isoleucina (em verde), de leucina (em rosa) e de lisina (em azul).

$[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly}$  - Ile - Leu - Asp - Ala - Ile - Lys - Ala - Ile - Ala - Lys - Ala - Ala - Gly  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



A atribuição dos resíduos foi realizada de acordo com suas posições na sequência primária. Sabendo-se que as cadeias peptídicas dos glicotriazol-peptídeo adquirem conformação helicoidal em solução de TFE e presença de micelas de SDS, conforme

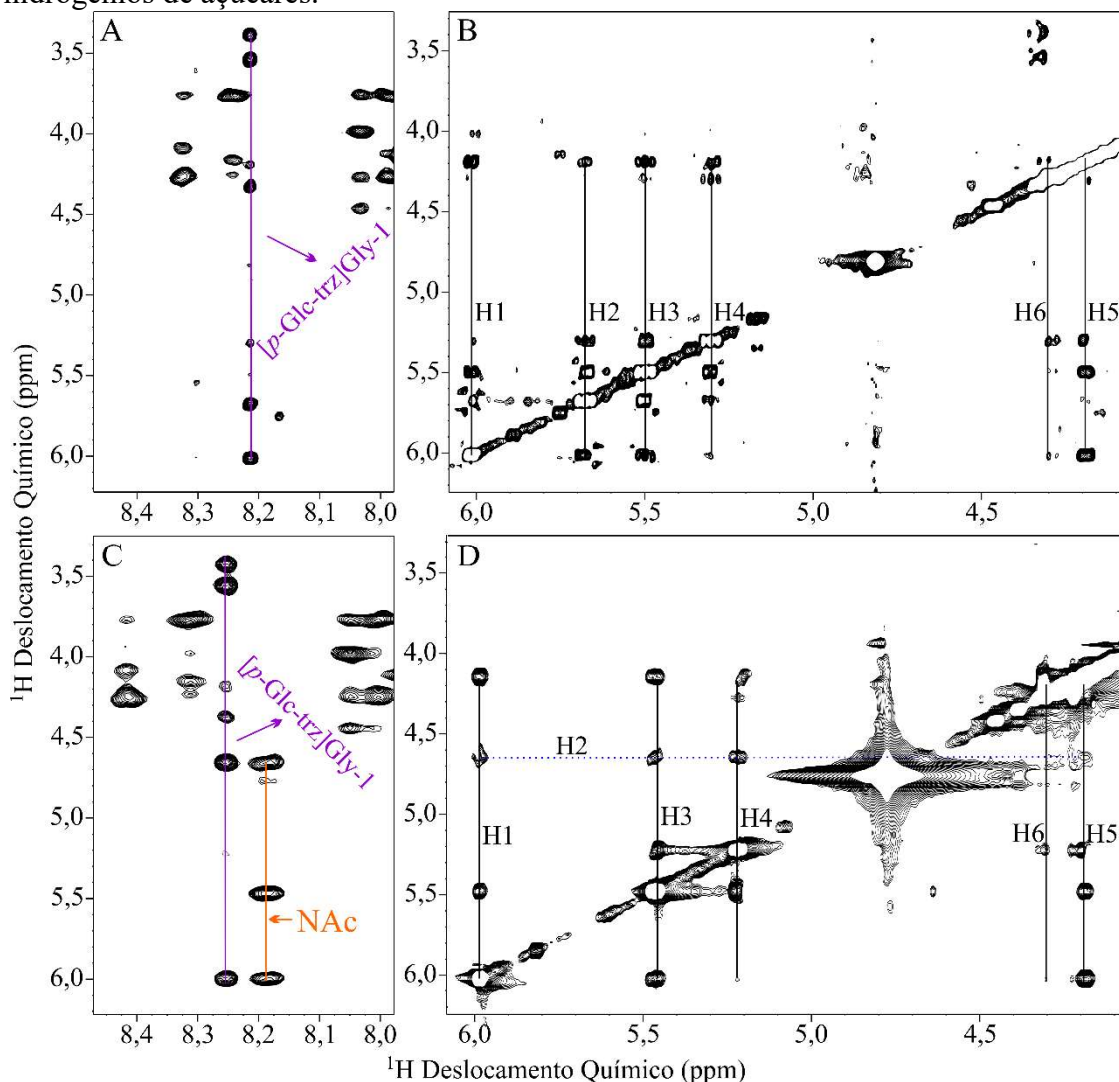
avaliado pelos dados de CD (FIG. 45 p 61), foram identificadas correlações do tipo  $H_{NN}(i,i+1)$ ,  $H_{NN}(i,i+2)$ ,  $H_{\alpha N}(i,i+1)$ ,  $H_{\alpha N}(i,i+2)$ ,  $H_{\alpha N}(i,i+3)$ ,  $H_{\alpha N}(i,i+4)$ ,  $H_{\beta N}(i,i+1)$  e  $H_{\alpha\beta}(i,i+3)$ . A FIG. 33 (p 54) apresenta um resumo dos principais nOes interresiduais para cada as cadeias peptídicas de ambos os glicotriazol-peptídeos.

Importante destacar as correlações  $H_{NN}(i, i+1)$  e  $H_{\alpha N}(i, i+1)$  do resíduo de Leu-3, que permitiram identificar o resíduo de Ile-2 ( $\delta = 8,60$  ppm). O que foi fundamental para a identificação do  $^1\text{H}$  do anel triazólico com deslocamento químico próximo a 8,20 ppm. Isso porque foram identificados dois sinais de 3,55 e 3,40 ppm, deslocamento característicos de grupos  $\text{CH}_2$  ligado diretamente em anéis aromáticos de azóis (como no caso da Histidina). Esses sinais apresentaram correlações com o hidrogênio amídico do resíduo de Ile-2, indicando uma correlação do tipo  $H_{\beta N}(i, i+1)$ , auxiliando assim na identificação do resíduo de [*p*-Glc-trz]Gly.

Ainda nas análises dos mapas de contornos NOESY, foram assinalados os sinais correspondentes ao acoplamento dipolar dos núcleos  $^1\text{H}$  triazólicos com os  $^1\text{H}$  anoméricos no deslocamento químico de  $\delta = 6,00$  ppm para o [*p*-Glc-trz- $\text{G}^1$ ]HSP1 e de  $\delta = 5,97$  ppm para o [*p*-GlcNAc-trz- $\text{G}^1$ ]HSP1 (Figura 33). Estas correlações, juntamente com as correlações  $H_{\beta N}(i, i+1)$  entre o hidrogênio amídico do resíduo de Ile-2 e o grupo  $\text{CH}_2$  do resíduo de [*p*-Glc-trz- $\text{G}^1$ ]HSP1 e [*p*-Glc-trz- $\text{G}^1$ ]HSP1, tornou possível concluir que os sinais próximos a 8,2 ppm eram referentes ao núcleo do  $^1\text{H}$  triazólico. No caso do [*p*-GlcNAc-trz- $\text{G}^1$ ]HSP1 ainda foi possível observar as correlações entre os núcleos H1, H2 e o  $^1\text{H}$  amídico do grupo *N*-acetila ligado ao carbono H2 (FIG. 33C p 54).

**Figura 33:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

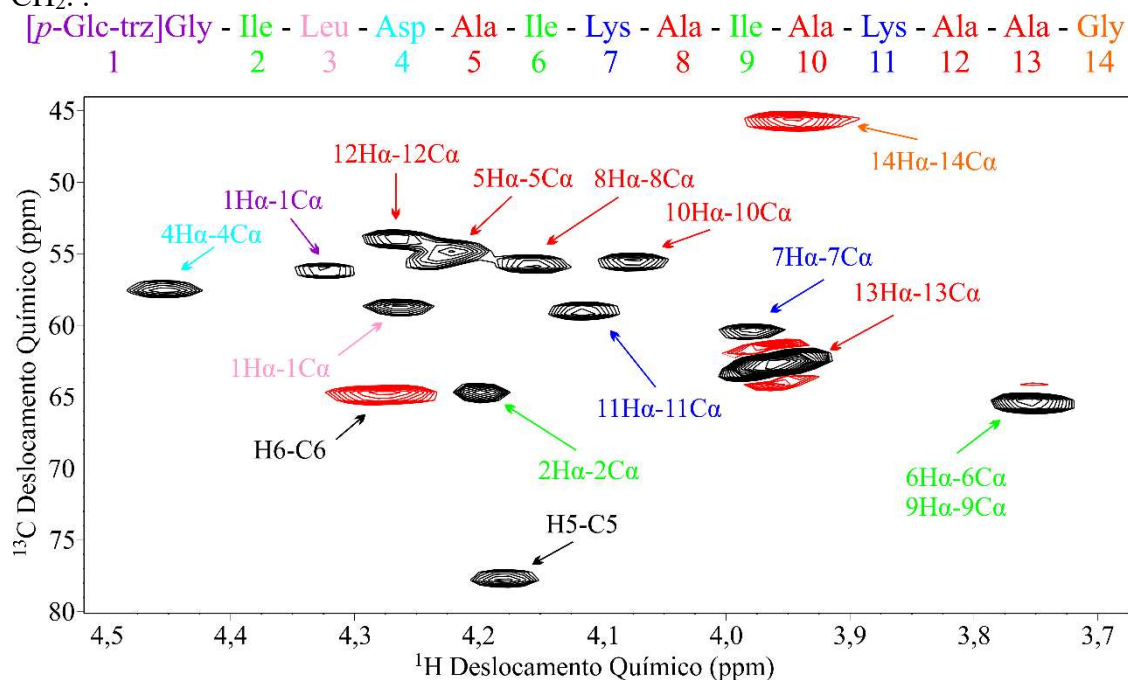
Ampliação (A) do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e (C)  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  na região amídica e (B)  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e (D)  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  região características de hidrogênios de açúcares.



Os mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 34) foram assinalados com base nos deslocamentos de  $^1\text{H}_\alpha$  e  $^1\text{H}$  de cadeia lateral referente a cada resíduo identificado pelo TOCSY e NOESY, e permitiram prontamente a identificação dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  diretamente ligados ( $^1J$ ) a estes núcleos de hidrogênio. Foram realizados experimentos de HSQC editado (Berger e Braun, 2004) para fácil diferenciação entre carbonos CH,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Nesse tipo de experimento as correlações de núcleos de carbonos que apresentam ligações com um ou três núcleos de hidrogênios apresentam-se em fases opostas aqueles que estão ligados a dois átomos de hidrogênio, conforme pode ser verificado na FIG. 34 p 55.

**Figura 34:** Ampliação na região  $C\alpha$  e  $H\alpha$  do mapa de contornos  $^1H$ - $^{13}C$ -HSQC editado para o  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]$ HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).

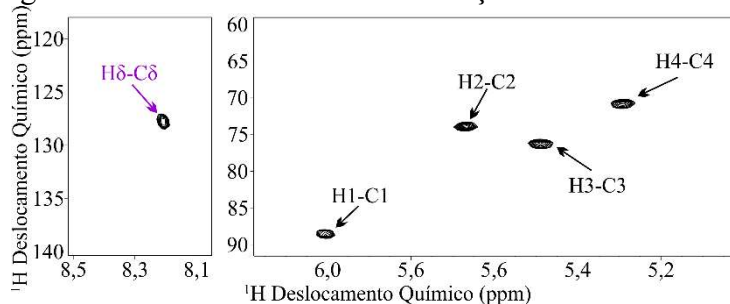
Os sinais em preto são referentes aos núcleos CH e os sinais em vermelho aos núcleos de  $CH_2$ .



É possível notar alguns sinais “satélites” em torno dos resíduos Ala-13 e Ile-6/Ile-9. Esses sinais, também chamados de artefatos, são vestígios originados durante o processamento dos mapas de contornos, podendo ser gerados durante uma má execução da etapa ou resultantes de acoplamentos escalares  $^{13}C$ - $^{13}C$  ( $^1J_{CC}$ ), muitas vezes atribuídos como ruídos (Bigler, 2000). Ainda foi observado que os sinais para o  $C\alpha$  da Ile-6 e Ile-9 possuem o mesmo deslocamento químico assim como ocorreu para o  $H\alpha$ , revelando um ambiente químico muito similar para estes resíduos de aminoácidos. O que já era esperado, tendo em vista que na estrutura primária, ambos apresentam como vizinhos resíduos de alanina, além de estarem próximos espacialmente de lisinas. Ainda foram observados os deslocamentos químicos dos carbonos da estrutura sacarídea assim como o carbono triazol (FIG. 35 p 56).

**Figura 35:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC editado parcial para o  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

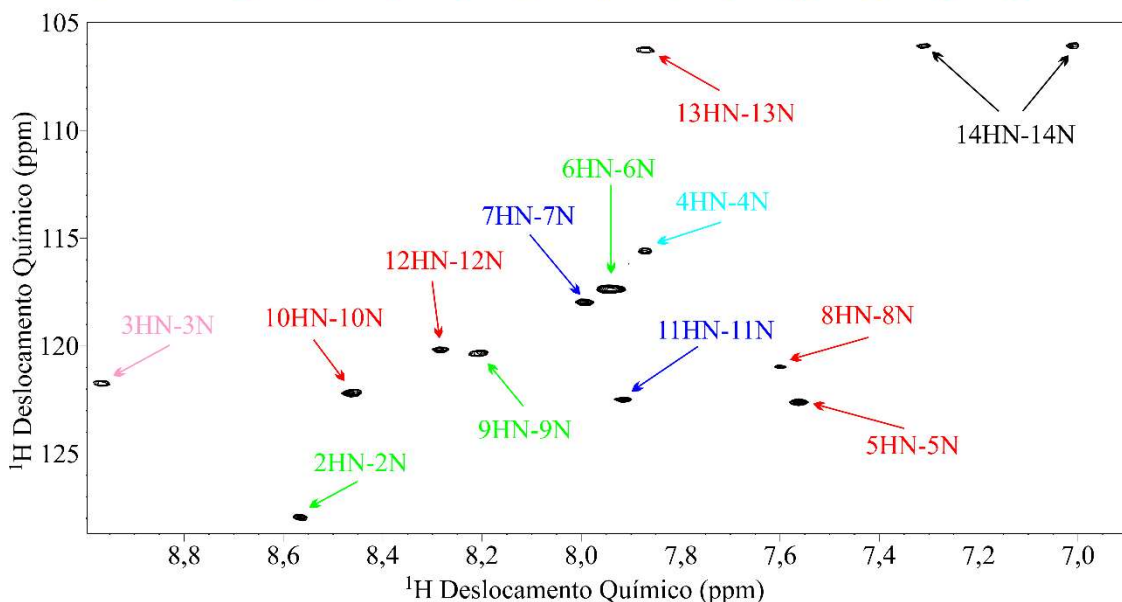
Ampliação na região característica de carbonos de açúcares.



Por fim, foi assinalado o mapa de contornos  $sf$ - $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC (Figura 36), onde foram identificadas todas as correlações entre  $^1\text{H}_\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ , com exceção para os resíduos PraGly-1 e Gly-14. No entanto, a Figura 36 aponta dois sinais referentes a possíveis correlações do Gly-14, que podem ser referentes ao  $^1\text{H}$  amídico assim como o  $^1\text{H}$  da região C-terminal amidada. Contudo, não foram identificados nos outros experimentos informações que pudessem levar a essa confirmação.

**Figura 36:** Mapa de contornos  $sf$ - $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMQC parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

$[p\text{-Glc-trz}]$ Gly - Ile - Leu - Asp - Ala - Ile - Lys - Ala - Ile - Ala - Lys - Ala - Ala - Gly  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



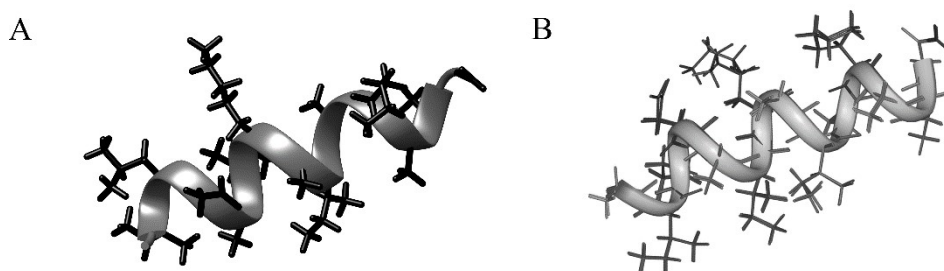
Após o assinalamento de todos os experimentos de RMN, os sinais foram convertidos em dados de restrição de distância e ângulos diedros. Para as restrições, foi utilizado a intensidade dos nOes identificadas no experimento de NOESY. Enquanto que os ângulos foram obtidos pelos deslocamentos químicos de  $C_\alpha$ ,  $H_\alpha$ ,  $C_\beta$  e  $H_\beta$  do HSQC,



assim como dos  $^{15}\text{N}$  amídico do *sf*-HMQC. Posteriormente, esses dados foram empregados na realização dos cálculos de dinâmica molecular para obtenção das estruturas tridimensionais. Inicialmente, os cálculos foram realizados desconsiderando a cadeia lateral do resíduo de [*p*-Glc-trz]Gly1, para uma verificação primária das atribuições nos mapas de contornos (FIG. 37A).

**Figura 37:** Projeção da estrutura tridimensional prévia do (A) [*p*-Glc-trz-G1]HSP1 e (B) HSP1.

(A) Estrutura tridimensional calculada para o [*p*-Glc-trz-G1]HSP1 desconsiderando a cadeia lateral da PraGly-1 e (B) estrutura calculada por Prates *et al.*, 2004.



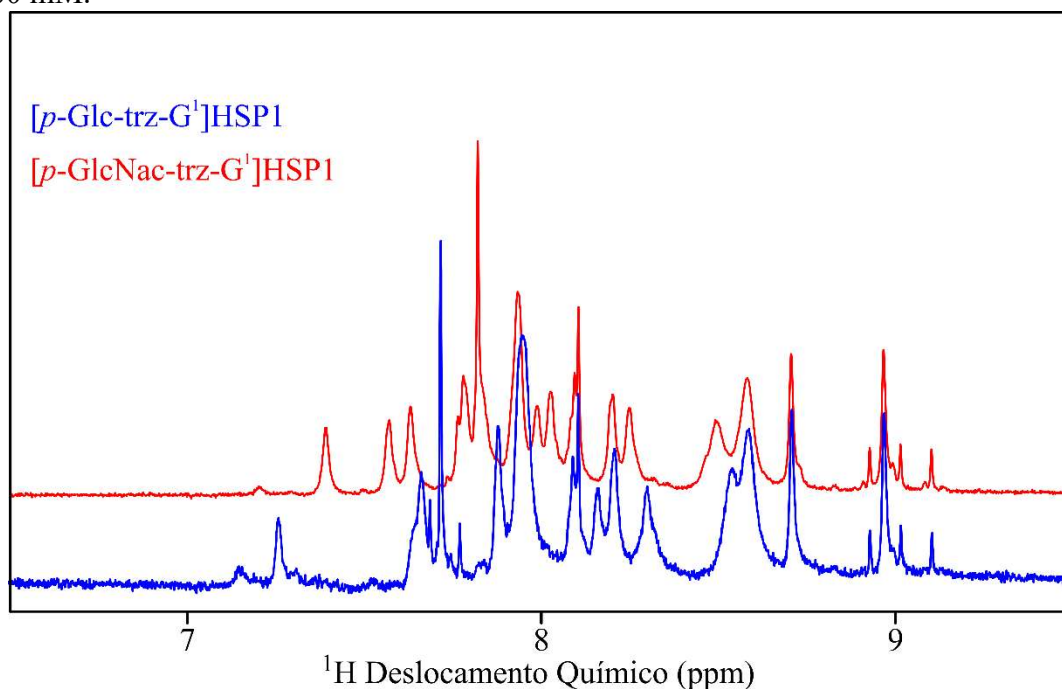
Observando a FIG. 37 verifica-se que a inserção da estrutura glicotriazol não altera a conformação preferencial do peptídeo. A FIG. 37B traz a estrutura previamente calculada em TFE por Prates *et al.* (2004), na qual o peptídeo HSP1 apresenta estrutura em  $\alpha$ -hélice por toda extensão da cadeia peptídica. Comparando-a com a FIG. 37A do [*p*-Glc-trz-G1]HSP1, nota-se que a  $\alpha$ -hélice continua sendo a estrutura predominante. A partir disso é possível concluir que o glicotriazol não provoca perturbações na estrutura a ponto de modificar a conformação preferencial do peptídeo frente a membrana.

Para uma melhor compreensão das diferenças conformacionais implicadas pela estrutura sacarídea ainda foram realizados experimentos em SDS. Isso porque, o meio micelar de SDS combina o ambiente apolar da membrana bem como suas propriedades interfaciais e, além disso, são conhecidas por serem adequados a determinação da estrutura de RMN de alta resolução de peptídeo (Lindberg *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Dessa forma, foram realizados experimentos de RMN para os glicotriazol-peptídeos em presença de micelas de SDS.

### 5.2.2 Meio Biomimético de SDS

Para o assinalamento dos mapas de contorno dos glicotriazol-peptídeos em presença de 500 mM de SDS foram utilizados os mesmo experimentos e estratégia empregada em solução de 30% TFE (v/v). Assim como esperado em TFE por se tratarem de peptídeos com mesma cadeia principal, diferenciando-se apenas por um átomo na cadeia sacarídea, os núcleos apresentaram deslocamentos químicos muito parecidos, sendo evidenciado pela FIG. 38. No entanto, os mapas de contorno do [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 não foram apresentados no texto, pois ainda não foram completamente finalizados, estando presente apenas aqueles que evidenciaram alguma diferença.

**Figura 38:** Espectros unidimensionais <sup>1</sup>H dos peptídeos [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em azul e [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em vermelho, ampliação da região amídica, em solução de SDS 500 mM.

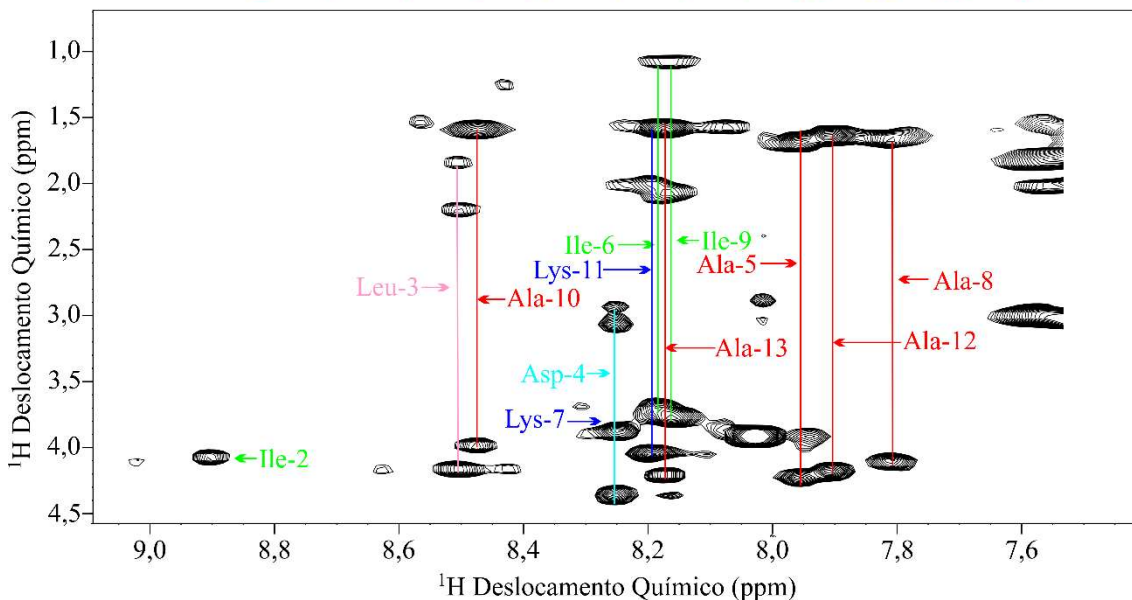


O TOCSY em SDS apresentou diferenças nos deslocamentos químicos de diversos núcleos, podendo ser principalmente observada no início da cadeia peptídica nos resíduos de Leu-3, Asp-4 e Ala-5. Além disso, a interpretação dos mapas de contornos apresentou maior dificuldade quando em comparação a solução de TFE por conta da ausência de sinais de correlação na região amídica. No entanto, pela análise da FIG. 39 p 59 é possível notar que foi possível identificar todos os sinais referentes ao núcleo do resíduo Asp-4, assim como os sinais de correlações dos núcleos das alaninas.

**Figura 39:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de SDS 500 mM.

Ampliação da região amídica. Sendo representadas as correlações do resíduo de alanina (em vermelho), de isoleucina (em verde), de leucina (em rosa) e de lisina (em azul).

$[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly} - \text{Ile} - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Ala} - \text{Ile} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ile} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Gly}$   
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

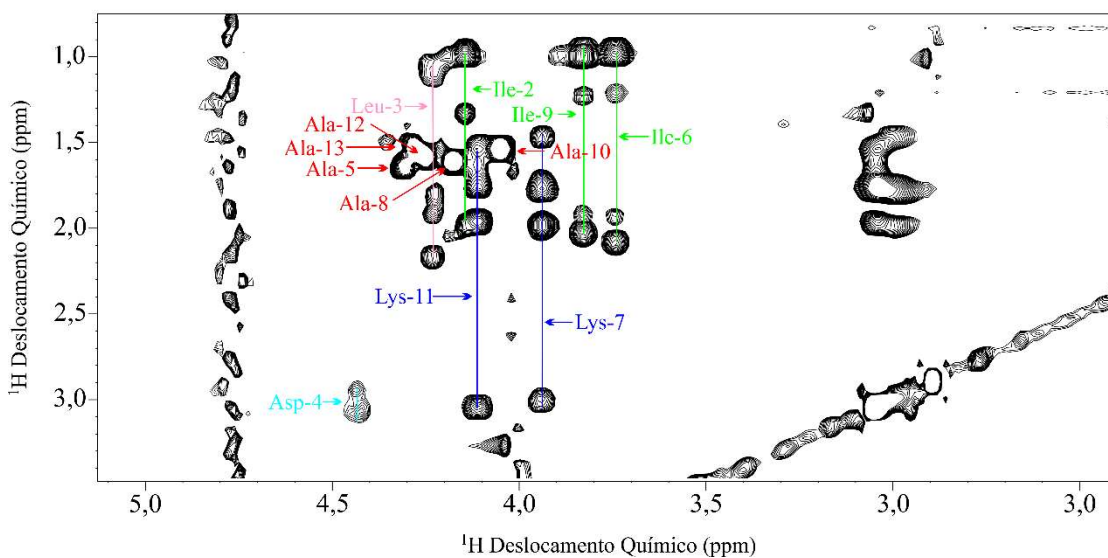


Apesar da ausência de sinais ainda foi possível identificar na região amídica todas as correlações  $\text{H}_{\text{Na}}$ , possibilitando assim a determinação dos deslocamentos químicos de  $\text{H}_{\alpha}$  de cada um dos resíduos em ambos os casos.

**Figura 40:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de SDS 500 mM.

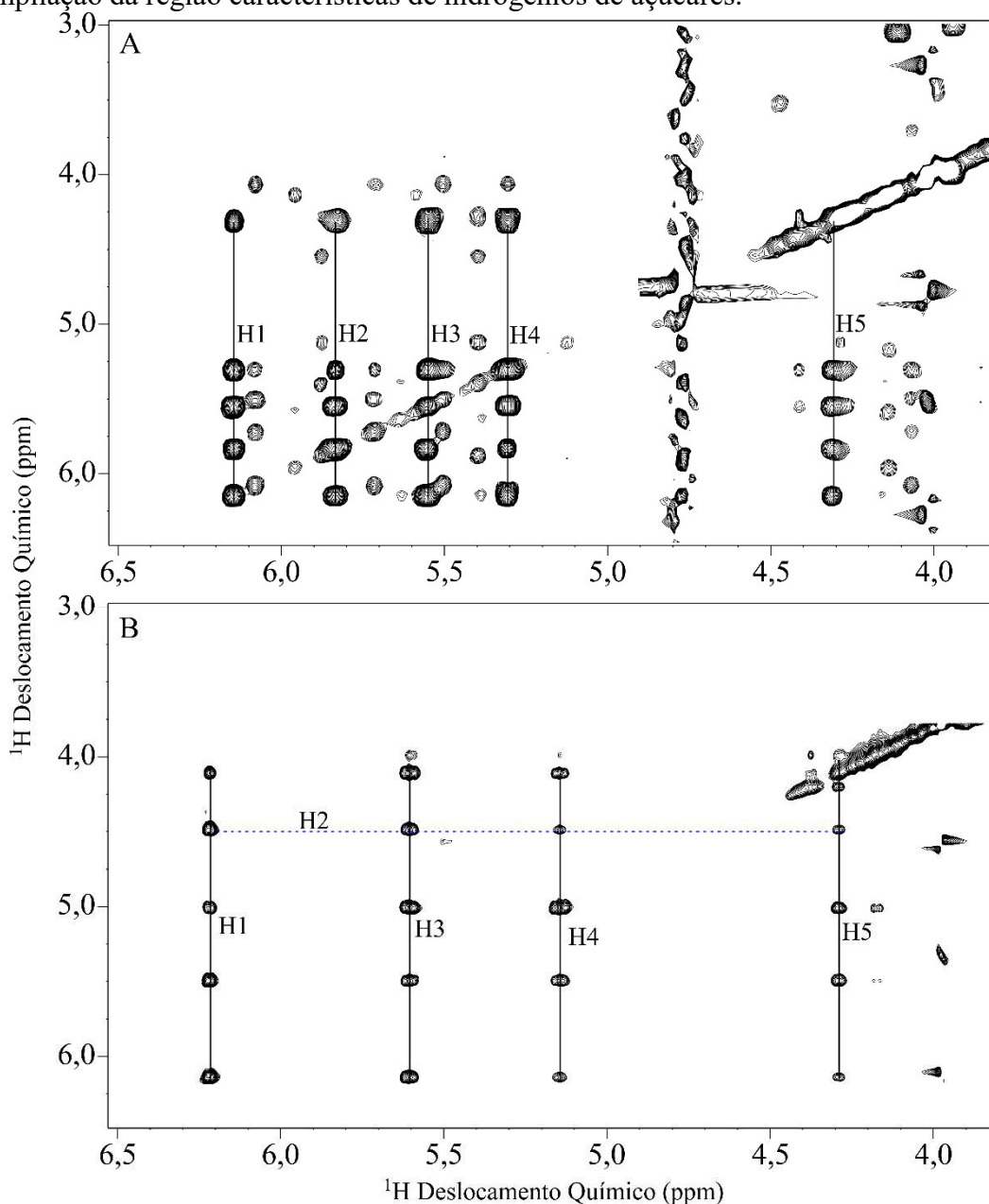
Ampliação da região de hidrogênio alfa. Sendo representadas as correlações do resíduo de alanina (em vermelho), de isoleucina (em verde), de leucina (em rosa) e de lisina (em azul).

$[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly} - \text{Ile} - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Ala} - \text{Ile} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ile} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Gly}$   
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Sendo assim, foram obtidos os deslocamentos químicos de  $H_\beta$ ,  $H_\gamma$  e  $H_\delta$ , a partir das correlações com  $H_\alpha$ , dos resíduos aos quais não foi possível identificar na região amídica, como mostrado na FIG. 40 p. 59. É possível notar que diferente do experimento com TFE, em SDS o sinal do núcleo Ile-2 foi identificado a partir das correlações com  $H_\alpha$ , que não apareceram no experimento anterior. Partindo para o mapa de contornos da região de açúcares (FIG. 41), não foi observada nenhuma mudança em relação aos experimentos de TFE, apenas leve alterações no deslocamento químico dos núcleos de hidrogênio, condizente com a mudança de ambiente químico.

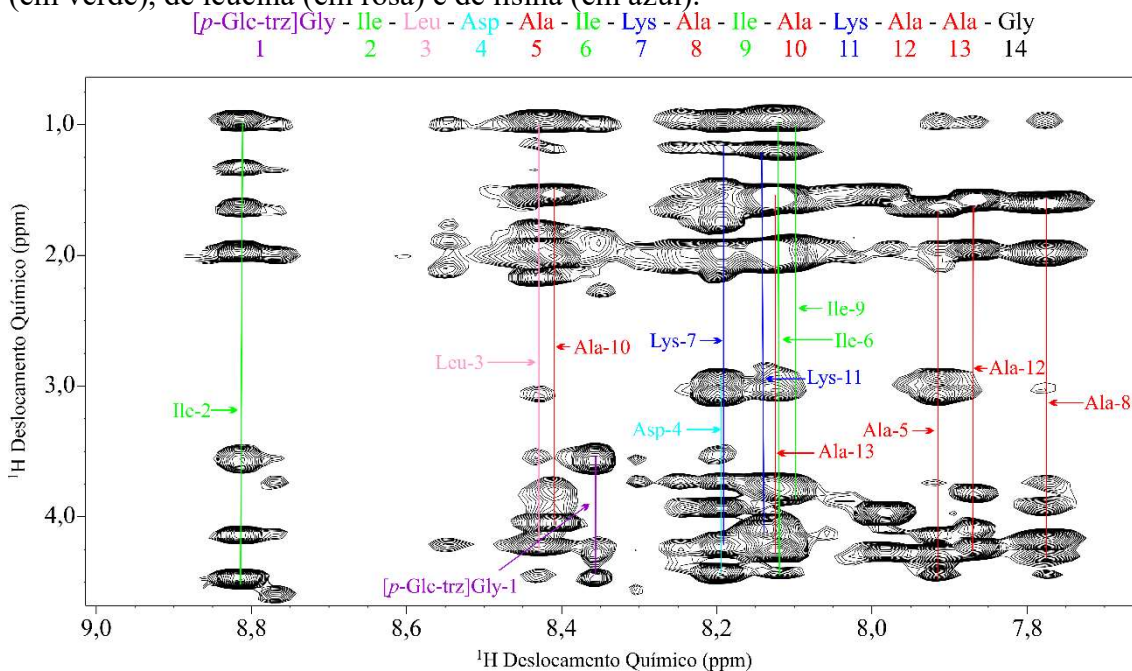
**Figura 41:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial dos peptídeos (A) [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e (B) [*p*-GlcNac-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em solução de SDS 500 mM. Ampliação da região característica de hidrogênios de açúcares.



Através da análise do mapa de contornos NOESY foi possível assinalar todas as correlações sequências e características de estruturas em  $\alpha$ -hélice assim como em TFE. Além disso, os sinais de correlação que não foram observados no TOCSY estavam presentes no NOESY, corroborando com a interpretação realizada. Na FIG. 42 ainda pode-se notar que o sinal referente a correlação  $H_N-H_\beta$  e  $H_N-H_\delta$  do resíduo de  $[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly}1$ , dessa vez não apresentaram dois sinais, permitindo concluir que há uma menor mobilidade nessa região, não havendo mais uma grande diferença de ambientes químicos entre os dois núcleos de hidrogênio  $H_\beta$ .

**Figura 42:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de SDS 500 mM.

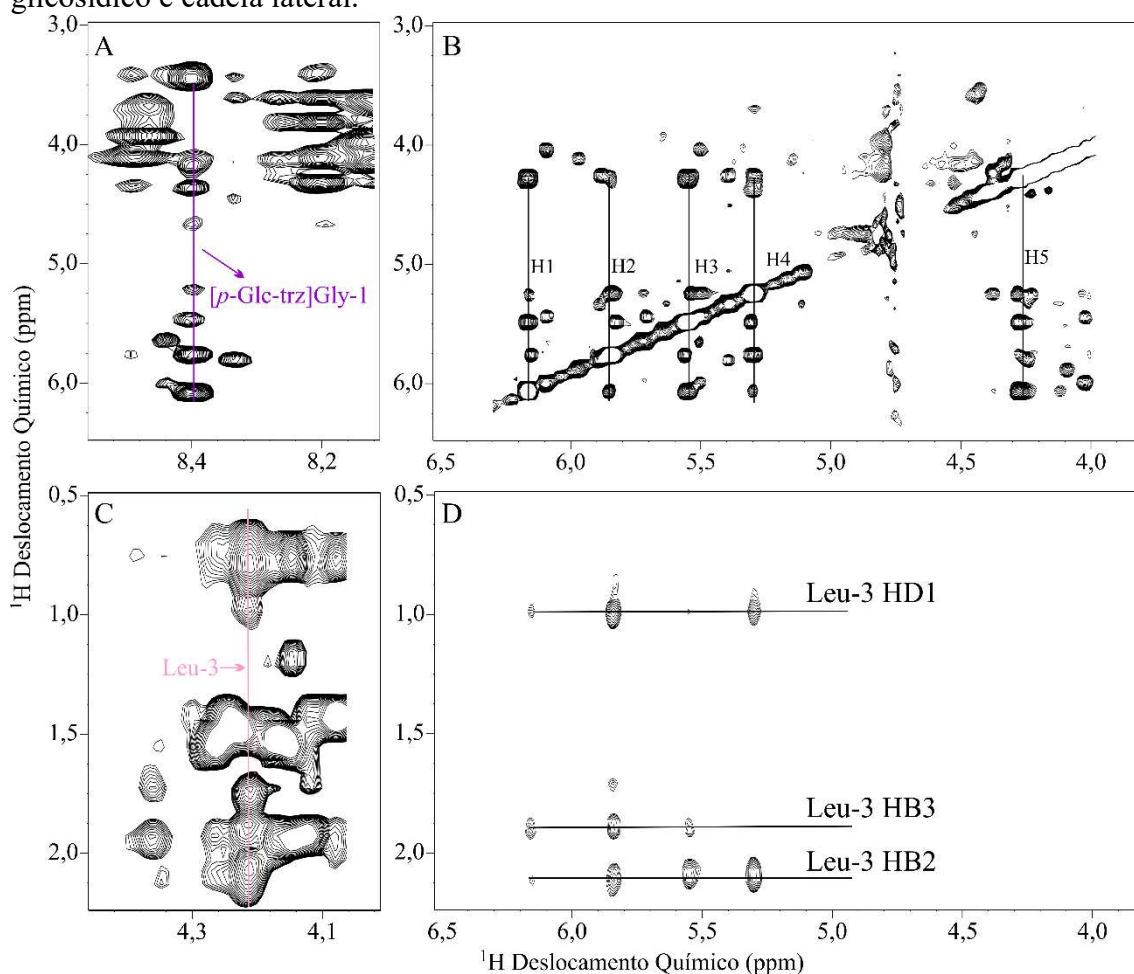
Ampliação na região amídica, destacando os sistemas de spin dos resíduos de ácido aspártico (em ciano), alanina (em vermelho), de propargilglicina (em roxo), de isoleucina (em verde), de leucina (em rosa) e de lisina (em azul).



Ainda no mapa de contornos NOESY, foi possível observar as correlações dos hidrogênios glicosídicos com o  $^1\text{H}$  triazólico do resíduo de  $[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly}1$  (FIG. 43 p 62), bem como correlações dos  $^1\text{H}$  glicosídicos com sinais de deslocamento químico característicos de  $H_\beta$ ,  $H_\gamma$  e  $H_\delta$  do resíduo de Leu-3. Estas correlações, não foram notadas em solução aquosa de 30% TFE, são fortes indícios de alterações na conformação da cadeia peptídica, proveniente das interações com o meio micelar.

**Figura 43:** Mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de SDS 500 mM.

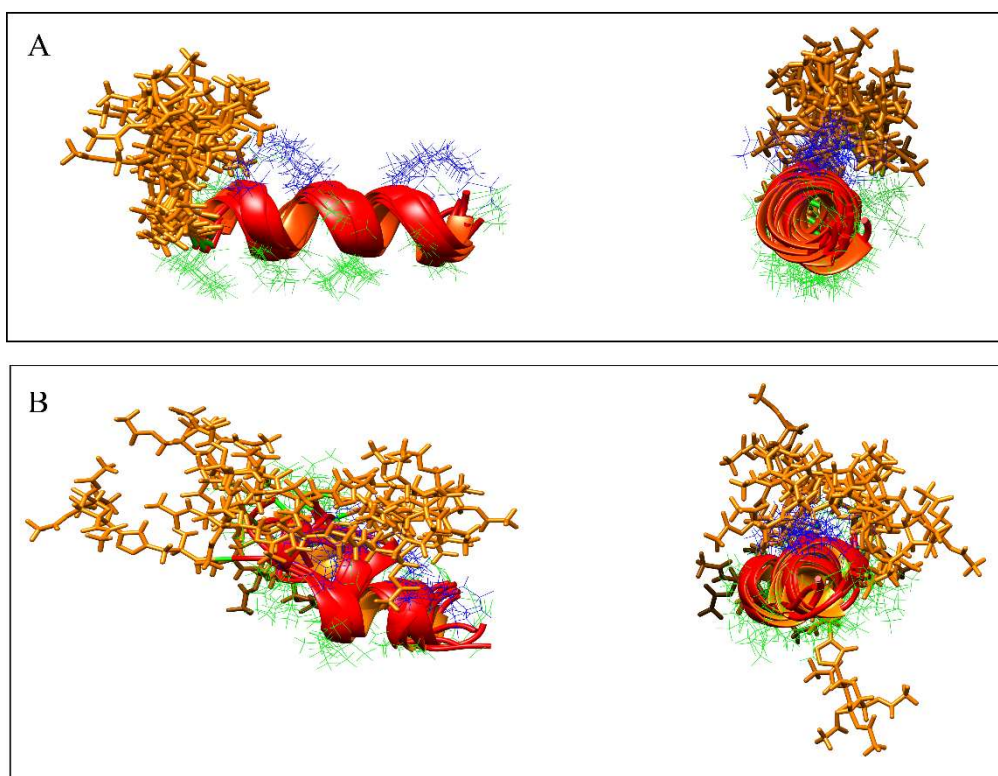
Ampliação (A) na região amídica, (B) região característica de hidrogênios glicosídicos, (C) região de correlação  $\text{H}_\alpha$  e cadeia lateral e (D) região de correlação hidrogênio glicosídico e cadeia lateral.



Logo, pode-se assumir que em presença de micelas de SDS a cadeia lateral do resíduo de  $[p\text{-Glc-trz}]\text{Gly1}$  encontra-se na mesma face hidrofóbica a qual o resíduo de Leu-3 também está localizado. Essa orientação indica uma maior estabilidade da estrutura helicoidal da região  $N$ -terminal, o que facilitaria o ancoramento da estrutura peptídica na bicamada fosfolipídica, elevando o potencial antifúngico do derivado glicotriazólico em relação aos peptídeos HSP1 e o  $[\text{trz-G}^1]\text{HSP1}$ , assim como apresentados por Junior (2017). A FIG. 44 (p 63) mostra a sobreposição das 10 estruturas tridimensionais de menor energia para o peptídeo  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v) e no meio biomimético de SDS.

**Figura 44:** Estrutura tridimensional do peptídeo [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em (A) solução de TFE 30% (v/v) (B) e em presença de meio micelar de SDS.

Sobreposição das 10 estruturas de menor energia em solução de TFE 30% (v/v) (A) e meio 200 mM de SDS (B). As cadeias laterais apolares estão representadas em verdes enquanto que as polares carregadas em azul. A unidade glicotriazólica encontra-se colorida na cor laranja.



A comparação entre os conjuntos de estruturas nos dois meios revela maior estabilidade da estrutura helicoidal e anfipaticidade em solução de TFE 30% (v/v) (FIG. 44A). Em TFE a estrutura glicotriazólica mantém-se sempre orientada em mesma face hidrofílica da estrutura helicoidal, enquanto que na presença de micelas de SDS há uma maior dinâmica conformacional da região *N*-terminal, ocasionando em distorções na hélice, e uma distribuição mais heterogênea da estrutura sacarídea em relação as faces hidrofílicas e hidrofóbicas. Possivelmente, a primeira etapa da interação peptídeo-membrana ocorre segundo uma atração eletrostática da face hidrofílica de [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 (FIG. 44A) com a superfície da membrana celular, TFE, facilitando desta forma o ancoramento da região *N*-terminal na interface da membrana. Em seguida, a cadeia peptídica pode alterar sua orientação em diferentes formas, como observado em micelas de SDS (FIG. 44B), inserindo as cadeias laterais de resíduos apolares direcionadas por interações hidrofóbicas com o interior da membrana. Como resultado dessa maior dinâmica molecular tem-se um ganho na capacidade de perturbação da estrutura da

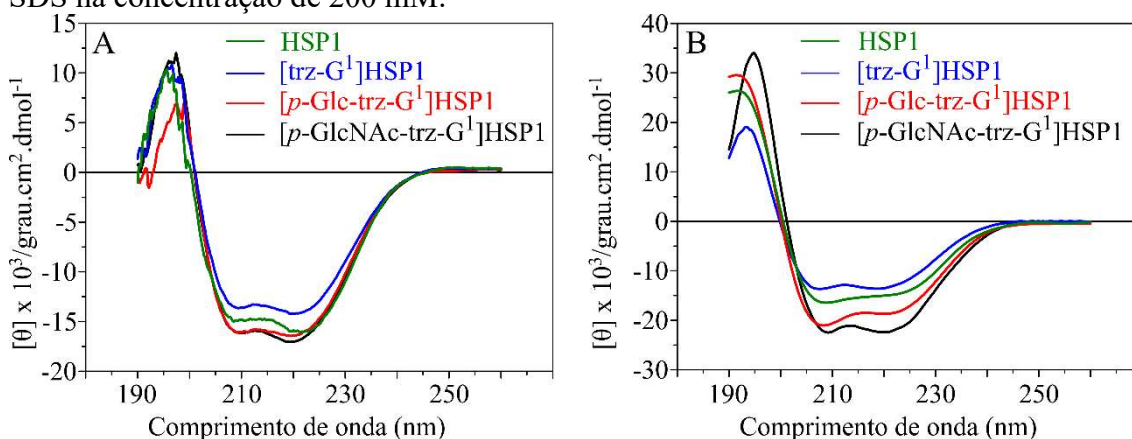
bicamada lipídica e conseqüentemente maior atividade microbiana dos glicotriazol-peptídeos em relação ao HSP-1 e trz-HSP1 (Henzler-Wildman e Kern, 2007).

### 5.3 Dicroísmo Circular (CD)

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica que permite a obtenção de informações a respeito das preferências conformacionais de peptídeos em diferentes meios biomiméticos. Dessa forma, foram propostos experimentos de CD para o peptídeo HSP1 e análogos em solução de TFE 30% (v/v) e presença de micelas de SDS na concentração de 200 mM para efeitos de comparação do comportamento conformacional dos peptídeos nesses diferentes meios.

A técnica de CD é bastante sensível a variações conformacionais de peptídeos. Onde estruturas com conformação em  $\alpha$ -hélice caracteristicamente apresentam nesse tipo de experimento dois vales negativos em  $\lambda_{\text{máx}}$  208 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  222 nm e um pico positivo de alta intensidade em  $\lambda_{\text{máx}}$  196 nm. A  $\beta$ -folha por sua vez é caracterizada por dois vales negativos em  $\lambda_{\text{máx}}$  180 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  217 nm e um pico positivo de média intensidade em  $\lambda_{\text{máx}}$  195 nm (Woody, 1995). A Figura 40 apresenta os espectros de CD para o peptídeo HSP1 e seus análogos.

**Figura 45:** Espectros de CD obtidos em (A) solução de TFE 30% (v/v) e (B) micelas de SDS na concentração de 200 mM.



A partir dos espectros obtidos (FIG. 45), é possível verificar que tanto o HSP1 quanto seus análogos apresentam conformação em  $\alpha$ -hélice quando em presença de vesículas, apresentando os respectivos sinais, sendo um pico positivo em  $\lambda_{\text{máx}}$  196 nm e duas bandas negativas entre  $\lambda_{\text{máx}}$  208 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  222 nm. Já na presença apenas de solução tampão, ambos apresentam comportamento característico de estruturas desenoveladas.



Ainda foram realizados cálculos de deconvolução para obtenção do valor de conteúdo helicoidal dos peptídeos em cada meio, cujos os valores estão apresentados na TAB. 5.

**Tabela 5:** Conteúdo helicoidal calculado para os peptídeos HSP1, [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em soluções de TFE 30% (v/v) e micelas 200 mM de SDS.

	% de conteúdo helicoidal ( <i>H</i> )	
	TFE 30% (v/v)	SDS 200 mM
<b>HSP1</b>	70	67
<b>[trz-G<sup>1</sup>]HSP1</b>	65	60
<b>[<i>p</i>-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1</b>	78	84
<b>[<i>p</i>-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1</b>	80	88

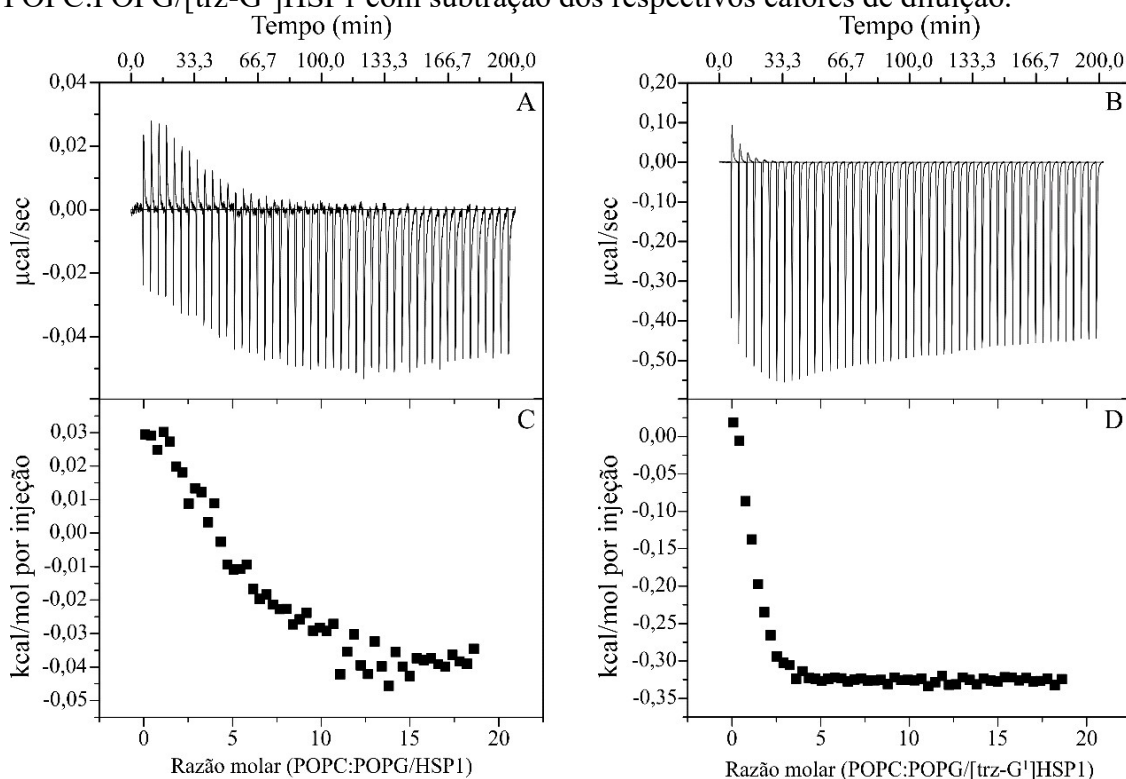
Os dados de helicidade molar (*H*) mostram que a introdução da estrutura tiazol não altera de forma significativa o perfil de estrutura secundária de HSP1. Contudo, a presença das unidades glicotriazol resultam em um aumento da helicidade em relação ao peptídeo original. Comparando-se a estrutura tridimensional do peptídeo HSP1 com as estruturas de [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 obtidas neste trabalho (FIG. 37 p 57), é possível notar uma similaridade na extensão da hélice na cadeia peptídica, que em ambas as estruturas estende-se do resíduo de Ile-2 a Gly-14. Neste sentido, o maior conteúdo de hélice deve estar relacionado com a maior constante de partição dos glicotriazol-peptídeos em comparação com HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 (Ladokhin *et al.*, 2010). Assim sendo, o estudo sugere que a presença das unidades glicotriazol aumentam a interação dos derivados em relação ao peptídeo HSP1.

#### 5.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Com o intuito de avaliar comparar a interação peptídeo-membrana de HSP1 e dos derivados sintetizados, foi proposto o estudo por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A técnica de ITC fornece parâmetros termodinâmicos onde, a partir das variações de calor gerado no sistema é possível prever os tipos de interações predominantes, sendo as principais eletrostáticas e hidrofóbicas (Ball e Maechling, 2009). Neste trabalho a ITC foi utilizada para verificar se a termodinâmica da interação peptídeo-membrana dos glicotriazol-peptídeos em comparação com o triazol-peptídeo e HSP1, e dessa forma, relacionar com o aumento na atividade antifúngica dos glicotriazol-peptídeos.

Foram realizados experimentos para os peptídeos HSP1, [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, [p-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [p-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1. Nas vesículas de POPC:POPG (3:1) em tampão tris-HCl em pH 8,5, foram utilizadas as concentrações de 10 mM para vesícula e de 100  $\mu$ M para os peptídeos HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, já para os experimentos com os analogos glicotriazolicos foi usada a concentração 50  $\mu$ M para os peptídeos e de 20 mM para as vesículas.

**Figura 47:** Isotermas de titulação calorimétrica para os peptídeos HSP1 e [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em POPC:POPG (3:1) em tampão tris-HCl em pH 8,5. Gráfico de fluxo de calor para cada injeção de POPC:POPG em (A) HSP1 e (B) [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em função do tempo. Entalpia por razão molar de (C) POPC:POPG/HSP1 e (D) POPC:POPG/[trz-G<sup>1</sup>]HSP1 com subtração dos respectivos calores de diluição.



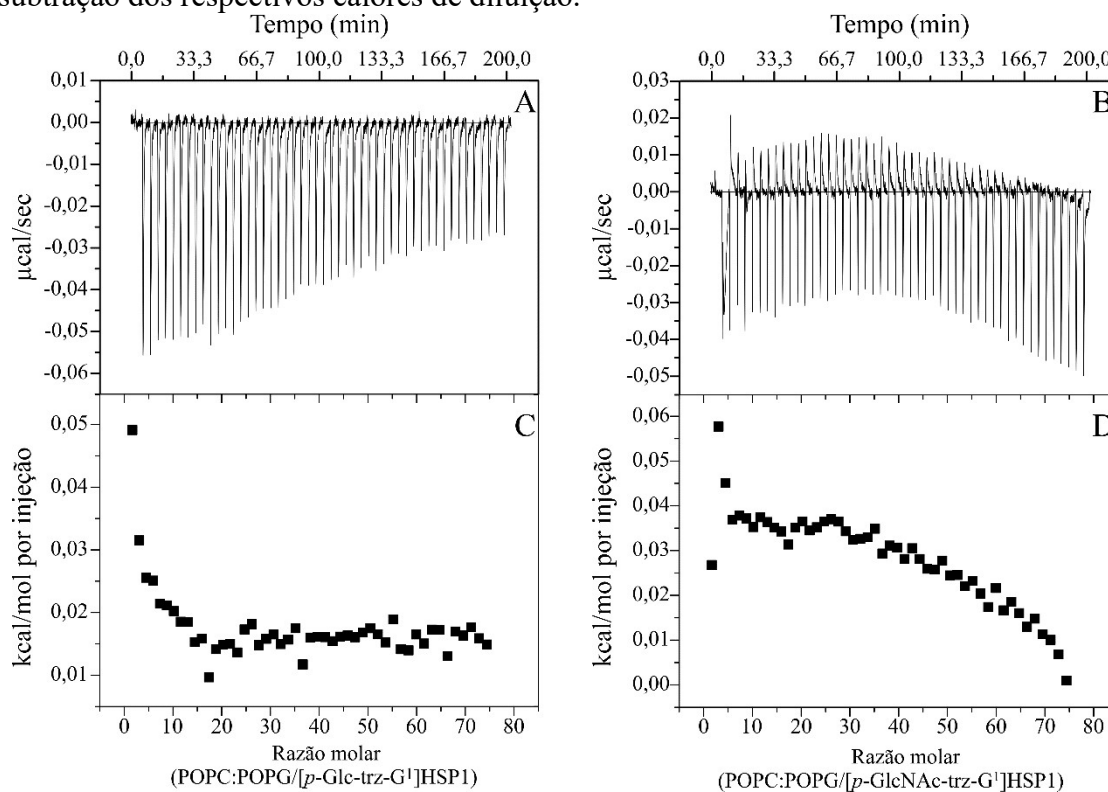
As isotermas apresentaram um padrão de titulação que sugere que as interações predominantes são as eletrostáticas devido a variação negativa do fluxo de calor a cada injeção de vesículas a solução de peptídeo (Seelig, 2004). Na titulação de LUV em solução de HSP1 (FIG. 47A e 47C), a variação de calor foi muito próxima aos valores do calor de diluição das LUV, sugerindo que não há uma interação significativa peptídeo com as vesículas de POPC:POPG (Ball e Maechling, 2009), o que condiz em parte com a baixa atividade antibacteriana do peptídeo (Prates *et al.*, 2004).

Em contrapartida, os dados obtidos com o [trz-G<sup>1</sup>]HSP1 (FIG. 47B e 47D) apontam para uma maior interação do peptídeo com as LUV de POPC:POPG, evidenciado pelo

maior calor envolvido em cada ponto da titulação (Arias *et al.*, 2016). Este resultado mostra que a presença do anel triazol na estrutura pode propiciar maior interação do peptídeo na bicamada fosfolipídica. No entanto, não há uma diminuição do calor ao ponto de se aproximar do calor de diluição do sistema, o que mostra uma baixa constante de partição do peptídeo no meio lipídico (Le *et al.*, 2013).

A FIG. 48 apresenta os dados obtidos das titulações de LUVs de POPC:POPG(3:1) nas soluções de  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e  $[p\text{-GlcNAc-trz-G}^1]\text{HSP1}$ .

**Figura 48:** Isotermas de titulação calorimétrica para os peptídeos  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e  $[p\text{-GlcNAc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em POPC:POPG(3:1) em tampão tris-HCl em pH 8,5. Gráfico de fluxo de calor para cada injeção de POPC:POPG em (A)  $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e (B)  $[p\text{-GlcNAc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em função do tempo. Entalpia por razão molar de (C) POPC:POPG/ $[p\text{-Glc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  e (D) POPC:POPG/ $[p\text{-GlcNAc-trz-G}^1]\text{HSP1}$  com subtração dos respectivos calores de diluição.



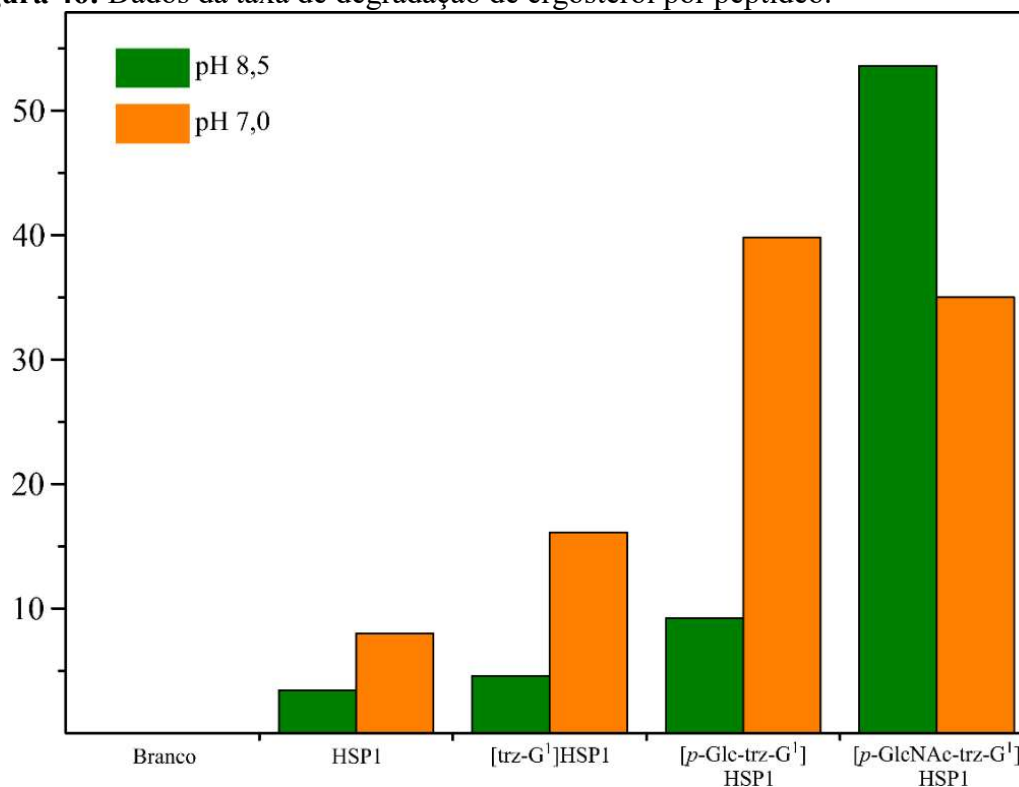
Após a subtração do calor de diluição das LUV em cada experimento verifica-se valores positivos nas isotermas de entalpia por razão molar de ambos os peptídeos, sugerindo assim uma maior predominância de interações hidrofóbicas (Hoernke *et al.*, 2012). Este resultado indica maior preferência dos glicotriazol-peptídeo pela interface apolar em comparação com a HSP1 e  $[\text{trz-G}^1]\text{HSP1}$ , o que pode ser decorrente da maior inserção das unidades glicosídicas na região apolar da membrana fosfolipídica. Tais resultados estão condizentes com os dados de CD que mostram maior helicidade

para os glicotriazol-peptídeos devido a maior constante de partição no meio lipídico, quando comparados também ao peptídeo HSP1 e o derivado triazol. Além disso, assim como apontado nos dados de RMN, a presença da estrutura glicotriazólica favorece o ancoramento da estrutura peptídica, somado ainda a maior dinâmica molecular que permite uma melhor permeabilização do peptídeo na bicamada lipídica por meio do favorecimento das interações apolares.

#### 5.4 Degradação de Ergosterol

Até o momento, os resultados deste trabalho revelaram que a presença das unidades glicotriazol tem efeito direto no modo de interação dos derivados de HSP1 com membranas fosfolipídica, podendo este ser um fator responsável pelo aumento da atividade antifúngica dos derivados glicotriazol de HSP1. Contudo, muitos agentes antifúngicos, como os derivados triazóis, ou mesmo um fármaco comercial como a anfotericina B, são capazes de realizar a sua ação sem a necessidade de entrar na célula procariota (Herbrecht *et al.*, 2002). Isso ocorre, pois essas moléculas são capazes de degradar o ergosterol presente na membrana do fungo desestabilizando-a (Walsh *et al.*, 2004). Neste sentido, afim de verificar se a presença do anel triazólico e das unidades sacarídeas podiam atuar diretamente no ergosterol presentes em células de fungos, foram propostos experimentos para avaliar a capacidade de degradação de ergosterol em LUV de POPC:POPG. Para isso, foram preparadas soluções 2 mM de POPC:POPG (3:1) contendo 30% em mol de ergosterol em tampão tris-HCl (pH 8,5) e tampão fosfato (pH 7,0), sendo adicionados 200  $\mu$ M de solução de peptídeo e análogos deixando-se sob agitação durante 18h. Para a quantificação de ergosterol foram seguidos as bases metodológicas apresentadas por Clejan e Bittman, (1985), com algumas adaptações.

A partir de uma mesma solução controle foram separadas 5 alíquotas, somente em uma não foi adicionado o peptídeo. A quinta amostra passou pelos mesmos processos aos quais foram empregadas as amostras com peptídeos. Sendo preparada para que se tivesse uma amostra controle, e tornando possível a identificação de perdas ou erros durante todo o processo, essa amostra foi denominada de branco. Os dados obtidos estão apresentados na FIG. 46 (p 69).

**Figura 46:** Dados da taxa de degradação de ergosterol por peptídeo.

Os resultados revelam que em pH 8,5 apenas o [p-GlcNAc-trz-G1]HSP1 é capaz de degradar o ergosterol em taxas superiores a 50%. No entanto, em pH 7,0 tanto o [p-Glc-trz-G1]HSP1 quanto o [p-GlcNAc-trz-G1]HSP1 demonstraram capacidade de degradação de ergosterol, com valores próximos a 40%. Tais resultados mostram que em valores de pH mais próximos daqueles empregados em ensaios antifúngicos, ambos os glicotriazol-peptídeos apresentam capacidade similar de degradação do ergosterol na membrana de fungos, sendo estas de 39,7% e 35,0%, respectivamente.

Deste modo, pode-se verificar um efeito sinérgico na atividade dos glicotriazólicos, dependente não apenas da modificação estrutural, mas também do pH do ambiente ao qual estão expostos. Apesar do seu conhecido potencial antifúngico, apenas a presença do anel triazólico não obteve a mesma capacidade de degradação de ergosterol quanto as estruturas glicotriazólicas. Sendo observado mais uma vez, a necessidade das estruturas sacarídeas para que haja uma maior perturbação da membrana, facilitando assim o acesso ao ergosterol.



## 6 Conclusão

Os dados obtidos a partir dos experimentos de CD, ITC e RMN apresentaram mudanças significativas no modo de interação peptídeo-membrana entre os glicotriazol-peptídeos e o HSP1. A partir dos dados de CD foi possível verificar que a inserção da estrutura triazólica não altera significativamente as preferências conformacionais da cadeia peptídica de HSP1 mesmo com a inserção das unidades glicotriazol. Contudo, as estruturas contendo a unidade glicotriazólica apresentaram aumento nos valores de helicidade, sendo ainda mais evidente quando na presença de micelas de SDS. Em acordo com estes dados, as estruturas tridimensionais obtidas por RMN para os glicopeptídeos mostraram uma extensão de hélice muito similar tanto para HPS1 quanto para os seus derivados. Neste sentido, pode-se afirmar que a maior helicidade está relacionada ao aumento da constante de partição de HSP1 devido a presença da porção glicotriazol. Diante disso, foram obtidas isotermas da interação de HSP1 e dos derivados com vesículas de POPC:POPG cujos os resultados comprovaram predominância de interações eletrostáticas para HSP1 e o [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, enquanto que para [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 e [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 demonstraram a predominância de interações hidrofóbicas, corroborando assim com os dados estruturais.

Além disso, os testes de degradação de ergosterol mostraram que os derivados glicotriazólicos foram mais ativos que os HSP1 e o [trz-G<sup>1</sup>]HSP1, provavelmente advindos da maior dinâmica molecular na bicamada lipídica provida pela presença da unidade sacarídea, que conseqüentemente, além de aumentar a interação com a bicamada fosfolipídica também eleva o grau de perturbação. Assim sendo, embora o anel triazólico exerça importante papel na inibição do ergosterol, é possível concluir que a presença da unidade sacarídea é primordial para o aumento do potencial antifúngico dos glicotriazol-peptídeos derivados de HSP1, cujo efeito está em grande parte associado a capacidade de elevar a interação do peptídeo com a membrana perturbando sua estrutura.





## 7 Referências

AHER, N. G. et al. Synthesis and Antifungal Activity of 1,2,3-Triazole Containing Fluconazole Analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 3, p. 759-763, 2009.

AHLQUIST, M.; FOKIN, V. V. Enhanced reactivity of dinuclear copper (I) acetylides in dipolar cycloadditions. **Organometallics**, v. 26, n. 18, p. 4389-4391, 2007.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and Consequences of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-57, 2016.

ARIAS, M.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Calorimetry Methods to Study Membrana Interactions. In: HANSEN, P. R. (Ed.). **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, v.1548, 2016. cap. 2, p.431.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. et al. Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3332-3337, 1999.

AUER, G. K.; WEIBEL, D. B. Bacterial Cell Mechanics. **Biochemistry**, v. 56, n. 29, p. 3710-3724, 2017.

AVITABILE, C.; D'ANDREA, L. D.; ROMANELLI, A. Circular Dichroism Studies on the Interactions of Antimicrobial Peptides with Bacteria Cells. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4293, p. 1-7, 2014.

BALL, V.; MAECHLING, C. Isothermal Microcalorimetry to Investigate Non Specific Interactions in Biophysical Chemistry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3283-3315, 2009.

BARDIN, A. et al. Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, n. 3, p. 537-551, 2004. ISSN 1351-0088.

BECHINGER, B.; AISENBREY, C.; BERTANI, P. The Alignment, Structure and Dynamics of Membrane-Associated Polypeptides by Solid-State NMR Spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, n. 1, p. 190-204, 2004.

BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J. Advances in fmoc solid-phase peptide synthesis. **journal of Peptide Science**, v. 22, p. 4-27, 2015.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Carbohydrates. In: (Ed.). **Biochemistry**. 7. Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012. cap. 11, p.319-336.

BERGER, S.; BRAUN, S. **200 and More NMR Experiments: A Practical Course**. Wiley-VCH, 2004. 854.

BI, S. et al. Affinities and in-plan stress forces between glycopeptide antibiotics and biomimetic bacterial membranes. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 3, p. 24-30, 2015.

BIGLER, P. **NMR Spectroscopy: Processing Strategies**. 1. Weinheim: Wiley Company, 2000.

BIONDI, B. et al. Effects of Aib Residues Insertion on the Structural-Functional Properties of the Frog Skin-Derived Peptide Esculetin-1a (1-21) NH<sub>2</sub>. **Amino Acids**, v. 49, n. 1, p. 139-150, 2016.

BOESZE-BATTAGLIA, K.; SCHIMMEL, R. J. Cell Membrana Lipid Composition and Distribution: Implications for Cell Function and Lessons Learned From Photoreceptors and Platelets. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 2927-2936, 1997.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRADLEY SCOTT PERRIN, J. et al. High-Resolution Structures and Orientations of Antimicrobial Peptides Piscidin 1 and Piscidin 3 in Fluid Bilayers Reveal Tilting, Kinking, and Bilayer Immersion. **Journal of American Chemical Society**, v. 136, n. 9, p. 3491-3504, 2014.

BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.-O.; BERGER, S. **150 and More Basics NMR Experiments: a practical course**. 2<sup>o</sup> Ed. Weinheim: Wiley-VHC, 1998. 596.

BROGDEN, K. A. ANTIMICROBIAL PEPTIDES: PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA? **Nature Reviews: Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19A, n. 1, p. 1-19, 2003.

BUTLER, M. S. et al. Glycopeptides antibiotics: back to the future. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 9, p. 631-644, 2014.

CASALINUOVO, I. A.; FRANCESCO, P. D.; GARACI, E. Fluconazole Resistance in *Candida albicans*: A Review of Mechanisms. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 8, p. 69-77, 2004.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 2000.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. 2. Ed. Oxford: Elsevier, 2009.

CLEJAN, S.; BITTMAN, R. Rates of Amphotericin B and Filipin Association with Sterols. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 5, p. 2884-2889, 1985.

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

CRONAN, J. E. Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 203-224, 2003.

CRUCHO, C. I. C. et al. Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate Research**, v. 402, p. 124-132, 2015.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 71-87, 1999.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277-293, 1995.

DELMAR, J. A.; SU, C.-C.; YU, E. W. Bacterial Multi-Drug Efflux Transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 43, p. 93-117, 2014.

DIAMOND, G. et al. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. **Current Pharmaceuticals Design**, v. 15, n. 21, p. 2377-2392, 2009.

DUPONT, S. et al. Ergosterol biosynthesis: A fungal pathway for life and land? **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

FERREIRA, S. Z. et al. Synthesis of a New Peptide-Coumarin Conjugate: A Potential Agent Against *Cryptococcosis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 271-275, 2015.

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**. 2015. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FREITAS, L. B. D. O. et al. A Reação "Click" na Síntese de 1,2,3-Triazóis: Aspectos Químicos e Aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

GALDIERO, S. et al. Peptide-Lipid Interactions: Experiments and Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 18758-18789, 2013.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; TKACZ, J. S. The fungal cell wall as a drug target. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 98-104, 1995.

GORBENKO, G. P.; LOFFE, V. M.; KINNUNEN, P. K. J. Binding of Lysozyme to Phospholipid Bilayers: Evidence for Protein Aggregation upon Membrane Association. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 140-153, 2007.

GU, S. et al. Bi- and trinuclear copper (I) complexes of 1,2,3-triazole-tethered NHC ligands: synthesis, structure, and catalytic properties. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 863-873, 2016.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

HENRIKSEN, J. R.; ANDRESEN, T. L. Thermodynamic Profiling of Peptide Membrane Interactions by Isothermal Titration Calorimetry: A Search for Pores and Micelles. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 1, p. 100-109, 2011.

HENZLER-WILDMAN, K.; KERN, D. Dynamic personalities of proteins. **Nature**, v. 450, p. 964-972, 2007.

HERBRECHT, R. et al. Voriconazole Versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 6, p. 408-415, 2002.

HOERNKE, M. et al. Binding of cationic pentapeptides with modified side chain lengths to negatively charged lipid membranes: Complex interplay of electrostatic and hydrophobic interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, n. 1, p. 1663-1672, 2012.

JENSEN, K. J. Solid-phase peptide synthesis: An introduction. In: JENSEN, K. J.; SHELTON, P. T., *et al* (Ed.). **Peptide synthesis and applications**. 2. Ed. New York: Humana Press, v.1047, 2013. cap. 1, p.1-22. (Springer Protocols).

JENSSEN, H.; HAMIL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JOHNSON, B. A.; BLEVINS, R. A. NMR View: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 4, n. 5, p. 603-614, 1994.

JUNIOR, E. F. C. **Síntese Química, Avaliação do Potencial Biológico e Estudos de Interação com Meios Biomiméticos de Glicopeptídeo-Triazóis Derivados de HSP1**. 2015. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Química, UFVJM, Diamantina.

JUNIOR, E. F. C. et al. Glycotriazole-Peptides Derived from the Peptide HSP1: Synergistic Effect of Triazole and Saccharide Rings on the Antifungal Activity. **Amino Acids**, v. 49, n. 8, p. 1389-1400, 2017a.

KAN, C.-C.; YAN, J.; BITTMAN, R. Rates of Spontaneous Exchange of Synthetic Radiolabeled Sterols between Lipid Vesicles. **Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1866-1874, 1992.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5678-5698, 2012.

KHANDELIA, H.; KAZNESSIS, Y. N. Molecular Dynamics Simulations of the Helical Antimicrobial Peptide Ovispirin-1 in a Zwitterionic Dodecylphosphocholine Micelle: Insights into Host-Cell Toxicity. **Journal Physical Chemistry**, v. 109, n. 26, p. 12990-12996, 2005.

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

KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial Peptides (AMPs) as Drug Candidates: a Patent Review (2003–2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 6, p. 689-702, 2016.

LADOKHIN, A. S.; FERNÁNDEZ-VIDAL, M.; WHITE, S. H. CD Spectroscopy of Peptides and Proteins Bound to Large Unilamellar Vesicles. **The Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 3, p. 247-253, 2010.

LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Synthetic Multivalent Antifungal Peptides Effective Against Fungi. **PLOS One**, v. 9, n. 2, 2014.

LE, V. H. et al. Modeling Complex Equilibria in ITC Experiments: Thermodynamic Parameters Estimation for a Three Binding Site Model. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 2, p. 233-241, 2013.

LEE, K. H. et al. Solution structure of termite-derived antimicrobial peptide, spingerin, as determined in SDS micelle by NMR spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 3, p. 591-597, 2003.

LINDBERG, M. et al. Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3141-3149, 2001.

MATEJUK, A. et al. Peptide-Based Antifungal Therapies Against Emerging Infections. **Drugs Future**, v. 35, n. 3, p. 197, 2010.

MDOWELL, P. et al. 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. ISSN 1365-2958.

MELO, J. O. et al. 1, 2, 3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006. ISSN 0100-4042.

MIELKE, S. P.; KRISHNAN, V. V. Characterization of protein secondary structure from NMR chemical shifts. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 54, n. 3-4, p. 141-165, 2009.

- MOJSOSKA, B.; ZUCKERMANN, R. N.; JENSSEN, H. Structure-Activity Relationship Study of Novel Peptoids That Mimic the Structure of Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4112-4120, 2015.
- MORADI, S. V. et al. Glycosilation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides. **Chemical Science**, v. 7, p. 2492-2500, 2016.
- MÜLLER, C. et al. Antifungal drug testing by combining minimal inhibitory concentration testing with target identification by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 12, n. 5, p. 947-963, 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: (Ed.). **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 3, p.76-105.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.
- NIKAIDO, H. Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 3905-3908, 1994.
- NIR, S. et al. Aggregation and Fusion of Phospholipids Vesicles. **Progress in Surface Science**, v. 13, n. 1, p. 1-124, 1983.
- OLSUFYEVA, E. N.; TEVYASHOVA, A. N. Synthesis, Properties, and Mechanism of Action of New Generation of Polycyclic Glycopeptide Antibiotics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 32, p. 2166-2198, 2017.
- PARADIS-BAS, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The road to the synthesis of "difficult peptides". **Chemical Society Review**, v. 45, p. 631-654, 2016.
- PAVIA, D. L. et al. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: (Ed.). **Introduction of Spectroscopy**. 4<sup>o</sup> Ed. Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning, 2009. cap. Cap. 3,
- PESCHEL, A.; SAHL, H.-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 4, p. 529-536, 2006.
- PETROVA, K. T. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of 1,2,3-Triazole-Sucrose Derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 417, p. 66-71, 2015.
- PRATES, M. V. et al. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 13018-13026, 2004a.
- PRATES, M. V. et al. The NMR-Derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide From the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018-13026, 2004b.

PRATT, M. R.; BERTOZZI, C. R. Synthetic Glycopeptides and Glycoproteins as Tools of Biology. **Chemical Society Review**, v. 34, p. 58-68, 2005.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 11, p. 4150-4168, 1999.

RAHNAMAEIAN, M. et al. Insect Antimicrobial Peptides Show Potentiating Functional Interactions Against Gram-Negative Bacteria. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 282, n. 1806, 2015.

RICE, L. B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 11-19, 2006.

ROSTOVTSEV, V. V. et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angew. Chem.**, v. 114, n. 14, p. 2708-2711, 2002.

SCHMIDTCHEN, A.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M. Effect of Hydrophobic Modifications in Antimicrobial Peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 265-274, 2014.

SEELIG, J. Thermodynamics of Lipid-Peptide Interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 40-50, 2004.

SHAW, W. H. C.; JEFFERIES, J. P. The Determination of Ergosterol in Yeast Part I. The Ultra-violet Absorption of Purified Ergosterol. **Analyst**, v. 78, p. 509-514, 1953.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SIEGAL, F. P. et al. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1439-1444, 1981. ISSN 0028-4793.

SINCLAIR, A. M.; ELLIOTT, S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 94, n. 8, p. 1626-1635, 2005. ISSN 1520-6017.

SOHLENKAMP, C.; GEIGER, O. Bacterial Membrane Lipids: Diversity in Structures and Pathways. **FEMS Microbiology Review**, v. 40, n. 1, p. 133-159, 2015.

SONNICHSEN, F. D. et al. Effect of Trifluoroethanol on Protein Secondary Structure: an NMR and CD Study Using a Synthetic Actin Peptide. **Biochemistry**, v. 31, n. 37, p. 8790-8798, 1992.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.

- THOMAS, E. et al. Mitochondria Influence CDR1 Efflux Pump Activity, Hog1-Mediated Oxidative Stress Pathway, Iron Homeostasis, and Ergosterol Levels in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5580-5599, 2013.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. In: (Ed.). 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap. 20, p.554-583.
- TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The Interaction of Antimicrobial Peptides with Membrane. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 521-532, 2017.
- 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.
- TURK, M. et al. Salta-Induced Changes in Lipid Composition and Membrana Fluidity of Halophilic Yeast-Like Melanized Fungi. **Extremophiles**, v. 8, p. 53-61, 2004.
- VERLY, R. M. et al. Structure and Membrane Interactions of the Homodimeric Antibiotic Peptide Homotarsinin. **Scientific Reports**, 2017.
- WALSH, T. J. et al. Caspofungin versus Liposomal Amphotericin B for Empirical Antifungal Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 14, p. 1391-1402, 2004.
- WANG, L. **Analysis of NMR Chemical Shifts in Peptide and Protein Structure Determination**. VDM Verlag Dr Muller e.K, 2008. 236.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, Problems, and Perspectives. **Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 877-900, 2013.
- WIEPRECHT, T.; SEELIG, J. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Interactions Between Peptides and Lipid Membranes. **Current Topics in Membranes**, v. 52, p. 31-56, 2002.
- WILLIAMSON, M. P. Peptide Structure Determination by NMR. In: JONES, C.;MULLOY, B., *et al* (Ed.). **Spectroscopy Methods and Analyses**. Totowa: Humana Press, v.17, 1993. cap. Cap. 3,
- WOODY, R. W. Circular Dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 34-71, 1995.
- WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Science**, v. 340, p. 457-460, 2013.
- WÜTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**. New York: Wiley, 1986.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 27-55, 2003.



ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

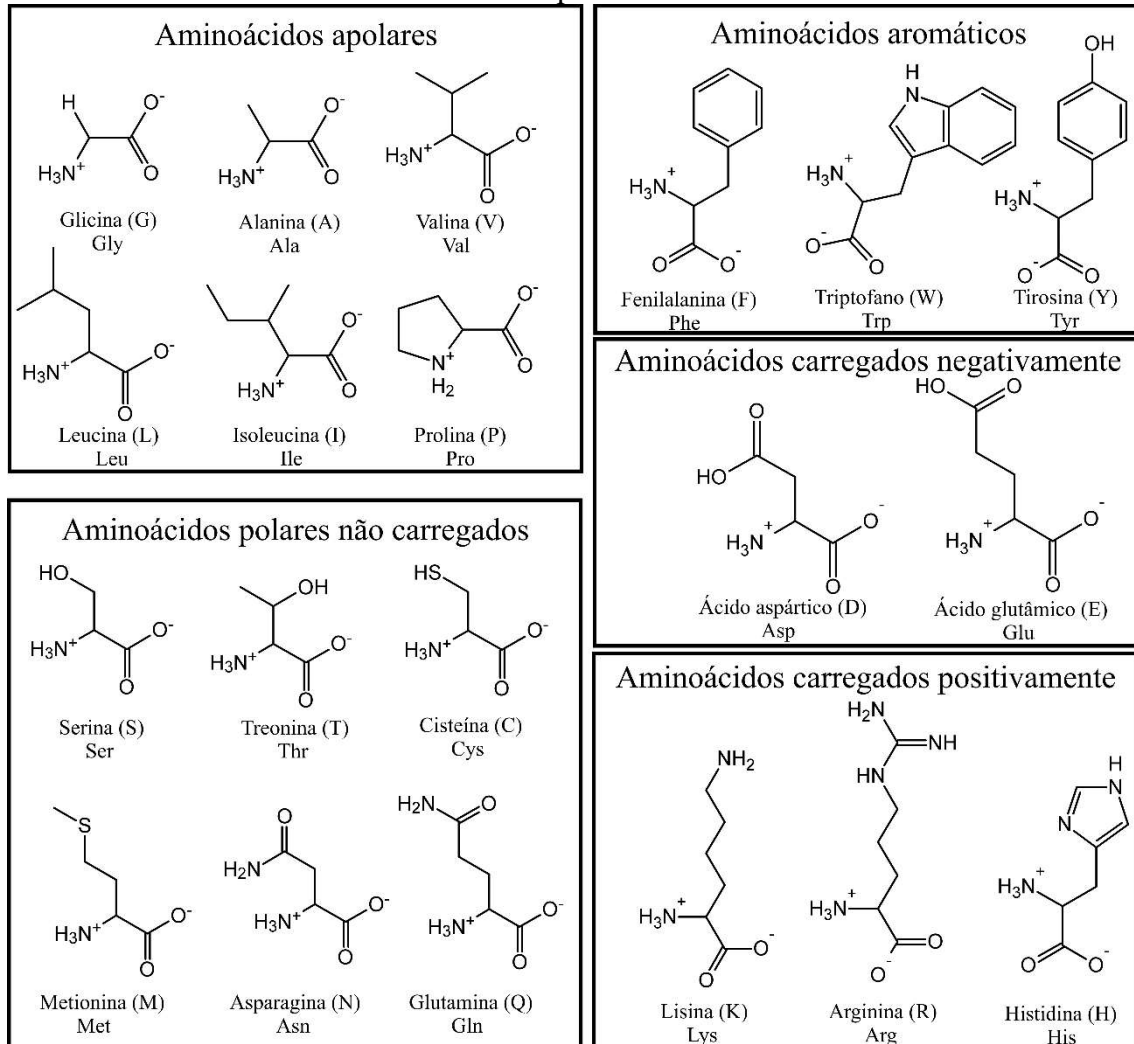
ZENG, D. et al. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016.



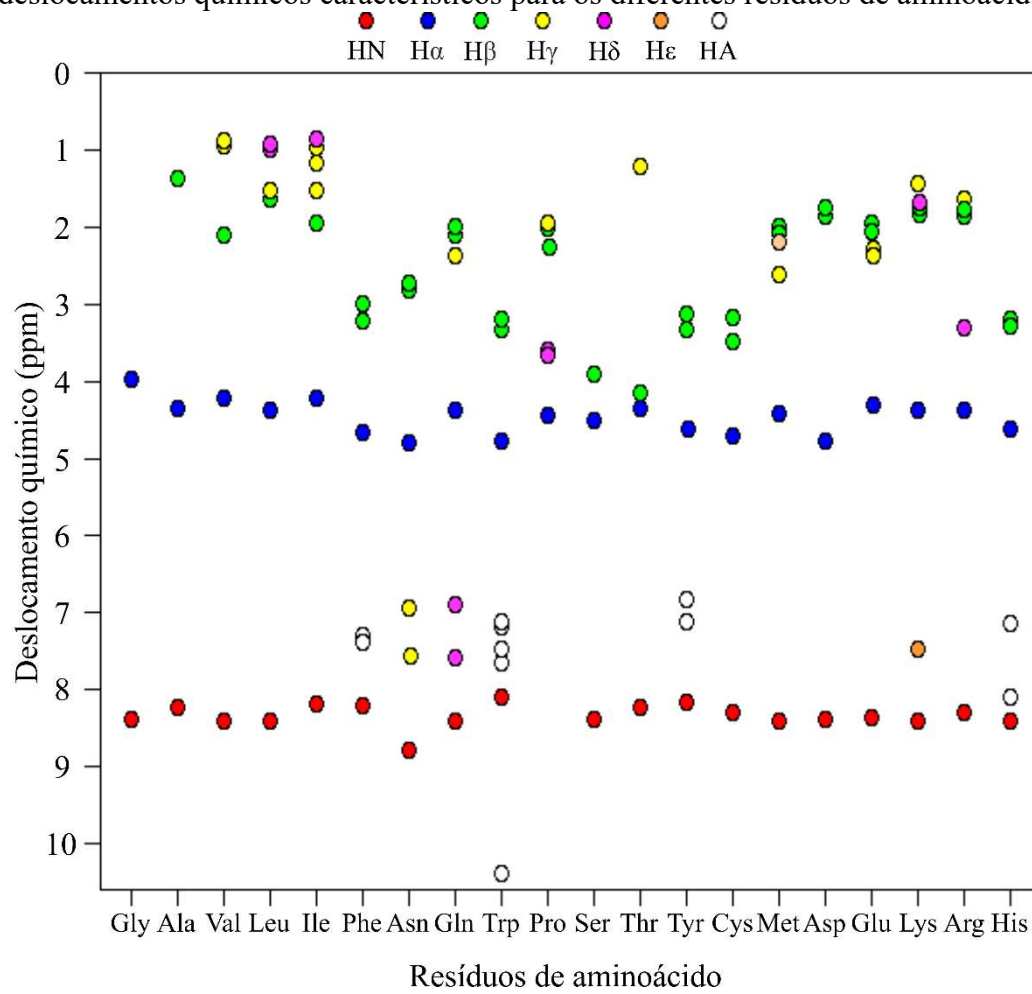
## 8 Anexos

### 8.1 Figuras e Tabelas

**Anexo 1:** Estrutura dos vinte aminoácidos padrão.



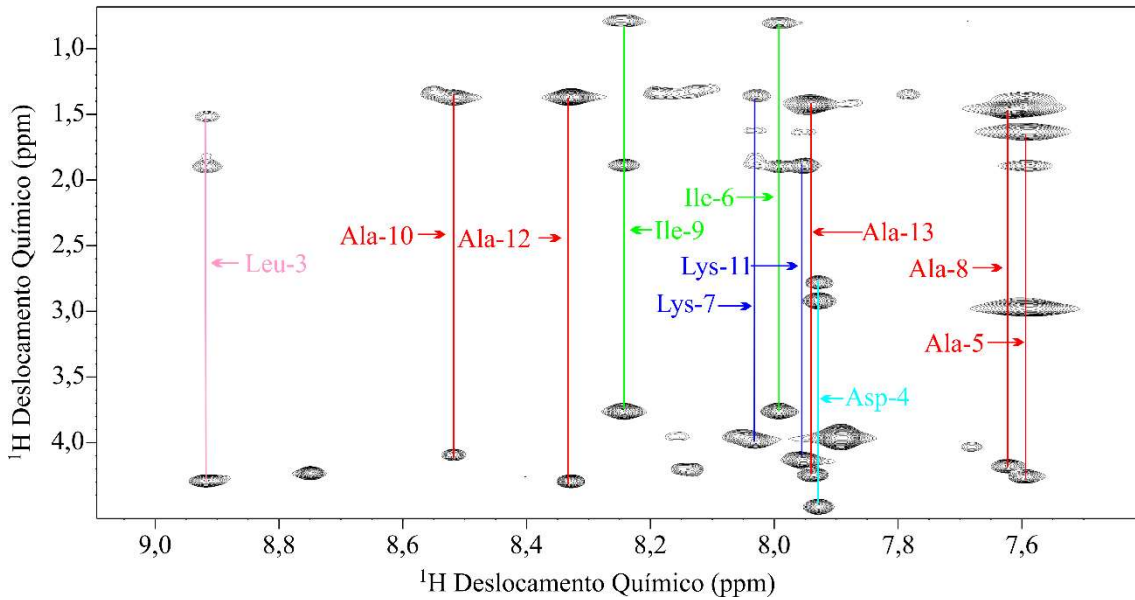
**Anexo 2:** Esquema representativo dos sistemas de *spins* com os respectivos deslocamentos químicos característicos para os diferentes resíduos de aminoácidos.



**Anexo 3:** Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY parcial do  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

Ampliação da região amídica.

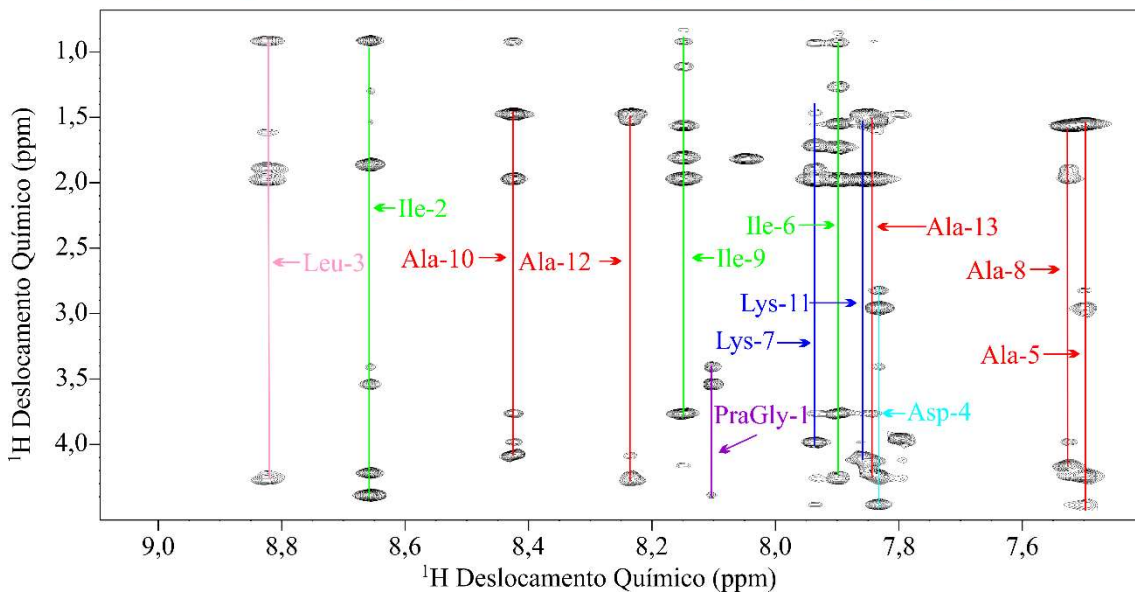
PraGly - Ile - Leu - Asp - Ala - Ile - Lys - Ala - Ile - Ala - Lys - Ala - Ala - Gly  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



**Anexo 4:** Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY parcial do  $[p\text{-GlcNac-trz-G}^1]\text{HSP1}$  em solução de TFE 30% (v/v).

Ampliação da região amídica.

PraGly - Ile - Leu - Asp - Ala - Ile - Lys - Ala - Ile - Ala - Lys - Ala - Ala - Gly  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



**Anexo 5:** Tabela de deslocamento químico dos resíduos de aminoácido de 1 a 13 do peptídeo [*p*-Glc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).

Resíduo 1 ([ <i>p</i> -Glc-trz]Gly)		Resíduo 7 (Lys)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	4,333	HN	8,03
HB1	3,539	HA	3,987
HB2	3,387	HB2	1,975
HD11	8,215	HG2	1,489
H1	6,015	HD2	1,725
H2	5,684	HE2	2,974
H3	5,499	Resíduo 8 (Ala)	
H4	5,304	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
H5	4,201	HN	7,64
H6	4,304	HA	4,167
		HB	1,581
Resíduo 2 (Ile)		Resíduo 9 (Ile)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HN	8,606	HN	8,242
HA	4,167	HA	3,768
HB	1,849	HB	1,978
HG12	1,297	HG12	1,126
HD1	0,919	HG13	0,856
Resíduo 3 (Leu)		Resíduo 10 (Ala)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HN	9,003	HN	8,502
HA	4,27	HA	4,086
HB2	1,975	HB	1,491
HG2	1,626	Resíduo 11 (Lys)	
HD1	0,936	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
Resíduo 4 (Asp)		HN	7,961
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	HA	4,126
HN	7,911	HB2	1,986
HA	4,457	HG2	1,487
HB2	2,959	HD2	1,738
HB3	2,85	HE2	2,981
Resíduo 5 (Ala)		Resíduo 12 (Ala)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HN	7,598	HN	8,325
HA	4,251	HA	4,276
HB	1,56	HB	1,489
Resíduo 6 (Ile)		Resíduo 13 (Ala)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HN	7,988	HN	7,91
HA	3,763	HA	3,983
HB	1,984	HB	1,488
HG12	1,275		
HD1	0,941		

**Anexo 6:** Tabela de deslocamento químico dos resíduos de aminoácido de 1 a 13 do peptídeo [*p*-GlcNAc-trz-G<sup>1</sup>]HSP1 em solução de TFE 30% (v/v).

Resíduo 1 ([ <i>p</i> -GlcNAc-trz]Gly)		Resíduo 7 (Lys)	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	4,387	HN	8,005
HB1	3,539	HA	3,956
HB2	3,457	HB2	1,936
HD11	8,107	HG2	1,438
H1	5,975	HD2	1,7
H2	4,591	HE2	
H3	5,482	Resíduo 8 (Ala)	
H4	5,227	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
H5	4,148	HN	7,621
H6	4,268	HA	4,128
Resíduo 2 (Ile)		HB	1,552
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Resíduo 9 (Ile)	
HN	8,681	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	4,187	HN	8,204
HB	1,844	HA	3,738
HG12	1,296	HB	1,952
HD1	0,898	HG12	1,098
Resíduo 3 (Leu)		HG13	0,896
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Resíduo 10 (Ala)	
HN	8,84	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	4,243	HN	8,463
HB2	1,96	HA	4,05
HG2	1,595	HB	1,461
HD1	0,941	Resíduo 11 (Lys)	
Resíduo 4 (Asp)		Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	HN	7,933
HN	7,909	HA	4,093
HA	4,43	HB2	1,957
HB2	2,934	HG2	1,507
HB3	2,808	HD2	1,704
Resíduo 5 (Ala)		HE2	
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Resíduo 12 (Ala)	
HN	7,595	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	4,206	HN	7,916
HB	1,536	HA	4,246
Resíduo 6 (Ile)		HB	1,511
Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)	Resíduo 13 (Ala)	
HN	7,969	Sigla (átomo)	Deslocamento químico (ppm)
HA	3,735	HN	8,285
HB	1,96	HA	4,246
HG12	1,249	HB	1,451
HD1	0,919		