

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Cláudia Mancilha Rocha

**Estudos de Síntese de Glicotriazol-Peptídeos Derivados do Peptídeo  
Antimicrobiano Hilaseptina 1 e suas Interações com Membranas**

Belo Horizonte

2019

UFMG/ ICEx/ DQ. 1.370

D. 744

Cláudia Mancilha Rocha

**Estudos de Síntese de Glicotriazol-Peptídeos Derivados do Peptídeo  
Antimicrobiano Hilaseptina 1 e suas Interações com Membranas**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Jarbas Magalhães Resende

Coorientador: Prof. Rodrigo Moreira Verly

Belo Horizonte

2019

Ficha Catalográfica

R672e Rocha, Cláudia Mancilha  
2019 Estudos de síntese de glicotriazol-peptídeos  
D derivados do peptídeo antimicrobiano hilaseptina 1 e  
suas interações com membranas [manuscrito]/Claudia  
Mancilha Rocha. 2019.  
[xvii], 84 f.: il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.  
Coorientador: Rodrigo Moreira Verly

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Peptídeos-Síntese -  
Teses 3. Peptídeos - Teses 4. Antimicrobianos - Teses  
5. Mecanismos de reações orgânicas- Teses  
6. Carboidratos - Teses I. Resende, Jarbas Magalhães -  
Orientador II. Verly, Rodrigo Moreira- Coorientador  
III. Título

CDU 043

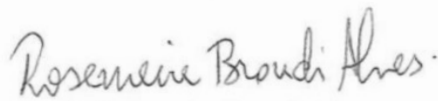
**"Estudos de Síntese de Glicotriazol-Peptídeos Derivados do Peptídeo Antimicrobiano Hilaseptina 1 e suas Interações com Membranas"**

**Cláudia Mancilha Rocha**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador  
UFMG

  
Prof. Amanda Silva de Miranda  
UFMG

  
Prof. Rosemeire Brondi Alves  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer à Cláudia do passado. À Cláudia que se apaixonou pela Química depois de ler um livro roubado da madrinha e, principalmente, à Cláudia desses últimos dois anos, que foi forte o suficiente para que eu conseguisse defender esse trabalho. Mesmo nos momentos em que a vontade de desistir de tudo foi grande, ela foi forte (mesmo que nem sempre), resistiu e continuou.

Em segundo lugar, muito obrigada, papai e mamãe! Muito obrigada por me ouvirem, por se desdobrarem em milhões para que eu pudesse estar onde estou hoje, me apoiarem e por estarem sempre tão presentes, me confortando sempre que necessário. Amo vocês, acima de tudo!

Também gostaria de agradecer meu namorado, Lucas Raposo. A pessoa que presenciou quase todos os momentos de choro e desespero, e me acalmou em cada um deles; a pessoa que sempre se dispôs a me ajudar quando necessário; a pessoa que sempre esteve do meu lado quando precisei. Sem o seu apoio incondicional nada disso teria acontecido, minha coisa linda!

Aos amigos que o laboratório me deu: Iza, Jade, Breno, José, Lídia, Suedson, Bruna e Adriana, por muuuuito mais do que a ajuda durante as dificuldades do projeto. Obrigada por deixar meus dias mais leves e os problemas, menores. Muito obrigada por cada risada, cada sexta-feira de muito trabalho avulso, por cada meme espalhado pelo laboratório. E voltarei pra vender docinhos pra vocês e colocar as fofocas e reclamações em dia HAHAHA!

Aos amigos de Itajubá e de CRV: Dois (mesmo que ninguém mais te chame assim haha), João, Grazi, Thithi, Chu, Karinne, Evandro e Jéssica, que me escutaram, aconselharam e foram meus portos seguros, mesmo que longe. Menos Selminha, que ainda tem que me aturar e entrar nas minhas maluquices diárias, e pegar na minha mãozinha e me falar pra parar de ser louca HAHAHHAHAH

Aos amigos que o DQ-UFMG me deu, especialmente Glaucimar e Lu! Vocês são dois presentinhos LINDOS que o mestrado me trouxe, desde quando a nossa maior preocupação era não reprovar nas matérias!

Agradeço ao meu orientador, Jarbas, por me acolher e aceitar me orientar, quando eu era só uma pessoa perdida nos corredores procurando por um projeto de pesquisa HAHAH. Também ao meu coorientador, Rodrigo Moreira Verly, e aos inúmeros colaboradores do projeto, que possibilitaram a realização deste. Um agradecimento especial à Samara, que mais

do que ajuda com as sínteses envolvendo o catalisador de rutênio, me ofereceu colo e conselhos para os momentos em que nada dava certo, além de uma amizade muito linda!

Agradeço aos outros pós-graduandos, professores e cientistas que, mesmo nos tempos sombrios que atravessamos, de negação do conhecimento científico e desvalorização da educação, continuam firmes em seus trabalhos. Somos, acima de tudo, guerreiros, por fazermos tanto com tão pouco!

Agradeço à banca avaliadora, Rosemeire Brondi Alves e Amanda Silva de Miranda, que dispuseram parte do seu tempo a corrigir e acrescentar muito ao trabalho, e também a me acalmar muito durante a apresentação da dissertação!

Agradeço ao Centro de Laboratórios Multiusuários do ICB-UFMG, pelas análises de Espectrometria de Massas; ao Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução do DQ-UFMG pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear e também ao Laboratório de Espectroscopias no Ultravioleta-Visível, de Fluorescência e de Dicroísmo Circular do DQ-UFMG pela disponibilização da infraestrutura para realização das análises de Dicroísmo Circular.

Por fim, gostaria de agradecer aos órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, FAPEMIG e CAPES, responsáveis pelo financiamento deste projeto, e notadamente à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. Também ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG, que me acolheu e possibilitou que este trabalho fosse realizado.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível. ”*

- Charles Chaplin

## RESUMO

Este trabalho objetiva a obtenção dos glicotriazol-peptídeos (GtPs) inéditos 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, derivados glicosilados do peptídeo hilaseptina 1 (HSP1), que apresenta atividade antimicrobiana moderada.

Nas metodologias de trabalho propostas, pretende-se a obtenção dos esqueletos polipeptídicos por meio da estratégia 9-fluorenilmtoxycarbonila de síntese de peptídeos em fase sólida (Fmoc-SPFS). Para se incorporarem as unidades glicotriazólicas, foi inicialmente proposta a inserção de um resíduo de propargilglicina na última etapa da SPFS, seguindo-se então etapas de reação de cicloadição 1,3-dípolar entre a alcino-peptidil-resina e azido-açúcares, para a obtenção dos GtPs de interesse. No planejamento da síntese do 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, utilizou-se Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como catalisador e um azido-açúcar per-*O*-acetilado, a fim de se obter o produto com a regioquímica desejada (reação RuAAC – Cicloadição Alcino-Azida Catalisada por Rutênio). Todavia, a despeito de terem sido testadas variadas condições de reação, não se conseguiu sucesso na RuAAC entre a peptidil-resina e o azido-açúcar. Optou-se então pela realização da reação RuAAC entre a Fmoc-propargilglicina e a azido-glicose per-*O*-acetilada, tendo-se conseguido obter o Fmoc-1,5-glicotriazol-aminoácido, que poderia vir então a ser empregado na SPFS para a obtenção do resíduo desejado. Embora tenha-se confirmado a obtenção do glicotriazol-aminoácido de interesse, esse foi obtido em quantidade muito baixa, não sendo possível a posterior obtenção do GtP. A despeito disso, neste trabalho foi então desenvolvida uma metodologia que pode ser empregada posteriormente para a obtenção de maiores quantidades de Fmoc-1,5-triazol-aminoácido a fim de se realizar a síntese dos respectivos 1,5-GtPs.

Por outro lado, a síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, a partir de uma cicloadição [4+2] catalisada por Cu(I) (reação CuAAC – Cicloadição Alcino-Azida Catalisada por Cobre) entre a respectiva alcino-peptidil-resina e uma azido-glicose (com as hidroxilas livres) levou à formação do produto de interesse, tendo-se obtido pela primeira vez, até o ponto que sabemos, um 1,4-GtP contendo um carboidrato com as hidroxilas livres. Na realidade, essa síntese levou a um par de isômeros, aos quais foram dados os nomes de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A e B. A existência de um par de isômeros foi confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF, ensaios cromatográficos (por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Ademais, análises espectroscópicas de dicroísmo circular (CD) e de RMN indicaram que esses 1,4-GtP isoméricos



apresentam conformações helicoidais em meios de membrana, sendo que o isômero B apresenta uma maior elipticidade que o isômero A. Esses isômeros tiveram suas atividades biológicas avaliadas contra três cepas de fungos, tendo os dois apresentado atividades bastante similares, mas maiores que o peptídeo HSP1-NH<sub>2</sub>, indicando que a inserção da unidade glicotriazólica aumenta o potencial antifúngico dessas moléculas. Todavia, esses dois 1,4-GtPs contendo a glicose com as hidroxilas livres foram menos ativos que o análogo contendo a glicose per-*O*-acetilada, indicando que a acetilação é importante para uma maior atividade desse GtP derivado da hilaseptina 1. É, entretanto, sabido que as interações com membranas de micro-organismos (processo essencial para a atividade antibacteriana e antifúngica) depende da composição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos em posições específicas da estrutura primária, de forma que pode ser interessante se ter, em determinados casos, análogos glicotriazol-peptídicos com as hidroxilas do carboidrato livres.

**Palavras-chave:** Reação click, glicotriazol-peptídeos, peptídeos antimicrobianos, síntese de peptídeos, atividade biológica.

## ABSTRACT

This work is related to the synthesis of two novel glycotriazole-peptides, namely 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, which are glycosylated derivatives of hylaseptin 1 (HSP1), a peptide that presents moderate antimicrobial activity.

According to the proposed methodologies, the peptide backbone is to be obtained by solid phase peptide synthesis (SPPS), using the 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. To link the glycotriazole and polypeptide moieties, it was initially proposed the incorporation of a Fmoc-propargylglycine residue at the last step of the SPPS to give the alkyne-decorated peptidyl-resin, which would then be used in 1,3-dipolar cycloaddition reactions with azide derivatives of glucose to provide the respective GtPs. For the synthesis of 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, the per-*O*-acetylated azide derivative of glucose was used together with Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, which is supposed lead to 1,5-triazoles (RuAAC reaction – Ruthenium-catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition reaction). Several attempts and reaction conditions were investigated but, despite these efforts, the desired 1,5-GtP was not obtained. Therefore, the synthesis strategy was modified to firstly obtain the Fmoc-1,5-glycotriazol-amino acid by reacting the per-*O*-acetylated azide derivative of glucose with Fmoc-propargylglycine under ruthenium catalysis, inasmuch as this product could be incorporated into the peptide backbone during the SPPS. Although the synthesis of the Fmoc-1,5-glycotriazol-amino acid was successfully confirmed, very small amounts were obtained, which has obliterated any possibility of carrying on the synthesis of the desired 1,5-GtP. Nevertheless, after several attempts the viability of the RuAAC reaction to obtain the Fmoc-1,5-glycotriazol-amino acid derivative was confirmed, which means that higher amounts can be prepared and used in the synthesis of the respective 1,5-GtPs.

On the other hand, the Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction between the alkyne-decorated peptidyl-resin and the non-acetylated azide derivative of glucose was successful and, up to our knowledge, this is the first report of the synthesis of a 1,4-GtP peptide, which carries a non-acetylated saccharide ring. Actually, this cycloaddition reaction afforded a couple of isomers, namely 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A e B. This was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry, high performance liquid chromatography (HPLC) analyses and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Besides, circular dichroism (CD) and NMR spectroscopies indicated that both isomers present helical

conformations in membrane mimetic environments, although B presents higher helicity when compared to A. The biological activities of these isomers were investigated against three fungal strains and they showed similar antifungal potentials. Interestingly, this pair of 1,4-GtPs showed significantly stronger activities in comparison to the peptide HSP1-NH<sub>2</sub>, which indicates that the glycotriazole moiety enhances the antifungal potential of these molecules. However, these two 1,4-GtPs were less active in comparison to the derivative containing the per-*O*-acetylated glucose, which indicates that acetylation is important to the activity of the GtP derivatives of hylaseptin 1. Nevertheless, it is well-known that peptide-membrane interactions, which is essential for antifungal and antibacterial activities, depend on the presence of hydrophilic and hydrophobic residues at specific sites of the primary structure, which means that it might be interesting for some glycotriazole-peptide sequences the incorporation of non-acetylated saccharide rings.

**Key-words:** click reaction, glycotriazole-peptides, antimicrobial peptides, peptide synthesis, biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Gráfico contendo o número de publicações sobre "antimicrobial peptides" desde 1948, segundo dados do Scopus. Acesso em 01 de agosto de 2019.....	2
<b>Figura 1-2.</b> Representação estrutural do ciclopeptídeo gramidicina S e três de seus análogos obtidos via síntese química empregando um resíduo de propargilglicina para obtenção de triazóis. Adaptado de KNAAP et al., 2011. ....	4
<b>Figura 1-3.</b> Representação estrutural do peptídeo Ubiquidina e seu análogo Ubiquidina-Cumarina, obtido via síntese química. Adaptado de FERREIRA et al., 2015. ....	5
<b>Figura 1-4.</b> Representação estrutural da Vancomicina, com o dissacarídeo em destaque. ....	6
<b>Figura 1-5.</b> Representação estrutural da telavancina, com as porções hidrofóbicas e hidrofílicas inseridas quimicamente em destaque. Adaptado de BINDA; MARINELLI; MARCONE, 2014. ....	7
<b>Figura 1-6.</b> Representação esquemática dos principais modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos, que envolvem a morte direta por ruptura da membrana celular: (A) barril de aduelas, (B) detergente, (C) poro toroidal e (D) tapete ou carpete. Em vermelho, a parte hidrofílica do peptídeo e, em azul, a hidrofóbica. Imagens retiradas e adaptadas de (TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017) com autorização da Elsevier (Anexo C).....	8
<b>Figura 1-7.</b> Esquema geral de modificações estruturais propostas baseadas no peptídeo 1,4-GrP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> , já estudado pelo grupo. ....	9
<b>Figura 2-1.</b> Estrutura das biomacromoléculas 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> e 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> , cujas sínteses são propostas neste trabalho. ....	11
<b>Figura 2-2.</b> Estrutura da peptidil-resina [Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (V). ....	12
<b>Figura 2-3.</b> Estrutura da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina (IV). ...	12
<b>Figura 2-4.</b> Estrutura da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina (III). ....	12
<b>Figura 3-1.</b> Esquema geral de síntese dos produtos propostos 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (II). 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (I). ....	14
<b>Figura 3-2.</b> Esquema geral de síntese da [Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina (III). ....	17
<b>Figura 3-3.</b> Estrutura do catalisador Cp <sup>*</sup> RuCl(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> empregado na síntese. ....	17
<b>Figura 3-4.</b> Esquema geral de síntese da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina. ....	19

<b>Figura 3-5.</b> Esquema geral de síntese do ácido (S)-2-{{{(Fmoc)amino}-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1- desoxi- $\beta$ -D-glicopiranoose)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-5-il} propanóico ( <b>VII</b> ). .....	20
<b>Figura 3-6.</b> Esquema geral de síntese da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina ( <b>IV</b> ) a partir do ácido (S)-2-{{{(Fmoc)amino}-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1- desoxi- $\beta$ -D-glicopiranoose)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-5-il} propanóico ( <b>VII</b> ).....	21
<b>Figura 3-7.</b> Esquema geral de síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina. ....	22
<b>Figura 3-8.</b> Esquema simplificado de clivagem das peptidil-resinas.....	23
<b>Figura 3-9:</b> Representação estrutural dos fosfolipídeos 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol) e também do ergosterol. ....	25
<b>Figura 4-1.</b> Espectro de massas completo do produto obtido por meio da <b>metodologia a</b> , mostrando também a expansão na região entre <i>m/z</i> 1340-1580, juntamente com a representação estrutural da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> e sua massa teórica. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	29
<b>Figura 4-2.</b> Composto <b>VIII</b> , obtido empregando a <b>metodologia a</b> .....	30
<b>Figura 4-3.</b> Espectro de massas completo do produto obtido por meio da <b>metodologia b</b> , mostrando também a expansão na região entre <i>m/z</i> 1340-1580, juntamente com a representação estrutural da [trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> ( <b>IX</b> ) e sua massa teórica. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	32
<b>Figura 4-4.</b> Espectro de massas completo do produto obtido por meio da <b>metodologia f</b> , mostrando também a expansão na região entre <i>m/z</i> 600-750, juntamente com a estrutura Ácido (S)-2-{{{(Fmoc)amino}-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranoose)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-5-il} propanoico ( <b>VII</b> ) e sua razão massa/carga teórica. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	33
<b>Figura 4-5.</b> Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do ácido (S)-2-{{{(Fmoc)amino}-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1- desoxi- $\beta$ -D-glicopiranoose)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-5-il} propanóico ( <b>VII</b> ). Amostra injetada (1000 $\mu$ L de uma solução a 1 mg.mL <sup>-1</sup> ) em coluna Pursuit <sup>®</sup> C18 5 $\mu$ m (250 x 10,0 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2,5 mL.min <sup>-1</sup> . Absorbância monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214$ nm. ....	35
<b>Figura 4-6.</b> Espectro de massas completo do produto obtido através da por meio CuAAC, mostrando também a expansão na região entre <i>m/z</i> 1550-1625. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	36

<b>Figura 4-7.</b> Estruturas referentes aos dois principais picos observados no espectro de massas após a clivagem dos produtos formados na glicosilação catalisada por cobre, juntamente com suas relações massa/carga teóricas. ....	37
<b>Figura 4-8.</b> Espectro de massas obtido na fragmentação do íon de $m/z$ 1575,6886, mostrando os fragmentos mais relevantes, de $m/z=1413,83$ (perda de glicose) e $m/z=1385,92$ (perda de glicose e $N_2$ ). Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBean® com potência de 40%. ....	38
<b>Figura 4-9.</b> Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> . Amostra injetada (800 µL de uma solução a 3 mg.mL <sup>-1</sup> ) em coluna Pursuit® C18 5 µm (250 x 10,0 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 3 mL.min <sup>-1</sup> . Absorbância monitorada em $\lambda_{m\acute{a}x} = 214$ nm. ....	39
<b>Figura 4-10.</b> Espectro de massas completo das frações 1 e 2 coletados na purificação, mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 1550-1600, juntamente com a representação estrutural da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> e sua massa teórica. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam® com potência de 40%. ....	40
<b>Figura 4-11.</b> Em preto, perfil de CLAE do produto bruto da síntese do peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> , injetado com concentração 30 vezes menor (0,1 mg.mL <sup>-1</sup> ) que na purificação original. Sobrepostos em azul e rosa, respectivamente, os perfis das frações 1 e 2, purificadas. Amostras injetadas (200 µL de soluções a 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> ), em coluna Pursuit® C18 5 µm (250 x 10,0 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1 % em um fluxo de 3 mL.min <sup>-1</sup> . Absorbância monitorada em $\lambda_{m\acute{a}x} = 214$ nm. ....	41
<b>Figura 4-12.</b> Espectros de CD obtidos para os isômeros <b>A</b> e <b>B</b> em diferentes proporções de TFE:H <sub>2</sub> O.....	43
<b>Figura 4-13.</b> Espectros de CD obtidos para os isômeros <b>A</b> e <b>B</b> em diferentes proporções de LUVs (POPC:POPG:Ergosterol 3:1:1):H <sub>2</sub> O .....	45
<b>Figura 4-14.</b> A $\alpha$ -hélice. As ligações em preto representam as pertencentes ao esqueleto do peptídeo. As linhas pontilhadas representam as ligações de hidrogênio, que conectam a carbonila de um resíduo de aminoácido com o hidrogênio da amina logo. Imagens retiradas e adaptadas de FEHER, 2016 com autorização da Elsevier (Anexo D). ....	46
<b>Figura 4-15.</b> Mecanismo de formação de isômeros em aminoácidos.....	47
<b>Figura 4-16.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H das amostras do (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> A e (B) B em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). ....	48

<b>Figura 4-17.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ parciais das amostras do (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH <sub>2</sub> A e (B) B em TFE- $d_2$ :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Região de ressonâncias de hidrogênios amídicos e aromático.....	48
<b>Figura 4-18.</b> Sobreposição dos mapas de contornos $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HMQC das amostras de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> A (vermelho) e B (azul) em TFE- $d_2$ :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). .....	49
<b>Figura 4-19.</b> Sobreposição dos mapas de contornos TOCSY parciais das amostras de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> A (vermelho) e B (azul) em TFE- $d_2$ :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). .....	51
<b>Figura 4-20.</b> Mapas de contornos NOESY das amostras de (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH <sub>2</sub> A e (B) B em TFE- $d_2$ :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Correlações entre os hidrogênios anoméricos e triazólicos estão destacadas em círculos vermelhos; entre os hidrogênios triazólicos e outros hidrogênios do anel da glicose estão destacadas em retângulos vermelhos; entre hidrogênios do anel da glicose e de resíduos de aminoácidos são destacadas em retângulos azuis; entre hidrogênio triazólico e hidrogênios de resíduos de aminoácidos são destacadas em retângulos magenta; entre os hidrogênios anoméricos e outros hidrogênios do anel da glicose estão destacadas em retângulos verdes .....	53
<b>Figura 4-21.</b> Comparação entre as estruturas primárias dos glicotriazóis-peptídeos e peptídeo empregados nos testes antifúngicos. ....	55
<b>Figura A-1.</b> Aminoácidos essenciais com suas representações, características estruturais e massas. ....	64
<b>Figura B-1.</b> Representação estrutural dos aminoácidos empregados na síntese, com seus respectivos grupos protetores e massas. ....	65
<b>Figura E-1.</b> Espectro de massas completo do produto obtido empregando a <b>metodologia c</b> , mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 1340-1410. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	69
<b>Figura E-2.</b> Espectro de massas completo do produto obtido empregando a <b>metodologia d</b> . Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	70
<b>Figura E-3.</b> Espectro de massas completo do produto obtido empregando a <b>metodologia e</b> . Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. ....	70
<b>Figura F-1.</b> Espectro de massas completo do produto obtido através da reação CuAAC, mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 1140-1420, cujos picos são referentes à	

reações incompletas, conforme discutido na seção 5.2.1. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. .....	71
<b>Figura F-2.</b> Espectro na região do infravermelho da azidoglicose com as hidroxilas desprotegidas, juntamente com a representação estrutural do composto.....	72
<b>Figura F-3.</b> Espectro de massas completo da <b>Fração 1-B</b> coletada na purificação de <b>I</b> , mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 700-1550. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. .....	73
<b>Figura F-4.</b> Espectro de massas completo de <b>Fração 2-B</b> coletada na purificação de <b>I</b> , mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 700-1550. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%. .....	73
<b>Figura F-5.</b> Espectro de massas completo do produto obtido através da primeira reação CuAAC (empregando-se 1,8 equivalentes de azidoaçúcar) mostrando também a expansão na região entre $m/z$ 1150-1625, cujos picos são analisados de forma análoga àquela mostrada na <b>seção 4.2.1</b> . Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam <sup>®</sup> com potência de 40%....	74
<b>Figura F-6.</b> Mapas de contornos <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Correlações com fase positiva são apresentadas em preto (CH ou CH <sub>3</sub> ) e correlações com fase negativa são apresentadas em vermelho (CH <sub>2</sub> ). .....	75
<b>Figura F-7.</b> Mapas de contornos <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC parcial das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Nesta expansão são apresentadas as correlações entre os H e C anoméricos e triazólicos.....	76
<b>Figura F-8.</b> Mapas de contornos <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). .....	77
<b>Figura F-9.</b> Mapas de contornos NOESY das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). .....	78



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3-1.</b> Análise do resultado do teste de Kaiser. ....	16
<b>Tabela 3-2:</b> Resumo das condições reacionais empregadas na síntese da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina. ....	18
<b>Tabela 3-3.</b> Resumo das condições <b>b - e</b> empregadas na síntese da Síntese da 1,5-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,5-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina.....	19
<b>Tabela 4-1.</b> Comparação entre as massas teóricas de <b>VIII</b> e as observadas nos espectros mostrados na <b>Figura 4-1</b> . ....	30
<b>Tabela 4-2.</b> Comparação entre as massas teóricas de <b>VIII</b> e as observadas nos espectros mostrados na <b>Figura 4-3</b> . ....	32
<b>Tabela 4-3.</b> Comparação entre as massas teóricas de diversas estruturas similares à inicialmente proposta, a fim de identificar os picos de massa $m/z = 608,23$ e $m/z = 730,33$ , observados na <b>Figura 4-4</b> . ....	34
<b>Tabela 4-4.</b> Comparação entre as massas teórica do <b>Produto I</b> e as massas observadas nos espectros mostrados na <b>Figura 4-8</b> . ....	40
<b>Tabela 4-5.</b> Comparação entre os tempos de retenção da amostra bruta, diluída e das frações purificadas .....	41
<b>Tabela 4-6.</b> Comparação entre a atividade fungicida do peptídeo HSP1-NH <sub>2</sub> , glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[( <i>p</i> -OAc)Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> (1,4-GtP( <i>p</i> -OAc)), 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> A e B e anfotericina B em <i>Candida sp</i> ATCC.....	56
<b>Tabela C-1.</b> Dados da primeira tentativa de síntese da [Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> , utilizando uma resina de grau de substituição 0,74 mmol.g <sup>-1</sup> . ....	66
<b>Tabela C-2.</b> Dados da primeira tentativa de síntese da [Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> , utilizando uma resina de grau de substituição 0,52 mmol.g <sup>-1</sup> . ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
APD	Banco de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
ATR-FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada, do inglês <i>Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared</i>
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CuAAC	Cicloadição Alcino-Azida Catalisada por Cobre(I), do inglês <i>Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
DCM	Diclorometano
DHB	Ácido 2,5-diidroxibenzóico
DIC	<i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio
EM	Espectrometria de Massas
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HMQC	Correlação Heteronuclear de Múltiplo Quantum, do inglês <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	Coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPA	Álcool isopropílico
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima, do inglês <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MMC	Concentração Microbiana Mínima, do inglês <i>Minimal Microbial Concentration</i>
NOESY	Espectroscopia por Efeito Nuclear Overhauser, do inglês <i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>

PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PIPE	4-metilpiperidina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RuAAC	Cicloadição Alcino-Azida Catalisada por Rutênio, do inglês <i>Ruthenium-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano
TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total, do inglês <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF	Tempo de Vôo, do inglês <i>Time of Flight</i>

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Peptídeos antimicrobianos</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Modificações estruturais por meios sintéticos em PAMs .....	3
1.1.2. Peptídeos antimicrobianos e sua aplicação como antibióticos .....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1. Objetivos gerais</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>11</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. Esquema geral de síntese</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2. Síntese da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina</b> .....	<b>15</b>
3.2.1. Acoplamento dos Fmoc-resíduos de aminoácidos .....	15
3.2.2. Desproteção .....	15
3.2.3. Lavagem.....	16
3.2.4. Teste de Kaiser .....	16
<b>3.3. Síntese da 1,5-GtP[(p-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina</b> .....	<b>17</b>
3.3.1. Metodologias baseadas na peptidil-resina [Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> .....	18
3.3.2. Metodologia usando o resíduo Fmoc-Pra .....	20
<b>3.4. Síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5. Clivagem e liofilização</b> .....	<b>22</b>
<b>3.6. Purificação</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7. Elucidação estrutural</b> .....	<b>24</b>
3.7.1. Espectroscopia no Infravermelho .....	24

3.7.2.	Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	25
3.7.3.	Ressonância Magnética Nuclear.....	26
<b>3.8.</b>	<b>Testes Biológicos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.</b>	<b>Síntese do glicotriazol-peptídeo 1,5-GtP[(<i>p</i>-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>.....</b>	<b>29</b>
4.1.1.	Metodologia a.....	29
4.1.2.	Metodologias b-e .....	31
4.1.3.	Metodologia f.....	33
<b>4.2.</b>	<b>Síntese do glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>.....</b>	<b>36</b>
4.2.1.	Síntese e purificação .....	36
4.2.2.	Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	43
4.2.3.	Espectroscopia de Ressonância Magnética .....	47
4.2.4.	Testes biológicos .....	55
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO C.....</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXO D.....</b>	<b>83</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Peptídeos antimicrobianos

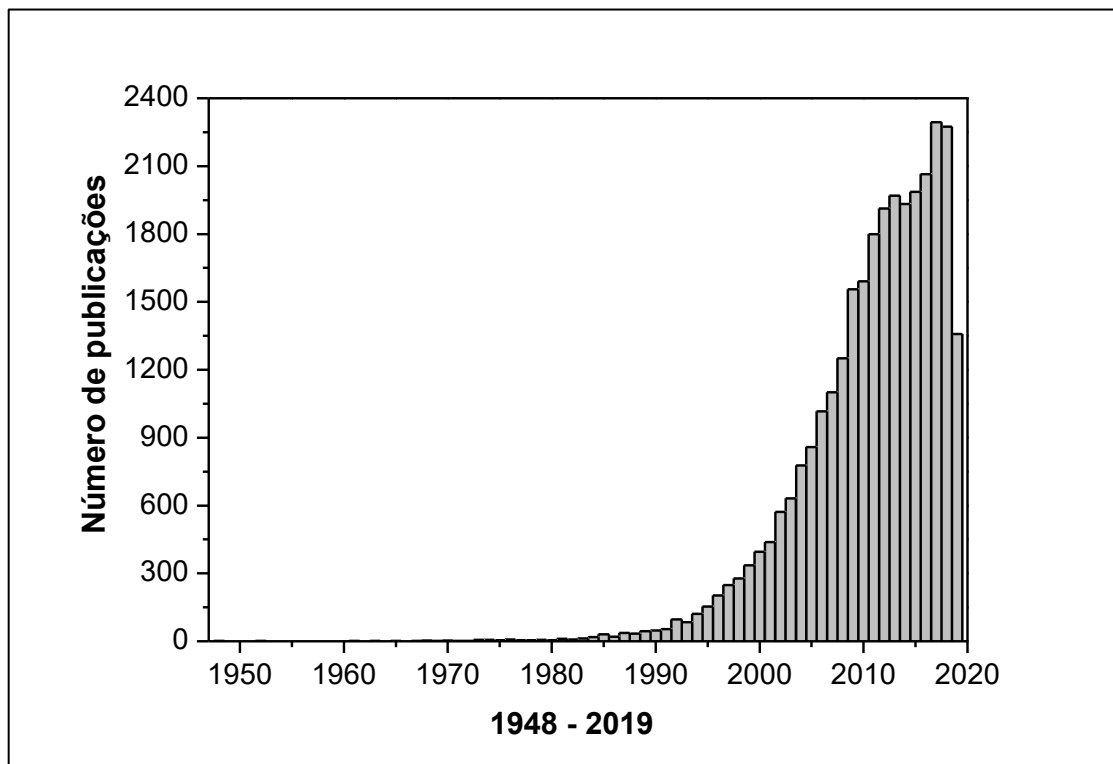
O primeiro relato de resistência microbiana remonta ao início do século XX, quando Paul Ehrlich mostrou espécies de tripanossomas resistentes ao tratamento com azo-corantes. Já em 1948, apenas 20% das cepas de bactérias *Neisseria gonorrhoeae* eram sensíveis ao uso de sulfonamidas, assim como outras espécies de micróbios. Nesse cenário, a busca por novos compostos capazes de inibir ou matar micro-organismos resistentes danosos à saúde tem impulsionado a busca por novos agentes antibióticos. Assim, peptídeos com atividade antimicrobiana passaram a despertar grande interesse da comunidade científica, uma vez que grande parte dessas moléculas provoca lise das membranas celulares dos micro-organismos, dificultando a indução de resistência microbiana.

Peptídeos são biomoléculas formadas a partir de ligações amídicas (ligações peptídicas), resultado de reações de condensação entre resíduos de aminoácidos, sendo quase que em sua totalidade na configuração L para moléculas de origem natural, embora existam relatos de peptídeos contendo resíduos de D-aminoácidos (DE MAGALHÃES et al., 2013).

Resultados de anos de evolução, os peptídeos são componentes do sistema imune dos seres vivos, responsáveis pela defesa do corpo na eliminação de corpos invasores e no combate a infecções (BAHAR; REN, 2013). A descoberta do primeiro peptídeo antimicrobiano (PAM) foi feita por Dubos em 1939 (DUBOS, 1939a, 1939b), quando um extrato obtido por meio de uma cepa de *Bacillus* apresentou propriedades protetoras em ratos contra infecções por *Pneumococos*. No ano seguinte, a gramidicina, uma mistura de três peptídeos bioativos, foi obtida deste extrato por Hotchkiss e Dubos (HOTCHKISS; DUBOS, 1940), tendo ela se mostrado eficaz no tratamento de úlceras e feridas. Em 1941, foram descobertos dois novos PAMs: a tirocidina, eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas tóxica ao sangue humano (RAMMELKAMP; WEINSTEIN, 1941); e a purotionina, eficaz contra fungos e algumas bactérias patogênicas (apud. BAHAR; REN, 2013). Por fim, a defensina, o primeiro PAM isolado de animais, foi obtida em 1956 a partir de leucócitos de coelhos (HIRSCH, 1956).

Desde então, vêm-se pesquisando cada vez mais sobre esse tema, como mostram os dados sobre publicações relacionadas a peptídeos antimicrobianos, desde o ano de 1948 até hoje (**Figura 1-1**). O aumento pronunciado no número de publicações sobre o assunto é coincidente

com a crescente resistência microbiana, devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Devido a essa, têm-se observado infecções resistentes, com altas taxas de mortalidade.



**Figura 1-1.** Gráfico contendo o número de publicações sobre "antimicrobial peptides" desde 1948, segundo dados do Scopus. Acesso em 01 de agosto de 2019.

Nesse cenário, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos é um assunto cada vez mais urgente e os peptídeos antimicrobianos surgem como uma promissora alternativa. Desde sua última atualização, realizada em Janeiro/2019, foram registrados 3065 no Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos peptídeos obtidos de seis fontes naturais, sendo 343 de bactérias; 5 vindos do domínio *archaea*; 8 de protistas; 20 de fungos, 349 derivados de plantas e 2307 derivados animais, incluindo alguns peptídeos sintéticos (“APD - Antimicrobial Peptide Database”, [s.d.]

Geralmente os PAMs são formados por 10-50 resíduos de aminoácidos e possuem caráter anfipático, devido à presença de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. Já a presença dos resíduos de Lisina, Arginina e Histidina em grande parte dos PAMs, confere a estes um caráter tipicamente catiônico (CIUMAC et al., 2019).

As ligações de hidrogênio intramoleculares entre os resíduos são responsáveis pela estrutura secundária do peptídeo. Quando exposta ao ambiente de membrana, essas ligações intramoleculares conferem à biomolécula uma estrutura tridimensional bem definida. Para a

maioria dos PAMs, geralmente observa-se o enovelamento do peptídeo em  $\alpha$ -hélice, embora outros tipos de estruturação (como conformações  $\beta$ ) podem ser também observadas. Contudo, a composição de resíduos de aminoácidos (sequência ou estrutura primária) é determinante para a estrutura tridimensional da molécula, podendo influenciar em parâmetros como anfipaticidade, carga global e momento hidrofóbico (CIUMAC et al., 2019).

Devido ao avanço da ciência no estudo de peptídeos antimicrobianos, fez-se necessário o desenvolvimento de estratégias de síntese que permitissem o *design* racional dessas moléculas, não dependendo exclusivamente do isolamento destes a partir de fontes naturais.

### ***1.1.1. Modificações estruturais por meios sintéticos em PAMs***

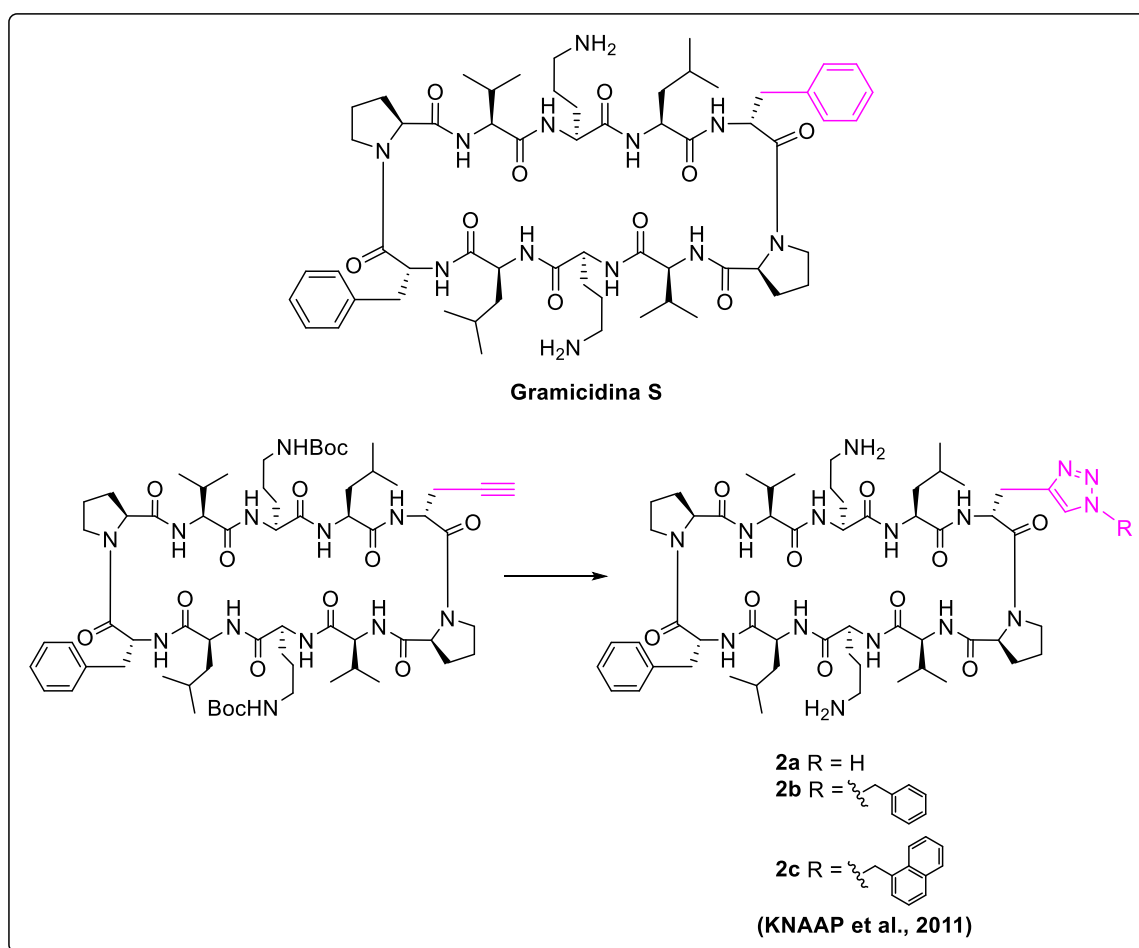
Nos anos 1960, Merrifield revolucionou a síntese de peptídeos. Em sua publicação no *Journal of the American Chemical Society*, ele descreveu a síntese e purificação de um tetrapeptídeo, usando um polímero de poliestireno insolúvel como suporte onde as reações de acoplamento dos resíduos de aminoácido aconteceram (MERRIFIELD, 1963). No ano seguinte, ele publicou, na mesma revista, a síntese de um fragmento contendo nove resíduos da bradicinina. Com modificações na metodologia inicialmente proposta, como o emprego de resíduos de aminoácidos protegidos com o grupo Boc (*tert*-butoxi-carbonil), que demandava condições reacionais mais brandas e eliminava problemas, como a perda de intermediários de reação, foi obtido um material de alta pureza com rendimento de 68% (MERRIFIELD, 1964).

Num período em que os únicos métodos de obtenção de peptídeos eram o isolamento de fontes naturais (que fornecem baixas concentrações dos peptídeos de interesse) ou síntese em solução, limitada ao uso em pequena escala e com peptídeos de até cinco resíduos, a técnica de Merrifield logo foi adotada pela comunidade científica. Naturalmente, a técnica se aperfeiçoou ao longo dos anos, sendo encontrados hoje em dia várias compilações de metodologias de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), sendo a publicação de Chan e White uma das mais citadas atualmente (CHAN, W. C; WHITE, 2000).

Além da síntese química de peptídeos em fase sólida clássica, são amplamente estudadas modificações sintéticas nas estruturas dessas moléculas, a fim de potencializar sua atividade e minimizar efeitos colaterais. Três das modificações em voga são o desenvolvimento e aperfeiçoamento de peptídeos cíclicos, bem como o uso de resíduos de aminoácidos não usuais (ou seja, diferentes dos 20 resíduos essenciais, mostrados no **Apêndice A**) e a glicosilação dessas macrobiomoléculas.



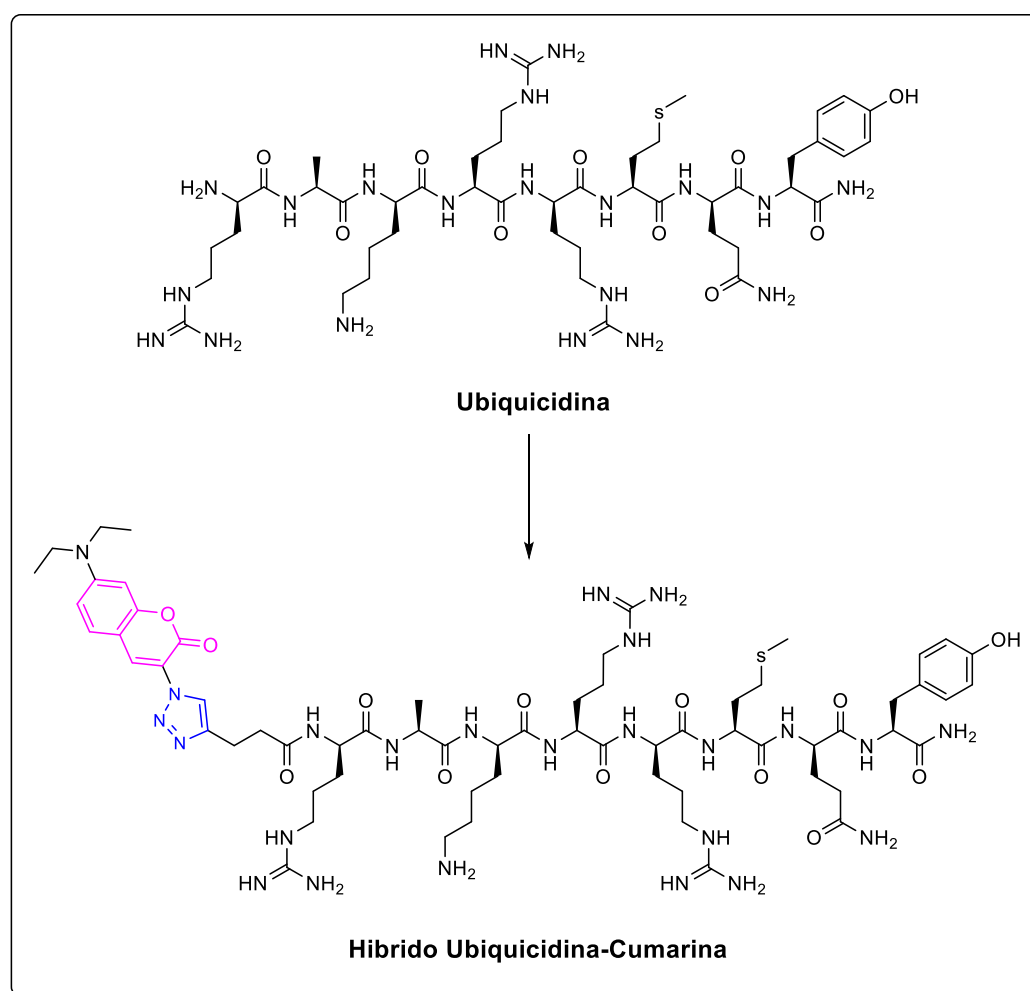
A gramicidina S, isolada por Gause e Brazhnikova em 1944 (GAUSE; BRAZHNIKOVA, 1944), foi um dos primeiros peptídeos antimicrobianos cíclicos que se tem notícia, sendo muito investigada ainda hoje devido à sua robusta atividade antibiótica frente cepas Gram-positivas e Gram-negativas de bactérias. Em abril de 2019, Guan e colaboradores publicaram uma revisão sobre avanços recentes em análogos dessa biomolécula, que tem mais de 70 anos na clínica (GUAN et al., 2019). Já foram realizadas várias modificações na estrutura primária da Gramidicina S, desde a substituição dos resíduos presentes na cadeia peptídica (TAMAKI et al., 2012), até a inserção de estruturas fotossensíveis (BABII et al., 2014). O grupo de Knaap propôs, entre outras modificações, a substituição de um dos resíduos aromáticos por triazóis 1,4-dissubstituídos (**Figura 1-2**) (KNAAP et al., 2011).



**Figura 1-2.** Representação estrutural do ciclopeptídeo gramicidina S e três de seus análogos obtidos via síntese química empregando um resíduo de propargilglicina para obtenção de triazóis. Adaptado de KNAAP et al., 2011.

Após a troca do resíduo de D-fenilalanina em uma das dobras- $\beta$  da estrutura por 1,2,3-triazóis com diferentes substituintes, pôde-se observar mudanças na atividade biológica da molécula, em comparação com a precursora. O resultado mais expressivo foi a redução do MIC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para matar ou inativar metade das cepas) em quatro vezes do produto **2c** (MIC<sub>50</sub> = 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), quando comparado à gramidicina S (MIC<sub>50</sub> = 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mostrando que o triazol substituído pode ser um bom grupo bioisótero para o anel aromático naquela porção do peptídeo.

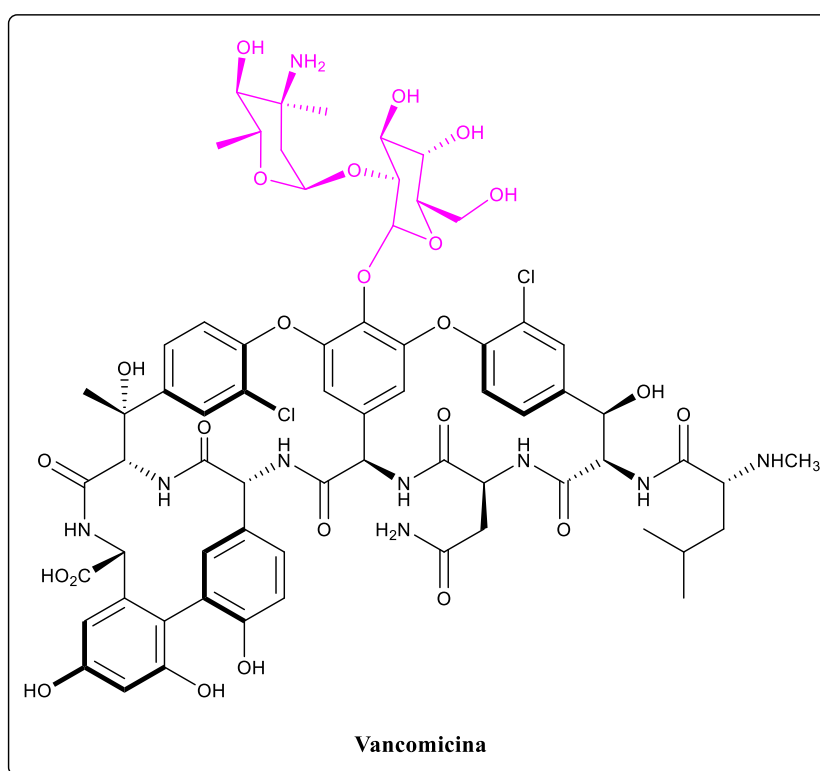
A inserção de unidades não usuais no esqueleto peptídico também é interessante na combinação dessas a diversas outras moléculas e polímeros bioativos, permitindo a modulação da atividade antimicrobiana do conjunto. Ferreira e colaboradores estudaram os efeitos da união entre a ubiquicidina e a cumarina (em rosa), através de um *link* triazólico (em azul) (**Figura 1-3**) (FERREIRA et al., 2015).



**Figura 1-3.** Representação estrutural do peptídeo Ubiquidina e seu análogo Ubiquidina-Cumarina, obtido via síntese química. Adaptado de FERREIRA et al., 2015.

Essa hibridação forneceu um produto mais ativo do que o peptídeo original frente às duas cepas de fungos testadas. Muito desse resultado se deve à conhecida atividade antifúngica do triazol, amplamente explorada pela comunidade científica.

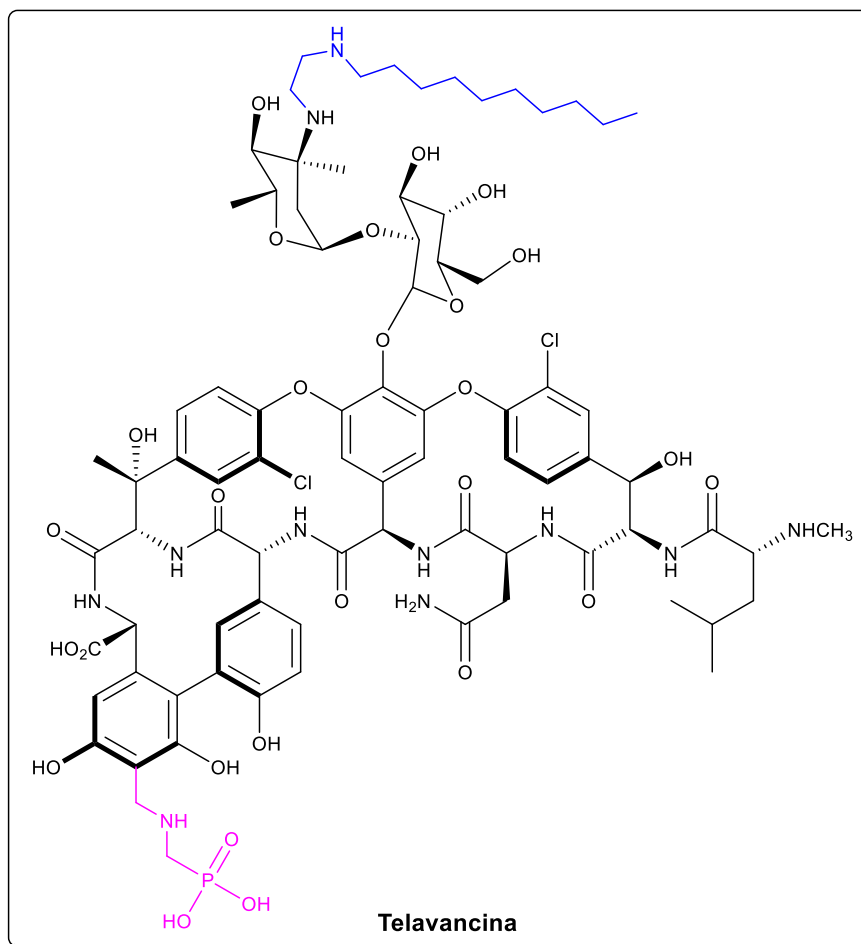
Também se mostra relevante o estudo de peptídeos glicosilados, uma vez que essa classe de compostos está presente em alguns medicamentos disponíveis no mercado. A vancomicina (**Figura 1-4**), por exemplo, é um glicopeptídeo aplicado no tratamento de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.



**Figura 1-4.** Representação estrutural da Vancomicina, com o dissacarídeo em destaque.

Além disso, a glicosilação de peptídeos é uma estratégia para melhorar a biodisponibilidade destes, aumentando, por exemplo, a estabilidade metabólica do composto (COSTA et al., 2013; MORADI et al., 2016). A telavancina (**Figura 1-5**) é um derivado semissintético da família da vancomicina, já empregada na clínica. Esta molécula teve grupos hidrofílicos e hidrofóbicos inseridos em sua estrutura a fim de otimizar a ação contra cepas já resistentes à vancomicina. A inclusão da porção hidrofóbica (assinalada em azul) é responsável pelo aumento da atividade antimicrobiana, enquanto a porção hidrofílica (assinalada em rosa)

promove uma melhora em parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco (BINDA; MARINELLI; MARCONE, 2014).

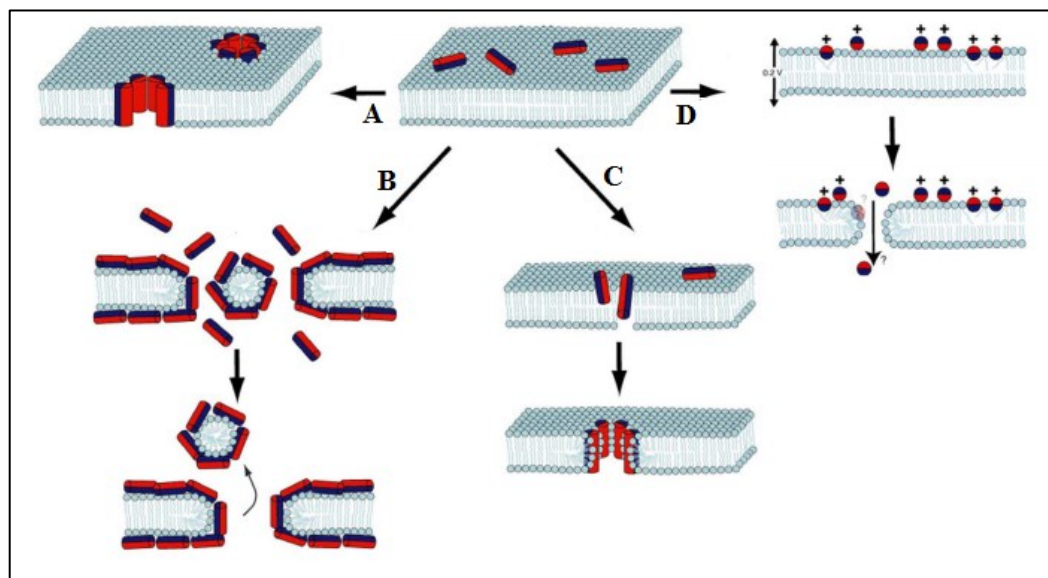


**Figura 1-5.** Representação estrutural da telavancina, com as porções hidrofóbicas e hidrofílicas inseridas quimicamente em destaque. Adaptado de BINDA; MARINELLI; MARCONE, 2014.

### ***1.1.2. Peptídeos antimicrobianos e sua aplicação como antibióticos***

O desenvolvimento de novos antibióticos é um assunto cada vez mais urgente, visto a crescente resistência microbiana aos fármacos disponíveis no mercado. Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou seu primeiro relatório sobre o assunto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), alertando para uma possível era pós-antibióticos, onde simples ferimentos e infecções podem ser fatais. Nesse cenário, o uso de peptídeos no combate de micro-organismos danosos à saúde pode ser considerado uma alternativa promissora.

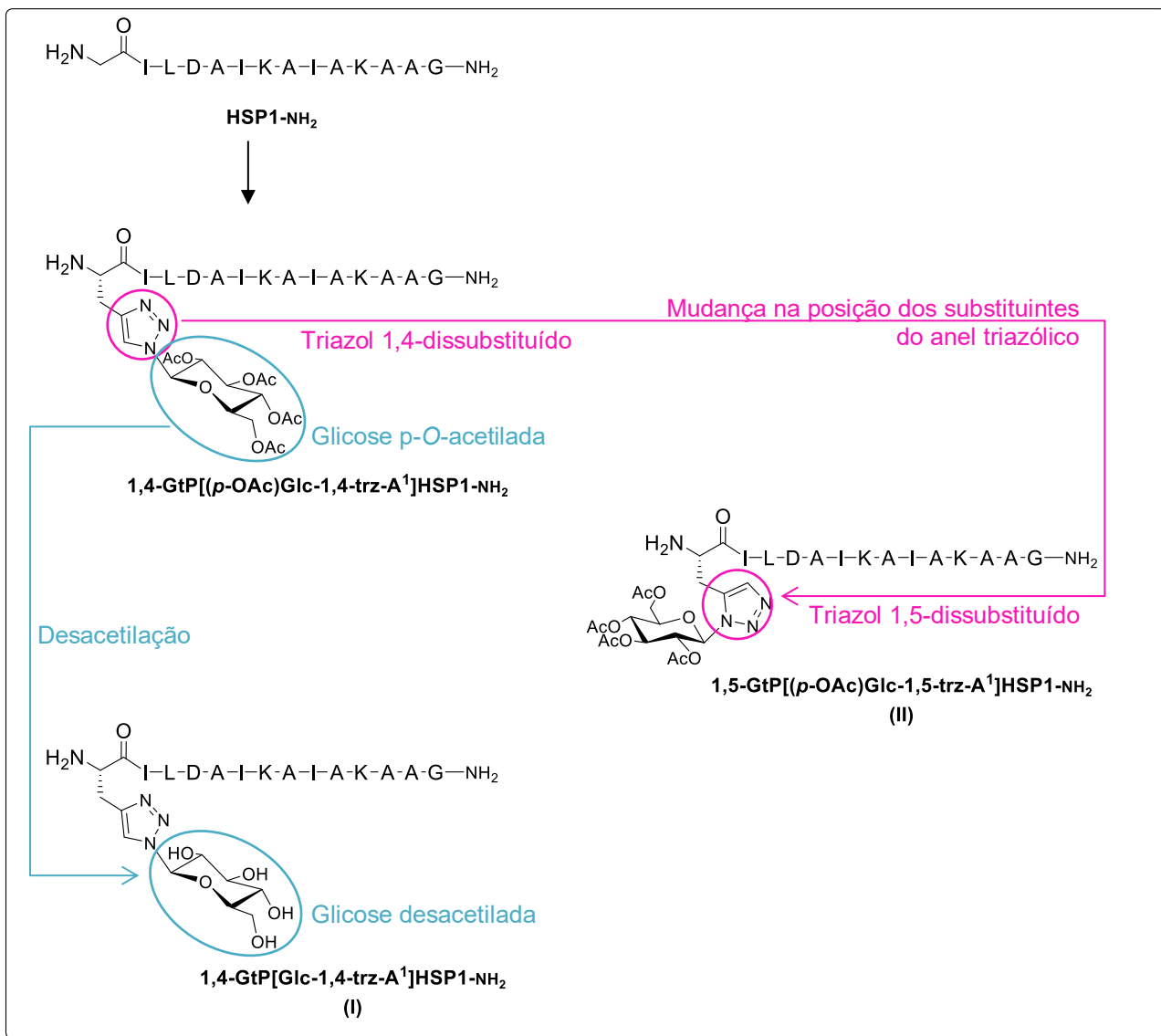
Os mecanismos de ação dessas macrobiomoléculas são divididos em duas classes principais: a que causa a morte direta do micro-organismo e a que faz a modulação do sistema imune do hospedeiro (ULM et al., 2012). Na morte direta por ruptura da membrana celular – cujos principais modelos são o barril de aduelas, tapete, poros toroidais e detergente (Figura 1-6) (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018) – observa-se que não é necessária a interação ou ligação do peptídeo a um receptor específico. Assim, a grande vantagem do emprego dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) na clínica é o difícil desenvolvimento de resistência microbiana, por ter a membrana como alvo. Além disso, cerca de 50% das proteínas humanas possuem uma unidade glicosídica (APWEILER; HERMJAKOB; SHARON, 1999), e estudos mostram que a glicosilação de peptídeos e proteínas é determinante na estrutura, atividade e estabilidade térmica desses (SILVA et al., 2012).



**Figura 1-6.** Representação esquemática dos principais modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos, que envolvem a morte direta por ruptura da membrana celular: (A) barril de aduelas, (B) detergente, (C) poro toroidal e (D) tapete ou carpete. Em vermelho, a parte hidrofílica do peptídeo e, em azul, a hidrofóbica. Imagens retiradas e adaptadas de (TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017) com autorização da Elsevier (Anexo C).

Modificações estruturais na hilaseptina-1 (HSP-1) empregando a química click já foram estudadas pelo grupo de pesquisa do presente trabalho (JUNIOR et al., 2017), e se mostraram promissoras, uma vez que foi observado um aumento significativo na atividade antifúngica em relação ao peptídeo nativo, embora a atividade antibacteriana não tenha sofrido alterações

significativas. Dessa forma, foram planejados dois análogos de um dos peptídeos analisados por Júnior e colaboradores (JUNIOR et al., 2017), conforme mostrado na **Figura 1-7**.



**Figura 1-7.** Esquema geral de modificações estruturais propostas baseadas no peptídeo 1,4-GrP[(p-OAc)Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HPS1-NH<sub>2</sub>, já estudado pelo grupo.

As modificações propostas podem influenciar na taxa de morte celular, no mecanismo de ação, e/ou também na força de interação do PAM com a superfície da membrana do micro-organismo. Em contrapartida, JUNIOR et al., 2017 mostrou que a presença do 1,4-triazol é relevante na inibição da biossíntese do ergosterol, além disso, a presença do açúcar per-*O*-acetilado aumenta a afinidade do peptídeo pela membrana. A obtenção do GtP análogo, contendo um anel 1,5-triazólilco possibilitará a verificação de efeitos da regioquímica desse heterociclo na atividade biológica. Além disso, a inserção do açúcar desacetilado pode alterar

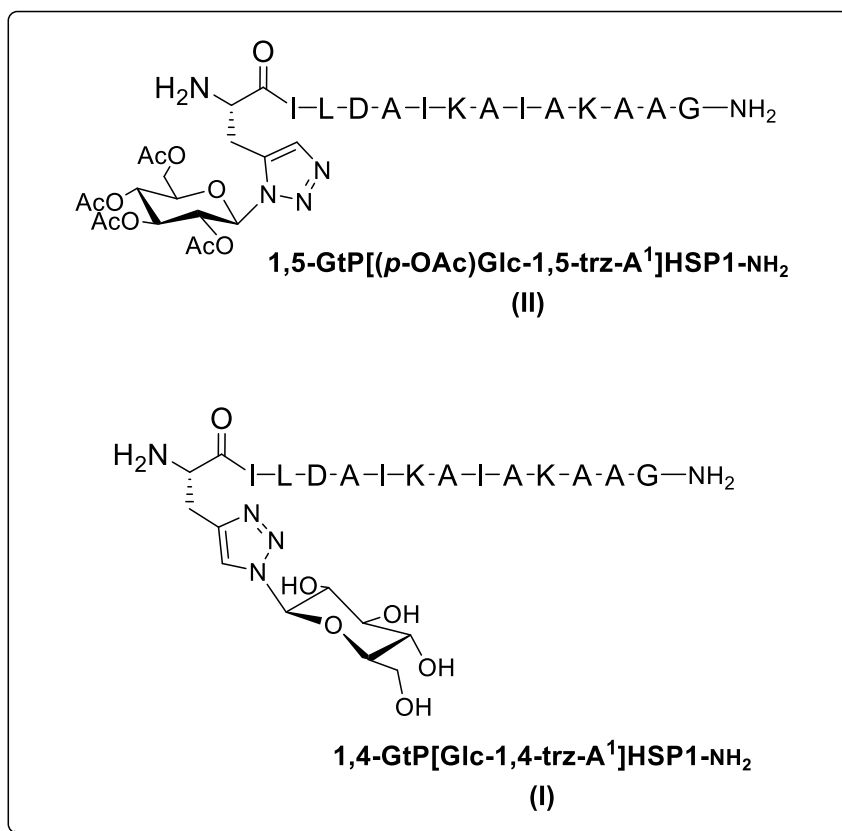
a forma de interação do peptídeo com a membrana, uma vez que pode alterar no grau de inserção do carboidrato na bicamada, bem como na disposição topológica da biomolécula na interface membranar, que é dependente da polaridade de suas unidades formadoras (RESENDE et al., 2014). Logo, o estudo das modificações estruturais propostas neste trabalho são relevantes, uma vez que possivelmente trarão informações sobre a relação estrutura-atividade dessa classe de compostos antimicrobianos e similares, permitindo o design racional de novos derivados de PAMs.

E, assim como pontuaram Brogden e Brogden, os peptídeos antimicrobianos modificados apresentam características e habilidades únicas, podendo se tornar a próxima geração de peptídeos com grandes potenciais farmacêuticos (BROGDEN; BROGDEN, 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Sintetizar os peptídeos inéditos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (**Figura 2-1**) e investigar suas atividades biológicas, preferências conformacionais e interações com membranas.

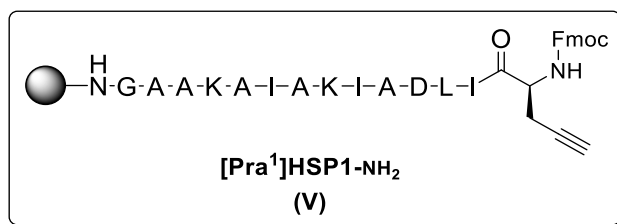


**Figura 2-1.** Estrutura das biomacromoléculas 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, cujas sínteses são propostas neste trabalho.

### 2.2. Objetivos específicos

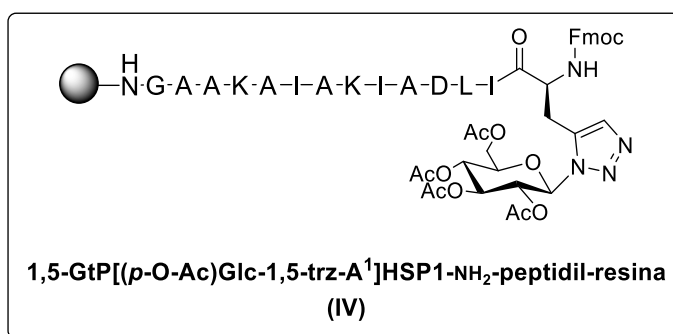
- Por síntese de peptídeos em fase sólida, obter a [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (V);





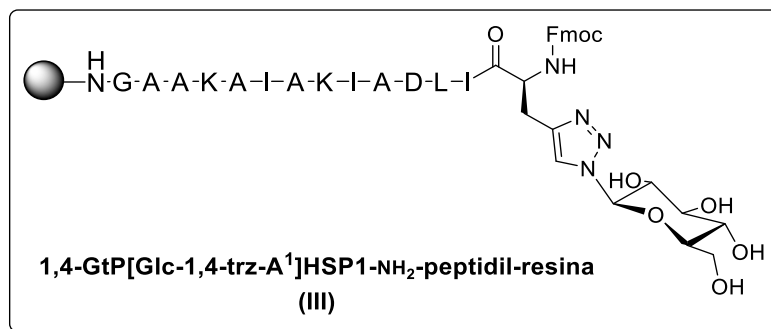
**Figura 2-2.** Estrutura da peptidil-resina [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (V).

- Obter a 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (IV);



**Figura 2-3.** Estrutura da 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (IV).

- Obter a 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (III);



**Figura 2-4.** Estrutura da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (III).

- Sintetizar e caracterizar o glicotriazol-peptídeo 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (II) a partir de Espectrometria de Massas MALDI-TOF;

- Sintetizar e caracterizar glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (I) por meio de Espectrometria de Massas MALDI-TOF, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e Espectroscopia de Ressonância

Magnética Nuclear (RMN), por meio dos experimentos de TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e HMQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  *sofast*;

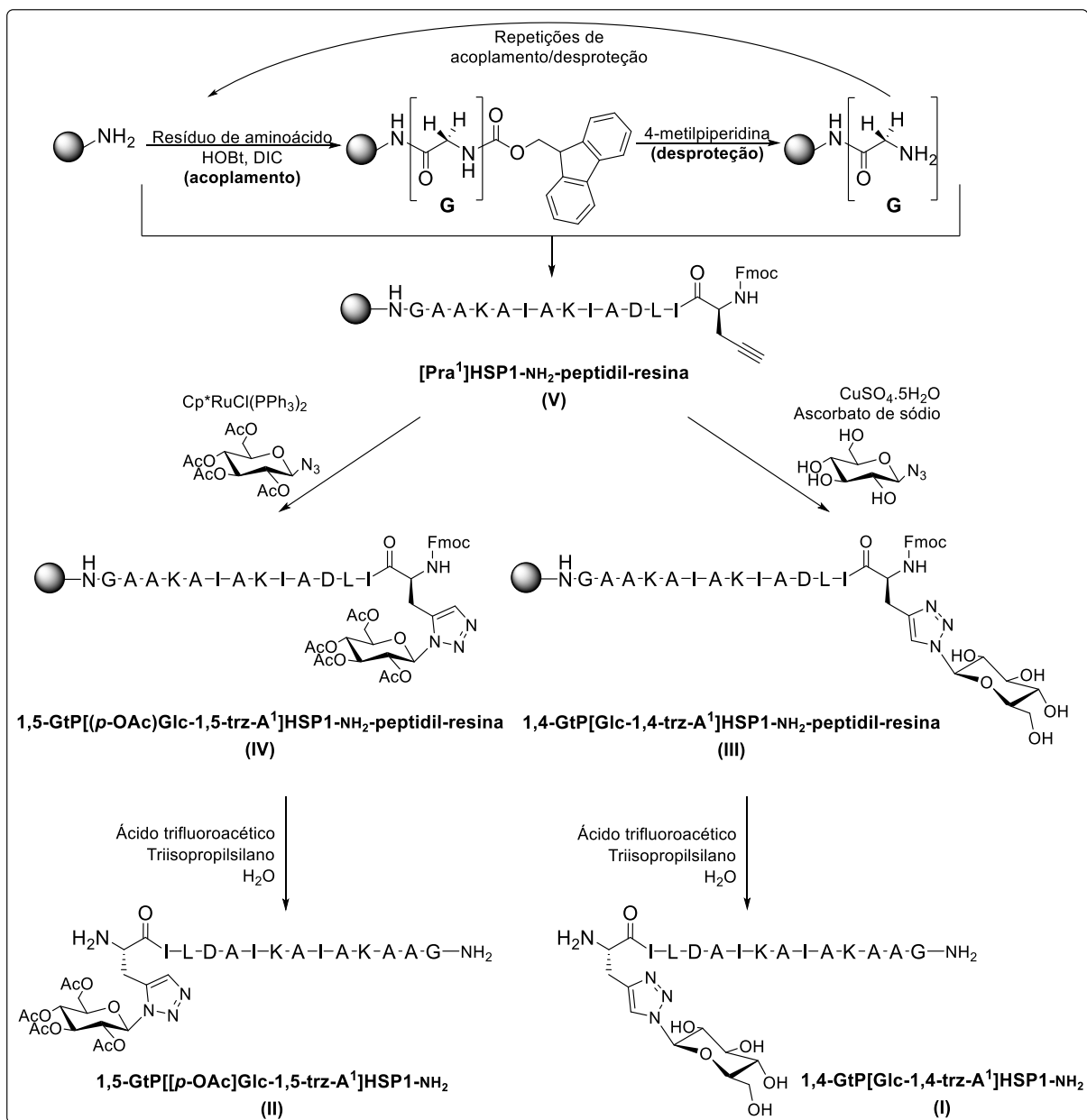
- Avaliar as conformações preferenciais e interações com membranas dos glicotriazol-peptídeos por espectroscopia de dicroísmo circular;

- Investigar as atividades antifúngicas dos glicotriazol-peptídeos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Esquema geral de síntese

O esquema geral de síntese dos dois produtos propostos é mostrado na **Figura 3-1**.



**Figura 3-1.** Esquema geral de síntese dos produtos propostos 1,5-GtP[p-OAc]Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (II).  
1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (I).

### 3.2. Síntese da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina

Mais de uma metodologia foi utilizada nas reações de acoplamento dos Fmoc-resíduos de aminoácidos (cujas estruturas estão no **Apêndice B**), devido à ineficácia de algumas reações. Neste tópico serão apresentadas as metodologias de forma simplificada. Porém, no **Apêndice C**, encontram-se tabelas com informações detalhadas da síntese.

A síntese da hilaseptina-1 amidada na porção carboxi-terminal, cujo resíduo 1 foi substituído por uma propargilglicina ([Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>), foi realizada usando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) de síntese de peptídeos em fase sólida, descrita por Chan e White (CHAN e WHITE, 2000).

Primeiramente, 0,28726 g da resina Rink-Amide Chemmatrix<sup>®</sup> de grau de substituição 0,52 mmol.g<sup>-1</sup> foi colocada em uma seringa com um filtro de poliuretano e expandida com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 min). Em seguida, esta foi lavada três vezes alternadamente com DMF e isopropanol (IPA) (3 x 3 mL cada) e duas vezes com DCM (2 x 3 mL).

#### 3.2.1. Acoplamento dos Fmoc-resíduos de aminoácidos

Para as oito primeiras etapas de acoplamento, empregaram-se 4 equivalentes dos Fmoc-resíduos de aminoácidos, bem como dos ativadores 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC). Estes foram solubilizados em 3 mL de uma mistura de DMF destilada/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1 (v/v) e a reação se processou por 3 h a 450 rpm. Para os cinco resíduos seguintes, utilizaram-se 5 equivalentes de cada reagente, solubilizados em 3 mL de solvente (mais detalhes no **Apêndice B**), durante 3h30 – 4h de reação a 450 rpm.

- **Propargilglicina:** O último acoplamento foi realizado utilizando apenas 1,5 equivalente do Fmoc-resíduo de aminoácido, bem como dos ativadores HOBt e DIC, solubilizados em 3 mL de DMF destilada, devido ao seu preço elevado. A reação se processou por 4 h, a 450 rpm.

#### 3.2.2. Desproteção

As etapas de desproteção foram realizadas utilizando 5 mL de uma solução de 4-metilpiperidina 20% em DMF destilada, em dois ciclos de 12 minutos.

### 3.2.3. Lavagem

Ao final de cada etapa de acoplamento ou de desproteção (o que inclui a lavagem entre os ciclos de 12 min), a peptidil-resina foi lavada três vezes alternadamente com DMF e isopropanol (IPA) (3 x 3 mL cada) e duas vezes com DCM (2 x 3 mL).

### 3.2.4. Teste de Kaiser

A eficácia dos acoplamentos e desproteções foi verificada por meio do teste Kaiser (KAISER et al., 1970): de cinco a dez grãos de resina foram transferidos para um tubo de ensaio limpo, e adicionaram-se as seguintes soluções:

- Uma gota de piridina a 2% (v/v) em solução aquosa de cianeto de potássio (KCN) 1 mM;
- Duas gotas de fenol a 80% em etanol (v/v);
- Uma gota de ninidrina 5% em piridina (m/v).

Após 5 min a 100°C, analisou-se se ocorreu a formação do azul de Ruhemann conforme a **Tabela 3-1** e, quando necessário, a reação em questão foi repetida. Assim, sucessivas etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas, até que a peptidil-resina de interesse fosse obtida.

**Tabela 3-1.** Análise do resultado do teste de Kaiser.

Aspecto da peptidil-resina	Conclusão	
Coloração amarela	Grupo amino protegido	Acoplamento completo
		Desproteção incompleta
Coloração violeta	Grupo amino desprotegido	Acoplamento incompleto
		Desproteção completa

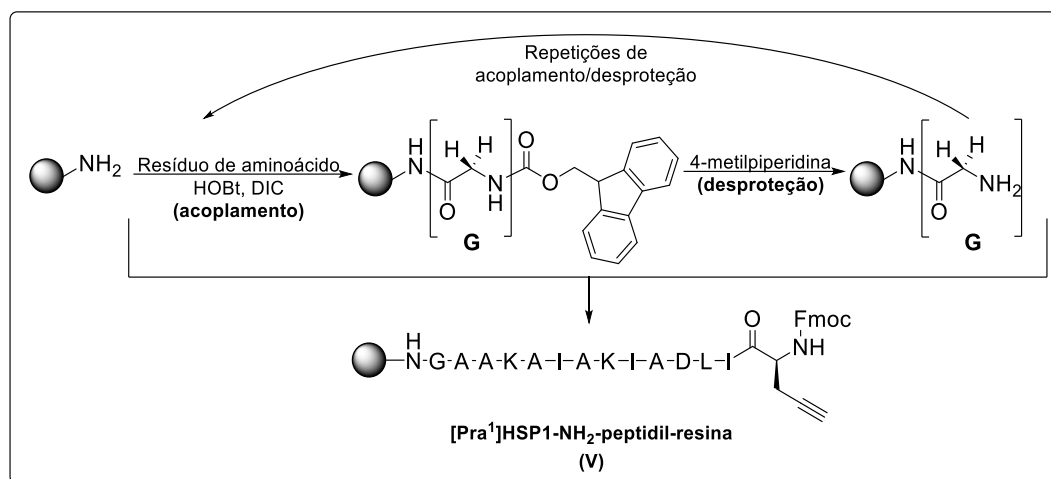


Figura 3-2. Esquema geral de síntese da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (III).

### 3.3. Síntese da 1,5-GtP[(p-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina

Nessa etapa, foram utilizadas seis metodologias de síntese (**metodologias a-f**), a fim de otimizar as reações de cicloadição 1,3-dipolar catalisadas por rutênio. Todos os solventes foram secos conforme descrito no **Apêndice D**, o azidoaçúcar (cuja síntese é descrita no **Anexo A**) foi fornecido pelo Prof. Dr. Ricardo José Alves, Faculdade de Farmácia – UFMG e o catalisador Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**Figura 3-3**, cuja síntese é apresentada no **Anexo B**) foi fornecido pela Prof. Dra. Maria Helena Araújo, Departamento de Química – UFMG.

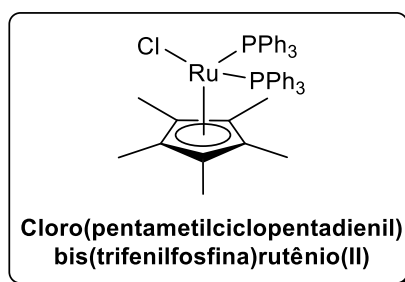


Figura 3-3. Estrutura do catalisador Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> empregado na síntese.

Nas **metodologias a-e**, as reações foram feitas utilizando 50 mg de peptidil-resina, sendo que o azidoaçúcar foi empregado na **metodologia a** e azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) nas **metodologias b-e**, a fim de se investigar a eficiência das diferentes estratégias de síntese. Para as **metodologias b-e**, a peptidil-resina foi pesada após secagem sob fluxo de N<sub>2</sub>, a fim de minimizar erros devido à presença de solvente residual. Uma vez que com 0,28726 g de resina

é possível obter cerca de 0,2 g de peptídeo, para os cálculos posteriores considerou-se que cada 50 mg de peptidil-resina continha cerca de 20 mg de peptídeo.

Já a **metodologia f** envolve a reação entre a Fmoc-Pra e o azidoaçúcar, objetivando-se uma posterior etapa de acoplamento do Fmoc-resíduo obtido à peptidil-resina.

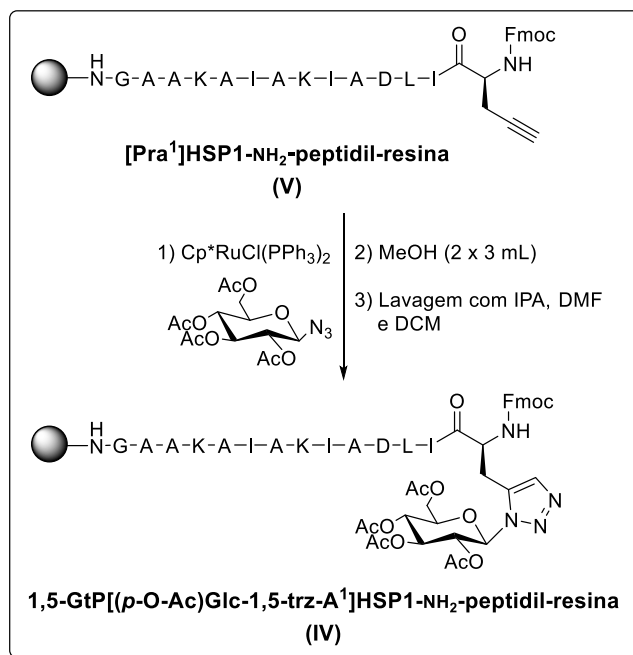
As metodologias a-f, sumariadas na **Tabela 3-2**, serão detalhadas abaixo.

**Tabela 3-2:** Resumo das condições reacionais empregadas na síntese da 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina.

Metodologia	Azida	Alcino	Solvente	Reação (h)
<b>a</b>	Azidoaçúcar	[Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina	THF	96
<b>b</b>	NaN <sub>3</sub>	[Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina	DMF	72
<b>c</b>	NaN <sub>3</sub>	[Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina	DMF	72
<b>d</b>	NaN <sub>3</sub>	[Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina	DCM	72
<b>e</b>	NaN <sub>3</sub>	[Pra <sup>1</sup> ]HSP1-NH <sub>2</sub> -peptidil-resina	DCM	72
<b>f</b>	Azidoaçúcar	Fmoc-Pra	DCM	120

### 3.3.1. Metodologias baseadas na peptidil-resina [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>

- **Metodologia a:** Primeiramente, a peptidil-resina foi colocada em um frasco tipo Schlenk com válvula para alto vácuo, seguindo-se adição de 0,0091 g (1,7 mol eq.) de azidoaçúcar e 0,0032 g (25% mol) de Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, juntamente com cerca de 4 mL de THF anidro. A reação foi mantida sob agitação magnética por 96 h. Ao término desta, a peptidil-resina foi transferida para uma seringa com filtro de poliuretano e lavada com metanol (2 x 3 mL), seguido do protocolo de lavagens descrito no **item 3.2.3**.



**Figura 3-4.** Esquema geral de síntese da 1,5-GtP[(p-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina.

- **Metodologias b – e:** A fim de verificar o escopo da reação, realizaram-se testes substituindo o azidoaçúcar por azida de sódio. Em dois casos, fez-se o tratamento prévio da peptidil-resina por 60 minutos com DCM, no intuito de verificar a influência da expansão da resina na reação.

Assim, foi usada a mesma condição reacional: para cada mol de **V**, se empregou 1,7 mol de NaN<sub>3</sub> e 10% mol de catalisador. A reação foi deixada sob agitação magnética por 72h, e as condições são mostradas na **Tabela 3-3**.

**Tabela 3-3.** Resumo das condições **b - e** empregadas na síntese da Síntese da 1,5-GtP[(p-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina.

Metodologia	Tratamento com DCM	Solvente	Azida de sódio (g)	Cp <sup>*</sup> RuCl(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (g)
<b>b</b>	Não	DMF	0,0095	0,0014
<b>c</b>	Sim	DMF	0,0092	0,0036
<b>d*</b>	Não	DCM	0,0110	**
<b>e*</b>	Sim	DCM	0,0109	**

\* A azida de sódio não se solubilizou no solvente escolhido

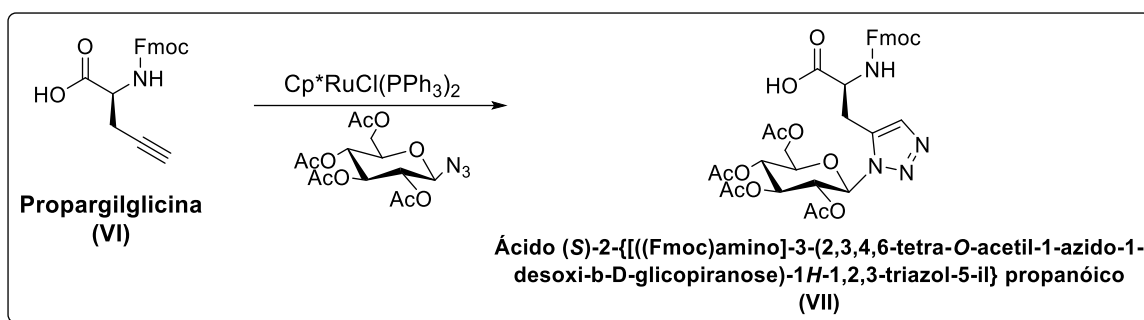
\*\* Não foi possível pesar com precisão a massa de catalisador, devido à instabilidade da balança.

Após o tempo previsto de reação, a peptidil-resina foi transferida para uma seringa e lavada de forma análoga à descrita na **Metodologia a**.



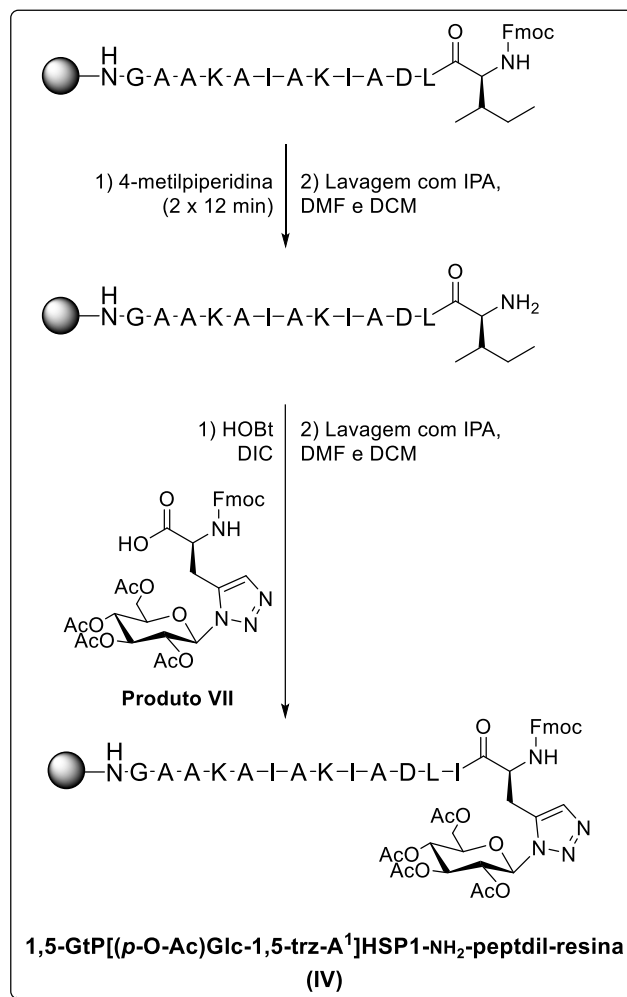
### 3.3.2. Metodologia usando o resíduo Fmoc-Pra

- **Metodologia f:** Primeiramente, 0,10074 g de propargilglicina foi colocada em um frasco tipo Schlenk com válvula para alto vácuo, seguido de 0,11090 g (1,0 mol) de azidoaçúcar e cerca de 10 mg (10% mol) de  $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ , juntamente com cerca de 5 mL de DCM anidro. A reação foi mantida sob agitação magnética por 120 h e, ao término desta, o produto foi concentrado sob pressão reduzida e purificado.



**Figura 3-5.** Esquema geral de síntese do ácido (S)-2-[[[(Fmoc)amino]-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-azido-1-desoxi-β-D-glicopiranoose)-1H-1,2,3-triazol-5-il] propanóico (VII).

Uma vez obtido VII, esse pode ser empregado na décima quarta etapa de acoplamento utilizando-se metodologia de SPFS, para obtenção de IV (Figura 3-6).



**Figura 3-6.** Esquema geral de síntese da 1,5-GtP[(p-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (IV) a partir do ácido (S)-2-[[[(Fmoc)amino]-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-azido-1-desoxi-β-D-glicopiranosose)-1H-1,2,3-triazol-5-il] propanóico (VII).

### 3.4. Síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina

Primeiramente, a peptidil-resina (V) foi seca sob fluxo de N<sub>2</sub>. Pesou-se 0,20756 g desta, que foi colocado em uma seringa com um filtro de poliuretano. Em seguida, foram succionadas as soluções, na seguinte ordem:

- 0,04303 g do azidoaçúcar desprotegido (1,5 mol; fornecido pelo Prof. Dr. Ricardo José Alves, Faculdade de Farmácia – UFMG) solubilizado em 2 mL de tetraidrofurano (THF)/água ultrapura 1:3 (v/v);
- 0,00995 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,5 mol) solubilizado em 0,5 mL de água ultrapura e
- 0,00921 g ascorbato de sódio (0,6 mol) solubilizado em 0,5 mL de água ultrapura.

A mistura reacional, inicialmente amarelo-amarronzada, foi deixada em agitação por 96 h, a 450 rpm. Ao término da reação, evidenciado pela descoloração dos grãos de resina, a glicotriazol-peptidil-resina resultante foi lavada por duas vezes com 2 mL de uma preparação contendo 25% de NaOH e 10% de EDTA (v/v), seguida de protocolo de lavagens descrito no item 3.2.3.

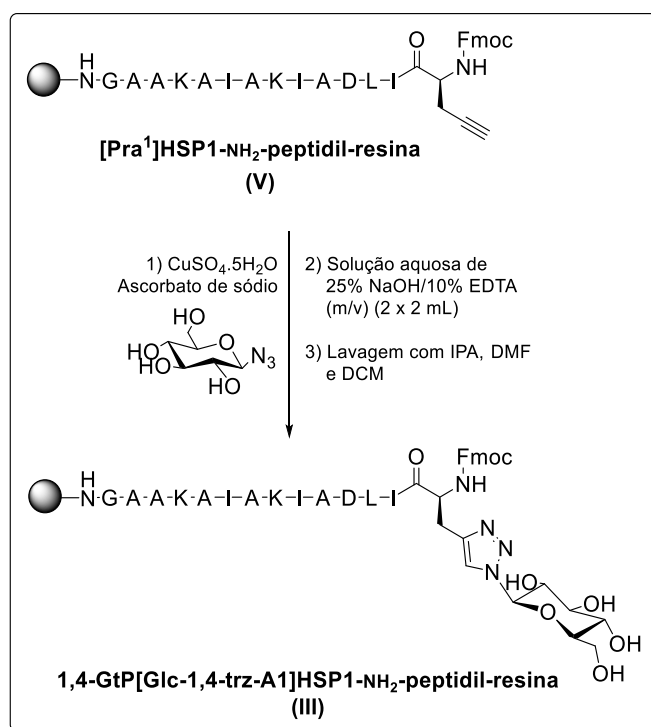


Figura 3-7. Esquema geral de síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina.

### 3.5. Clivagem e liofilização

A cada 1,0 g da peptidil-resina em questão, empregaram-se 10 mL de solução de clivagem. As proporções dos reagentes são descritas abaixo:

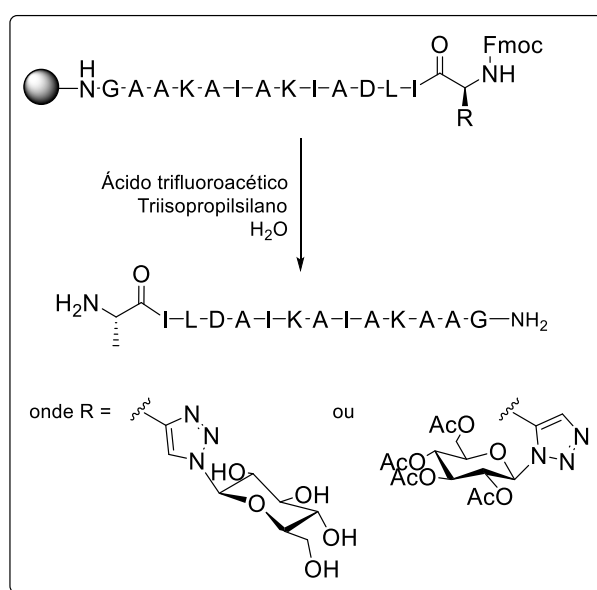
- **Clivagem da 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (IV):** Solução contendo 96% de TFA, 3% de TIS e 1% de água ultrapura.

- **Clivagem da 1,4 GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina (III):** Solução contendo 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água ultrapura.

O preparo das soluções foi feito de forma análoga em ambos os casos. Os reagentes foram adicionados a um béquer na seguinte ordem: Primeiro a água, seguida do TIS e, por fim,

o TFA. A respectiva solução foi succionada na seringa e a reação foi deixada a 450 rpm durante 2h - 2h30.

Ao término, a solução resultante foi transferida para um tubo para centrífuga tipo Falcon de 50 mL, lavou-se a resina com TFA (2 x 2 mL) e o conteúdo do tubo foi deixado sob fluxo de nitrogênio até que o volume se mantivesse constante. Em seguida, o produto foi precipitado utilizando éter previamente gelado e levado à centrífuga (5 min, 6000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido quatro vezes. Por fim, o excesso de éter foi retirado sob fluxo de N<sub>2</sub>.



**Figura 3-8.** Esquema simplificado de clivagem das peptidil-resinas.

Os produtos obtidos foram solubilizados em uma mistura água ultrapura/acetonitrila (ACN) nas proporções de 1:1 (produto **I**) ou 1:2 (produto **II**) e liofilizados por 24h - 48h. Antes da purificação, estes foram caracterizados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, usando um espectrômetro Bruker Daltonics® Autoflex III SmartBeam, usando ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB) ou ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) como matriz e laser com potência de 40%, a fim de comprovar se a síntese foi eficaz.

### 3.6. Purificação

Quando conveniente, a purificação foi feita usando um cromatógrafo Varian ProStar®210, equipado com colunas semipreparativas de fase reversa Kinetex® C18 5  $\mu$ m (250

x 10,0 mm, Phenomenex, Torrance, EUA) e Pursuit® C18 5 µm (250 x 10,0 mm Agilent, Santa Clara, EUA). A eluição foi realizada com gradiente linear de água ultrapura acidificada com 0,1% de TFA (fase A) e acetonitrila grau CLAE/UV com 0,08% de TFA (fase B) e os respectivos peptídeos foram detectados a 214 nm (detector na região do ultravioleta, modelo ProStar® 330).

- **Produto VII:** Após uma eluição em escala analítica, empregando um gradiente de 60 min iniciado em 35% de ACN e injeção de 200 µL de solução a 1 mg.mL<sup>-1</sup> 35% ACN (v/v), os parâmetros foram otimizados. Assim, em escala semipreparativa, foram realizadas injeções de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, com fluxo de 2,5 mL.min<sup>-1</sup> (0 – 20 min, gradiente de 35 – 60% B; 20 – 25 min, gradiente de 60 – 100% B; 25 – 30 min, gradiente de 100 – 35% B). Todas as amostras foram coletadas manualmente.

- **Produto I:** Após uma eluição em escala analítica, empregando um gradiente de 60 min iniciado em 30% de ACN e injeção de 200 µL de solução a 1 mg.mL<sup>-1</sup> 30% ACN (v/v), os parâmetros foram otimizados. Assim, em escala semipreparativa, foram realizadas injeções de 3 mg.mL<sup>-1</sup>, com fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> (0 – 5 min, gradiente de 30 – 35% B; 5 – 15 min, gradiente de 35 – 55% B; 15 – 18 min, gradiente de 55 – 100% B; 18 – 21 min, gradiente de 100 – 30% B). Todas as amostras foram coletadas manualmente.

### 3.7. Elucidação estrutural

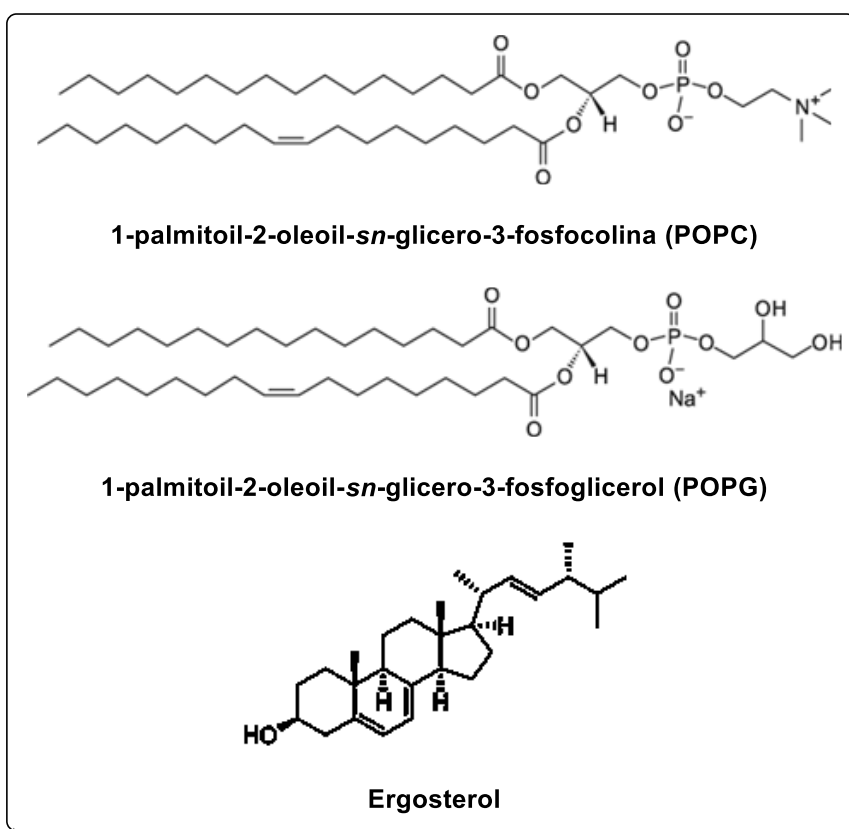
A caracterização das substâncias sintetizadas foi realizada por meio das seguintes técnicas:

#### 3.7.1. Espectroscopia no Infravermelho

Quando conveniente, os espectros na região do infravermelho foram adquiridos em um aparelho Perkin Elmer Spectrum® RX I da, na faixa de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2,0 cm<sup>-1</sup>, empregando-se reflectância total atenuada (ATR-FTIR), e os dados foram analisados com a ajuda do *software* EssentialFTIR.

### 3.7.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Para os ensaios empregando TFE, foram preparadas amostras com proporções variadas de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)/água (0:100; 10:90; 20:80; 30:70; 50:50 e 60:40), contendo de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de cada peptídeo analisado, separadamente. Utilizou-se uma cubeta de 1,0 mm de caminho óptico para as análises. Já para os ensaios empregando vesículas unilamelares, estas foram preparadas a partir dos fosfolipídios POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol), juntamente com ergosterol, na razão molar de 3:1:1 (POPC:POPG:ergosterol).



**Figura 3-9:** Representação estrutural dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol) e também do ergosterol.

Para as preparações, os respectivos fosfolipídios foram diluídos em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, que foi logo removido por evaporação rotativa a pressão reduzida, resultando em um filme fino, o qual foi hidratado com água ultrapura. Para a obtenção das LUVs, submeteu-se a suspensão para extrusão (cerca de 11x) através de uma membrana de policarbonato de 100 nm em um mini-extrusor (Avanti®, Polar Lipids Inc., AL, EUA).

Os experimentos foram realizados a 25 °C, em um espectropolarímetro Jasco J-815<sup>®</sup> acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco PTC-423L<sup>®</sup>. Os parâmetros para a aquisição dos espectros foram: janela espectral de 190 – 260 nm, velocidade de varredura 10 nm.min<sup>-1</sup>, intervalo de coleta de dados de 0,2 nm, 1 nm de largura de banda, tempo de resposta de 1 s e quatro acumulações. Em todas as análises, os espectros foram subtraídos dos respectivos brancos para correção de linha de base. Os espectros, adquiridos e processados com a suíte de softwares Spectra Manager<sup>®</sup> (Jasco) e analisados com o software CDPro<sup>®</sup> (Sreerama & Woody, 2004; Sreerama & Woody, 2000).

### 3.7.3. Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN, executados pelo Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende (Departamento de Química – UFMG), foram realizados a 20 °C em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm de tripla ressonância (<sup>1</sup>H/X) com bobina para aplicação de pulsos de gradiente de campo. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) da UFMG. Entre 1,2 – 1,8 mg dos peptídeos foram solubilizados em 600 ou 800 µL de TFE-*d*<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (50:50%, v/v), contendo 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS – referência interna) a 1 mmol.L<sup>-1</sup>.

Experimentos de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) foram realizados usando-se a sequência de pulsos DIPSY-II com o emprego de *excitation sculpting* por pulsos de gradiente de campo para supressão de água (HWANG; SHAKA, 1995; SHAKA; LEE; PINES, 1988). Os parâmetros empregados foram: largura espectral de 6250 Hz (10,4140 ppm), 512 incrementos em *t*<sub>1</sub> com 16 transientes de 4096 pontos totais.

Experimentos de NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) foram adquiridos com diferentes tempos de mistura (100, 150, 200 e 300 ms), com o objetivo de se avaliar difusão de *spin*. Utilizou-se janela espectral de 6250 Hz (10,4140 ppm), 512 incrementos em *t*<sub>1</sub> com 32 transientes de 4096 pontos totais para cada FID. Para supressão de água, utilizou-se uma sequência de pulsos com o emprego de *excitation sculpting* por pulsos de gradiente de campo (HWANG; SHAKA, 1995).

Experimentos de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 27932,96 Hz (185,08 ppm) e 6250 Hz (10,4140 ppm), respectivamente, e foram usados 360 incrementos em *t*<sub>1</sub> coletados com 80 transientes de

2048 pontos totais. Os experimentos foram adquiridos com edição de fase, de forma que as correlações de CH e CH<sub>3</sub> apresentem fase positiva e as de CH<sub>2</sub> fase negativa (BOYER; JOHNSON; KRISHNAMURTHY, 2003; WILLKER et al., 1993).

Uma sequência de pulsos de RMN rápida (*sofast*) foi utilizada para aquisição dos experimentos de <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) (SCHANDA; BRUTSCHER, 2005). Os seguintes parâmetros foram empregados: janelas espectrais em F1 e F2 de 2128,56 Hz (35,00 ppm) e 6250 Hz (10,4140 ppm), respectivamente, e 128 incrementos em *t*<sub>1</sub> foram coletados com 2400 transientes de 1024 pontos totais para cada FID.

### 3.8. Testes Biológicos

Os ensaios antifúngicos, realizados pela Profa. Dra. Helen Rodrigues Martins (Faculdade de Farmácia – UFVJM), seguiram o método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Foram utilizadas as cepas *Candida tropicalis* do fabricante *American Type Culture Collection ATCC*<sup>®</sup> 28707, *Candida parapsilosis ATCC*<sup>®</sup> 22019 e *Candida krusei ATCC*<sup>®</sup> 34135.

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

Para a preparação dos inóculos, as cepas *C. tropicalis ATCC*<sup>®</sup> 28707, *Candida parapsilosis ATCC*<sup>®</sup> 22019 e *Candida krusei ATCC*<sup>®</sup> 34135 foram replicadas em tubos estéreis com ágar *Sabouraud* dextrose e incubadas a 35 °C. O inóculo foi preparado escolhendo-se três colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm de cultura de 24 horas para espécies de *Candida* de 48 horas. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol.L<sup>-1</sup> (8,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl; salina a 0,85%). A suspensão resultante foi submetida a agitação em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro *Multileitora Spectramax Paradigm* (Molecular Devices), acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de *McFarland* 0,5 em comprimento de onda  $\lambda$  de 530 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 x 10<sup>6</sup> a 5 x 10<sup>6</sup> células por mL. A suspensão de trabalho foi diluída 1:50 seguida de outra diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI-1640, resultando em concentração de 5,0 x 10<sup>2</sup> a 2,5 x 10<sup>3</sup> células por mL em placas de 96 poços estéril de poliestireno cristal transparente em fundo de 350  $\mu$ L. As placas de culturas foram



incubadas em 35°C por 48 horas na presença das amostras testadas em absorbância no comprimento de onda de 595 nm, e como controle utilizou-se a anfotericina B *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>. O valor do MIC<sub>50</sub> foi definido como a menor concentração em que se observa 50% da diminuição da turbidez do poço controle (isento de droga), e para realização do cálculo do MIC<sub>50</sub> utilizou-se o *software Prism 5.0* com os testes realizados em triplicatas.

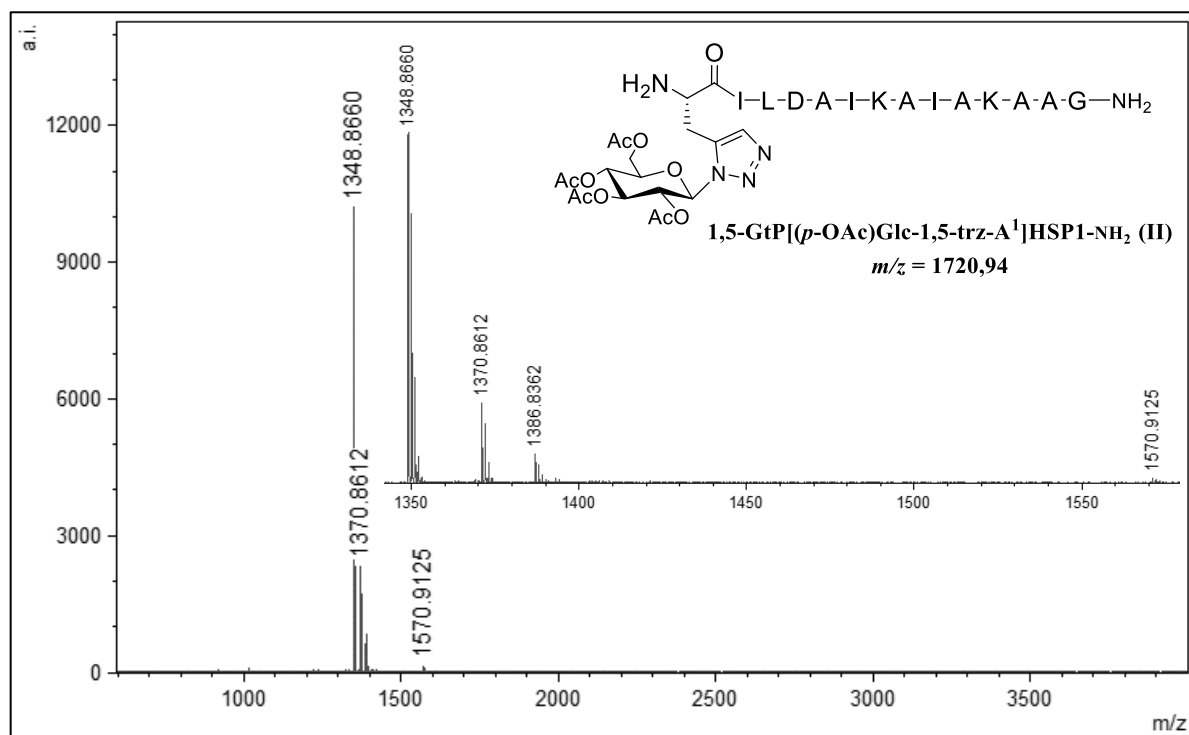
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Síntese do glicotriazol-peptídeo 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>

#### 4.1.1. Metodologia a

A fim de avaliar se a reação de 1,3-cicloadição catalisada por rutênio empregando o catalisador Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ocorreu conforme planejado, realizou-se a caracterização do produto por meio de espectrometria de massas (**Figura 4-1**).

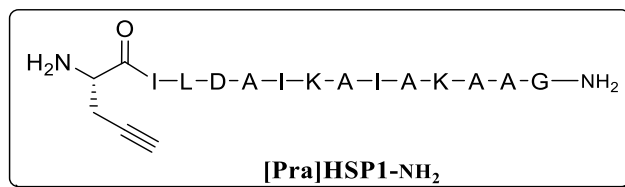
A mistura reacional, alaranjada devido à coloração do catalisador, escureceu levemente após as 96 h de reação. A coloração da resina também mudou após a reação. Esta, inicialmente amarela pálida, apresentava-se marrom mesmo depois do protocolo de lavagem (**seção 3.2.3**).



**Figura 4-1.** Espectro de massas completo do produto obtido por meio da **metodologia a**, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  1340-1580, juntamente com a representação estrutural da 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e sua massa teórica. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

Os três primeiros picos observados no espectro de massas são referentes, respectivamente, às massas dos adutos de próton, sódio e potássio do peptídeo [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (**Figura 4-2**), ou seja, o resultado da clivagem da peptidil-resina original **III** (**Figura 3-2**), tendo-se a remoção dos grupos protetores Fmoc e das cadeias laterais, conforme mostrado na

**Tabela 4-1.** Portanto, esses picos mais intensos não estão relacionados à formação do produto de interesse **II**.



**Figura 4-2.** Composto **VIII**, obtido empregando a **metodologia a**.

**Tabela 4-1.** Comparação entre as massas teóricas de **VIII** e as observadas nos espectros mostrados na **Figura 4-1**.

	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$
<b>Teórico</b>	1348,83	1370,81	1386,79
<b>Observado</b>	1348,87	1370,86	1386,84

Entretanto, também foi identificado um pico de menor intensidade de  $m/z = 1570,91$ . Como esse não corresponde à massa esperada, foram calculadas as massas teóricas de produtos análogos que poderiam ser compatíveis com o observado, levando em consideração, inclusive, o uso de um azidoaçúcar incorreto na reação.

Foram analisadas estruturas com diferentes açúcares. No primeiro, considerou-se a adição incorreta de *N*-acetilglicosamina acetilada no meio reacional, em substituição ao açúcar *p*-*O*-acetilado. Outras propostas estruturais envolviam a remoção de um ou todos grupos acetila dos açúcares, pois pensou-se que seria uma possível reação paralela no meio reacional. Também foram avaliados produtos onde **VIII** estivesse complexado ao catalisador, substituindo o átomo de cloro, ou ao óxido de rutênio (subproduto da catálise, de cor escura – o que explicaria a coloração da resina após a reação), sem sucesso. Por fim, não foi possível atribuir a diferença de massa observada ( $\Delta(m/z) = 222,05$ ) a nenhum composto. Assim, concluiu-se que a síntese não foi eficaz.

Pode-se explicar esse resultado pelo uso da resina como suporte, que reduz a mobilidade das cadeias peptídicas (em comparação com um peptídeo não ligado ao suporte sólido) e impede a aproximação do catalisador, muito impedido estericamente, impossibilitando que a reação aconteça. A ineficácia da reação também pode ser devida ao emprego de condições reacionais inadequadas, como solvente e tempo de reação (trabalhos anteriores mostram que o uso de azidas secundárias acarreta num maior tempo reacional (BAHIA, 2016)), ou até mesmo a

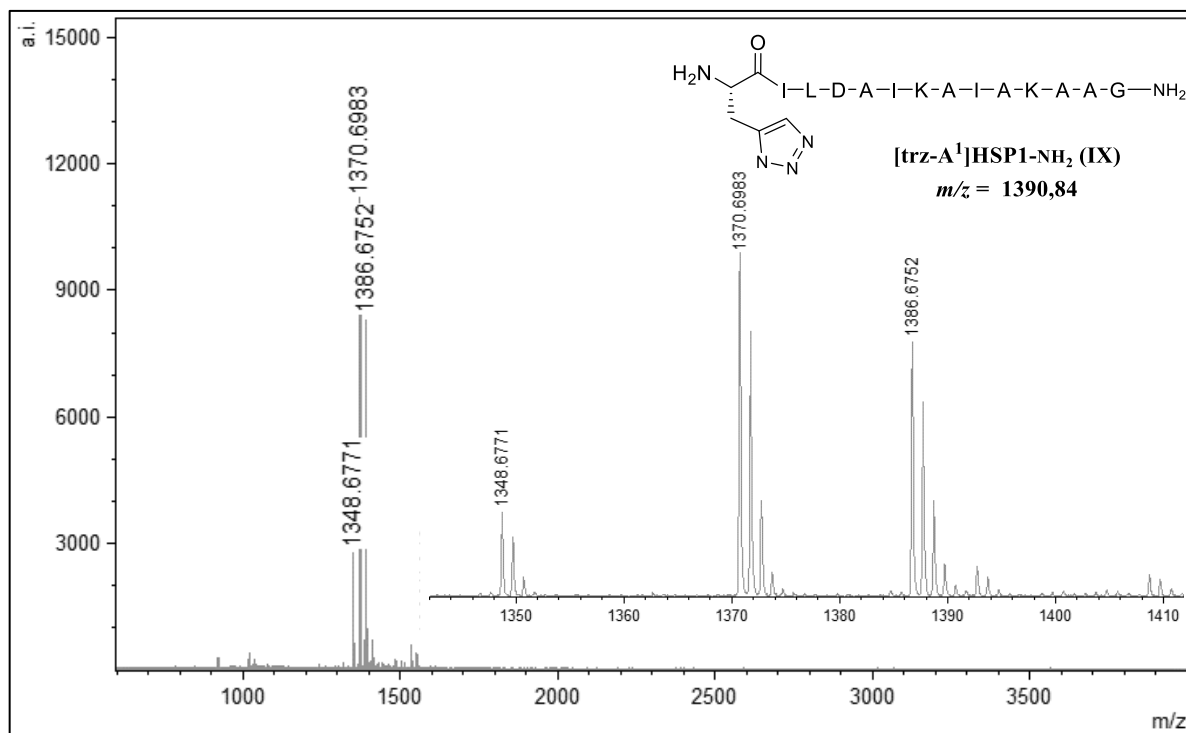
integridade do catalisador, que é extremamente reativo em presença de oxigênio ou água. Uma vez que, durante a SPFS, utiliza-se DMF destilada apenas na etapa de acoplamento, água residual pode ter comprometido a eficácia da reação, bem como a presença de oxigênio residual nos solventes empregados na reação click (que foram apenas secos, e não degaseificados). Além disso, o catalisador utilizado já havia sido sintetizado e, mesmo com a armazenagem correta, parte deste pode ter degradado e se convertido em óxidos de rutênio.

#### ***4.1.2. Metodologias b-e***

Uma vez que o produto de interesse não foi obtido empregando a **metodologia a**, decidiu-se testar a viabilidade da reação modificando, principalmente, a azida usada. Assim, as **metodologias b-e** usaram azida de sódio ao invés do azidoaçúcar. O tempo de reação foi menor do que na **metodologia a**, uma vez que foi utilizada uma azida primária.

Também se variaram os solventes, dando preferência àqueles já utilizados durante a síntese do peptídeo de partida. Por fim, em dois casos, a resina foi tratada previamente com DCM, a fim de verificar se este influenciaria na reação.

Assim como na reação anterior, em todos os casos, a mistura reacional, alaranjada devido à coloração do catalisador, escureceu levemente após as 72 h de reação, assim como a coloração da resina, que se apresentou marrom mesmo depois do protocolo de lavagem. Depois de clivado da resina, fez-se a análise do produto por espectrometria de massas (**Figura 4-3**).



**Figura 4-3.** Espectro de massas completo do produto obtido por meio da **metodologia b**, mostrando também a expansão na região entre *m/z* 1340-1580, juntamente com a representação estrutural da [trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (**IX**) e sua massa teórica. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

Mais uma vez, o espectro de massas obtido para o produto obtido por meio da **metodologia b** indica que obteve-se o **VIII** (mostrado em 4.1.1, **Figura 4-2**), onde os picos observados na expansão do espectro de massas correspondem, respectivamente, às massas dos adutos de próton, sódio e potássio do peptídeo de partida, conforme a **Tabela 4-3**.

**Tabela 4-2.** Comparação entre as massas teóricas de **VIII** e as observadas nos espectros mostrados na **Figura 4-3**.

	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
<b>Teórico</b>	1348,83	1370,81	1386,79
<b>Observado</b>	1348,68	1370,70	1386,68

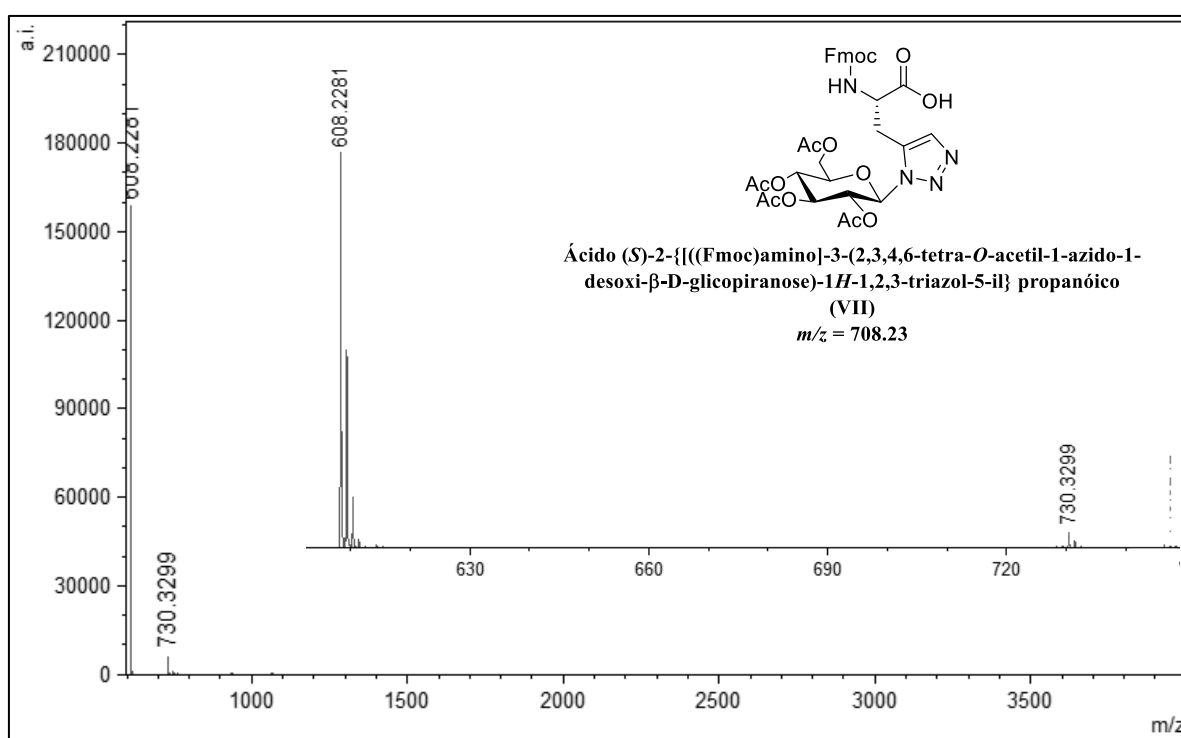
Por fim, nas duas vezes em que empregou-se DCM como solvente, a azida de sódio não se solubilizou, devido à grande diferença de polaridade entre o substrato (polar) e o solvente (apolar). Contudo, a reação foi mantida, pois esperava-se que, ao longo da reação, fatores

cinéticos (como a estabilização do estado de transição pelo solvente) favorecessem a formação do produto.

Não houve a formação do produto de interesse em nenhuma das reações seguindo as **metodologias b-e** e os espectros de massas relacionados aos produtos obtidos após a clivagem encontram-se no **Apêndice E**. Mais uma vez, atribuiu-se a ineficácia da reação, principalmente, ao grande impedimento espacial das espécies (peptídeo e catalisador), e aos fatores já discutidos anteriormente.

#### 4.1.3. Metodologia f

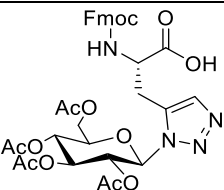
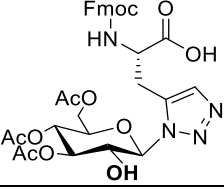
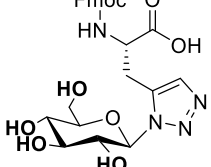
A última tentativa de síntese do **Produto II** envolveu a reação entre a Fmoc-Pra e o azidoaçúcar, a fim de minimizar os efeitos espaciais causados pelo suporte sólido e pelo peptídeo. Após as 120 h de reação, a solução, inicialmente alaranjada, apresentava-se mais escura. Depois de concentrar o produto sob pressão reduzida, fez-se a análise desse por espectrometria de massas (**Figura 4-4**).



**Figura 4-4.** Espectro de massas completo do produto obtido por meio da **metodologia f**, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  600-750, juntamente com a estrutura Ácido (S)-2-(((Fmoc)amino)-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-azido-1-desoxi-β-D-glicopirranose)-1H-1,2,3-triazol-5-il) propanoico (VII) e sua razão massa/carga teórica. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam® com potência de 40%.

Assim como nas reações anteriores, não foi possível identificar o pico referente à massa do aduto de próton do produto de interesse. Logo, as massas de estruturas análogas (incluindo seus adutos) foram calculadas (**Tabela 4-3**), a fim de tentar identificar o produto correspondente às massas observadas no espectro, imaginando que os grupos OAc pudessem ter reagido com o rutênio presente no meio reacional.

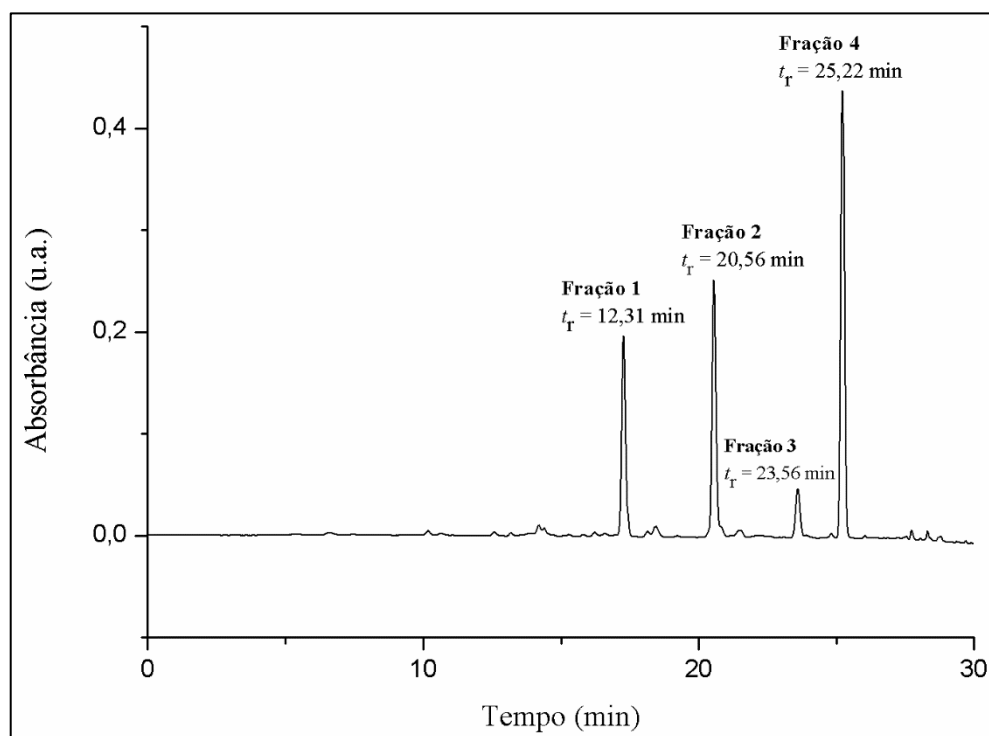
**Tabela 4-3.** Comparação entre as massas teóricas de diversas estruturas similares à inicialmente proposta, a fim de identificar os picos de massa  $m/z = 608,23$  e  $m/z = 730,33$ , observados na **Figura 4-4**.

Estruturas consideradas	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$
	709,24	<b>731,22</b>	747,19
	667,23	689,21	705,18
	540,19	563,18	579,15

Percebe-se que o aduto de sódio de uma das estruturas consideradas apresenta  $m/z$  muito próximo ao observado no espectro de massas. Como é incomum que o pico base seja um aduto de sódio, durante o processamento do espectro pode-se ter descontado, de forma errônea, a massa de um próton, levando ao resultado observado.

Uma vez existem quatro átomos de nitrogênio na estrutura, seguindo a Regra do Nitrogênio (PAVIA et al., 2016), espera-se que a massa do produto seja par, o que é incompatível o resultado da subtração da massa atômica um átomo de sódio do pico base observado no espectro de massas. Dessa forma, concluiu-se que a síntese o produto foi obtido com sucesso, porém, devido à um possível erro de processamento, a razão massa carga do produto não foi obtida de forma acurada.

Assim, prosseguiu-se com a purificação de **VII**, a fim de se pudesse prosseguir com a síntese. O perfil cromatográfico do produto bruto apresenta três bandas de maior intensidade, nomeadas de **Fração 1** ( $t_r = 12,31$  min), **Fração 2** ( $t_r = 20,56$  min), e **Fração 4** ( $t_r = 25,22$  min), Essas, juntamente com a banda de menor intensidade, nomeada de **Fração 3** ( $t_r = 23,56$  min), foram coletadas manualmente e enviadas para a liofilização (**Figura 4-5**).



**Figura 4-5.** Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do ácido (S)-2-[[[(Fmoc)amino]-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose)-1*H*-1,2,3-triazol-5-il] propanóico (**VII**). Amostra injetada (1000  $\mu$ L de uma solução a 1 mg.mL<sup>-1</sup>) em coluna Pursuit® C18 5  $\mu$ m (250 x 10,0 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. Absorbância monitorada em  $\lambda_{\text{máx}} = 214$  nm.

Após a liofilização dos compostos purificados, devido à quantidade mínima de amostra obtida, foi inviável a realização de novas análises a fim de confirmar a estrutura dos produtos resultantes da reação, como a caracterização por meio de RMN. Dessa forma, não foi possível concluir a da síntese do 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>. Contudo, é de interesse do grupo de pesquisa, em investigações futuras, a otimização da síntese desse resíduo Fmoc-1,5-glicotriazólico, para que o mesmo seja então empregado na rotina de síntese de peptídeos em fase sólida, objetivando-se a obtenção do 1,5-GtP de interesse.

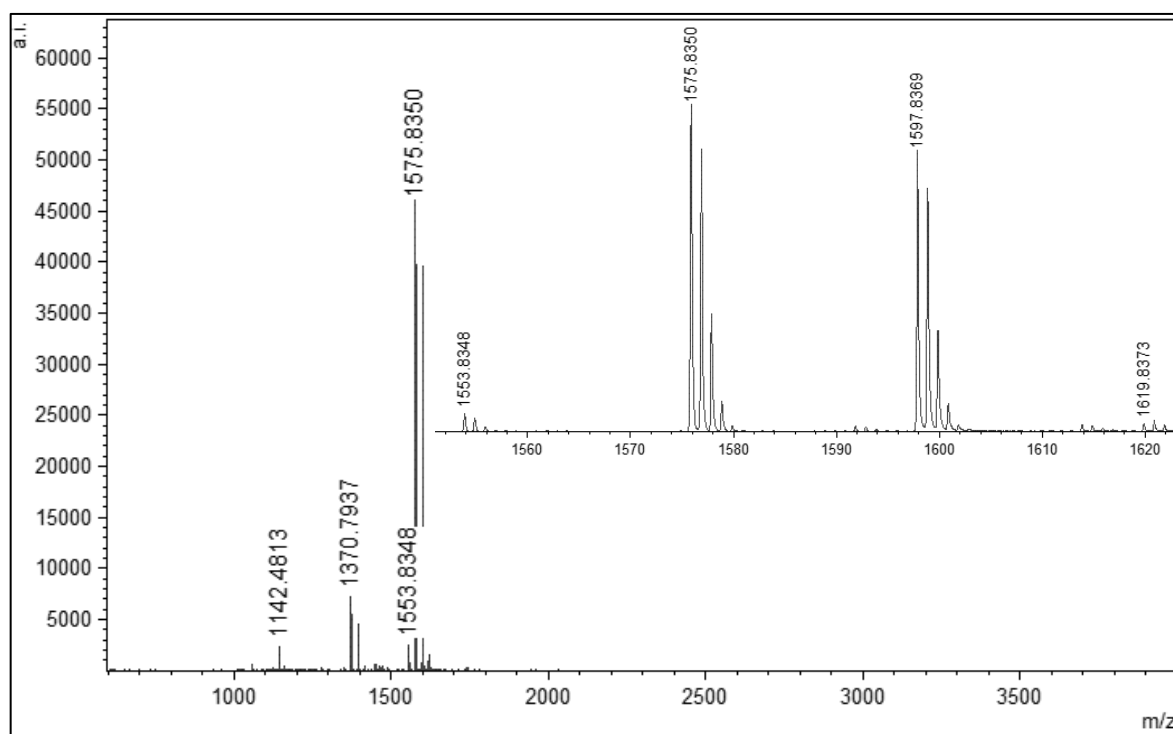


## 4.2. Síntese do glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>

### 4.2.1. Síntese e purificação

Após a síntese em fase sólida da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>-peptidil-resina por meio da estratégia Fmoc-SPFS e de sua caracterização durante as tentativas de síntese de **II**, prosseguiu-se com a síntese do glicotriazol-peptídeo (**I**) por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar, empregando-se CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O/ascorbato de sódio.

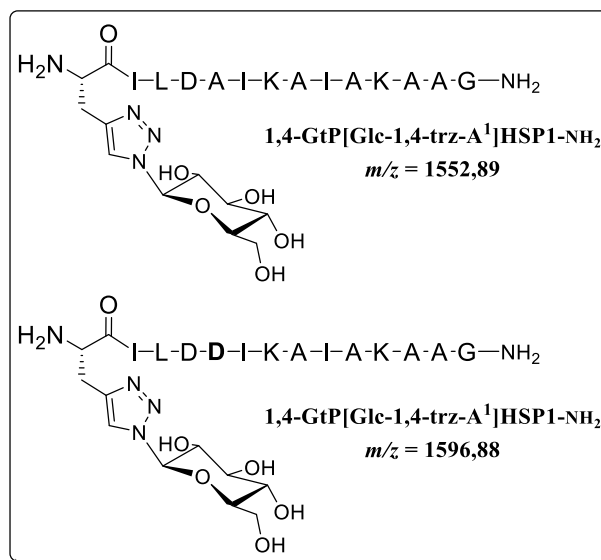
Antes da adição dos reagentes, a peptidil-resina apresentava leve coloração amarela. Ao adicionar os reagentes, os grãos de resina tornaram-se marrons, provavelmente devido à acumulação dos azidoaçúcares na superfície da resina. Contudo, com a evolução da glicosilação, a peptidil-resina volta à sua cor inicial. No espectro de massas do produto obtido após a clivagem (**Figura 4-6**) observa-se a formação de diversos subprodutos durante a síntese.



**Figura 4-6.** Espectro de massas completo do produto obtido através da por meio CuAAC, mostrando também a expansão na região entre m/z 1550-1625. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

Os dois primeiros picos mostrados na expansão do espectro de massas da **Figura 5-6** se referem aos íons [1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> e [1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>

+ Na]<sup>+</sup>, indicando que o peptídeo desejado foi obtido com sucesso por meio da cicloadição catalisada por cobre. Já o terceiro e quarto picos são referentes, respectivamente, ao íon molecular e ao aduto de sódio do análogo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>,D<sup>5</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, onde o resíduo de alanina (A) na posição 5 foi substituído por um resíduo de ácido aspártico (D) (**Figura 4-7**).

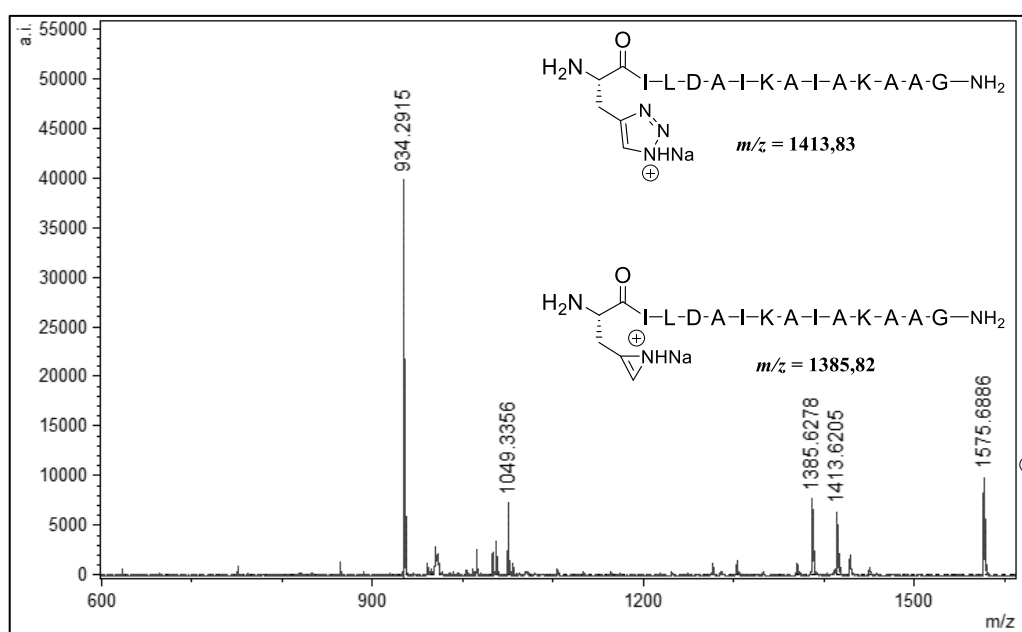


**Figura 4-7.** Estruturas referentes aos dois principais picos observados no espectro de massas após a clivagem dos produtos formados na glicosilação catalisada por cobre, juntamente com suas relações massa/carga teóricas.

Pode-se explicar a formação do subproduto uma vez que o teste de Kaiser é um método qualitativo de avaliação das reações de acoplamento e desproteção. Assim, o acoplamento da Fmoc-Ala-5 não se deu de forma completamente eficaz, e, na etapa seguinte, um resíduo de ácido aspártico a substituiu na posição 5 da cadeia peptídica. A sua repetição no subproduto deve-se, provavelmente, à adição incorreta de solução de desproteção (4-metilpiperidina) por alguns minutos antes da etapa de reacoplamento, necessária uma vez que o teste de Kaiser indicou que a primeira tentativa de acoplamento do resíduo não havia sido eficaz. Além disso, a caracterização do açúcar de partida empregando de Espectroscopia na Região do Infravermelho (**Apêndice F**) evidenciou que a reação de remoção dos grupos acetila ( $m/z = 43,02$ ) se deu de maneira completa, uma vez que o espectro não apresenta nenhuma banda na região  $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ , típica de ésteres não conjugados. Logo, a diferença de massa observada ( $\Delta(m/z) = 44,00$ ) deveria ser, exclusivamente, de algum resíduo incorreto na cadeia peptídica. Vale mencionar que as bandas observadas entre  $2358\text{-}2338\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao CO<sub>2</sub> presente no ar, não descontado durante a análise do branco.

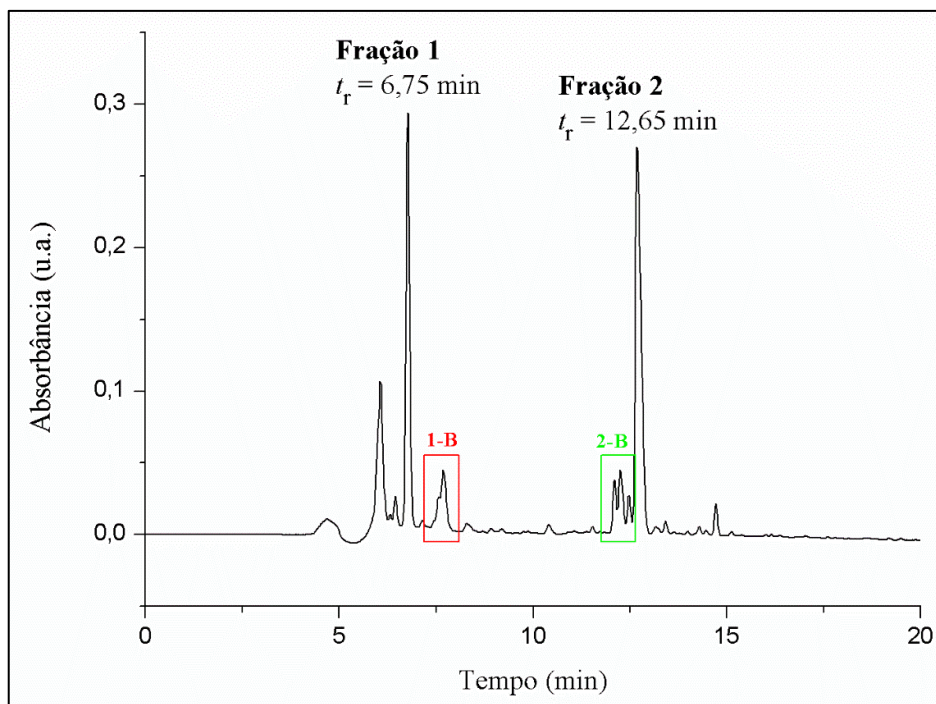
Os outros picos de menor intensidade (mostrados no **Apêndice F, Figura F-1**) são referentes a reações incompletas e seus adutos, como por exemplo,  $m/z = 1142,48$ , que corresponde ao peptídeo DDIKAIKAAG-NH<sub>2</sub> e  $m/z = 1370,79$ , que corresponde ao aduto de sódio do peptídeo (Pra)ILDAIKAIAKAAG-NH<sub>2</sub>.

A reação de formação do espaçador triazólico entre o peptídeo e a glicose também se confirma na análise do espectro de massas obtido na fragmentação do pico de maior intensidade referente à  $[M + Na]^+$ . Nesse, é possível identificar o íon de  $m/z = 1413,62$ , que indica a perda da unidade glicosídica, bem como o pico de  $m/z = 1385,63$ , cuja diferença de massa para o pico base ( $\Delta(m/z) = 190,06$ ) equivale à fragmentação do triazol, com perda de glicose e N<sub>2</sub> (**Figura 4-8**).



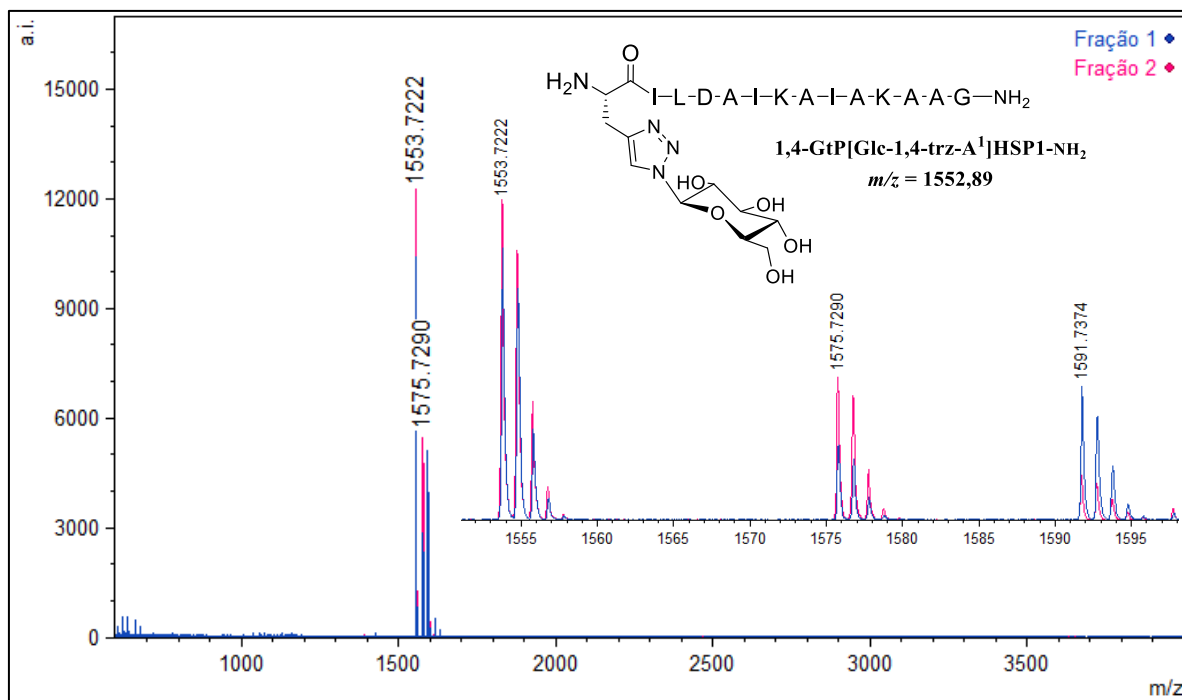
**Figura 4-8.** Espectro de massas obtido na fragmentação do íon de  $m/z = 1575,6886$ , mostrando os fragmentos mais relevantes, de  $m/z = 1413,83$  (perda de glicose) e  $m/z = 1385,92$  (perda de glicose e N<sub>2</sub>). Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBean® com potência de 40%.

Com a confirmação da obtenção do produto de interesse, prosseguiu-se com a purificação. O perfil cromatográfico do produto bruto apresenta duas bandas de maior intensidade, nomeadas de **Fração 1** ( $t_r = 6,75$  min) e **Fração 2** ( $t_r = 12,65$  min). Essas, juntamente com as bandas de menor intensidade indicadas em vermelho e azul, foram coletadas manualmente e enviadas para caracterização empregando EM (**Figura 4-9**).



**Figura 4-9.** Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>. Amostra injetada (800 µL de uma solução a 3 mg.mL<sup>-1</sup>) em coluna Pursuit® C18 5 µm (250 x 10,0 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 3 mL.min<sup>-1</sup>. Absorbância monitorada em  $\lambda_{\text{máx}} = 214$  nm.

Inicialmente, esperava-se que uma das bandas mais intensas fosse referente ao subproduto 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>,D<sup>5</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>. Contudo, as frações 1 e 2 apresentaram picos referentes a espécies com massas praticamente iguais na caracterização por MALDI-TOF, como é possível perceber na **Figura 4-10**, enquanto o subproduto 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>,D<sup>5</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> não foi identificado em nenhuma das frações coletadas (que inclui as Frações 1 e 2, juntamente com as identificadas em vermelho **(1-B)** e verde **(2-B)**, mostrados na **Figura 4-9**). Os espectros de massas das bandas de menor intensidade assinaladas encontram-se no **Apêndice F (Figuras F-3 e F-4)**.



**Figura 4-10.** Espectro de massas completo das frações 1 e 2 coletados na purificação, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  1550-1600, juntamente com a representação estrutural da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e sua massa teórica. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

**Tabela 4-4.** Comparação entre as massas teóricas do **Produto I** e as massas observadas nos espectros mostrados na **Figura 4-8**.

	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
<b>Produto I*</b>	1553,90	1575,88	1591,86
<b>Fração 1**</b>	1553,76	1575,77	1591,74
<b>Fração 2**</b>	1553,72	1575,73	1591,70

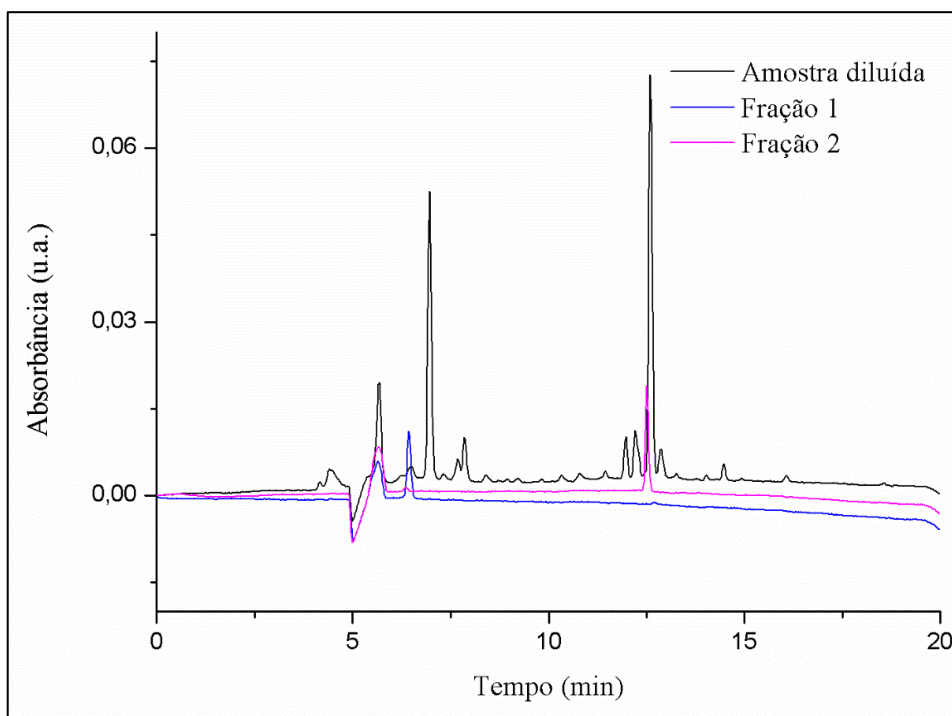
\* massa teórica

\*\* massa observada

Este resultado sugere fortemente a formação de dois isômeros, conforme já constatado em sínteses de peptídeos, onde resultados similares (substâncias com mesma massa molecular apresentando tempos de retenção distintos em análises cromatográficas) foram obtidos (REIS et al., 2018). A fim de confirmar se foram realmente obtidos dois isômeros e não duas frações correspondentes ao mesmo produto, mas eluídas em dois tempos de retenção distintos, decidiu-se realizar alguns testes.

A fim de se garantir que a detenção de dois picos com tempos de eluição distintos para produtos que levam a íons com mesma  $m/z$  não esteja relacionada a possíveis processos de

agregação (oligomerização), optou-se pela realização de outros dois tipos de análise cromatográfica. Em um primeiro ensaio, injetou-se uma alíquota da amostra bruta diluída 30 vezes ( $c_{\text{final}} = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), além do que, em uma outra proposta de análise, as frações 1 e 2, puras, coletadas do ensaio mostrado na **Figura 4-9**, foram analisadas separadamente, sem terem sido concentradas previamente. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 4-11**.



**Figura 4-11.** Em preto, perfil de CLAE do produto bruto da síntese do peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, injetado com concentração 30 vezes menor ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) que na purificação original. Sobrepostos em azul e rosa, respectivamente, os perfis das frações 1 e 2, purificadas. Amostras injetadas ( $200 \mu\text{L}$  de soluções a  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), em coluna Pursuit® C18  $5 \mu\text{m}$  ( $250 \times 10,0 \text{ mm}$ ) equilibrada com TFA a  $0,1 \%$ . Eluição: solução de acetonitrila/TFA  $0,1 \%$  em um fluxo de  $3 \text{ mL.min}^{-1}$ . Absorbância monitorada em  $\lambda_{\text{máx}} = 214 \text{ nm}$ .

**Tabela 4-5.** Comparação entre os tempos de retenção da amostra bruta, diluída e das frações purificadas.

	Tempo de retenção (min)	
	Fração 1	Fração 2
<b>Amostra bruta</b>	6,75	12,65
<b>Amostra diluída</b>	6,97	12,58
<b>Fração 1</b>	6,44	-
<b>Fração 2</b>	-	12,52

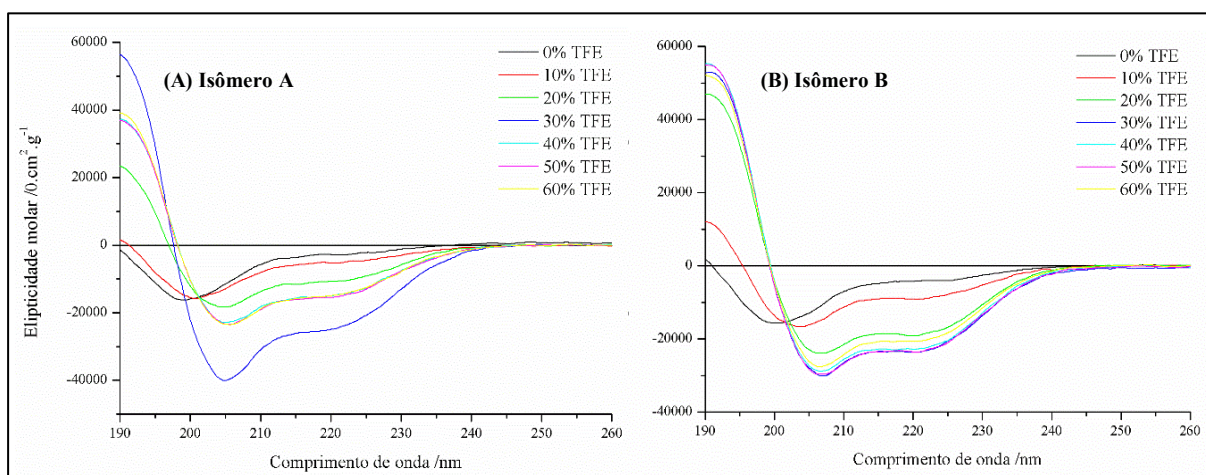
Mesmo com a diluição, o perfil cromatográfico da amostra bruta se manteve (cromatograma em preto). Dessa forma, descartou-se a possibilidade de que a agregação do peptídeo levou ao aparecimento de duas bandas no cromatograma. Além disso, as bandas de maior intensidade do produto bruto, quando injetadas separadamente, foram coletadas em tempos de retenção distintos (**Tabela 4-5**). Esses resultados indicam que as frações 1 e 2 (**Figura 4-9**) são substâncias distintas e, pelas frações apresentarem as mesmas massas moleculares, se tratam de um par de isômeros (**Figura 4-10**). Logo, concluiu-se que, durante a síntese, houve a isomerização de algum dos resíduos de aminoácido, uma vez que o diferente envelhecimento dos peptídeos na presença de H<sub>2</sub>O/ACN influencia nos seus tempos de retenção. A essas amostras peptídicas correspondentes aos dois isômeros são então atribuídas os nomes de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> **A** e 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> **B**.

Os dois isômeros foram coletados em tubos separados e liofilizados por 48h, sendo o rendimento total da purificação de 20%. O baixo rendimento pode estar associado a diversos fatores, como o tamanho de poro do filtro de seringa utilizado (0,22 μm), que pode ser incompatível com a amostra. Também houve a necessidade de reutilizar o filtro. Assim, ao longo dos usos, o acúmulo de amostra na superfície do filtro pode ter impedido uma filtração eficaz, diminuindo a concentração de produto na amostra a ser injetada. Ou, por fim, pode ter ocorrido perda de parte da amostra no loop de injeção.

Essa classe de biomoléculas, glicotriazol-peptídeos, teve sua síntese originalmente proposta concluída em trabalho desenvolvido em parceria entre nosso grupo de pesquisas na UFMG e o grupo de pesquisa do professor Rodrigo Moreira Verly da UFVJM (JUNIOR et al., 2017), todavia os GtPs obtidos no referido trabalho (também derivados da hilseptina 1) utilizaram de açúcares per-*O*-acetilados na etapa da reação CuAAC, tendo sido os GtP contendo a glicose e a *N*-acetilglicosamina per-*O*-acetiladas obtidas (1,4-GtP[(*p*-OAc)Glc-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,4-GtP [(*p*-OAc)GlcNAc-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>). Os resultados obtidos no atual trabalho, indicam o uso de azido-açúcares desprotegidos não leva a complicações na obtenção do produto na reação click (o que já era esperado), bem como não levam a problemas de degradação do produto na etapa de clivagem do GtP da resina, sendo então uma informação nova para a síntese dessa classe de moléculas. Ressalta-se que o uso do azido-açúcar sem proteção das hidroxilas é factível via a estratégia aqui apresentada, quando esse é inserido na última etapa da SPFS, uma vez que, caso se deseje inserir o resíduo em outra posição, reações laterais durante etapas de acoplamento podem vir a acontecer nesses grupos hidroxilas livre.

#### 4.2.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Na literatura (CIUMAC et al., 2019; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017) é relatado que a primeira etapa no mecanismo de ação de peptídeos envolve mudanças conformacionais na estrutura destes, relacionada a uma interação preferencial do peptídeo com a membrana microbiana. Além disso, fez-se necessária a análise dos isômeros através de espectroscopia de dicroísmo circular, a fim de investigar se diferem entre si no quesito de perfis de estruturação, justificando a realização de experimentos de ressonância magnética nuclear, bem como a identificação das melhores condições para os mesmos. Dessa forma foram, inicialmente, realizados experimentos de CD para os peptídeos na presença de soluções com proporções de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE):H<sub>2</sub>O variadas, e os espectros obtidos são mostrados na **Figura 4-12**. Os espectros em água pura (em preto) de ambos os isômeros são caracterizados por um mínimo em aproximadamente 198 nm, típico de peptídeos que não apresentam conformação preferencial. Com o aumento gradativo da concentração de TFE no meio, nota-se também um aumento na estruturação dos peptídeos, com a intensificação dos dois pontos de mínimo próximos a  $\lambda_{\min} = 208$  nm e  $\lambda_{\min} = 222$  nm e um ponto de máximo próximo a  $\lambda_{\max} = 192$  nm, característicos de conformações  $\alpha$ -helicoidal (GUSMÃO et al., 2017). Este é um comportamento típico de PAMs, que tendem a adquirir conformações bem definidas em contato com a superfície da membrana, diferente do observado para meios contendo apenas água.



**Figura 4-12.** Espectros de CD obtidos para os isômeros A e B em diferentes proporções de TFE:H<sub>2</sub>O

Utilizando-se programas apropriados, os teores de estruturação em hélice podem ser obtidos através da deconvolução dos espectros, o que foi feito com o auxílio do suíte de softwares CDPro. Os dados de %H obtidos por meio da deconvolução, juntamente com a análise dos espectros, os peptídeos não apresentam estruturas definidas em água (0% TFE),



devido à interação preferencial dos resíduos carregados (neste caso, lisinas (K) e ácido aspártico (D)) com as moléculas de solvente, em comparação às ligações de hidrogênio intramoleculares que a biomacromolécula pode estabelecer. Entretanto, com a adição de TFE, ocorre a mudança da constante dielétrica do meio, favorecendo as interações intramoleculares. Dessa forma, se utilizado em proporções corretas em combinação com a água, pode-se obter um meio que mimetiza o ambiente de membrana, favorecendo a estabilização das estruturas secundárias de peptídeos com tendência à estruturação (SÖNNICHSEN et al., 1992).

O perfil obtido para o GtP **A** é discordante dos dados gerados na deconvolução, já que o espectro de CD indica que a maior estruturação do peptídeo se deu em 30% de TFE, uma vez que esta porcentagem corresponde ao gráfico contendo pontos de máximo e mínimos mais intensos (em azul); enquanto a deconvolução indica a saturação no teor helicoidal (58% *H*) foi em 50% TFE (em magenta). Vale ressaltar que é aceitável um erro de até 5% na deconvolução, devido à margem de erro dos algoritmos utilizados no processo. Além disso, uma vez que estes são peptídeos modificados estruturalmente, o banco de dados da suíte de softwares pode não ser suficiente para uma análise muito acurada. Os dados obtidos sugerem que **A** seja correspondente ao isômero não usual, devido ao menor rendimento na purificação e menor estruturação quando comparado à **B**.

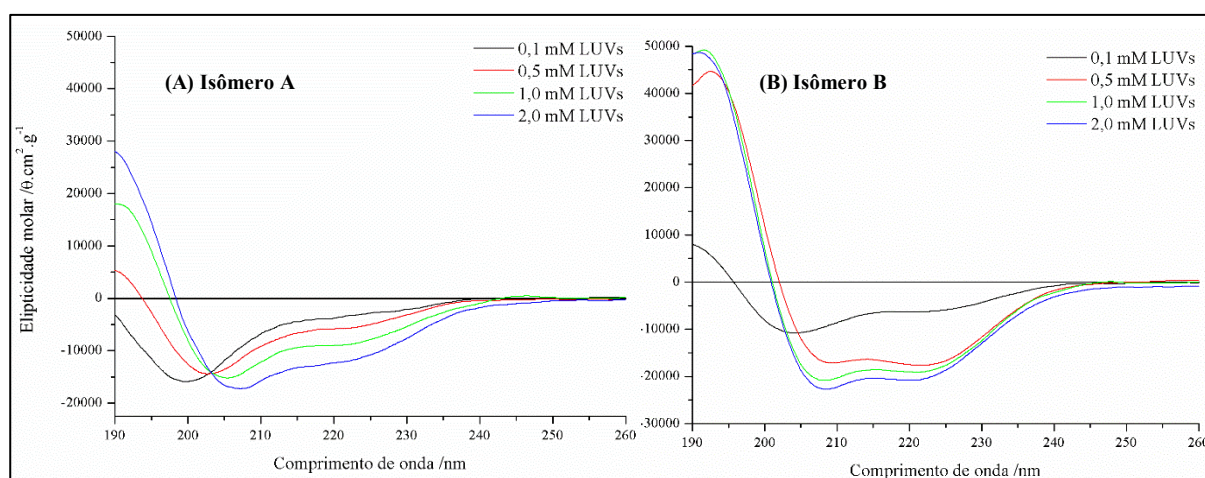
A análise dos espectros e das porcentagens de hélice do GtP **B** indica a saturação em 64% do teor  $\alpha$ -helicoidal, em 50% de TFE. No espectro, a partir de 30% de TFE, obtém-se teores de hélice semelhantes, assim como na deconvolução. Este isômero apresentou quase duas vezes mais %*H* em baixas porcentagens de TFE, além de necessitar de quantidades menores de TFE para adquirir uma estruturação significativa (20% de TFE (em verde), comparado aos 30% necessário para a estruturação do isômero **A**).

Nenhum dos espectros apresentou um ponto isodicroico próximo a  $\lambda_{\text{máx}} = 202$  nm, indicando a presença de outras estruturas além da  $\alpha$ -hélice. Por fim, uma vez que a deconvolução indicou que o maior teor  $\alpha$ -helicoidal se dá em 50% de TFE, esta concentração foi a proporção escolhida para a realização dos experimentos de RMN. Ademais, essa concentração possibilitará uma comparação direta com a estrutura tridimensional do peptídeo nativo HSP1, que foi previamente determinada em condições similares por estudos de espectroscopia de RMN (PRATES et al., 2004).

Devido à sua elevada acurácia e versatilidade, as vesículas unilamelares (LUVs) são amplamente empregadas como meios biomiméticos de membrana (EEMAN; DELEU, 2010). Assim, foi de suma importância analisar o comportamento dos isômeros também nesse meio,

uma vez que estes dados reproduzem com mais fidelidade os observados em meio biológico, quando comparados às análises em TFE. A **Figura 4-13** mostra os espectros obtidos em diferentes concentrações de LUVs e, de modo análogo ao observado anteriormente, os espectros em água pura (em preto) de ambos os isômeros apresentam um mínimo em aproximadamente 198 nm, típico de peptídeos que não apresentam conformação preferencial. Com o aumento concentração de LUVs no meio, nota-se também um aumento na estruturação dos peptídeos, com a intensificação dos pontos característicos de motivos estruturais de  $\alpha$ -hélice (mínimos em  $\lambda_{\min} = 208$  nm e  $\lambda_{\min} = 222$  nm e máximo em  $\lambda_{\max} = 192$  nm), que apresentam valores em módulo ainda maiores, quando comparados aos espectros obtidos em TFE, indicando uma maior estruturação quando se empregam LUVs.

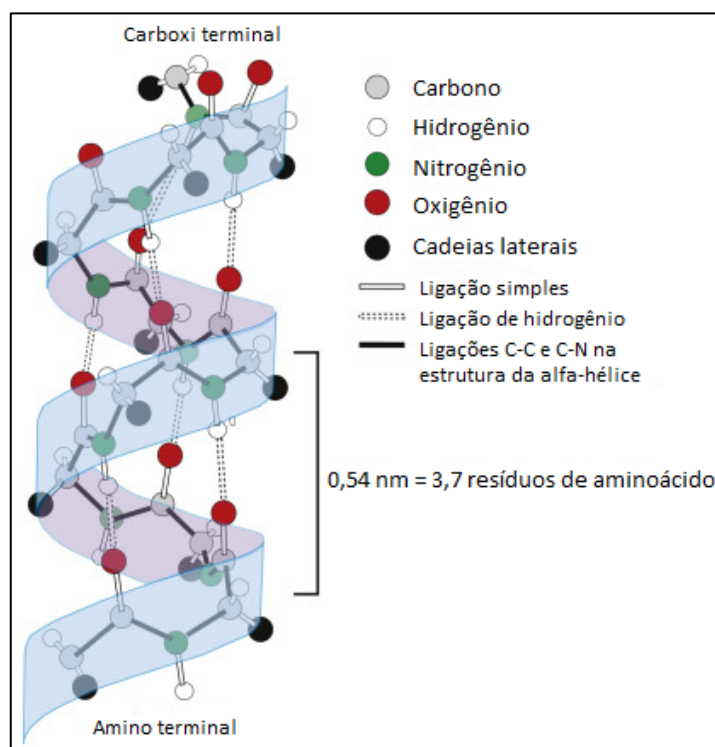
A incorporação do ergosterol, composto constituinte da membrana celular de fungos, às LUVs garante uma maior similaridade entre o modelo e o meio biológico, uma vez que trabalhos anteriores do grupo mostraram uma maior atividade biológica (e consequente interação) do peptídeo de referência 1,4-GtP(*p*-OAc) frente a cepas de fungos (JUNIOR et al., 2017).



**Figura 4-13.** Espectros de CD obtidos para os isômeros **A** e **B** em diferentes proporções de LUVs (POPC:POPG:Ergosterol 3:1:1):H<sub>2</sub>O

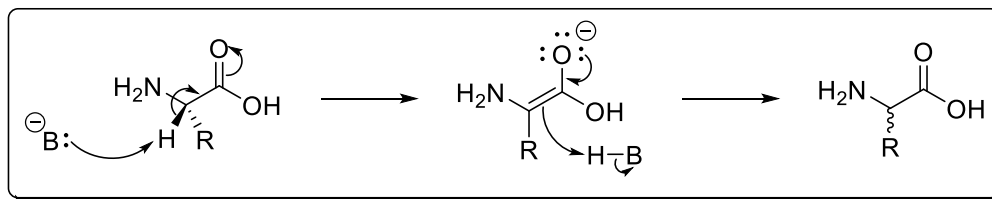
Em ambos os casos, a maior estruturação se deu em 2,0 mM de LUVs e, em concordância com o observado em TFE, o GtP **B** apresenta um espectro com pontos característicos de  $\alpha$ -hélice mais intensos. Além disso, a deconvolução dos espectros indicou que o maior teor helicoidal do GtP **A** se deu 0,25 mM (38% *H*), frente a 45% *H* que o GtP **B** apresentou em 2,0 mM de vesícula. Esses dados indicam que, muito provavelmente, o produto **B** é correspondente ao isômero padrão, que apresenta uma rede de interações intramoleculares mais coesa (em especial de ligações de H “*i,i+4*” CO $\cdots$ HN entre o oxigênio da carbonila da

posição  $i$ , com o hidrogênio amídico do quarto resíduo de aminoácido subsequente,  $i+4$ ), gerando um peptídeo mais estruturado (**Figura 4-14**). Resultado similar foi obtido por Reis e colaboradores (REIS et al., 2018), sendo que os estudos de RMN indicaram que o isômero padrão do peptídeo estudado por eles, LyeTx-B, é aquele com maior estruturação, tendo esse ainda apresentado maior atividade e interações com membranas mais fortes que o outro isômero.



**Figura 4-14.** A  $\alpha$ -hélice. As ligações em preto representam as pertencentes ao esqueleto do peptídeo. As linhas pontilhadas representam as ligações de hidrogênio, que conectam a carbonila de um resíduo de aminoácido com o hidrogênio da amina logo. Imagens retiradas e adaptadas de FEHER, 2016 com autorização da Elsevier (Anexo D).

Existem diversos mecanismos que levam à isomerização de peptídeos (KEMP, 1979) e um deles é inversão do centro quiral vizinho à carbonila, devido à presença de um átomo de hidrogênio de caráter ácido que, ao ser capturado por uma das bases presentes no meio reacional (como a 4-metilpiperidina, empregada durante a etapa de desproteção, ou a própria água residual dos solventes destilados), pode levar à isomerização de um ou mais centros quirais presentes na molécula, como mostrado na **Figura 4-15**.



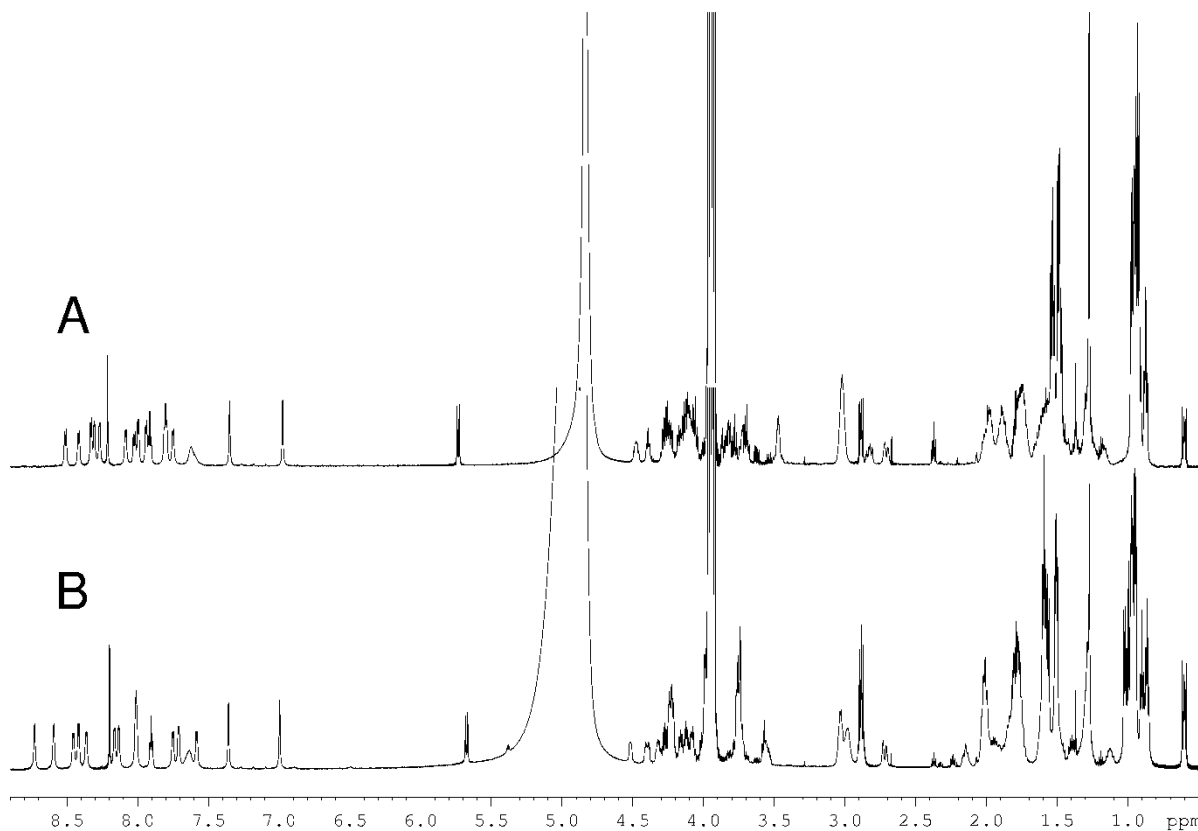
**Figura 4-15.** Mecanismo de formação de isômeros em aminoácidos

A inversão de um dos centros quirais da biomacromolécula pode enfraquecer uma ou mais ligações de hidrogênio responsáveis pela estabilização da estrutura secundária do peptídeo, devido à possível repulsão causada pela proximidade com outras cadeias laterais. Logo, espera-se que o isômero incomum apresente uma estruturação menor. Contudo, somente a obtenção das estruturas por RMN pode confirmar essa hipótese.

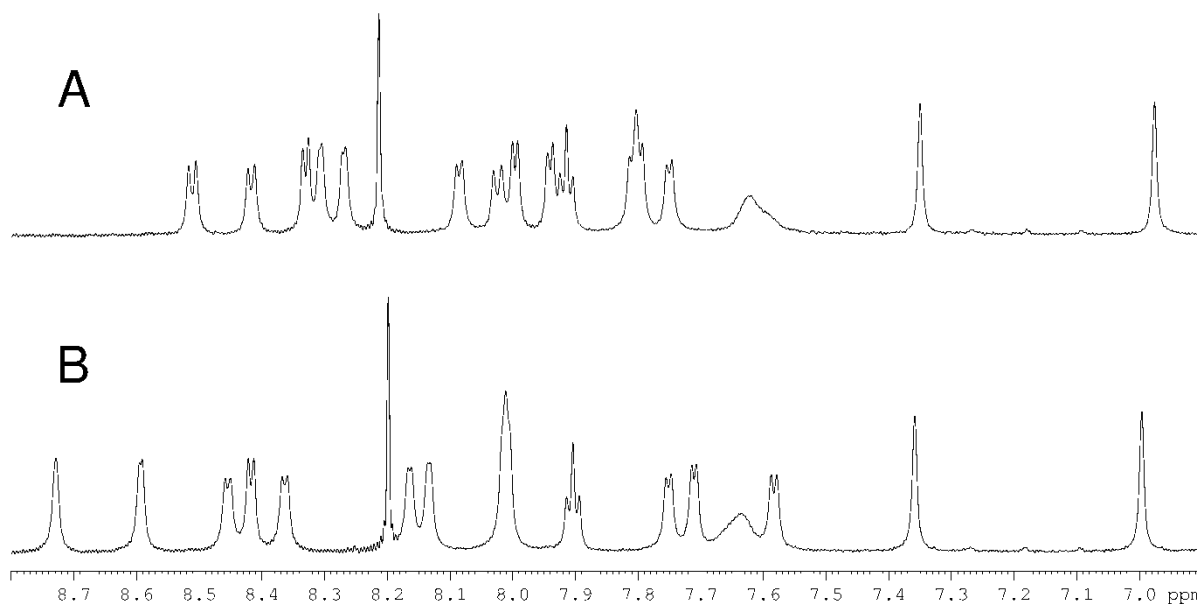
#### 4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética

Para se obterem mais dados que confirmem que as duas frações coletadas dos 1,4-GtPs se tratam de dois isômeros distintos, foram então preparadas soluções das respectivas amostras em TFE- $d_2$ /H $_2$ O (50:50%, v/v), tendo sido realizados experimentos de RMN das mesmas a 20 °C. Os espectros unidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  são apresentados a seguir na Figura 5-15. As diferenças relativas às composições químicas das amostras são nítidas pela inspeção desses espectros unidimensionais. Diferenças bem consideráveis de perfis espectrais nas regiões de menor deslocamento químico são constadas (**Figura 4-16**, faixa de  $\delta$  de 0,80 a 5,55 ppm), bem como nas regiões de deslocamentos químicos de hidrogênios amídicos e aromático, conforme expansão mostrada na região expandida da **Figura 4-17**, o que confirma que essas amostras tratam de um par de isômeros. Nas regiões de maiores deslocamentos químicos, os sinais relativos aos hidrogênios triazólico e anomérico são prontamente reconhecidos, uma vez que suas frequências de ressonância estão conectadas às respectivas frequências de ressonância dos átomos de carbono diretamente ligados nos mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (**Figura F-6**, e maior destaque na expansão apresentada na **Figura F-10, Apêndice F**). Neste contexto, os sinais de ressonância do H anomérico e do H triazólico de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH $_2$  **A** são observados em 5,73 e 8,21 ppm, enquanto que os de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH $_2$  **B** são observados em 5,56 e 8,20 ppm. Os sinais dos hidrogênios triazólicos são observados como simpletos, ao passo que os sinais dos hidrogênios anoméricos são dupletos, devido ao acoplamento de três ligações com o hidrogênio vizinho do anel glicosídico. Ainda, para os GtPs **A** e **B**, os sinais de ressonância do carbono hidrogenado do anel triazólico são observados nos

respectivos mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC em 124,5 e 125,3 ppm, ao passo que os dos respectivos carbonos anoméricos são observados em 87,7 e 87,6 ppm.

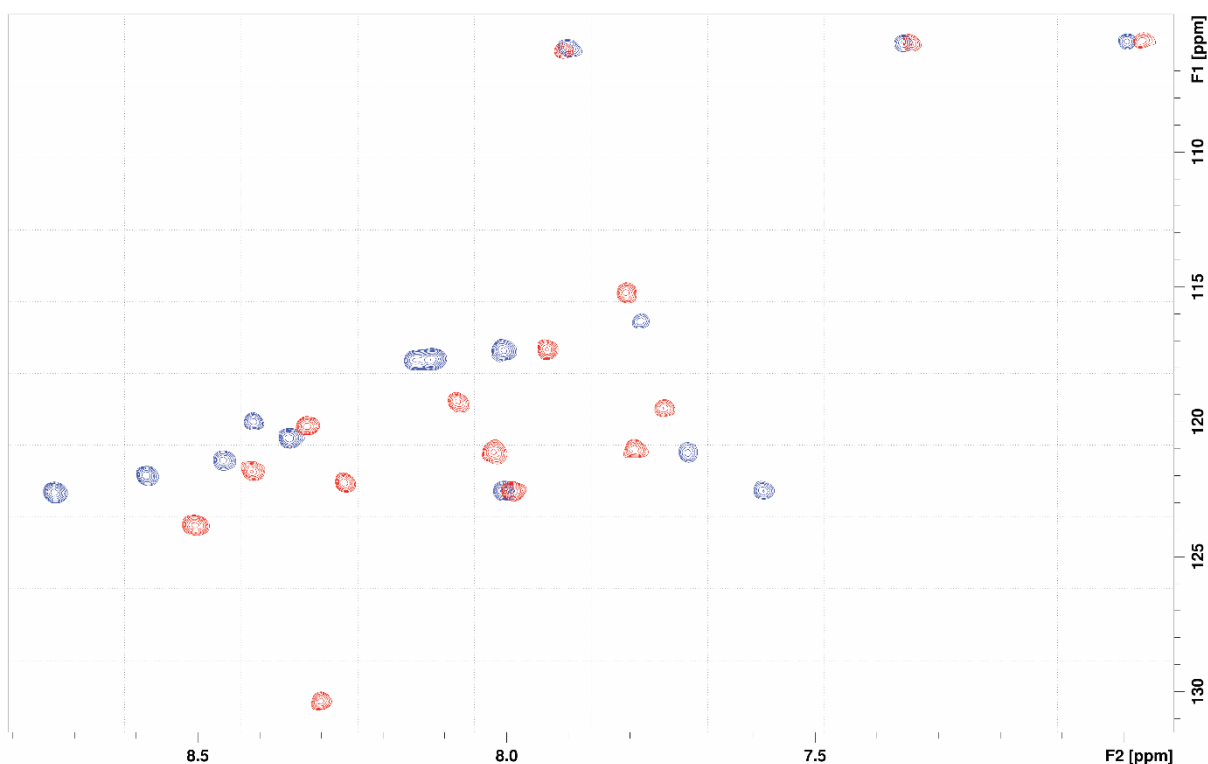


**Figura 4-16.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras do (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz).



**Figura 4-17.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  parciais das amostras do (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Região de ressonâncias de hidrogênios amídicos e aromático.

À exceção do sinal do respectivo hidrogênio triazólico, os demais sinais da **Figura 4-17** são relacionados a hidrogênios amídicos e apresentam distribuições de frequências de ressonâncias distintas para as duas amostras, o que confirma que as mesmas se tratam de um par de isômeros, conforme se constata pela superposição dos dois mapas de contornos na **Figura 4-18** apresentada a seguir. São observados perfis espectrais distintos, com diferenças de deslocamentos químicos de ambos os núcleos ( $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$ ), o que reforça a diferença da composição química das duas amostras.

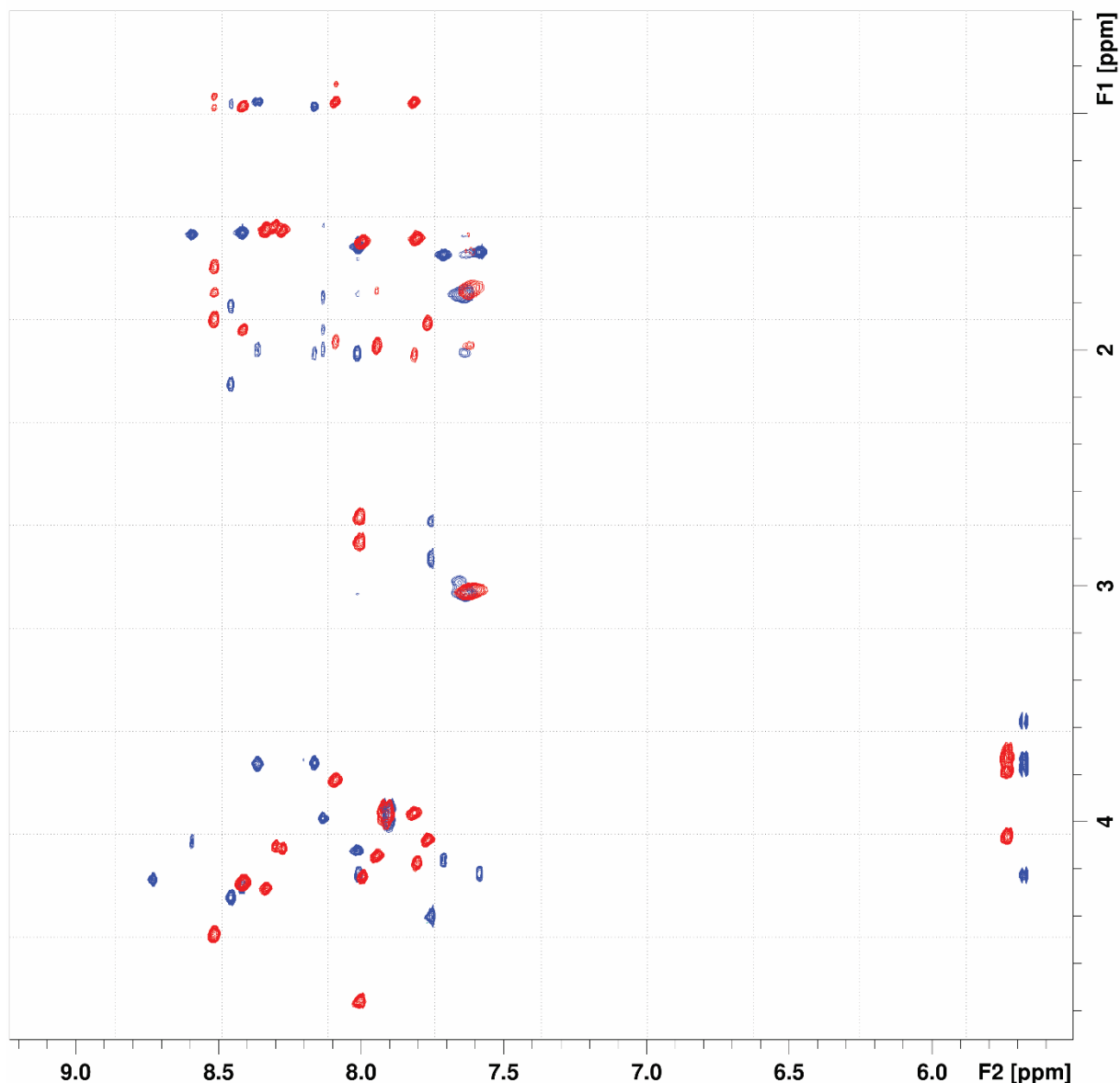


**Figura 4-18.** Sobreposição dos mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC das amostras de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A (vermelho) e B (azul) em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz).

Os respectivos mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC são apresentados sem sobreposição na **Figura F-8** do **Apêndice F**. Em ambos os espectros são observadas quinze correlações bem definidas, sendo as duas de menor deslocamento químico de hidrogênio (entre 6,9 e 7,4 ppm) associadas às ressonâncias da amidação C-terminal e as outras treze correlações estão associadas aos acoplamentos entre os hidrogênios amídicos dos resíduos de Ile-2 a Gly-14. Esses resultados indicam que os peptídeos apresentam significativo grau de estruturação, estando esses hidrogênios amídicos interagindo por ligação de hidrogênio com outros átomos da estrutura e, portanto, não estando envolvidos em processos de troca química rápida, o que impediria a detecção dessas correlações (RESENDE et al., 2008; WÜTHRICH, 1986). A

detecção do número de sistemas de spins de aminoácidos esperada é mais uma evidência da obtenção do par de isômeros glicotriazol-peptídicos, conforme evidenciado anteriormente por análises de espectrometria de massas e CLAE.

Na **Figura 4-19** são apresentadas superpostas seções dos mapas de contornos TOCSY. Na dimensão F2, as frequências de ressonâncias abaixo de 6,0 ppm correspondem aos hidrogênios anoméricos dos isômeros, sendo as respectivas correlações referentes aos sistemas de *spins* das unidades de glicose. Já as frequências de ressonância acima de 7,5 ppm correspondem às ressonâncias dos hidrogênios amídicos e as respectivas correlações são referentes aos sistemas de spins dos resíduos de aminoácidos. Conforme constatado anteriormente, são nítidas as diferenças de deslocamentos químicos dos hidrogênios amídicos. Ademais, são as diferenças de deslocamentos químicos de outros núcleos, como hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  dos resíduos de aminoácidos o que confirma, indubitavelmente, que as amostras em questão se tratam de um par de isômeros

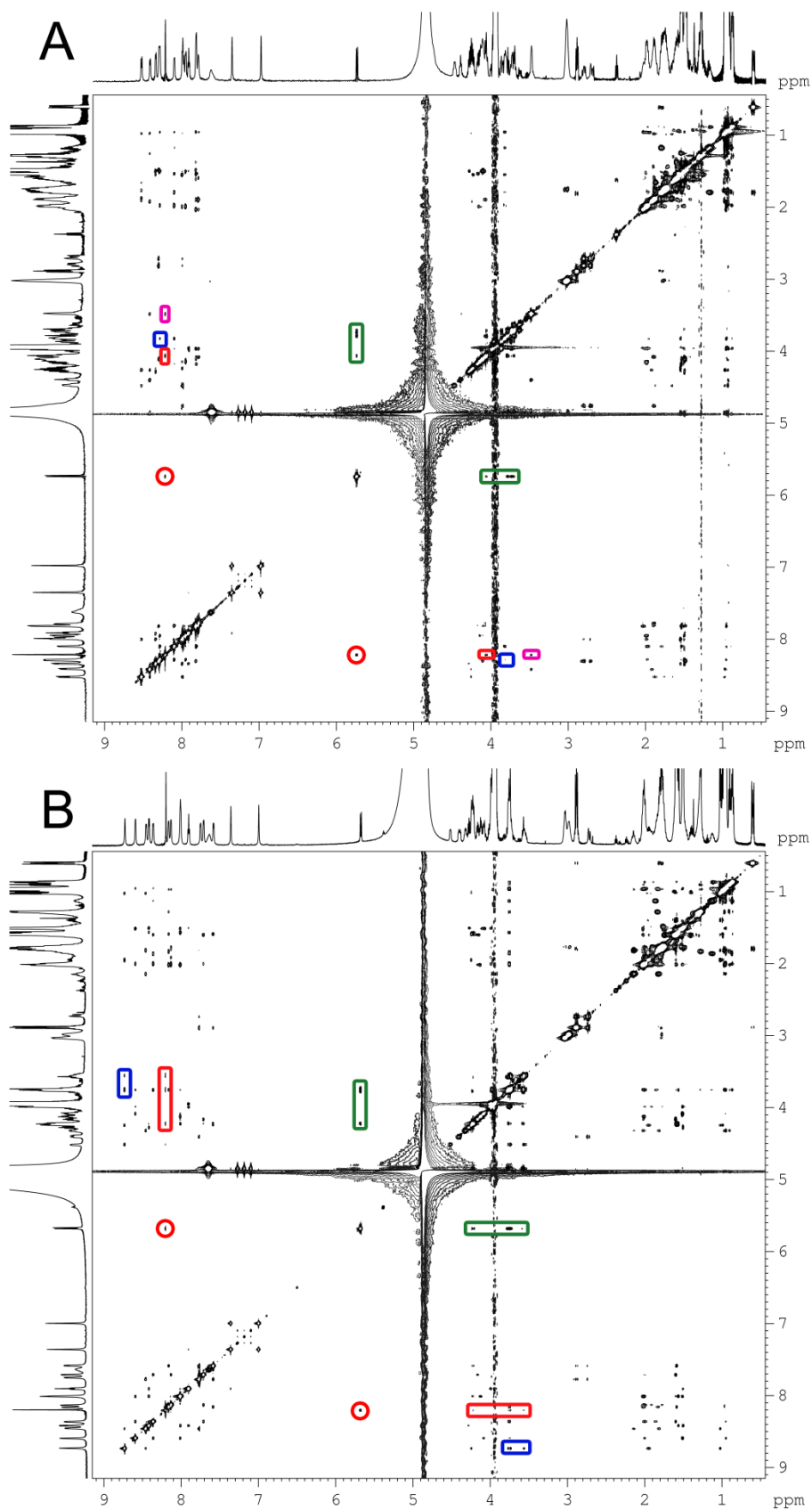


**Figura 4-19.** Sobreposição dos mapas de contornos TOCSY parciais das amostras de 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A (vermelho) e B (azul) em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz).

Os mapas de contornos NOESY dos dois GtPs são apresentados na **Figura 4-20**. Quando esses espectros são comparados aos respectivos mapas de contornos TOCSY (nos quais se observam as correlações associadas aos sistemas de spins dos aminoácidos), constata-se a presença de inúmeras correlações cruzadas, o que indica contatos entre resíduos de aminoácidos distintos e, por conseguinte, estruturação dos GtPs (RESENDE et al., 2008; WÜTHRICH, 1986). Destacam-se as várias correlações entre hidrogênios amídicos (regiões de deslocamento químico entre 6,4 e 8,8 ppm), que caracterizam contatos entre resíduos de aminoácidos espacialmente vizinhos. As correlações entre os hidrogênios anoméricos e outros hidrogênios do anel da glicose estão destacadas em retângulos verdes. Correlações que ainda merecem



destaque, são as entre os hidrogênios anoméricos e triazólicos nos dois mapas de contornos, destacadas em círculos vermelhos, indicando as respectivas proximidades espaciais do resíduo glicotriazólico. Ademais, são observadas outras correlações entre os hidrogênios triazólicos e outros hidrogênios do anel da glicose, destacadas em retângulos vermelhos, que indicam a conexão entre o anel triazólico e o glicosídico (ressalta-se que os deslocamentos químicos dos sistemas de spins dos anéis de glicose foram caracterizados pelo mapa de contornos TOCSY). Percebem-se ainda, destacados em retângulos azuis, a correlação entre hidrogênios do anel da glicose com hidrogênios de sistemas de spins de aminoácidos, o que confirma a proximidade espacial do resíduo glicotriazólico a outros resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica (ressalta-se que os deslocamentos químicos dos sistemas de spins dos resíduos de aminoácidos foram caracterizados pelo mapa de contornos TOCSY). Para o 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A (**Figura 4-20**), ainda observa-se correlação entre o hidrogênio triazólico e hidrogênio do sistema de spins dos resíduos de aminoácidos, destacadas em retângulos magenta. Vizinhanças espaciais entre resíduo glicotriazólico e outros aminoácidos foram previamente observadas pelo nosso grupo de pesquisa, em estudos estruturais da [(*p*-OAc)Glc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, um GtP derivado do peptídeo filoseptina-2



**Figura 4-20.** Mapas de contornos NOESY das amostras de (A) 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH<sub>2</sub> A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Correlações entre os hidrogênios anoméricos e triazólicos estão destacadas em círculos vermelhos; entre os hidrogênios triazólicos e outros hidrogênios do anel da glicose estão

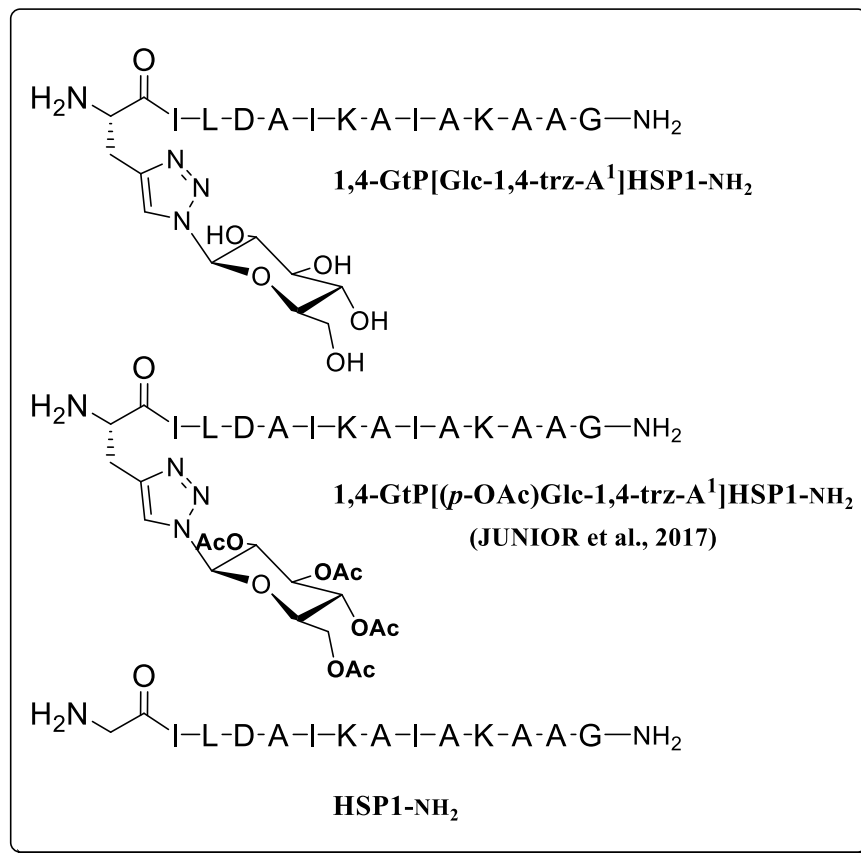
destacadas em retângulos vermelhos; entre hidrogênios do anel da glicose e de resíduos de aminoácidos são destacadas em retângulos azuis; entre hidrogênio triazólico e hidrogênios de resíduos de aminoácidos são destacadas em retângulos magenta; entre os hidrogênios anoméricos e outros hidrogênios do anel da glicose estão destacadas em retângulos verdes

Na literatura são relatadas sínteses de peptídeos, nas quais um par de isômeros foram obtidos. No trabalho de Reis e co-autores (REIS et al., 2018), foi proposta a síntese do peptídeo antimicrobiano LyeTxI-b, tendo sido obtidos no cromatograma da síntese duas frações diferentes que apresentavam a mesma massa molecular. Essas frações apresentaram atividades biológicas distintas, tendo sido obtidas a estrutura tridimensional de RMN do isômero mais ativo. Embora não tenha sido determinada a estrutura tridimensional do peptídeo com menor atividade nesse trabalho, significativas diferenças foram observadas entre os conjuntos de espectros de RMN, tendo-se então confirmada a existência de dois isômeros.

A caracterização dos sinais de ressonância do anel triazólico, por si só, confirmam a efetivação da reação click e obtenção dos glicotriazol-peptídeos, conforme observado por espectrometria de massas. Não obstante, foram reconhecidos com auxílios dos mapas de contornos HMQC e posterior análise dos mapas de contornos TOCSY, os respectivos sistemas de spins dos anéis glicosídicos nos dois isômeros. Nos mapas de contornos TOCSY ainda foram reconhecidas as regiões de deslocamentos químicos que definem os sistemas de spins dos resíduos de aminoácidos, tendo sido vizinhanças especiais entre esses sistemas de spins, bem como vizinhanças dos mesmos com o sistema de spins do resíduo glicotriazólico reconhecidas. A realização dos experimentos de RMN neste projeto de mestrado teve como objetivo principal a obtenção de mais um indício experimental da formação de dois isômeros na síntese do 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH<sub>2</sub>. As atribuições inequívocas dos sinais de ressonância e a obtenção das estruturas tridimensionais dos GtPs demanda um trabalho de significativa complexidade (WUST, 2017; WÜTHRICH, 1986) e estão fora do escopo do projeto de mestrado original. Portanto, tais estudos não foram realizados durante a execução das atividades desta dissertação. Entretanto, é objetivo de trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa a interpretação detalhada dos espectros de RMN desses dois GtPs, a fim de se obterem as respectivas estruturas tridimensionais, que são parâmetros importantes para uma compreensão da interação com membranas e da atividade antimicrobiana dessas moléculas.

#### 4.2.4. Testes biológicos

As atividades antifúngicas (**Tabela 4-6**) dos isômeros 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> A e B foram analisadas contra fungos *Candida spp.* Testes similares foram feitos para o peptídeo HSP1-NH<sub>2</sub> e para o glicotriazol-peptídeo per-*O*-acetilado 1,4-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (estruturas mostradas na **Figura 4-21**), sintetizados e caracterizados por Júnior e colaboradores (JUNIOR et al., 2017), e ao fármaco controle, Anfotericina B.



**Figura 4-21.** Comparação entre as estruturas primárias dos glicotriazóis-peptídeos e peptídeo empregados nos testes antifúngicos.

**Tabela 4-6.** Comparação entre a atividade fungicida do peptídeo HSP1-NH<sub>2</sub>, glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (1,4-GtP(*p*-OAc)), 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH<sub>2</sub> A e B e anfotericina B em *Candida sp* ATCC.

Micro-organismo	MIC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> / MFC <sub>50</sub> <sup>b</sup>				
	HSP1-NH <sub>2</sub>	1,4-GtP( <i>p</i> -OAc)	Isômero A	Isômero B	Anfotericina B
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	143,90	46,27	74,01	87,13	85,30
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	134,10	27,88	43,90	46,75	17,80
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	139,90	30,3	71,96	85,53	32,72

<sup>a</sup> concentração mínima inibitória.

<sup>b</sup> concentração fungicida mínima.

As análises foram realizadas de acordo com as recomendações do NCCLS (NCCLS, 2002).

Em comparação com o peptídeo HSP1-NH<sub>2</sub>, a inserção do anel triazólico e dos diferentes sacarídeos nas estruturas levou a um aumento significativo na atividade antifúngica dos compostos avaliados. Este é um resultado esperado, uma vez que em trabalho anterior do grupo foi mostrado que o triazol tem papel fundamental na inibição da biossíntese do ergosterol, um dos componentes da membrana celular de fungos, além do que o carboidrato aumenta a afinidade do GtP pela membrana, em comparação ao peptídeo e ao triazol-peptídeo análogos (JUNIOR et al., 2017).

Apesar do isômero GtP A apresentar MICs ligeiramente menores que os do GtP B contra todos os fungos testados, é observada diferença expressiva entre suas atividades. Quando comparados esses isômeros à Anfotericina B, atividades similares são observadas no combate a cepas de *Candida tropicalis*, todavia o controle se mostra mais ativo contra os outros dois micro-organismos. Embora vários peptídeos atibióticos apresentem atividades significativamente maiores que os controles, esse resultado não é por si só surpreendente, uma vez que, para se avaliar o efeito da inserção da unidade glicotriazólica, optou-se pela escolha de um peptídeo (HSP1-NH<sub>2</sub>) com atividades antibacteriana e antifúngica moderadas (conforme discutido anteriormente em JUNIOR et al., 2017). De fato, ao se compararem as atividades dos GtP A e B aos da HSP1-NH<sub>2</sub>, percebe-se uma melhora considerável do potencial antifúngico pela inserção do resíduo glicotriazólico.

Ao se compararem as atividades dos GtPs com as hidroxilas do carboidrato livres (1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A1]HSP1-NH<sub>2</sub> A e B) com a da espécie contendo a glicose per-*O*-acetilada percebe-se a 1,4-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> sendo muito mais ativa, tendo essa atividade inclusive bem superior à do fármaco controle no combate à *Candida tropicalis*, sendo similares a este em relação às outras cepas de *Candida spp*. Esses resultados confirmam que, sem sombra de dúvidas, a acetilação do carboidrato é importante para as atividades antifúngicas desses GtPs derivados da HSP1-NH<sub>2</sub>. Estudos de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) indicaram que o carboidrato per-*O*-acetilado aumenta a afinidade do GtP pela membrana (JUNIOR et al., 2017). Estudos análogos ainda não foram feitos com GtP contendo o açúcar com as hidroxilas livres, sendo que investigações futuras poderão dar informação relativas a isso. Sabe-se também que, tanto a estrutura tridimensional do peptídeo, quanto sua topologia de interação com membranas são fundamentais para o processo de interação peptídeo-membrana, de forma que a disposição de resíduos hidrofílicos ou hidrofóbicos em posições específicas podem aumentar ou diminuir a afinidade do peptídeo por membranas (cf. RESENDE et al., 2014). Neste contexto, é possível que o carboidrato per-*O*-acetilado estivesse parcialmente inserido na membrana, sendo que a remoção os grupos acetil possam estar associados a mudanças a estruturais e/ou topológicas do GtP. É de interesse futuro do grupo de pesquisa, trabalhos visando a obtenção das estruturas tridimensionais e de topologia de interação com membranas (feitos normalmente por RMN em solução e de sólidos, respectivamente), a fim de se obterem informações em resolução atômica sobre o papel do carboidrato para a interação peptídeo-membrana. Estudos de SPR para os isômeros A e B serão também importantes para se entender como a remoção dos grupos acetil interferem na constante de afinidade GtP-membrana.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho objetivou sintetizar as macrobiomoléculas 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> e 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, empregando diferentes metodologias de reação envolvendo cicloadições 1,3-dipolar, catalisadas, respectivamente, por Ru(II) e Cu(I).

O intermediário-chave [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (V) foi obtido por meio da estratégia Fmoc-SPFS, tendo o mesmo sido usado em cinco metodologias de síntese, que visavam obter mais informações acerca da viabilidade de obtenção de 1,5-triazol-peptídeos, pelo emprego de Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como catalisador organometálico. Por meio da análise dos espectros de massas obtidos para essas metodologias, pôde-se concluir que essas foram ineficazes. Contudo, o espectro de massas obtido para o produto formado empregando a sexta metodologia (f), que envolveu a reação entre o resíduo Fmoc-Pra e o azidoaçúcar *p*-*O*-acetilado, indica que esta foi bem sucedida para a obtenção do resíduo Fmoc-1,5-glicotriazólico (VII), embora seja necessário se otimizarem as condições reacionais. A caracterização do produto obtido por essa última metodologia foi realizada apenas por espectrometria de massas, uma vez que outras análises, como por espectroscopia de RMN, demandam maior quantidade de amostra. É de interesse do grupo de pesquisa, em investigações futuras, a otimização da síntese desse resíduo Fmoc-1,5-glicotriazólico, para que o mesmo seja então empregado na rotina de síntese de peptídeos em fase sólida, objetivando-se a obtenção do 1,5-GtP de interesse.

A síntese da 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> utilizando sulfato de cobre pentraidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), ascorbato de sódio e um azidoaçúcar, forneceu um par de isômeros em pequenos rendimentos, devido à grande perda durante o processo de purificação. Esses foram caracterizados por espectrometria de massas MALDI-TOF, sendo que análises de CLAE, CD e RMN que provaram, indubitavelmente, a formação de dessas duas moléculas isoméricas (A e B). Esses dois isômeros tiveram suas atividades biológicas avaliadas contra três espécies de fungos, sendo as mesmas confrontadas com as atividades antifúngicas do peptídeo base HSP1-NH<sub>2</sub> e do respectivo GtP contendo a glicose *per-O*-acetilada. As atividades dos isômeros A e B são muito similares, todavia a inserção do resíduo glicotriazólico na cadeia peptídica gera um aumento significativo na atividade antifúngica dos 1,4-GtP, quando comparados à HSP1-NH<sub>2</sub>. Quando comparadas as atividades antifúngicas de A e B às da 1,4-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (GtP contendo glicose *per-O*-acetilada), percebeu-se uma diminuição significativa na atividade antifúngica, indicando que a acetilação do carboidrato está associada a um papel importante para a ação antifúngica dessa espécie. Estudos

anteriores mostraram que a presença do carboidrato per-*O*-acetilado aumenta a afinidade do GtP pela membrana, sendo que é possível que, para o caso específico desses GtP, a desacetilação tenha levado a modificações topológico-estruturais e a uma menor afinidade.

Por fim, é de suma importância ressaltar que os resultados obtidos indicam que o emprego de azido-açúcares desprotegidos na síntese é factível, desde que estes sejam inseridos na cadeia peptídica na última etapa da SPFS. A presença destes açúcares não leva a complicações na obtenção do produto na reação click ou degradação durante a etapa de clivagem, levando à novas possibilidades de síntese envolvendo essa classe de compostos.



## REFERÊNCIAS

### APD - Antimicrobial Peptide Database.

APWEILER, R.; HERMJAKOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database 1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 4–8, 1999.

BABII, O. et al. Controlling Biological Activity with Light: Diarylethene-Containing Cyclic Peptidomimetics. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 3392–3395, 2014.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1543–1575, 2013.

BAHIA, S. B. B. B. **Síntese e Avaliação Tripanocida de Naftoquinonas 1,2,3-triazólicas 1,5-dissubstituídas obtidas por catálise com complexos de Rutênio(II)**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

BINDA, E.; MARINELLI, F.; MARCONE, G. L. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. **Antibiotics**, v. 3, p. 572–594, 2014.

BOYER, R. D.; JOHNSON, R.; KRISHNAMURTHY, K. Compensation of refocusing inefficiency with synchronized inversion sweep (CRISIS) in multiplicity-edited HSQC. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 165, p. 253–259, 2003.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. International Journal of Antimicrobial Agents Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals ? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 3, p. 217–225, 2011.

CHAN, W. C; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2000.

CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 537, p. 163–185, 2019.

COSTA, A. R. et al. Glycosylation: impact , control and improvement during therapeutic protein production. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–19, 2013.

DE MAGALHÃES, M. T. Q. et al. Conformational and Functional Effects Induced by D- and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1–14, 2013.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v. 70, p. 1–10, 1939a.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 70, p. 11–17, 1939b.

EEMAN, M.; DELEU, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 14, n. 4, p. 719–736, 2010.

FEHER, J. **Quantitative Human Physiology: An Introduction**. 2. ed. [s.l.] Academic Press,

2016.

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

FRANCO, L. L. et al. SÍNTESE DE N-GLICOSILSULFONAMIDAS DERIVADAS DE D-GLICOSE E N-ACETILGLICOSAMINA. **Química Nova**, v. 38, p. 1044–1052, 2015.

GAUSE, G. F.; BRAZHNIKOVA, M. G. Gramicidin S and its use in Treatment of Infected Wounds. **Nature**, v. 3918, p. 703, 1944.

GUAN, Q. et al. Recent Advances in the Exploration of Therapeutic Analogues of Gramicidin S, an Old but Still Potent Antimicrobial Peptide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. xx, p. xxx–xxx, 2019.

GUSMÃO, K. A. G. et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, p. 1–14, 2017.

HIRSCH, J. G. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, p. 589–611, 1956.

HOTCHKISS, R. D.; DUBOS, R. J. Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil Bacillus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 791–792, 1940.

HWANG, T.-L.; SHAKA, J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Filed Gradients. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 112, p. 275–279, 1995.

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, 2017.

KAISER, E. et al. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595–598, 1970.

KEMP, D. S. Racemization in Peptide Synthesis. In: **Major Methods of Peptide Bond Formation: The Peptides Analysis**. Nova Iorque: ACADEMIC PRESS, INC., 1979. v. 1p. 315–383.

KNAAP, M. VAN DER et al. Evaluation of Readily Accessible Azoles as Mimics of the Aromatic Ring of d-Phenylalanine in the Turn Region of Gramicidin S. **ChemMedChem**, v. 6, p. 840–847, 2011.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. **Biomolecules**, v. 8, p. 1–24, 2018.

LIU, J. et al. Exploration of Effective Catalysts for Diyne Polycyclotrimerization, Synthesis of an Ester-Functionalized Hyperbranched Polyphenylene, and Demonstration of Its Utility as a Molecular Container with Implication for Controlled Drug Delivery. **Macromolecules**, v. 42, p. 7367–7378, 2009.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. Tetrapeptide. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, p. 2149–2154, 1963.

MERRIFIELD, R. B. **Solid Phase Peptide Synthesis. II. The Synthesis of Bradykinin** **Journal of American Chemical Society**. [s.l: s.n.].

MORADI, S. V. et al. Glycosylation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides. **Chemical Science**, 2016.

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2007.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**. [s.l: s.n.].

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 5. ed. [s.l.] Cengage Learning Nacional, 2016.

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*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018–13026, 2004.

RAMMELKAMP, C. H.; WEINSTEIN, L. Toxic effects of tyrothricin, gramicidin and tyrocidine. **Journal of Infectious Diseases**, v. 71, p. 166–173, 1941.

REIS, P. V. M. et al. LyeTxI-b, a Synthetic Peptide Derived From *Lycosa erythrognatha* Spider Venom, Shows Potent Antibiotic Activity in Vitro and in Vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

RESENDE, J. M. et al. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: The role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. **Peptides**, v. 29, p. 1633–1644, 2008.

RESENDE, J. M. et al. Membrane Interactions of Phylloseptin-1, -2, and -3 Peptides by Oriented Solid-State NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 107, p. 901–911, 2014.

SCHANDA, P.; BRUTSCHER, B. Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 8014–8015, 2005.

SHAKA, A. J.; LEE, C. J.; PINES, A. Iterative Schemes for Bilinear Operators; Application to Spin Decoupling. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 293, p. 274–293, 1988.

SILVA, O. N. et al. Cn-AMP1: A New Promiscuous Peptide With Potential for Microbial Infections Treatment. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 322–331, 2012.

SÖNNICHSEN, F. D. et al. Effect of Trifluoroethanol on Protein Secondary Structure: An NMR and CD Study Using a Synthetic Actin Peptide. **Biochemistry**, v. 31, p. 8790–8798, 1992.

TAMAKI, M. et al. Polycationic Gramicidin S Analogues with Both High Antibiotic Activity and Very Low Hemolytic Activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, p. 1134–1138, 2012.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. June, p. 0–1, 2017.

ULM, H. et al. Antimicrobial host defensins – specific antibiotic activities and innate defense modulation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–4, 2012.

WILLKER, W. et al. Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 31, p. 287–292, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: [s.n.].

WUST, M. A. **Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil- triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A14]PS-2 em meios miméticos de membrana**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

WÜTHRICH, K. **NMR of Proteins and Nucleic Acids**. 1. ed. Nova Iorque: Wiley-Interscience, 1986.

## APÊNDICE A

Aminoácidos essenciais e suas respectivas representações, características estruturais e massas.

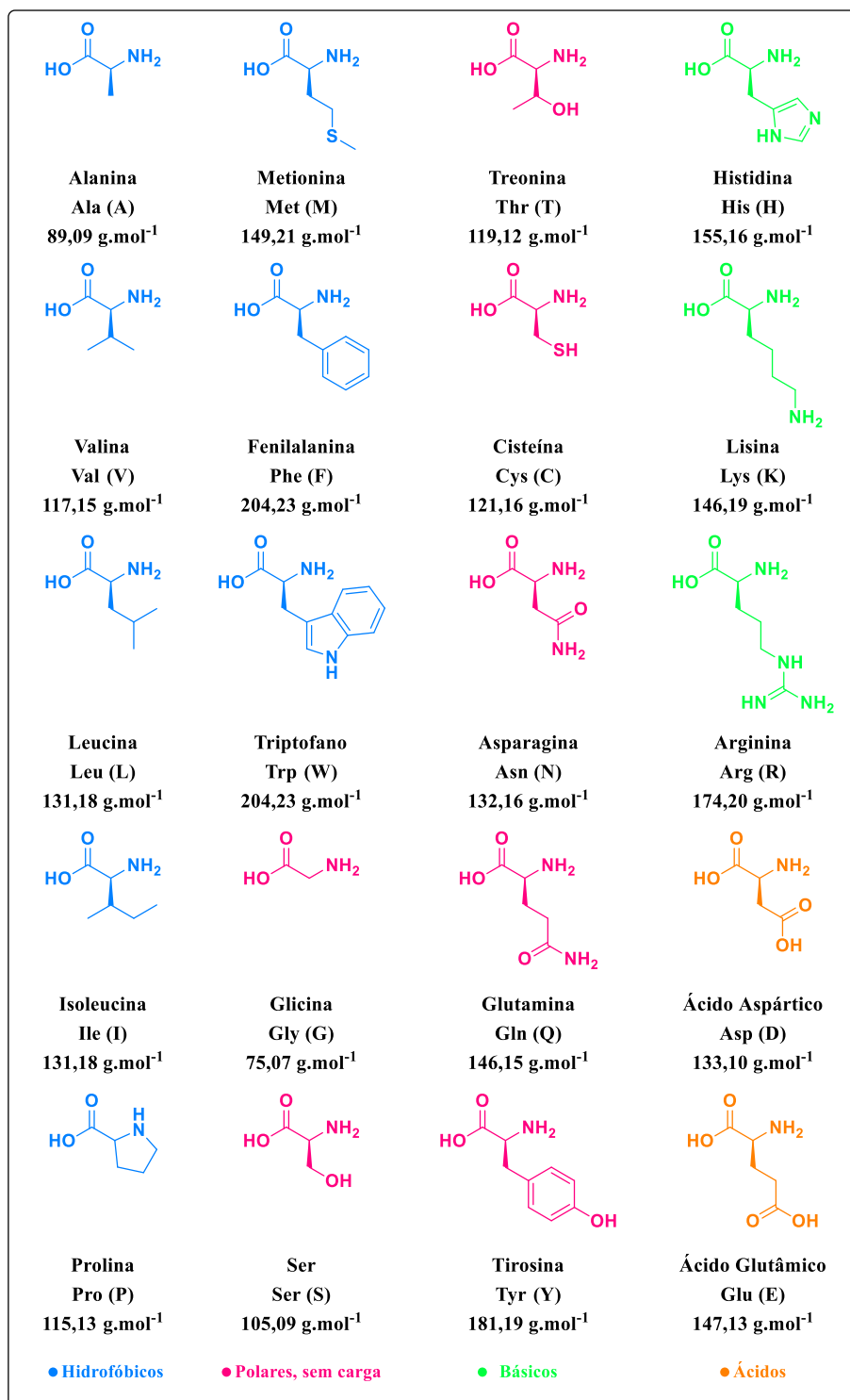


Figura A-1. Aminoácidos essenciais com suas representações, características estruturais e massas.

## APÊNDICE B

Aminoácidos empregados na síntese, com seus respectivos grupos protetores e massas.

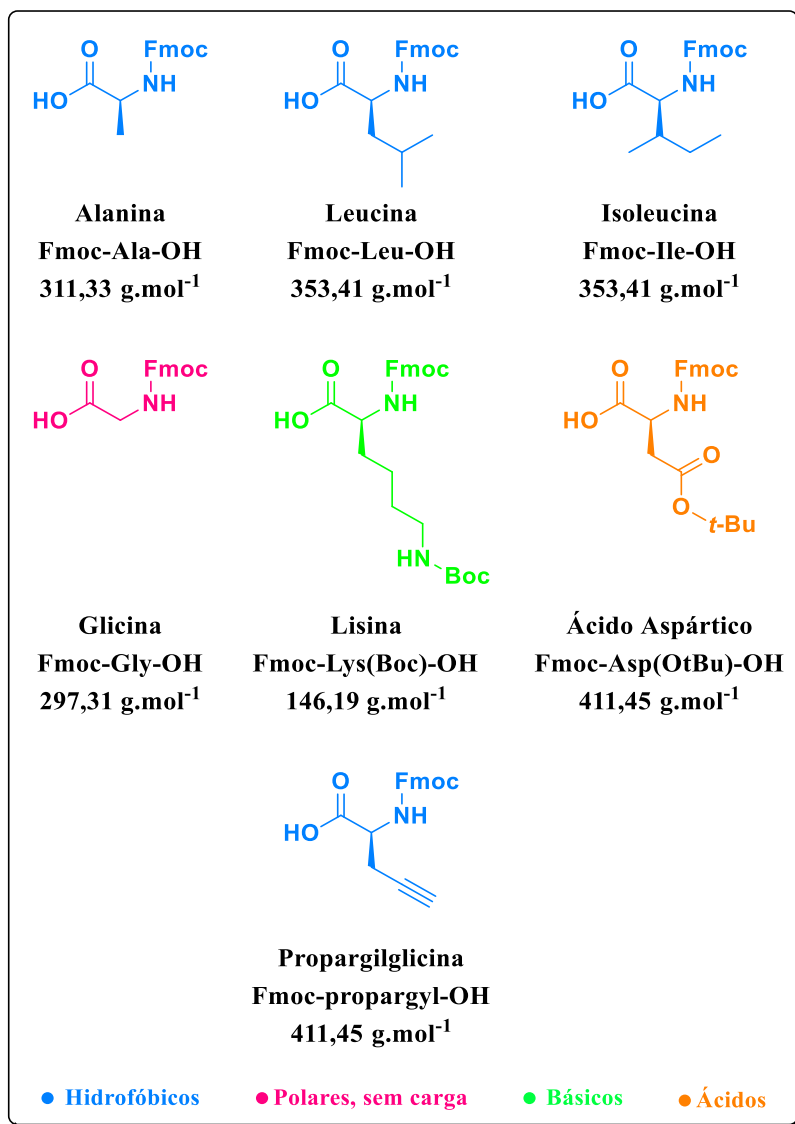


Figura B-1. Representação estrutural dos aminoácidos empregados na síntese, com seus respectivos grupos protetores e massas.

## APÊNDICE C

### Metodologia completa de síntese do peptídeo [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>.

Primeiramente, empregou-se uma resina de grau de substituição 0,74 mmol.g<sup>-1</sup> e as tentativas de acoplamento são descritas na tabela abaixo:

**Tabela C-1.** Dados da primeira tentativa de síntese da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, utilizando uma resina de grau de substituição 0,74 mmol.g<sup>-1</sup>.

Resíduo	Pesado (g)	HOBt (g)	DIC (μL)	DMF (mL)	DCM (mL)	Tempo de reação	Reação efetiva	Observações
G	0,17901	0,09131	92	2	1	3h	Sim	-
A	0,18469	0,09189	92	2	1	3h	Sim	-
A	0,18524	0,09094	92	2	1	3h	Sim	-
K	0,2782	0,0936	92	2	1	3h	Sim	-
A	0,18616	0,09216	92	2	1	3h	Sim	-
I	0,21064	0,09667	92	2	1	3h	Sim	-
A	0,18947	0,09796	92	2	1	3h	Não	-
A*	0,18581	0,09195	92	2	1	3h	Sim	-
K	0,27831	0,09210	92	2	1	3h	Não	-
K*	0,27973	0,09222	92	2	1	3h	Não	2 gotas de Triton®
K*	0,34906	0,12567	115	2	1	4h	Não	5 eq. e 2 gotas de Triton®
K*	0,28140	0,09186	92	2	1	3h	Não	31 °C e 2 gotas de Triton®
K*	0,29253	0,09481	92	2	1	3h	Não	4 gotas de Triton®
K*	0,28232	0,09121	92	3	-	4h	Não	0,3 mL de DMSO

\*acoplamentos repetidos

Após inúmeras tentativas falhas de acoplamento da Fmoc-Lys(Boc)-7, onde variou-se o número de equivalentes utilizado dos reagentes, tempo, temperatura, solvente e até a quantidade de detergente adicionado, esta síntese foi abandonada e mudou-se o grau de substituição da resina. Concluiu-se que a agregação das cadeias peptídicas, devido à sua grande proximidade na resina com maior grau de substituição, impedia o prosseguimento da síntese. Abaixo é apresentada a **Tabela C-2**, que sumaria as informações sobre a síntese com o emprego da resina de grau de substituição 0,52 mmol.g<sup>-1</sup>.

**Tabela C-2.** Dados da primeira tentativa de síntese da [Pra<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>, utilizando uma resina de grau de substituição 0,52 mmol.g<sup>-1</sup>.

Resíduo	Pesado (g)	HOBt (g)	DIC (μL)	DMF (mL)	DCM (mL)	Tempo de reação	Reação efetiva	Observações
<b>G</b>	0,17803	0,09130	92	2	1	3h	Sim	-
<b>A</b>	0,1878	0,0964	92	2	1	3h	Sim	-
<b>A</b>	0,1887	0,0961	92	2	1	3h	Sim	-
<b>K</b>	0,28133	0,09520	92	2	1	3h	Sim	-
<b>A</b>	0,19064	0,09305	92	2	1	3h	Sim	-
<b>I</b>	0,2126	0,09610	92	2	1	3h	Sim	-
<b>A</b>	0,18752	0,09428	92	2	1	3h	Sim	-
<b>K</b>	0,28911	0,09478	92	2	1	3h	Sim	-
<b>I</b>	0,21080	0,09457	92	2	1	3h	Não	-
<b>I*</b>	0,26505	0,11449	115	2	1	3h30	Não	5 eq.
<b>I*</b>	0,31680	0,13890	138	2	1	3h30	Sim	6 eq. e 2 gotas de Triton®
<b>A</b>	0,23171	0,11507	115	2	1	3h30	Não	5 mols
<b>A*</b>	0,20928	0,10543	104	2	1	3h30	Sim	4,5 eq. e 2 gotas de Triton®
<b>D</b>	0,37150	0,11495	115	2	1	3h30	Não	5 eq. e 2 gotas de Triton®
<b>D*</b>	0,30969	0,11861	115	3	-	4h	Sim	5 eq.e 0,3 mL de DMSO
<b>L</b>	0,26683	0,11510	115	3	-	4h	Sim	5 eq. e 2 gotas de Triton®
<b>I</b>	0,26443	0,11926	115	3	-	4h	Sim	5 eq. e 2 gotas de Triton®
<b>Pra</b>	0,05620	0,03471	35	3	-	4h	Sim	1,5 eq. e 2 gotas de Triton®

\*acoplamentos repetidos



## APÊNDICE D

### Procedimento de secagem de solventes

Baseado em MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007.

#### **Tetraidrofurano**

Inicialmente, secaram-se 40 g de  $\text{CaCl}_2$  em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 12h, que em seguida foi deixado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, e adicionado diretamente em uma garrafa recém aberta de THF. Após 24 h, filtrou-se o  $\text{CaCl}_2$  com o auxílio de um funil e papel de filtro, recolhendo-se o solvente em um balão de tamanho adequado. Foi feita uma destilação simples deste, tomando-se o cuidado de descartar as frações iniciais e finais da destilação. Com o auxílio da prensa, fez-se um fio de sódio no balão com o solvente recém-destilado e acrescentaram-se 50,0 mg de benzofenona. Essa mistura foi submetida a refluxo sob atmosfera de argônio e, ao apresentar uma coloração azulada, estava pronta para uso.

#### ***N,N*-dimetilformamida**

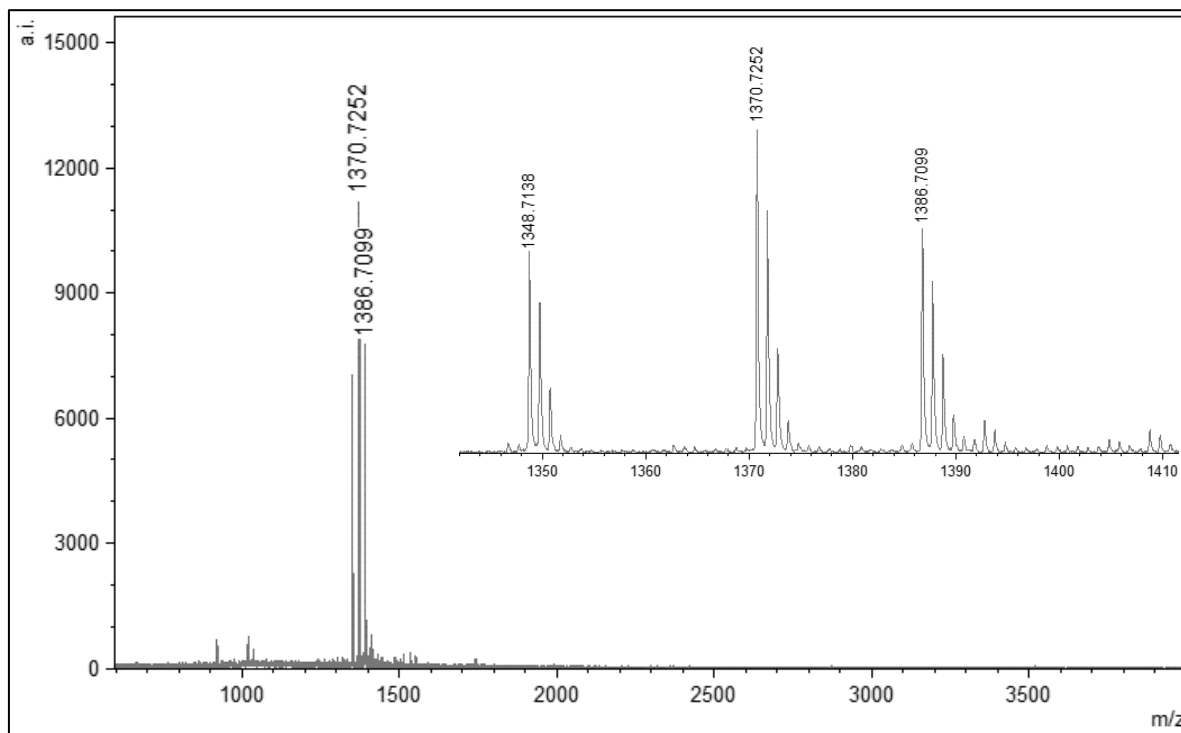
Inicialmente, o dobro da quantidade de peneira molecular 4 Å necessária para cobrir o fundo do frasco onde o DMF será armazenado foi ativada à aproximadamente  $300^\circ\text{C}$  por 4 horas. Após arrefecer até atingir  $100^\circ\text{C}$ , esta foi deixada em um dessecador até que atingisse a temperatura ambiente. Metade da quantidade de peneira ativada foi colocada em um frasco na presença de 100 mL DMF P.A. “overnight”, e no dia seguinte, transferiu-se o DMF para outro frasco contendo o restante da peneira molecular.

#### **Diclorometano**

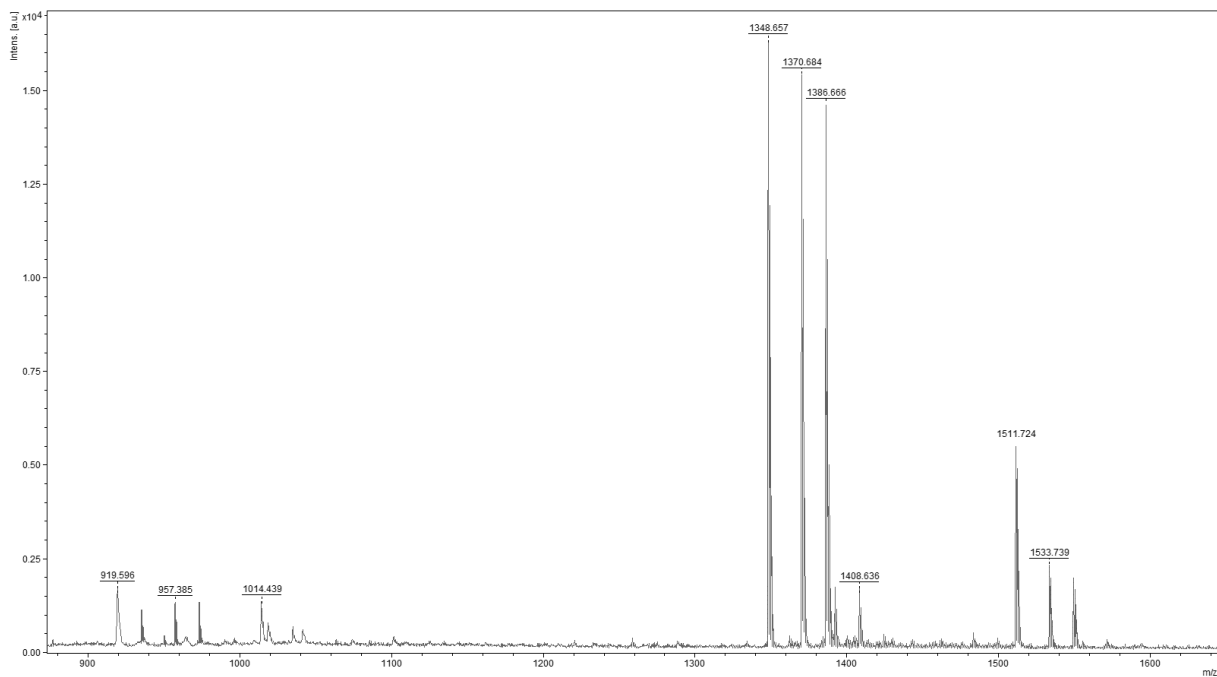
Inicialmente, 40 g de  $\text{CaCl}_2$  foram mantidos por 12 h em estufa a  $100^\circ\text{C}$ . Em seguida, este foi deixado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente e adicionado diretamente em uma garrafa recém-aberta de diclorometano. Após 24h, filtrou-se o  $\text{CaCl}_2$  utilizando funil e papel de vidro, recolhendo-se o solvente em um balão de tamanho adequado, onde se acrescentaram 3,0 g de  $\text{CaH}_2$ . O solvente foi submetido a refluxo por 4 - 5 h para garantir a eficiência da secagem.

## APÊNDICE E

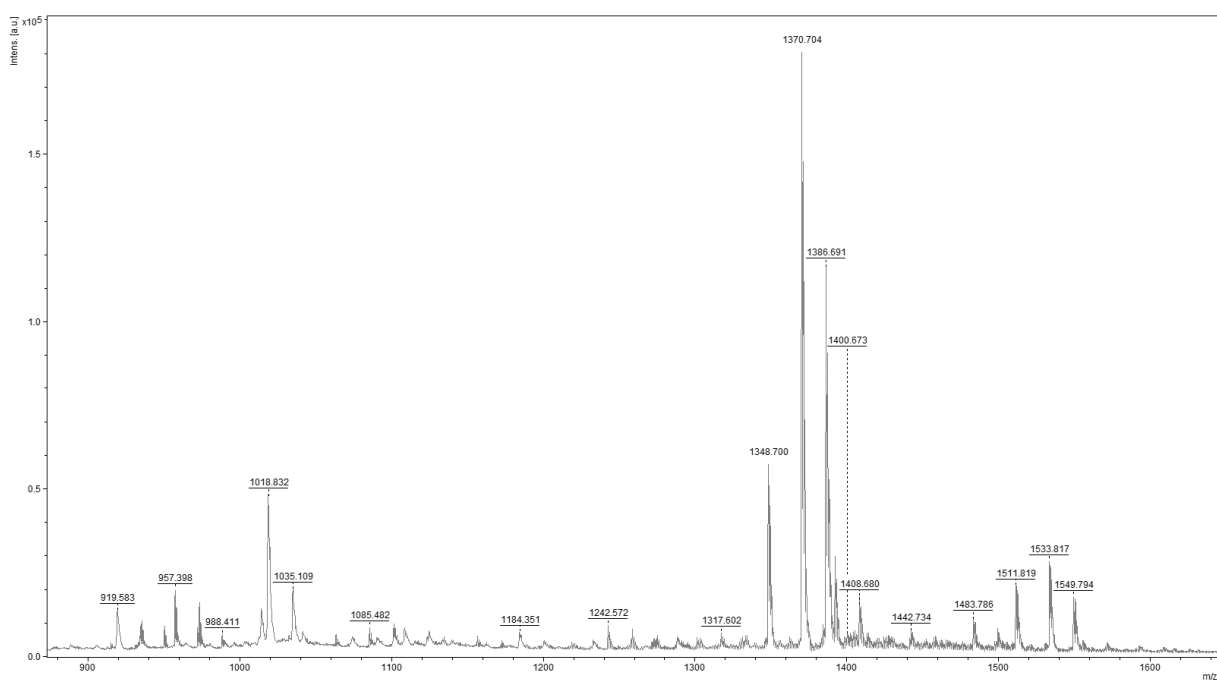
### Espectros relacionados à síntese do glicotriazol-peptídeo 1,5-GtP[(*p*-OAc)Glc-1,5-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>



**Figura E-1.** Espectro de massas completo do produto obtido empregando a **metodologia c**, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  1340-1410. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.



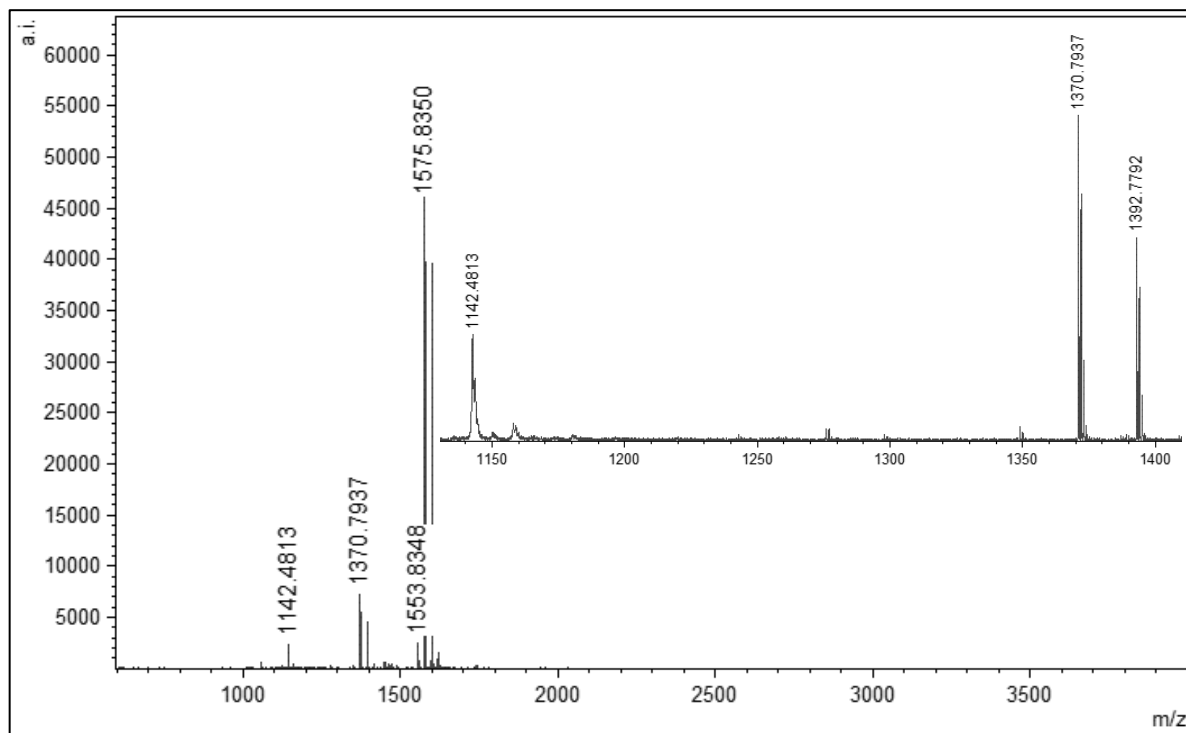
**Figura E-2.** Espectro de massas completo do produto obtido empregando a **metodologia d**. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.



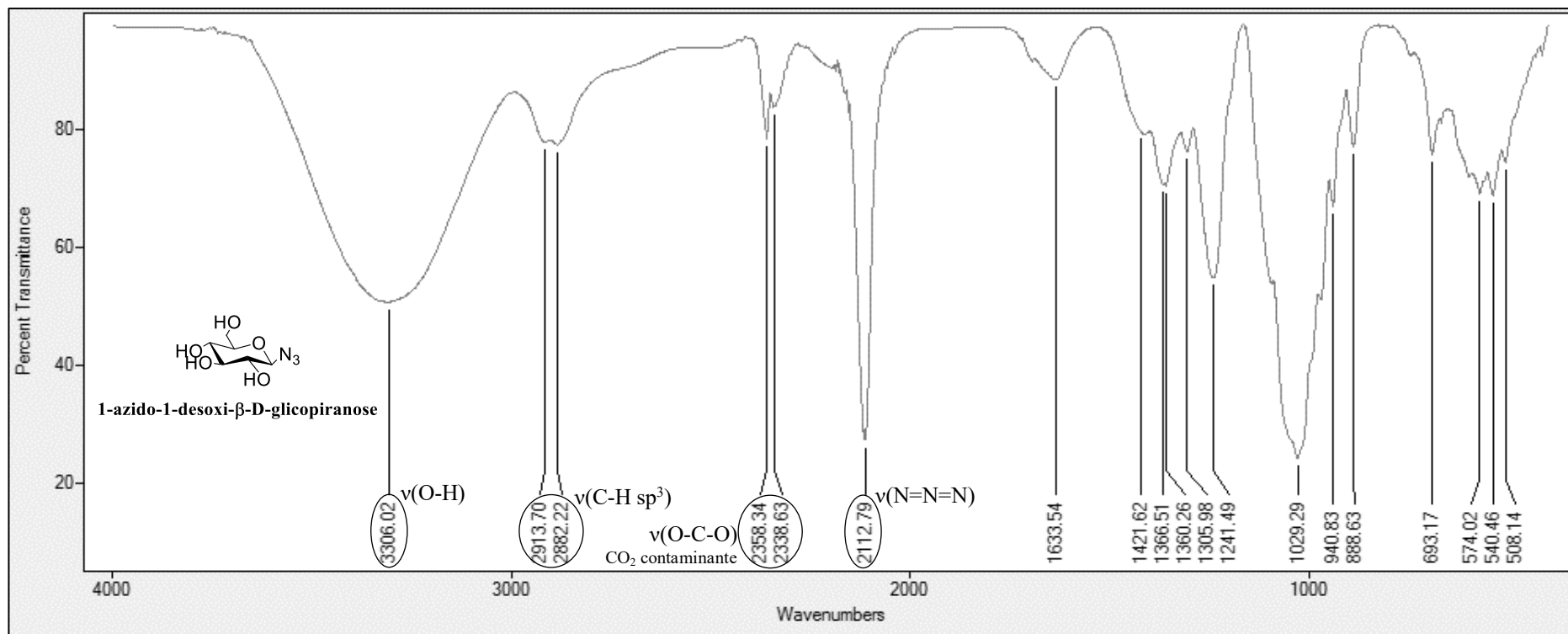
**Figura E-3.** Espectro de massas completo do produto obtido empregando a **metodologia e**. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

## APÊNDICE F

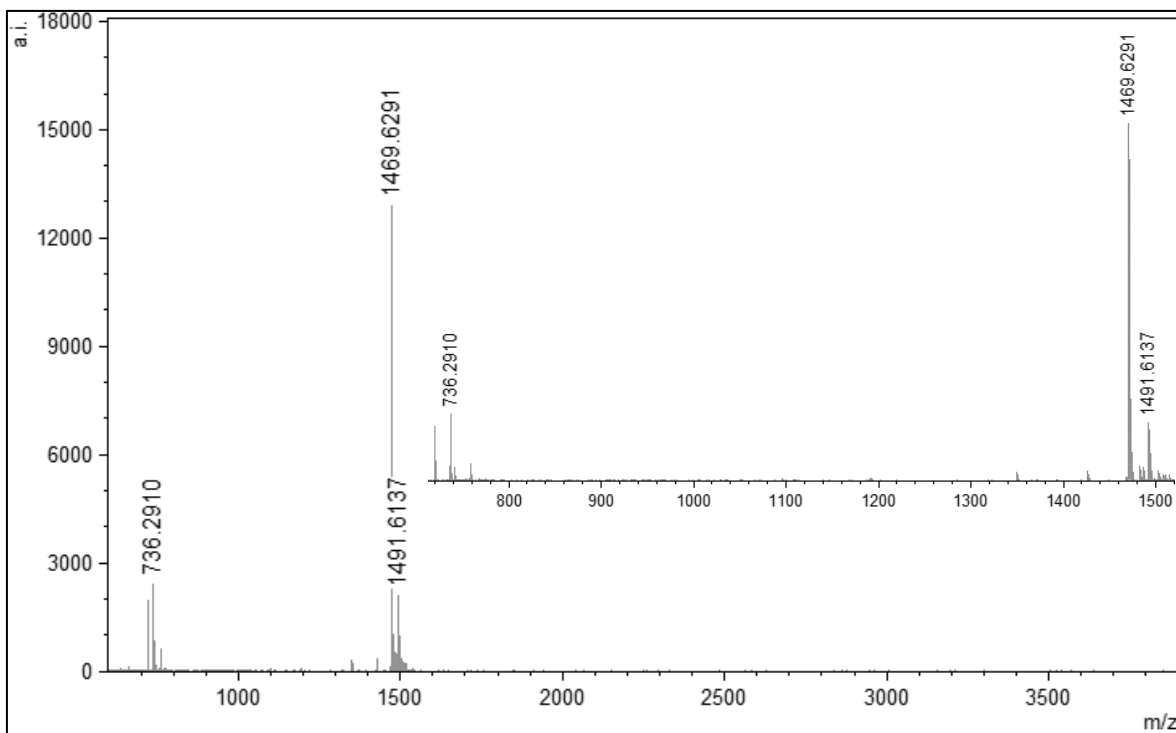
### Espectros relacionados à síntese do glicotriazol-peptídeo 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub>



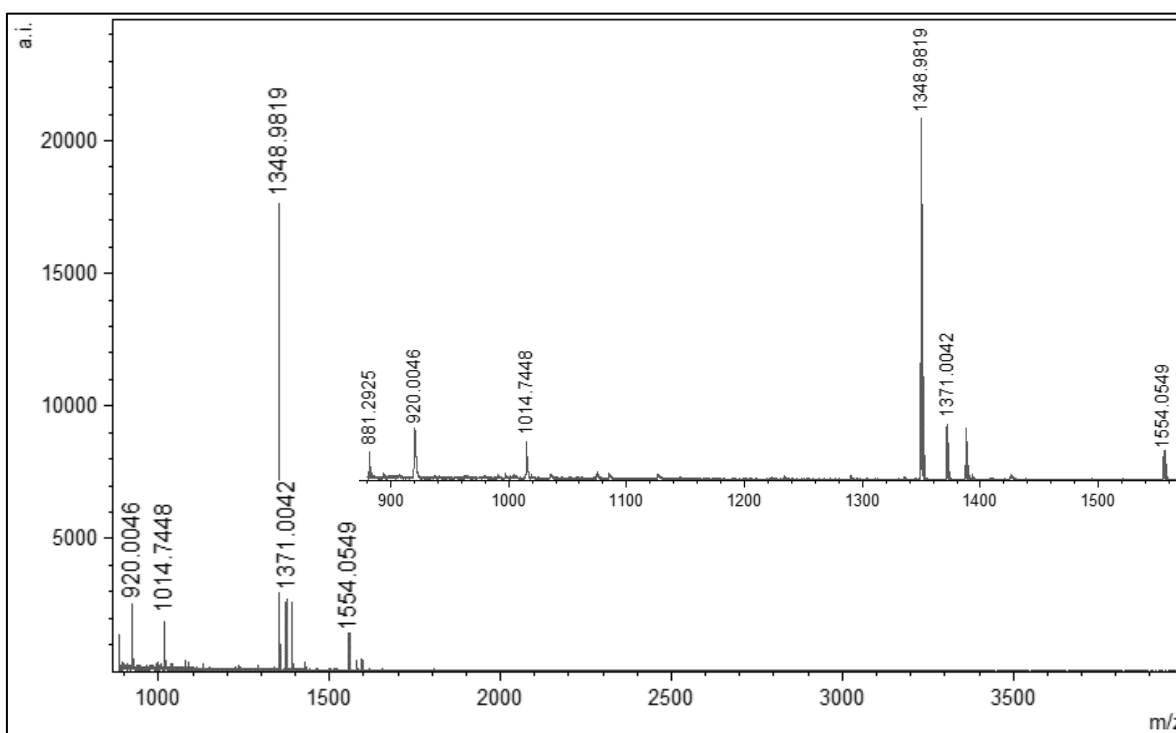
**Figura F-1.** Espectro de massas completo do produto obtido através da reação CuAAC, mostrando também a expansão na região entre m/z 1140-1420, cujos picos são referentes à reações incompletas, conforme discutido na seção 5.2.1. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.



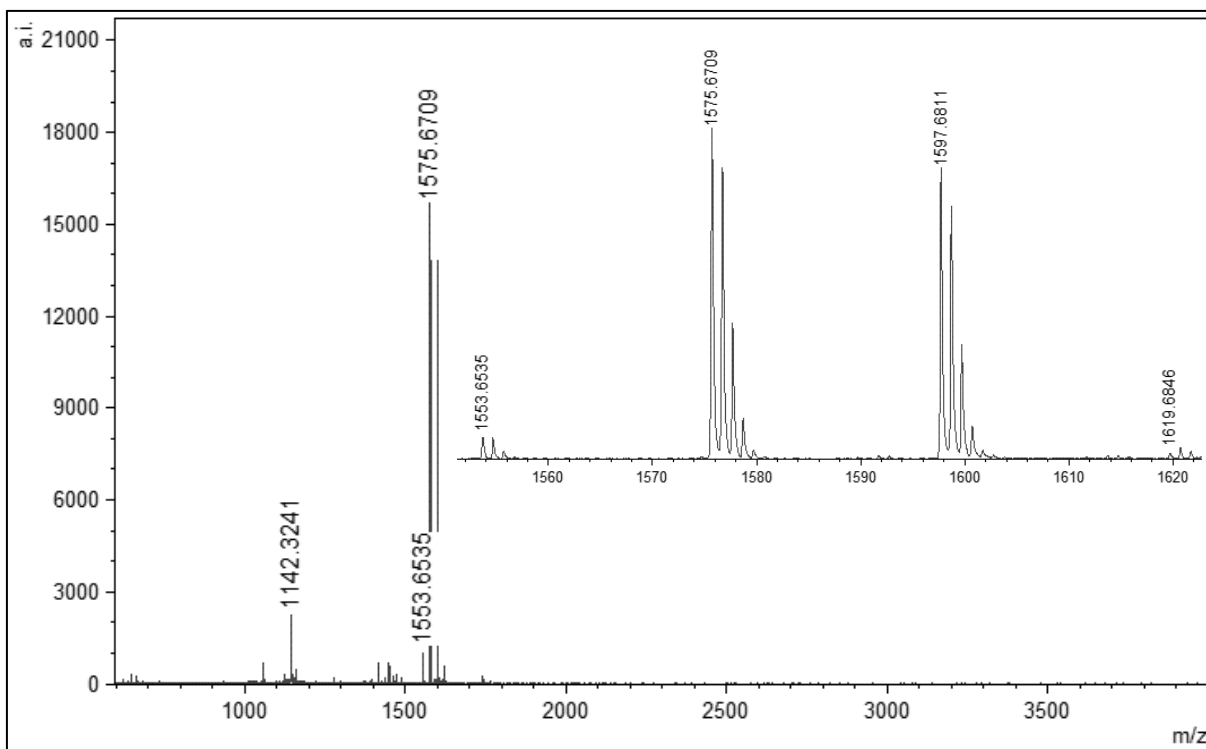
**Figura F-2.** Espectro na região do infravermelho da azidoglicose com as hidroxilas desprotegidas, juntamente com a representação estrutural do composto.



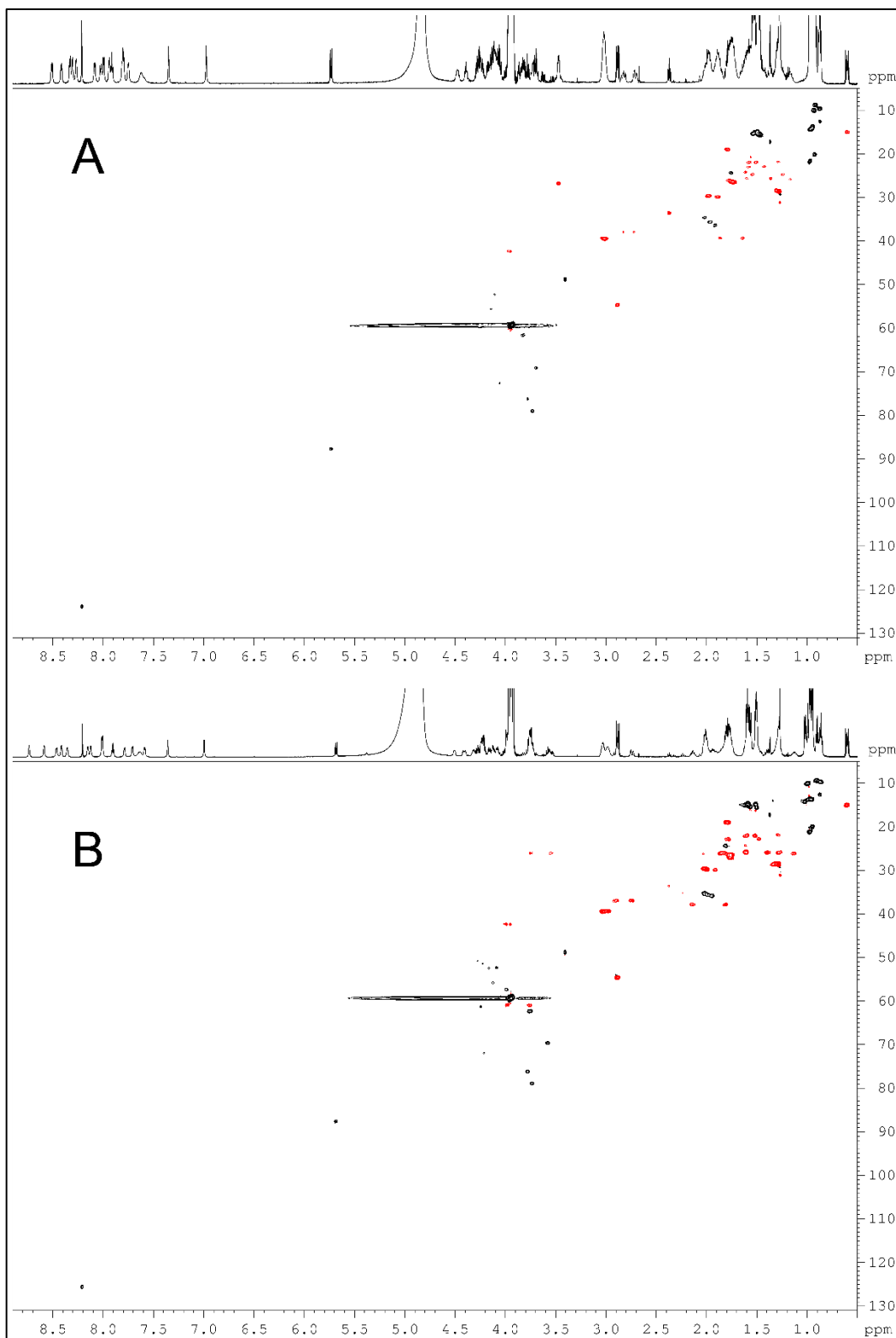
**Figura F-3.** Espectro de massas completo da **Fração 1-B** coletada na purificação de **I**, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  700-1550. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam® com potência de 40%.



**Figura F-4.** Espectro de massas completo de **Fração 2-B** coletada na purificação de **I**, mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  700-1550. Análise feita usando CHCA como matriz e laser SmartBeam® com potência de 40%.

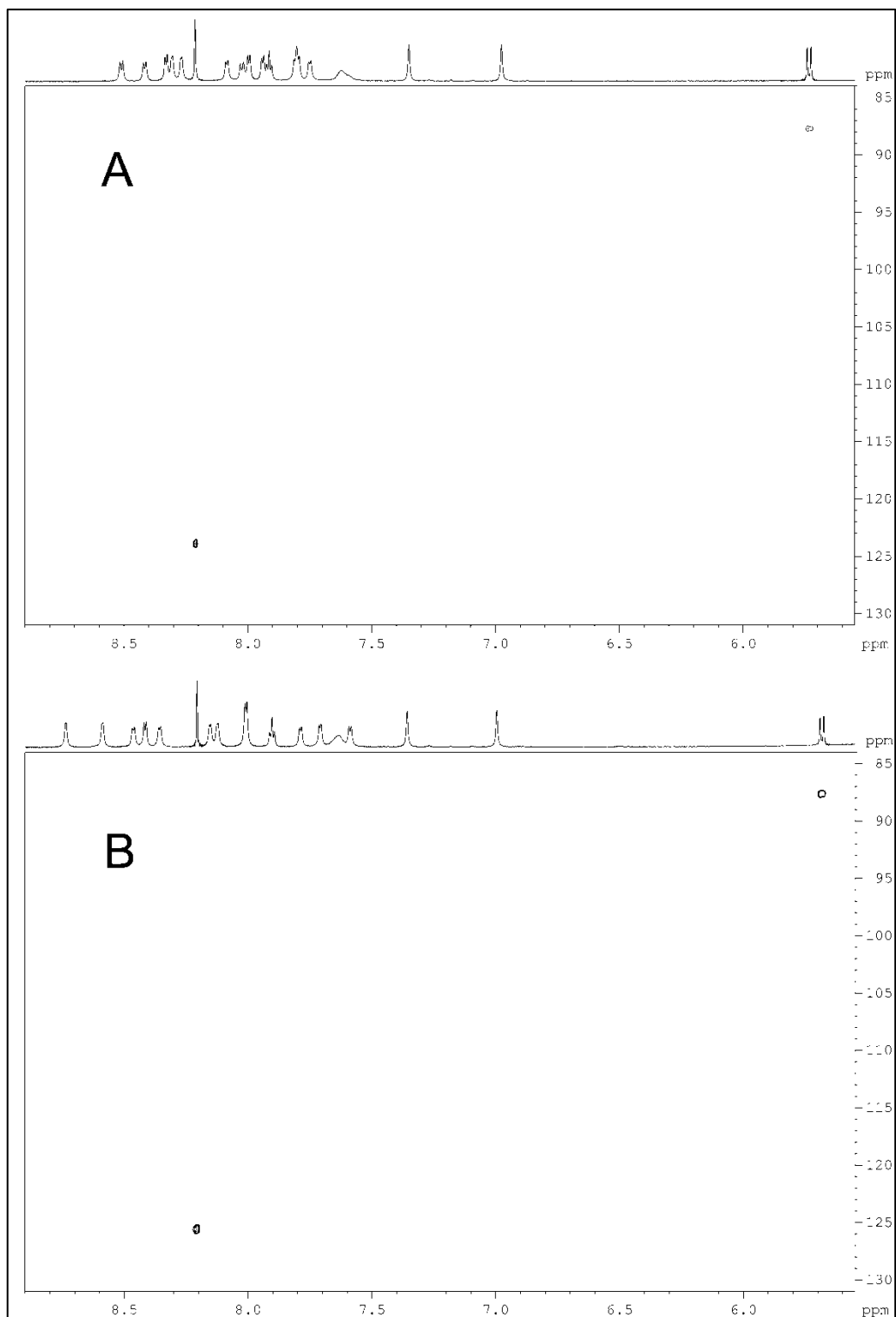


**Figura F-5.** Espectro de massas completo do produto obtido através da primeira reação CuAAC (empregando-se 1,8 equivalentes de azidoaçúcar) mostrando também a expansão na região entre  $m/z$  1150-1625, cujos picos são analisados de forma análoga àquela mostrada na **seção 4.2.1**. Análise feita usando DHB como matriz e laser SmartBeam<sup>®</sup> com potência de 40%.

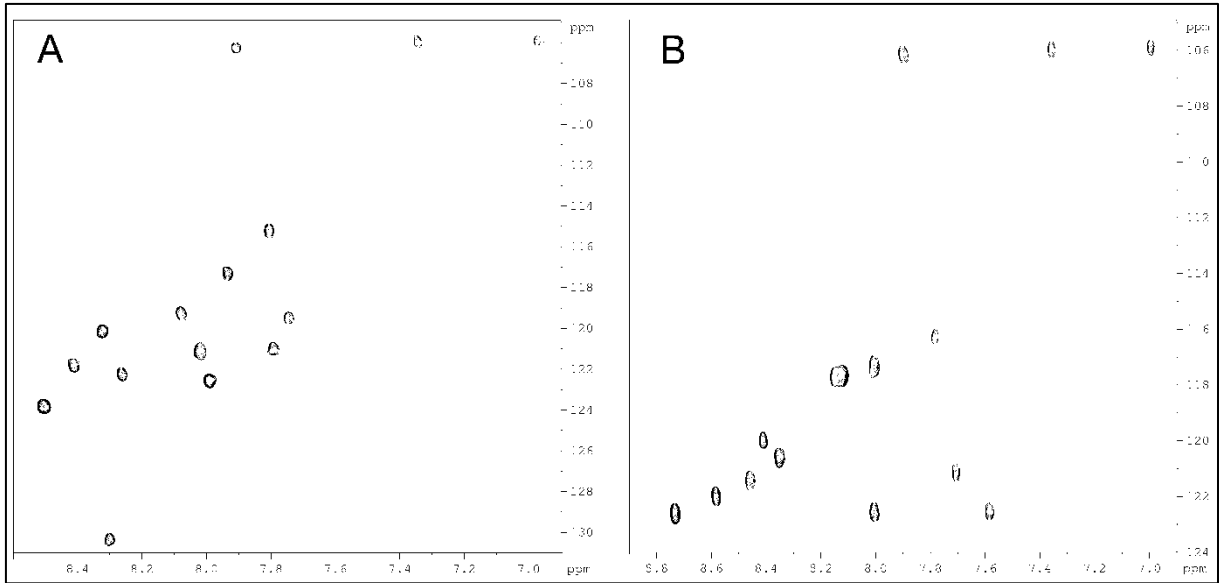


**Figura F-6.** Mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Correlações com fase positiva são apresentadas em preto (CH ou CH<sub>3</sub>) e correlações com fase negativa são apresentadas em vermelho (CH<sub>2</sub>).

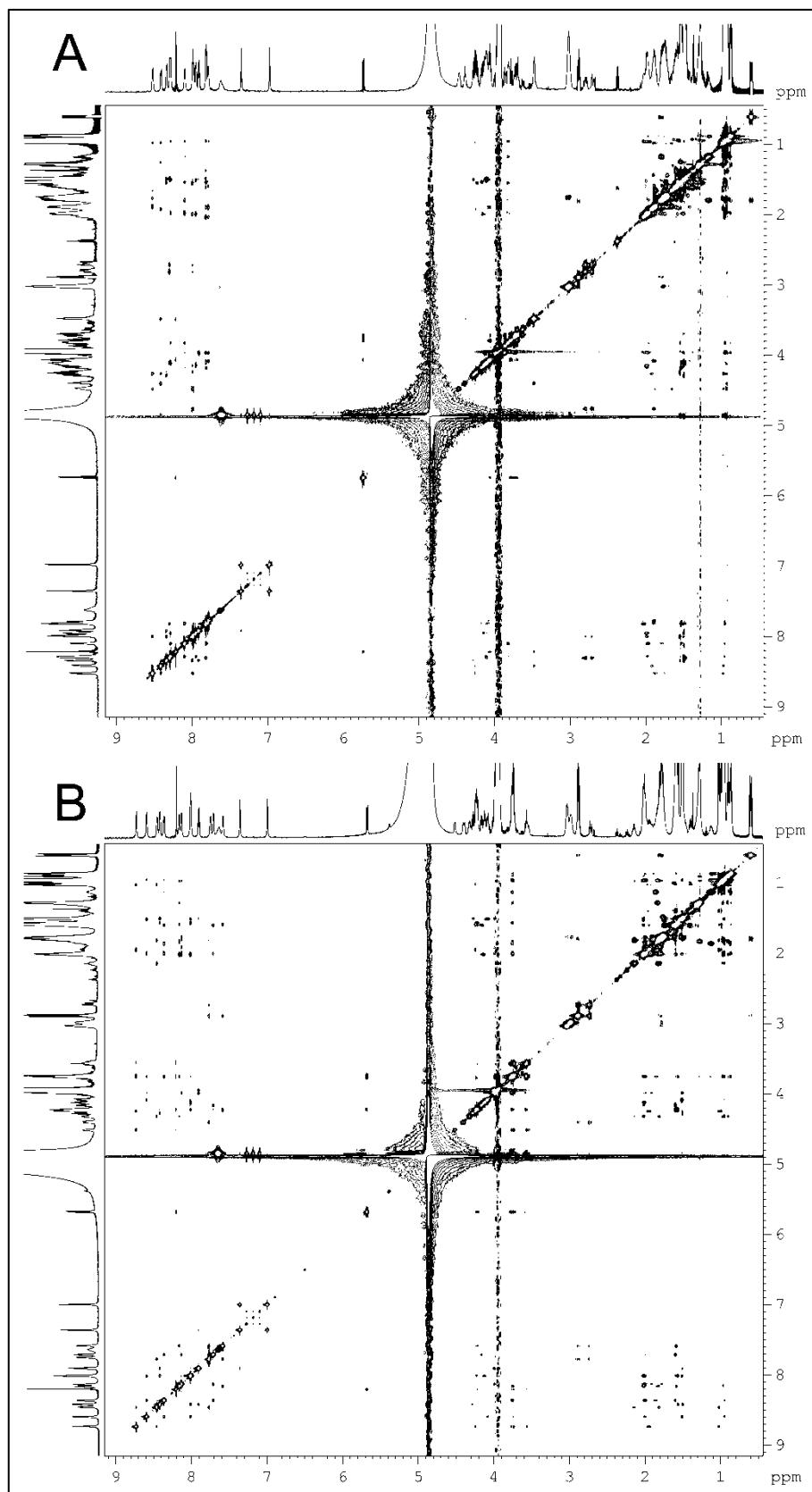




**Figura F-7.** Mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC parcial das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz). Nesta expansão são apresentadas as correlações entre os H e C anoméricos e triazólicos.



**Figura F-8.** Mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz).



**Figura F-9.** Mapas de contornos NOESY das amostras dos 1,4-GtP[Glc-1,4-trz-A<sup>1</sup>]HSP1-NH<sub>2</sub> (A) A e (B) B em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:50), a 20 °C, (600 MHz).

## ANEXO A

### Síntese do catalisador [RuCp\*(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

Metodologia de acordo com Tang e colaboradores (LIU et al., 2009), com algumas modificações. Esta etapa do trabalho foi realizada pelas colaboradoras Samara Ben Berg Bomjardim Bahia e Maria Helena de Araújo – Departamento de Química, UFMG.

Para a preparação do catalisador [RuCp\*(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] foi utilizado o complexo [RuCl<sub>2</sub>Cp\*]<sub>n</sub> (160mg, 0,3120 mmol) e zinco metálico (250 mg, 3,82 mmol), que foram deixados sob vácuo por 1 hora no balão Schlenk de reação. Adicionaram-se 20 mL de EtOH desgaseificado sob atmosfera inerte e, após aproximadamente 15 minutos, observou-se uma mudança de coloração da solução de castanho avermelhada para castanho esverdeado. A trifenilfosfina em lentilhas foi pulverizada e deixada à pressão reduzida em um Schlenk por alguns minutos e foi adicionada sólida à mistura reacional tendo-se imediatamente observado a mudança de cor para o laranja. Após 24 h sob agitação magnética à temperatura ambiente, filtrou-se a mistura da reação e o produto ficou retido na placa sinterizada, juntamente com o zinco. Solubilizou-se o composto com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e desgaseificado para um balão Schlenk. O solvente foi seco utilizando-se pressão reduzida, com auxílio de um trap auxiliar em linha dupla de vácuo/argônio, o produto foi então lavado com éter seco 4 x 10 mL, e secado em linha de vácuo.

O produto foi armazenado em um Schlenk sob atmosfera inerte, e deixado no congelador.

## ANEXO B

### **Síntese do azidoaçúcar 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosila.**

Metodologia de acordo com FRANCO et al., 2015. Esta etapa do trabalho foi realizada pelos colaboradores Lucas Lopardi Franco e Ricardo José Alves – Departamento de Farmácia, UFMG.

### **Síntese do 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosose**

Em um gral de vidro foram triturados 4 g de AcONa (48,76 mmol) e 5 g de d-glicose (27,74 mmol). Transferiu-se o material para um balão de fundo redondo de 250 mL e adicionaram-se 25 mL de Ac<sub>2</sub>O (264,47 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento (100 °C) por 3 horas. O monitoramento da reação foi feito por CCD (Hexano 6:4 AcOEt).

O produto bruto foi vertido em um béquer contendo cerca de 20 g de gelo picado e mantido sob agitação magnética por 1 hora. Foi observada a formação de um precipitado branco que foi filtrado e recristalizado em EtOH. Foram obtidos 9,38 g de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosose (88%).

### **Síntese do brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosila**

Em um balão de fundo redondo 250 mL foram solubilizados 4 g (10 mmol) de **23** em 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e, em seguida, adicionou-se uma solução previamente preparada de HBr em AcOH (25% v/v), gota a gota, a 0 °C. A solução foi mantida sob agitação magnética a 0 °C por 5 horas. O monitoramento da reação foi feito por CCD (Hexano 7:3 AcOEt).

Após observação do consumo completo da 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosose verteu-se o material em um béquer contendo cerca de 20 g de gelo picado e foi feita três extrações com 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica foi lavada com duas frações de 20 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e duas frações de 20 mL de água destilada. Em seguida a fase orgânica foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Foram obtidos 4 g de brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -d-glicopiranosila (95%) na forma de um sólido branco.

### **Síntese da 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -*D*-glicopiranosose**

Em um balão de fundo redondo 100 mL foram adicionados 0,64 g de azida de sódio (9,6 mmol) em 8 mL de água destilada e adicionaram-se uma solução contendo 4,8 mmol de brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glicopiranosila em 10 mL de acetona. Manteve-se a mistura sob agitação magnética à temperatura ambiente por cerca de 3 horas. O monitoramento da reação foi feito por CCD (Hexano 6:4 AcOEt).

Após observação do consumo do material de partida a acetona foi removida sob fluxo de ar e o precipitado branco formado foi filtrado e lavado com água gelada. Foram obtidos 1,48 g do produto (81%).

# ANEXO C

07/08/2019

RightsLink Printable License

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2019

This Agreement between Claudia ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4643671364541
License date	Aug 07, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Advances in Colloid and Interface Science
Licensed Content Title	The interaction of antimicrobial peptides with membranes
Licensed Content Author	Oksana G. Travkova,Helmuth Moehwald,Gerald Brezesinski
Licensed Content Date	Sep 1, 2017
Licensed Content Volume	247
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	12
Start Page	521
End Page	532
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Português
Original figure numbers	Fig. 1. Different models of antimicrobial peptide mode of action: A – barrel-stave, B – carpet, C – toroidal pore, D – molecular electroporation, E – sinking raft. The red part of the peptide represents a hydrophilic surface, while blue is hydrophobic.
Title of your thesis/dissertation	Estudos de síntese de glicotriazóis-peptídeos derivados do peptídeo antimicrobiano hilaseptina 1 e suas interações com membranas
Expected completion date	Aug 2019
Estimated size (number of pages)	102
Requestor Location	Claudia Rua Sena Madureira, 475  Belo Horizonte, Minas Gerais 31340-000 Brazil Attn: Claudia
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/5

## ANEXO D

18/02/2020

RightsLink Printable License

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 18, 2020

---

This Agreement between Claudia ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4664870002703
License date	Sep 09, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Quantitative Human Physiology
Licensed Content Author	Joseph Feher
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Licensed Content Pages	12
Start Page	130
End Page	141
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=7f936857-9026-4b22-a7a7-7e0693379c71>

1/7



Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Original figure numbers	Figure 2.3.12
Requestor Location	Claudia Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Pampulha Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 Brazil Attn: Claudia Rocha
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD

#### Terms and Conditions

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.