

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

Marco Aurélio Wust

**Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil-  
triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em meios  
miméticos de membrana.**

Belo Horizonte  
2017

Marco Aurélio Wust

**Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil-  
triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em meios  
miméticos de membrana.**

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 – Química  
Orgânica

W973e Wust, Marco Aurélio  
2017 Estudos estruturais por RMN do glicopiranosil-  
D triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em meios  
miméticos de membrana [manuscrito] / Marco Aurélio  
Wust. 2017.  
[xv], 78 f. : il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.  
Coorientador: Roberto Kopke Salinas.

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

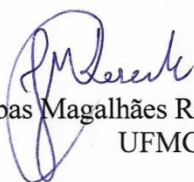
1. Química orgânica - Teses 2. Ressonância  
magnética nuclear - Teses 3. Peptídios - Síntese -  
Teses 4. Dicroísmo circular - Teses 5. Dinâmica  
molecular - Teses 6. Proteínas da membrana - Teses I.  
Resende, Jarbas Magalhães, Orientador II. Salinas,  
Roberto Kopke, Coorientador III. Título.

CDU 043

**"Estudos Estruturais por RMN do Glicopiranosil-triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em Meios Miméticos de Membrana"**

**Marco Aurélio Wust**

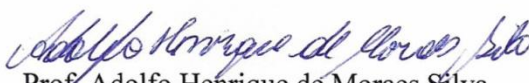
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador  
UFMG



Dr. Daniel Moreira dos Santos  
Fundação Ezequiel Dias



Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva  
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2017.

Essa dissertação foi realizada sobre a orientação do Professor Doutor Jarbas Magalhães Resende e sob co-orientação do Professor Doutor Roberto Kopke Salinas.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças, inteligência e disposição para realizar/finalizar este mestrado, porque sem Ele esse projeto não teria sido realizado.
- Agradeço à minha família por todo o apoio que me deram durante essa jornada e por não terem desistido de mim em nenhum momento, mesmo quando eu mesmo já tinha desistido de mim.
- Em especial, agradeço à minha mãe, Norma Wust, que, mesmo longe, sempre estava ao meu lado em todas as lutas e dificuldades que eu passei. Agradeço imensamente a ela por ter me convencido a acabar esse mestrado e por ter me dado suporte nos momentos mais difíceis da minha vida.
- Agradeço a Jessika Wust e Daniel Ribeiro por todo o companheirismo e ajuda que eles prestaram para mim durante todos esses anos.
- Agradeço ao meu orientador Jarbas Magalhães Resende por me instruir durante esse projeto. Sou grato pelas sugestões, conversas e apontamentos realizados nas várias etapas deste trabalho.
- Agradeço ao meu co-orientador Roberto Kokpe Salinas por ter me acompanhado durante os experimentos realizados na USP. A sua experiência e discussões sobre o projeto foram essenciais para a conclusão do mesmo.
- Agradeço aos meus colegas de laboratório: Carlos, Breno, Lídia, Karla e Virgílio. O auxílio de vocês durante diversas etapas deste projeto foi fundamental, agradeço por toda experiência e conhecimento compartilhado. Nunca irei me esquecer de vocês.
- Agradeço ao colaborador Francisco Gomes Neto (FIOCRUZ-RJ), que foi peça chave nos cálculos estruturais deste projeto. Obrigado pelas diversas discussões sobre o projeto por e-mail, telefone e skype.
- Agradeço ao professor Rodrigo Verly (UFVJM) por ter me instruído em um primeiro momento na didática dos cálculos, bem como no auxílio em como realizar diversas etapas deste projeto.
- Agradeço às professoras Rosemeire e Maria Helena de Araújo por terem me ajudado a ser o pesquisador que sou. Vocês foram verdadeiras tutoras na minha vida acadêmica.

- Agradeço todos da família Lopes: Rubens, Daniel e Rosiane. Vocês foram a minha família aqui em Belo Horizonte durante esses dois anos de mestrado.
- Agradeço a todos da família Dias: Carlos, Norma e Fernando. Vocês são importantes durante a minha jornada acadêmica e pessoal. Agradeço pela estadia na sua casa durante a época de experimentos na USP.
- Agradeço a todos da família Rego e Amend, por terem ajudado a minha mãe, pai e irmã em Londrina durante este período.
- Agradeço a todos os meus colegas do Departamento de Química da UFMG, mas em especial Bruna Terra e Poliane Chagas. As amizades de vocês foram uma das melhores coisas que aconteceram comigo aqui em Belo Horizonte.
- Agradeço às seguintes órgãos: CAPES, FAPEMIG, Rede Mineira de Química (RQ-MG) e PRPq-UFMG. Em especial à CAPES pela concessão da minha bolsa de mestrado e pelo projeto de Toxinologia número 063/2010.
- Agradeço às universidades UFMG e USP por possibilitarem a realização deste projeto.
- Em especial, agradeço à Danielle da Silva Alves dos Reis por me ensinar a ser uma pessoa melhor. Sua amizade foi ímpar para que eu soubesse como continuar a minha vida como pessoa e estar aqui agora.
- Agradeço à Amanda Cardoso por nestes últimos meses estar sempre ao meu lado, me ajudando em todas as etapas da minha vida. Obrigado por estar sendo essa pessoa maravilhosa comigo, nós nos conhecermos era uma das coisas na vida que não dá para explicar como aconteceu somente que era para acontecer.
- E finalmente agradeço ao meu pai: Alberto Luiz Candido Wust (*in memoriam*) que, apesar de sua condição de saúde no início deste mestrado não serem boas, sempre me motivou a correr atrás dos meus sonhos, independente da distância. Sua condição de saúde foi o que me fez seguir por essa jornada científica. Saiba que eu não vou parar de dar o meu melhor, porque um dia quero poder mudar a vida de pessoas como você. Sinto muito a sua falta e confesso que, durante alguns meses, pensei em desistir de tudo na minha vida, mas irei seguir o seu exemplo e utilizar a minha vida para mudar a vida das pessoas à minha volta. Até algum dia, te amo pai.

## RESUMO

### **Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil-triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em meios miméticos de membrana.**

Neste trabalho são investigadas e comparadas, de forma detalhada, modificações estruturais do derivado glicosilado da PS-2, a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, sendo empregadas, para tal objetivo, as espectroscopias de dicroísmo circular (CD) e de ressonância magnética nuclear (RMN). Primeiramente foi realizada a síntese do glicopiranosil-triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 empregando a estratégia Fmoc de síntese em fase sólida aliada a reação de cicloadição entre alcinos e azidas catalisada por cobre (I) (CuAAC). Em seguida, o produto foi purificado e caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (MS). Foram realizados estudos de preferências conformacionais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 por CD em diferentes meios e condições, como na presença de vesículas fosfolipídicas, micelas e em misturas de diferentes proporções de TFE:H<sub>2</sub>O. Os resultados obtidos a partir dessas análises indicaram um alto grau de estruturação helicoidal para condições comumente utilizadas em estudos de RMN em solução. Sendo assim, foram adquiridos espectros de RMN desse composto em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40) e na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>). Respectivas correlações foram assinaladas e as informações obtidas a partir dessas análises convertidas em restrições para cálculos estruturais. Foram realizadas análises comparativas entre as estruturas tridimensionais obtidas as estruturas da PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40) já relatadas na literatura, bem como entre as estruturas calculadas da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 nos diferentes meios analisados. Assim, os resultados apontam para diferenças mais pronunciadas para a porção C-terminal, sendo elas constituídas principalmente por diferentes orientações da porção glicosídica nos diferentes meios analisados e interações de stacking aromáticos entre os resíduos H-18 e F-19.

**Palavras chaves:** Peptídeos antimicrobianos, síntese em fase sólida, modificação estrutural, PS-2, Glicopiranosil-triazol-peptídeo e [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2.



## ABSTRACT

### **Structural NMR studies of Glycopyranosyl-triazole-peptide [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 in membrane mimetic environments.**

In this work, structural modifications of the glycosylated derivative of PS-2, [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, are investigated and compared in detailed by using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR). Firstly, glucopyranosyl-triazole-peptide [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 was performed employing a Fmoc strategy of solid phase synthesis associated with copper (I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction. The product was then purified and characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). The conformational preferences of [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 were investigated by CD in different environment and conditions, such as in the presence of phospholipid vesicles, micelles and in mixtures with different TFE:H<sub>2</sub>O ratios. The obtained results indicated high degrees of helical structure in the membrane media commonly used for NMR experiments. Thus, NMR spectra were obtained for the compound in TFE-*d*<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O (60:40) and in the presence of DPC-*d*<sub>38</sub> micelles (400 mmol.L<sup>-1</sup>). The respective correlations were assigned and the information obtained from these analyses were converted into geometric restrictions for structural calculations. Comparative analyses between the obtained three-dimensional structures and the ones of PS-2 in TFE-*d*<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O (60:40), already report in the literature, between the calculated structures of [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 in the different environment were performed. The obtained results point to more pronounced differences in the C-terminal portion, in which different orientations of the glycosidic group of the glucopyranosyl-triazole-peptide in the different environment analyzed and aromatic stacking interactions between the H-18 and F-19 residues are observed.

**Keywords:** Antimicrobial peptides, solid phase synthesis, structural modification, PS-2, glucopyranosyl-triazole-peptide and [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xv
OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Peptídeos.....	3
1.2 Peptídeos antimicrobianos .....	4
1.3 Filoseptina-2 .....	5
1.4 Estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida.....	6
1.4.1 Remoção do grupo Fmoc.....	10
1.4.2 Ativação do Fmoc derivado para reações de acoplamento.....	10
1.4.3 Clivagem do peptídeo da peptidil-resina.....	11
1.4.4 Teste de Kaiser .....	11
1.5 Reações “click” no desenvolvimento de peptídeos miméticos.....	12
1.6 Síntese em fase sólida aplicada à obtenção de Glicopeptídeos.....	15
1.7 Espectroscopia de Dicroísmo circular .....	18
1.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	19
1.8.1 RMN bi-dimensional .....	19
1.8.2 Assinalamento sequencial de peptídeos .....	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1 Obtenção do glicopiranosil-triazol-peptídeo .....	24
2.1.1 Síntese da cadeia polipeptídica.....	24

2.1.2	Teste de Kaiser .....	25
2.1.3	Acoplamento da porção glicosídica ao precursor peptídico utilizando reações do tipo CuAAC.....	26
2.1.4	Clivagem.....	26
2.1.5	Purificação do glicopiranosil-triazol-peptídeo por CLAE-FR e análise por EM .....	26
2.2	Preparo de vesículas fosfolipídicas.....	27
2.3	Dicroísmo circular .....	27
2.4	RMN em solução .....	28
2.5	Estrutura do glicopiranosil-triazol-peptídeo a partir de dados de nOe e deslocamento químico.....	30
3.	RESULTADOS .....	32
3.1	Obtenção do glicopiranosil-triazol-peptídeo .....	32
3.2	Dicroísmo circular .....	34
3.3	RMN em solução .....	37
3.3.1	Assinalamento dos sinais de RMN da cadeia polipeptídica.....	37
3.3.2	Assinalamento dos sinais do resíduo 3-[per- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazol]-Alanina.....	47
3.3.3	Determinação da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em solução de TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40) por RMN .....	50
3.3.4	Determinação da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) por RMN e sua comparação com a estrutura obtida em solução de TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40).....	58
4.	CONCLUSÃO.....	68
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
	ANEXO A .....	77
	ANEXO B .....	78

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D	Uni-dimensional
2D	Bi-dimensional
[pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2	[[3-per- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -glicopiranosil-1,4-triazol-alanina]-treonina <sup>14</sup> ]-Filoseptina-2
Boc	<i>t</i> -butiloxicarbolina
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
COSY	Espectroscopia de correlação, do inglês <i>correlation spectroscopy</i>
DBU	1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPC	Dodecilfosfocolina, do inglês <i>dodecylphosphocoline</i>
DQF-COSY	Espectroscopia de correlação com filtro de duplo quantum, do inglês <i>Double-quantum filtered COSY</i>
DSS	4,4-dimetil-4silapentano-1-sulfonato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
FID	Decaimento livre da indução, do inglês <i>free induction decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
FT	Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform</i>
GTP	Glicopiranosil-triazol-peptídeo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HSQC	Coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IPA	Álcool isopropílico, nome usual propan-2-ol
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
LUVs	Vesículas grandes unilamelares, dos inglês <i>large unilamellar vesicles</i>
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>

MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
m/z	Razão entre a massa e a carga
NOESY	Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PAM	Peptídeos antimicrobianos
PDB	Banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
RMSD	Raiz quadrada dos desvios médios quadrados, do inglês <i>root of mean square deviation</i>
SA	Arrefecimento simulado, do inglês <i>simulated annealing</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
THF	Tetraidrofurano
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFA	Ácido trifluoracético
TIS	Tri-isopropilsilano
TOCSY	Espectroscopia de correlação total, do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
$t_r$	Tempo de retenção
$\delta$	Deslocamento químico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modificação estrutural proposta neste trabalho. ....	3
Figura 2 - Representação da estrutura básica de um L-aminoácido, na projeção de Fischer. ....	4
Figura 3 - (A) Representação esquemática da metabolização do Prepropeptídeo da PS-2 até o peptídeo ativo. (B) Mecanismo bioquímico responsável pela amidação de peptídeos <i>in vivo</i> a partir da remoção de uma glicina na porção C-terminal, adaptada de KIM; SEONG, 2001. ....	5
Figura 4 - Peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3 e seus modos de interação propostos através de estudos topológicos, adaptada de RESENDE <i>et al.</i> , 2014. Reprodução autorizada (ANEXO A). ....	6
Figura 5 - Princípio da estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). O XtO-AA representado no acoplamento corresponde ao aminoácido ligado a um éster. ....	7
Figura 6 - Representação da variação do Rendimento global em função do rendimento médio por etapa de acoplamento para a obtenção de um peptídeo de dezenove resíduos via SPFS. ....	8
Figura 7 – Representação esquemática de uma etapa de remoção do grupo Fmoc, do acoplamento de um Fmoc resíduo de aminoácido e da etapa de clivagem da síntese do dipeptídeo Ala-Thr pela estratégia Fmoc de SPFS. ....	9
Figura 8 - Mecanismo genérico proposto para a reação de desproteção (remoção do grupo Fmoc), com piperidina em Fmoc-peptidil-resinas. ....	10
Figura 9 - Mecanismos genéricos propostos para a ativação do Fmoc resíduo de aminoácido e para a subsequente reação de acoplamento do respectivo éster ativado à peptidil-resina (estratégia DIC/HOBt). ....	11
Figura 10 - Mecanismo proposto para o teste de Kaiser. ....	12
Figura 11 - Esquema geral da reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre (I). ....	13
Figura 12 - Relação bioisostérica entre uma ligação amídica do tipo <i>trans</i> e um anel triazólico 1,4-disubstituído, adaptada de GUARNA; TRABOCCHI, 2014. ....	13
Figura 13 - Exemplos do emprego de anéis triazólicos 1,4-disubstituídos em química medicinal. (A) Modificação estrutural visando substituir uma ligação peptídica de um	

macrocíclico. (B) Modificação estrutural objetivando a formação de miméticos de dobras $\beta$ . (C) Modificação estrutural com o propósito de gerar um peptídeo mimético.	15
Figura 14 - Exemplos de importantes aminoácidos glicosilados já encontrados em <i>N</i> - e <i>O</i> -glicoproteínas. ....	16
Figura 15 – Exemplos de quebra da ligação glicosídica de <i>O</i> -Glicopeptídeos (A) na presença de meio ácido e (B) via reações de eliminação- $\beta$ na presença de meio básico. ....	17
Figura 16 - Estrutura genérica da cadeia principal de um sequência polipeptídica, com os ângulos $\Phi$ e $\Psi$ mostrados. ....	18
Figura 17 - Representação das transferências de magnetização por ligação química e pelo espaço. (A) Interação escalar <i>spin-spin</i> pela transmissão de polarização dos elétrons envolvidos na ligação química. (B) Interação direta dos <i>spins</i> pelo espaço. As setas indicam o caminho da transferência da magnetização.....	19
Figura 18 - Exemplos de experimentos bidimensionais de RMN para determinação do sistema de spins de resíduos em uma cadeia polipeptídica. Em preto e vermelho são mostrados as correlações COSY para o resíduo (i) e (i+1), respectivamente. Além das respectivas correlações em preto e vermelho, também acessíveis em espectros de TOCSY, são também observadas correlações em azul e verde para o resíduo (i) e (i+1), respectivamente. ....	20
Figura 19 - Representações de nOe típicas de estrutura secundária do tipo $\alpha$ -hélice. (A) Possíveis interações escalares e de nOe intra-residuais. (B) Possíveis interação nOe inter-residuais, adaptado de WÜTHRICH, 1986. (C) Representação tridimensional de cinco resíduos em uma $\alpha$ -hélice, a distancia entre o hidrogênio $\alpha$ de um resíduo e os hidrogênios amídicos dos quatro resíduos seguintes está assinalada na imagem.....	22
Figura 20 - Fmoc derivados de resíduos de aminoácidos utilizados na síntese do precursor peptídico .....	24
Figura 21 – Representação esquemática da reação de glicosilação utilizando Cu (II) e um agente redutor (Ascorbato de sódio).....	32
Figura 22 - Perfis de CLAE da amostra bruta (A) (semipreparativa) e da porção coletada ( $t_r$ :16,2 minutos) (B) (analítica). A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214$ nm. As setas representam o pico referente ao GTP.....	33

Figura 23 - Espectro de Massas (MALDI-ToF) da fração coletada ( $t_r$ : 16,4 minutos) na análise por CLAE-FR (analítica) da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2.....	34
Figura 24 – Espectros de CD da PS-2 (A) e da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 (B) em diferentes proporções de TFE:H <sub>2</sub> O (10,0 mM de tampão fosfato, pH 7,0). Quadro (A) adaptado de Resende <i>et al</i> , 2008, reprodução autorizada (ANEXO B). .....	35
Figura 25 – Espectros de CD da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 na presença de DPC (A) e de SDS (B). .....	36
Figura 26 - Espectro da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de vesículas grandes unilamelares de POPC (A) e de (POPC:POPG, 3:1) (B). .....	37
Figura 27 - (A) Ampliação do mapa de contornos TOCSY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 na região de deslocamento químico do H amídico com os demais resíduos do sistema de spins da valina-16. Espectro obtido para o GTP em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40, v/v), pH 7,0 em tampão fosfato 20mmol.L <sup>-1</sup> . As representações (B), (C) e (D) representam as conectividades determinadas nas respectivas correlações.....	39
Figura 28 - Mapa de contornos TOCSY do [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ), com as regiões características de correlações destacadas, conforme descrito na própria figura.....	40
Figura 29 - Mapas de contornos parciais TOCSY (à esquerda) e NOESY (à direita) do [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). .....	42
Figura 30 - (A) Mapa de contornos parcial NOESY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 na presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). (B) Representação tridimensional dos resíduos 7 a 11 em uma $\alpha$ -hélice. (C) Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 na presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) (D) Representação dos resíduos 7 a 11 em um segmento $\alpha$ -helicoidal. ....	44
Figura 31 - Mapas de contornos NOESY (A) parcial e <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC (B) do [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). .....	45
Figura 32 - Mapas de contornos parciais TOCSY (acima) e <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC (abaixo) da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). .....	47
Figura 33 - Representação do resíduo 3-[ <i>per-O</i> -acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazol]-Alanina, contendo o respectivo índice de nomenclatura. ....	48



Figura 34 - Mapa de contornos NOESY do [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ), com as regiões características correlação nOe assinaladas. ....	50
Figura 35 - Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). ....	51
Figura 36 - Sumário das principais conectividades nOe para a [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). ....	52
Figura 37 - Dez estruturas de menor energia obtidas para a [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). (A) Representação evidenciando os resíduos hidrofílicos. (B) e (C) Representação da interface dos resíduos polares e apolares. (D) Representação da porção C-terminal. As cadeias laterais dos resíduos apolares estão representados em azul e de resíduos polares em verde, sendo o resíduo 14 apresentado em vermelho. ....	53
Figura 38 - Qualidade estereoquímica das 10 estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). "Regiões mais favoráveis" são apresentadas em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" são representadas em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" representadas em bege e "regiões proibidas" representadas em branco. Dados obtidos com o uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI <i>et al.</i> , 1996). ....	54
Figura 39 - Superposição dos mapas de contornos <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 (em preto) e da PS-2 (em vermelho) em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), em pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ) (Adaptada de (RESENDE, 2008)). ....	56
Figura 40 –(A-D) Sobreposição da PS-2 (PDB 2JPY) (azul) e da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 (prata) em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). (A) Representação evidenciando a porção glicopiranosil-triazólica. (B) e (C) Representação lateral. (D) Representação da porção C-terminal. (E) Representação das dez estruturas mais estáveis apenas da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). O resíduo 14 da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 é apresentado em vermelho. ....	57
Figura 41 - Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). ....	59
Figura 42 - Mapa de contornos parcial NOESY da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). ....	60

Figura 43 - Sumário das principais conectividades nOe para a [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 na presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) .....	61
Figura 44 - (A-D) Dez estruturas de menor energia obtidas para a [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) (A) Representação evidenciando os resíduos hidrofílicos. (B) e (C) Representação da interface dos resíduos polares e a apolares. (D) Representação da porção C-Terminal. (E) Representação da porção N-terminal da estrutura de menor energia. As cadeias laterais dos resíduos apolares estão representadas em azul e de resíduos polares em verde, sendo o resíduo 14 apresentado em vermelho. (F) Representação da estrutura tridimensional gerada pelo <i>software</i> Pymol evidenciando a descrição da $\alpha$ -hélice. ....	62
Figura 45 - Qualidade estereoquímica das dez estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). "Regiões mais favoráveis" são apresentadas em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" são representadas em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" representadas em bege e "regiões proibidas" representadas em branco. Dados obtidos com o uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI <i>et al.</i> , 1996). ....	63
Figura 46 - Superposição dos mapas de contornos <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), em pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ) (em preto) e em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) (em vermelho).....	65
Figura 47 - Sobreposição das estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ) (em vermelho) e em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ) (em verde). (A) Representação evidenciando a porção glicopiranosil-triazólica. (B) e (C) Representação lateral. (D) Representação da porção C-terminal. (E) Representação das diferenças da porção glicopiranosil-triazólica com a porção C-terminal. ....	66
Figura 48 - Mapas de contornos (A) NOESY e (B) <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC parciais da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). (C) Representação dos resíduos H-18 e F-19 das dez estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de vesículas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). (D) Representação dos resíduos 18 e 19 com os nomes dos átomos indicados. ....	67

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Seqüência primária da Filoseptina-2 (PS-2) e da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2....	2
Tabela 2 - Deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C determinados para o resíduo glicotriazólico da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40) e na presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> . .....	49
Tabela 3 - Sumário das estatísticas estruturais da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em TFE- <i>d</i> <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L <sup>-1</sup> ). .....	55
Tabela 4 - Sumário das estatísticas estruturais da [pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2 em presença de micelas de DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (400 mmol.L <sup>-1</sup> ). .....	64

## OBJETIVOS

### - Objetivo geral:

Realizar estudos estruturais do peptídeo [3-per-*O*-acetil- $\beta$ -glicopiranosil-1,4-triazol-alanina<sup>14</sup>]filoseptina-2, [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, em meios miméticos de membrana, utilizando as espectroscopias de dicroísmo circular (CD) e de ressonância magnética nuclear (RMN) e comparar com as estruturas obtidas com as do peptídeo nativo filoseptina-2 (PS-2).

### - Objetivos específicos:

- Sintetizar manualmente a cadeia polipeptídica utilizando a metodologia de síntese em fase sólida (SPFS), empregando-se a estratégia Fmoc.
- Aplicar a reação “*click*” catalisada por cobre (I) na glicosilação da cadeia polipeptídica.
- Purificar e caracterizar o glicopiranosil-triazol-peptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.
- Avaliar a estruturação do glicopiranosil-triazol-peptídeo em diferentes meios miméticos de membrana por espectroscopia de dicroísmo circular. Estes estudos são propostos para o GTP em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O, na presença de micelas detergentes e na presença de vesículas fosfolipídicas.
- Obter espectros de RMN que possibilitem o assinalamento completo da molécula estudada, para que se possibilite obterem dados espectrais que serão convertidos em restrições em cálculos estruturais. Esses estudos são propostos em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O e na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub>.
- Realizar cálculos estruturais a partir dos dados experimentais obtidos por RMN e comparar os resultados obtidos com as estruturas do peptídeo nativo PS-2, já relatadas na literatura.
- Comparar as modificações estruturais observadas para as estruturas tridimensionais do GTP nos diferentes meios.

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos há aproximadamente 90 anos propiciou o início de um momento de inovação e implementação desses compostos em diversas áreas, como na saúde, veterinária e agricultura, tendo sido, por sua vez, observado o surgimento de resistências antimicrobianas com o passar dos anos (LIVERMORE, 2009; MARSTON *et al.*, 2016; WRIGHT, 2007). Entretanto, um estudo realizado em 2011 de análises genéticas com DNA de 30 mil anos atrás revela que a resistência antimicrobiana é algo muito mais antigo do que a próprio surgimento dos antibióticos comerciais (D’COSTA *et al.*, 2011). Com isso são propostas estratégias para a criação de novos fármacos antibacterianos e antifúngicos, que possam ser efetivos contra o maior espectro possível de patógenos. Dentre as possíveis abordagens a serem utilizadas, os peptídeos antimicrobianos aparecem como uma interessante abordagem, pois em geral a ação desta classe de compostos é destinada a membrana plasmática das bactérias (SABERWAL; NAGARAJ, 1994).

Neste trabalho, foi proposta a modificação estrutural da PS-2, um peptídeo originalmente isolado da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis*, cuja estrutura tridimensional e a topologia de interação com membranas já foram investigadas pelo nosso grupo de pesquisa (LEITE *et al.*, 2005; RESENDE *et al.*, 2008, 2014). A modificação estrutural proposta consiste na substituição do resíduo de aminoácido de Thr-14, do peptídeo nativo, por um resíduo glicopiranosil-triazólico, para se obter o derivado glicopiranosil-triazol-peptídeo: [3-per-*O*-acetil- $\beta$ -glicopiranosil-1,4-triazol-alanina<sup>14</sup>]filoseptina-2, [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 (Tabela 1), que terá suas preferências estruturais e suas interações com membranas avaliadas pelas espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN) e de dicróismo circular (CD).

Tabela 1 - Seqüência primária da Filoseptina-2 (PS-2) e da [pOAcGlc-trz-A14]PS-2.

Peptídeo	Seqüência
Filoseptina-2 (PS-2)	FLSLIPHAINAVSTLVHFF-NH <sub>2</sub>
[pOAcGlc-trz-A <sup>14</sup> ]PS-2	trz(pOAcGlc)   FLSLIPHAINAVSALVHFF-NH <sub>2</sub>

\*-NH<sub>2</sub>: amidação C-terminal; trz: anel triazólico; (pOAcGlc): *D*-glicose peracetilada

Em ensaios biológicos, a PS-2 se mostrou ativa contra fungos e bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas, sendo que a inserção da unidade glicosídica em sua estrutura visa o aumento das atividades antibacteriana e antifúngica, em relação ao peptídeo nativo. Do ponto de vista biológico, outra vantagem desse tipo de glicosilação em comparação às apresentadas até agora, se deve ao fato de que a unidade glicopiranosil-triazólica não é substrato para as principais enzimas glicosídases. Uma representação da modificação estrutural proposta neste trabalho é apresentada na Figura 1.

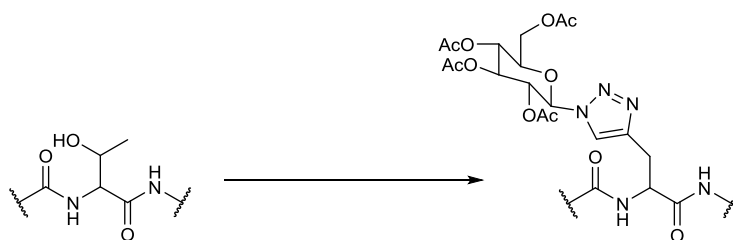


Figura 1 - Modificação estrutural proposta neste trabalho.

Nos itens subsequentes serão introduzidos os tópicos relacionados à química de peptídeos, às características gerais de peptídeos antimicrobianos, informações estruturais da PS-2, a síntese de peptídeos em fase sólida, temas relacionados à modificação estrutural proposta e métodos espectroscópicos utilizados em estudos estruturais de biomoléculas.

### 1.1 Peptídeos

Peptídeos são biopolímeros formados pela junção de unidades monoméricas, os aminoácidos. Na natureza é possível identificar diversos aminoácidos, sendo que vinte deles são à base de construção para a maioria das sequências peptídicas. A ligação desses aminoácidos é feita através da formação de uma ligação amida, proveniente da condensação de um grupo amino de um aminoácido com uma carboxila de outro aminoácido, tendo-se a eliminação de uma molecular de água. Cada aminoácido possui um uma porção comum, formada por um grupo amino, ácido carboxílico, carbono alfa e hidrogênio alfa, e uma porção variável, denominada de cadeia lateral (Figura 2, p. 4 ).

Diferentes classificações são realizadas em relação a aspectos estruturais envolvendo peptídeos (NELSON; COX, 2015). A sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica é denominada de estrutura primária, sendo esse o nível estrutural

mais simples, mas de suma importância, pois todos os outros níveis terão dependência da estrutura primária. A estrutura secundária é relacionada a arranjos particularmente estáveis de segmentos de cadeia polipeptídica, que apresentam padrões estruturais recorrentes. A estrutura terciária descreve o arranjo tridimensional de uma cadeia polipeptídica. Por fim, a estrutura quaternária descreve o arranjo espacial de uma proteína, ou peptídeo, que contém mais de uma subunidade polipeptídica.

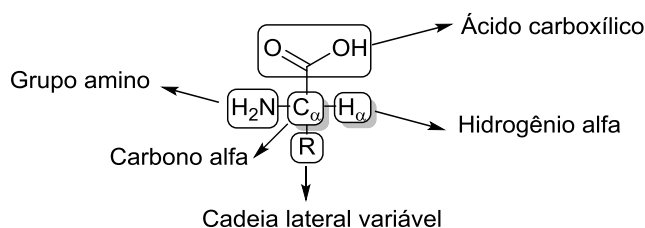


Figura 2 - Representação da estrutura básica de um L-aminoácido, na projeção de Fischer.

## 1.2 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos originados de plantas ou animais apresentam, em grande parte dos casos, algumas características em comum: possuem de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, são anfipáticos e possuem uma característica catiônica devido ao excesso de resíduos de lisina, arginina e histidina (HANCOCK; SCOTT, 2000). Modelos apontam a carga positiva líquida dos peptídeos antimicrobianos como essencial na atração inicial dos peptídeos pelas membranas bacterianas e de outros organismos, os quais apresentam uma superfície carregada negativamente, devido à presença de grupos fosfatos carregados negativamente (BECHINGER, 2004). Por exemplo, estudos realizados com o peptídeo antimicrobiano dermaseptina S4 correlacionam a presença da carga líquida positiva do peptídeo com sua seletividade do perante membranas bacterianas (LORIN *et al.*, 2005).

É possível observar diferentes motivos estruturais nos peptídeos antimicrobianos, como – por exemplo –  $\alpha$ -hélices, conformações  $\beta$  e estruturas estendidas (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Dentre esses, o motivo estrutural mais encontrado é o de  $\alpha$ -hélice. Normalmente, em solução aquosa, essas estruturas possuem estrutura randômica e ao se ligarem às membranas bacterianas se organizam em um motivo estrutural do tipo  $\alpha$ -hélice (GUSMÃO *et al.*, 2017).

### 1.3 Filoseptina-2

A Filoseptina-2 (PS-2) foi originalmente isolada da espécie de anuro *Phyllomedusa hypochondrialis* (LEITE *et al.*, 2005). Estudos de sequenciamento genético mostraram que este peptídeo é derivado do gene *psn2* (CHEN *et al.*, 2006). Um esquema básico sobre a metabolização do prepropeptídeo até a formação do peptídeo PS-2 é apresentada na Figura 3. Uma característica observada para a PS-2, e que é comum para vários peptídeos antimicrobianos, é a amidação C-terminal. *In vivo* é proposto que esta modificação é resultado da ação sequencial de duas enzimas, a Peptidilglicina  $\alpha$ -hidroxilação monooxigenase (PHM) e a Peptidil  $\alpha$ -hidroglicina  $\alpha$ -amidação liase (PAL) (KIM; SEONG, 2001; MERKLER, 1994). Esta modificação estrutural é favorável na geração de peptídeos antimicrobianos, uma vez que a carga negativa observada na posição C-terminal é retirada.

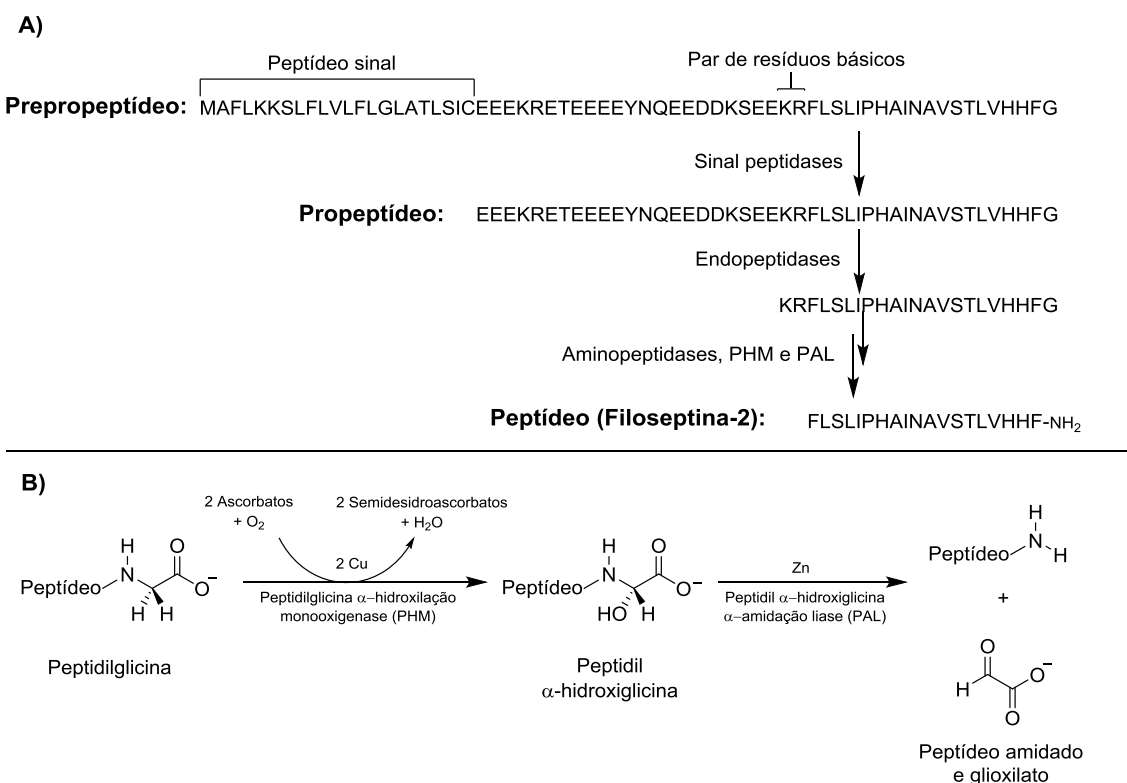


Figura 3 - (A) Representação esquemática da metabolização do Prepropeptídeo da PS-2 até o peptídeo ativo. (B) Mecanismo bioquímico responsável pela amidação de peptídeos *in vivo* a partir da remoção de uma glicina na porção C-terminal, adaptada de KIM; SEONG, 2001.

Nosso grupo de pesquisas realizou previamente inúmeros estudos estruturais e de interação com membranas com o peptídeo PS-2 e com outros dois peptídeos, a saber PS-1 e PS-3, sendo observada alta homologia entre as três seqüências peptídicas (74%



de homologia) (RESENDE *et al.*, 2008)(RESENDE *et al.*, 2014). Os resultados obtidos indicaram que a PS-2 apresenta maior afinidade por modelos miméticos de membranas, bem como possui maior grau de estruturação e atividades mais pronunciadas que os outros dois peptídeos. Uma análise detalhada da topologia de interação desses três peptídeos com modelos miméticos de membrana indica que o resíduo de Thr-14 desempenha um papel importante na interação mais favorável da PS-2, pois esse resíduo hidrofílico se encontra na interface polar da membrana (Figura 4), ao passo que os peptídeos PS-1 e PS-3 possuem um resíduo hidrofóbico de Ala na posição 14, o qual fica exposto à porção hidrofílica da interface.

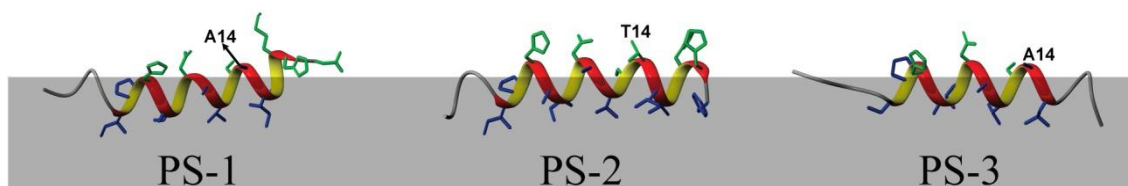


Figura 4 - Peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3 e seus modos de interação propostos através de estudos topológicos, adaptada de RESENDE *et al.*, 2014. Reprodução autorizada (ANEXO A).

#### 1.4 Estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida

Para estudos estruturais de peptídeos é necessário utilizar metodologias, que produzam quantidades satisfatórias dessas biomoléculas, já que as mesmas se encontram em baixa concentração em fontes naturais, dificultando o isolamento e purificação destas biomoléculas em quantidades suficientes. Dentre as metodologias disponíveis para a síntese de peptídeos, a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963) apresenta-se como uma importante ferramenta na obtenção de sequências peptídicas convencionais e até as não usuais, como – por exemplo – sequências contendo *D*-aminoácidos, aminoácidos não naturais, modificações na cadeia principal e nas extremidades carboxi e amino-terminais (AMBLARD *et al.*, 2006).

A SPFS é realizada com o auxílio de uma resina sólida polimérica insolúvel, a qual possui grupos funcionais, que propiciam as ligações covalentes de resíduos de aminoácidos à resina (Figura 5, p. 7). As reações de acoplamento, nas quais são acrescentados novos resíduos de aminoácidos à cadeia peptídica, são realizadas em um solvente ou mistura de solventes orgânicos, que fica em contato direto com a resina. O objetivo de se utilizar um suporte polimérico insolúvel para a síntese de peptídeos é a facilidade de separação do produto (peptidil-resina) dos demais reagentes, após cada etapa de acoplamento, já que o a cadeia peptídica de interesse fica ligada a resina

durante todo o processo de construção da sequência peptídica e uma simples filtração é capaz de retirar os solventes utilizados nas reações. Outra vantagem na utilização de suportes poliméricos é na possibilidade de utilizar condições mais severas que aquelas comumente empregadas em solução.

Um princípio geral da obtenção de uma cadeia peptídica pela SPFS é que resíduos de aminoácidos contendo o grupo amino protegido são ligados à resina ou peptidil-resina pelo grupo carboxila. Após confirmação de uma etapa de acoplamento, promove-se a retirada do grupo amino-protetor, podendo-se então realizar a etapa subsequente de acoplamento. Além da proteção do grupo amino, grupos reativos de cadeias laterais de aminoácidos devem estar protegidos durante todas as etapas de síntese da cadeia polipeptídica, a fim de se evitarem reações indesejadas. Geralmente, a escolha da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais é realizada com o objetivo que esses grupos sejam removidos de forma simultânea ao final da síntese (CHAN; WHITE, 2000).

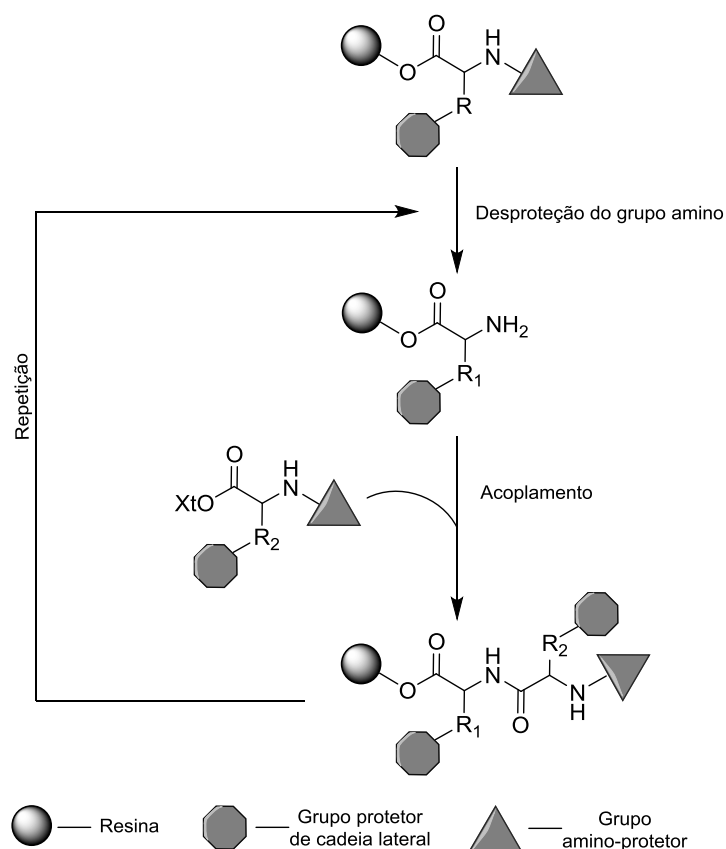


Figura 5 - Princípio da estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). O XtO-AA representado no acoplamento corresponde ao aminoácido ligado a um éster.

Uma característica importante da SPFS é o uso de excessos de reagentes nas etapas de acoplamento, já que até pequenas quedas de rendimento nas etapas de

acoplamento podem resultar em rendimentos globais muito pequenos, considerando-se o caráter cumulativo das perdas em cada uma dessas etapas. Na Figura 6 é apresentada a simulação da variação de rendimento global em relação ao rendimento médio de cada acoplamento para um peptídeo de dezenove resíduos. O perfil exponencial do gráfico mostra a importância de obter altos rendimentos médios, para que, ao final da síntese, obtenham-se quantidades satisfatórias do peptídeo.

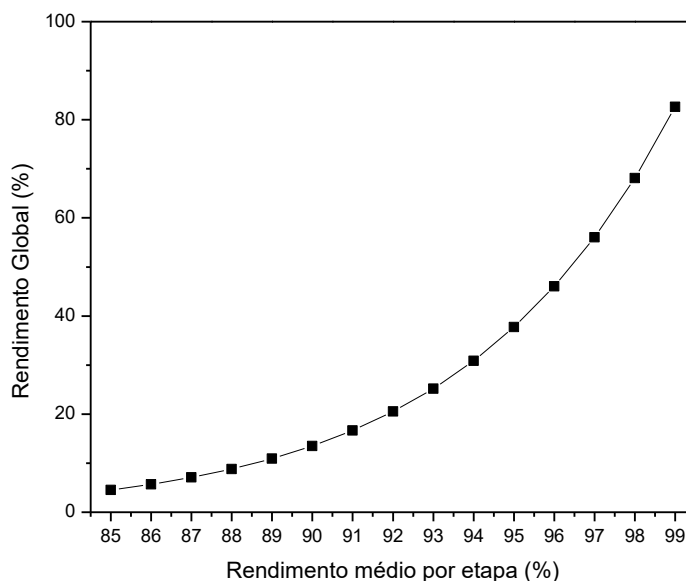


Figura 6 - Representação da variação do Rendimento global em função do rendimento médio por etapa de acoplamento para a obtenção de um peptídeo de dezenove resíduos via SPFS.

Atualmente as duas estratégias mais comuns na SPFS são a estratégia Boc e a Fmoc. Na estratégia Boc são utilizados grupos protetores, que são removidos por soluções ácidas, geralmente ácido trifluoracético (TFA), em diclorometano ou em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Para as cadeias laterais reativas, o grupo protetor utilizado, geralmente, é um derivado do grupo benzila; para o grupo amino é utilizado o *t*-butiloxicarbolina (Boc). Anteriormente, o reagente de acoplamento utilizado era o hexilcarbodiimida (DCC) em DCM, mas atualmente são utilizados anidridos simétricos pré-formados, ésteres ativos em DMF ou em *N*-metilpirrolidona (NMP) em DMF (STEWART, 1976). A clivagem do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais são conduzidas em condições ácidas mais severas como – por exemplo – fluoreto de hidrogênio anidro.

Por sua vez, a estratégia Fmoc emprega o grupo 9-fluorenil-metiloxicarbolina (Fmoc) como protetor do grupo amino, o que apresenta uma vantagem interessante dessa estratégia em relação à estratégia Boc. O grupo Fmoc é removido pelo tratamento com soluções básicas, sendo geralmente utilizada uma solução de 4-metilpiperidina em DMF. Como todos os grupos protetores de cadeias laterais são estáveis em meio básico, sendo apenas removidos por soluções ácidas, a estratégia Fmoc de SPFS propicia uma maior seletividade nas reações, preservando os grupos laterais durante toda a síntese e possibilitando o uso de metodologias mais brandas na clivagem do peptídeo da resina. Os grupos protetores das cadeias laterais utilizados na estratégia Fmoc são os grupos *t*-butila e tritila, esses são facilmente removidos com o emprego de TFA, o que confere um caráter ortogonal a essa estratégia de síntese de peptídeos.

Na Figura 7 a diferentes etapas da SPFS empregando a estratégia Fmoc são ilustradas para o exemplo da obtenção de um dipeptídeo.

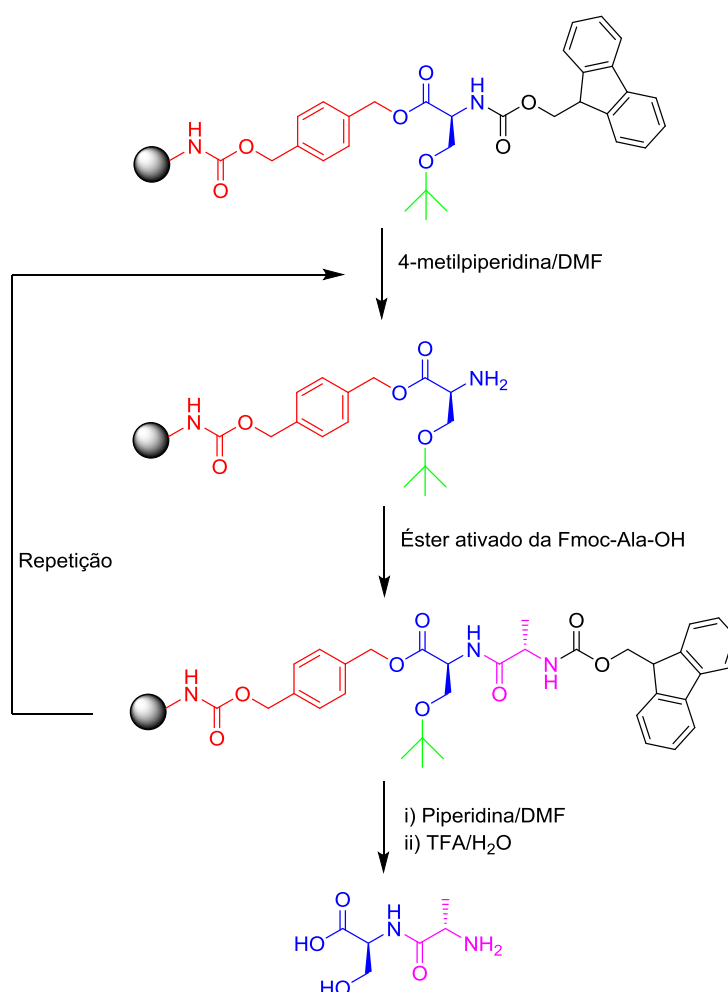


Figura 7 – Representação esquemática de uma etapa de remoção do grupo Fmoc, do acoplamento de um Fmoc resíduo de aminoácido e da etapa de clivagem da síntese do dipeptídeo Ala-Thr pela estratégia Fmoc de SPFS.

### 1.4.1 Remoção do grupo Fmoc

Na estratégia Fmoc de SPFS a desproteção é geralmente realizada com uma solução de 20-50 % de 4-metilpiperidina em DMF (Figura 8). A etapa limitante do processo é a desprotonação do anel fluoreno e a formação do ânion estabilizado pela ressonância dos anéis aromáticos do grupo Fmoc (CHAN; WHITE, 2000). Pode-se considerar essa reação como uma eliminação como uma reação do tipo E1cb, devido à sua cinética (VRANKEN; WEISS, 2012). Para a maioria dos peptídeos, a desproteção com piperidina é efetiva, mas pode ser necessário aumentar o tempo da reação de desproteção ou utilizar uma base mais forte como – por exemplo – 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) para sequências maiores. Nesses casos são acrescentados 2 % de 4-metilpiperidina, pois ela possui uma função de sequestrador, importante para não permitir a alquilação do peptídeo pelo produto dibenzofulveno gerado na reação de desproteção (KATES *et al.*, 1996).

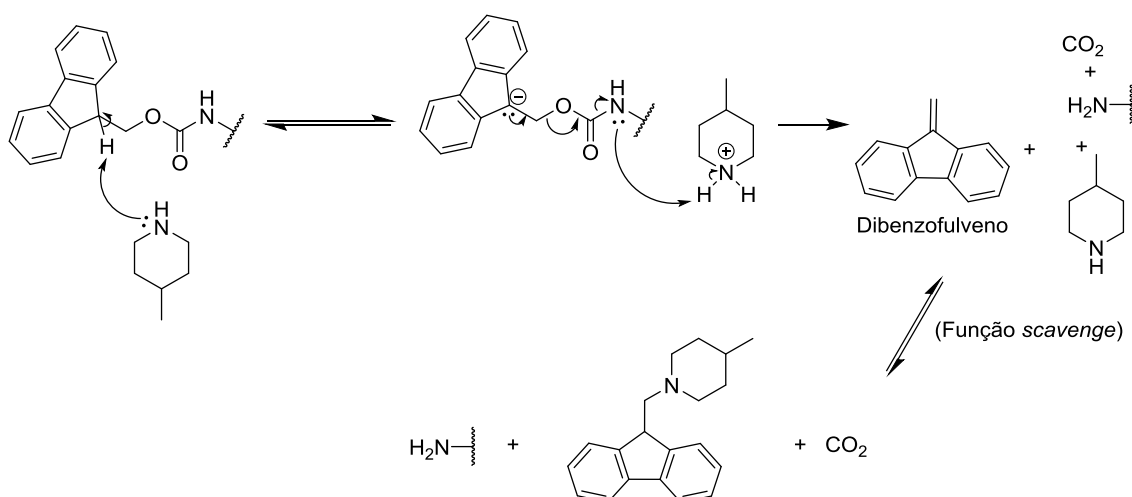


Figura 8 - Mecanismo genérico proposto para a reação de desproteção (remoção do grupo Fmoc), com piperidina em Fmoc-peptidil-resinas.

### 1.4.2 Ativação do Fmoc derivado para reações de acoplamento

A partir das técnicas conhecidas para a ativação de Fmoc-aminoácidos para a reação de acoplamento (CHAN; WHITE, 2000), neste trabalho foi empregada à técnica que utiliza 1,3-di-isopropil-carbo-di-imida (DIC) e 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT) para a formação de ésteres OBt (CHAN; WHITE, 2000). A reação de ativação, processo no qual o carbono do ácido carboxílico se torna mais eletrofílico para ocorrer formação da ligação peptídica, ocorre mais rapidamente em solventes não polares como o DCM, mas também pode ser realizada em DMF, sendo que esse último solvente importante na

retirada da ureia gerada durante o processo reacional. Os mecanismos de ativação e acoplamento estão mostrados na Figura 9.

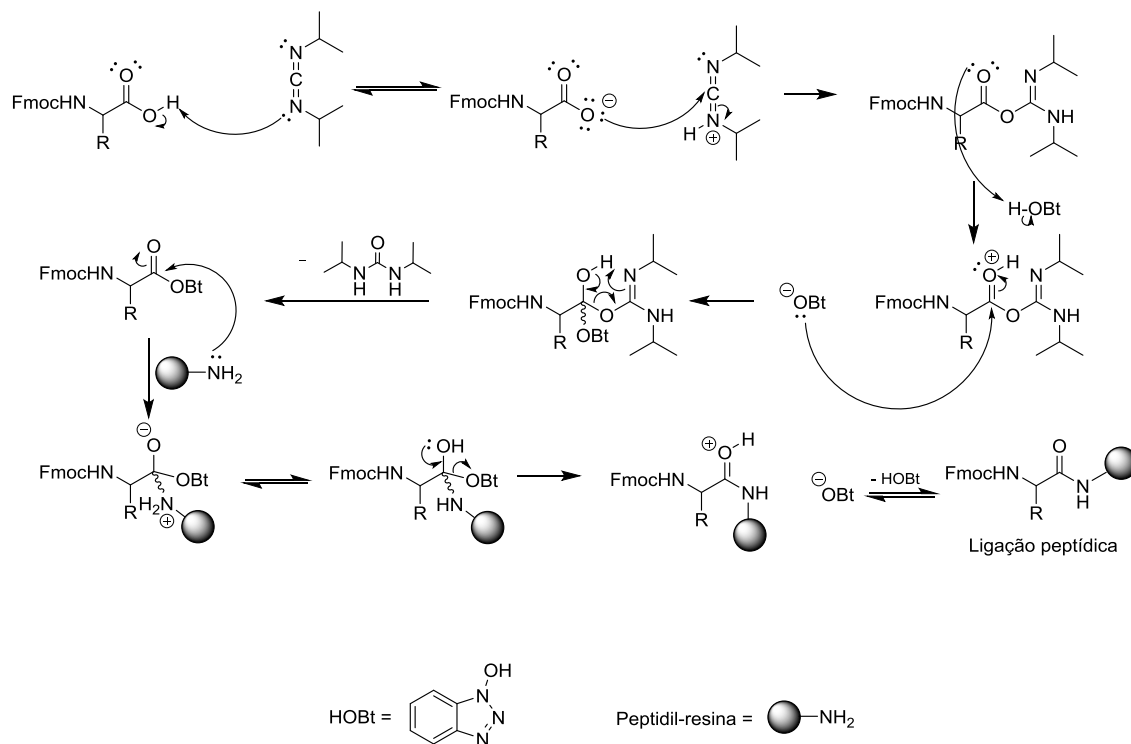


Figura 9 - Mecanismos genéricos propostos para a ativação do Fmoc resíduo de aminoácido e para a subsequente reação de acoplamento do respectivo éster ativado à peptidil-resina (estratégia DIC/HOBt).

### 1.4.3 Clivagem do peptídeo da peptidil-resina

Na estratégia Fmoc de SPFS a clivagem é realizada em meio ácido, diferentemente das etapas de desproteção que são realizadas em meio básico. Neste trabalho foi utilizado o TFA como espécie ácida responsável pela clivagem da cadeia polipeptídica. Durante o processo de clivagem, são geradas inúmeras espécies catiônicas reativas, que podem reagir com porções nucleofílicas do peptídeo, assim se utilizam outros reagentes que atuam como sequestradores de carbocátions durante a reação de clivagem. Dentre esses, os mais utilizados são a água e o tri-isopropilsilano (TIS).

### 1.4.4 Teste de Kaiser

O teste de Kaiser, também denominado teste de ninidrina, é utilizado para a identificação de grupos amino livre na resina, através de um ensaio colorimétrico. Essa reação é utilizada para controlar as etapas de desproteção dos grupos *N*-Fmoc, bem como as reações de acoplamento. Assim, quando a solução e resina possuem uma coloração amarelada, o teste de Kaiser apresenta resultado negativo, mostrando assim a

ausência de grupos amino livre. Esse resultado é esperado ao fim de cada acoplamento, pois mostra que todos os grupos amino reagiram com os Fmoc-derivados durante a etapa de acoplamento. Entretanto, para as etapas de desproteção, a peptidil-resina deve apresentar coloração violeta após o teste de Kaiser, uma vez que esse resultado positivo indica a presença de grupos amino livres (

Figura 10).

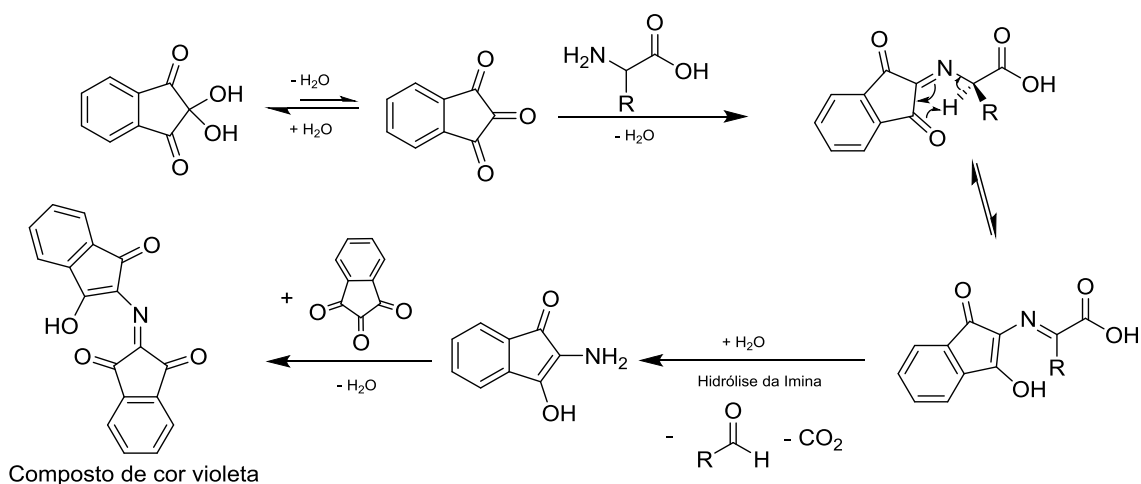


Figura 10 - Mecanismo proposto para o teste de Kaiser.

### 1.5 Reações “click” no desenvolvimento de peptídeos miméticos

Uma abordagem utilizada, com frequência, em química medicinal para a síntese de compostos a partir de fragmentos são as reações denominadas de “*click chemistry*” (KOLB; SHARPLESS, 2003).

Dentre todas as reações que preenchem os requisitos de “*click chemistry*”, a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen utilizando alcinos e azidas, também denominada de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC – do inglês *Cu-catalysed azide alkyne cycloaddition*), é indiscutivelmente o exemplo mais importante.

Inicialmente, a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen foi proposta como uma reação não catalisada por cobre, sendo necessário o aquecimento da mistura reacional. Entretanto, um dos problemas associados a essa reação é a regioquímica de cicloadição, que leva à mistura de produtos 1,5- e 1,4-dissubstituídos (HUISGEN; GRASHEY; SAUER, 1964). A partir do momento que se começou a utilizar o cobre (I) como catalisador para essas reações, observou-se a regioseletividade para a formação do produto 1,4-dissubstituído (Figura 11, p. 13) e as reações já não necessitavam de aquecimento, sendo esse um fator importante em reações envolvendo azidas. Outro

fator importante é a versatilidade dessas reações, pois é possível utilizar diferentes fontes de cobre (I) como – por exemplo – sistemas redutores utilizando cobre (II), iodeto de cobre (I) e complexos de ligantes com o cobre.

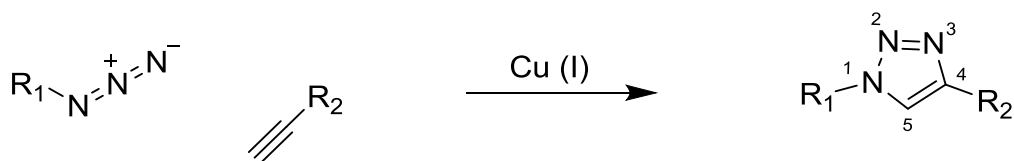


Figura 11 - Esquema geral da reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre (I)

Anéis triazólicos 1,4-disubstituídos são utilizados, na maioria das vezes, como *links* inertes na área de biomoléculas e bioconjugados, pois os mesmos não sofrem degradações, hidrólise e oxidação enzimática; assim sendo possível construir sistemas complexos a partir de pequenos fragmentos. O anel triazólico possui outra característica que vem sendo explorada em química medicinal, que é a sua capacidade de ser empregado como um bioisótero não clássico da ligação peptídica (TRON *et al.*, 2008); o anel triazólico tem sua forma planar, distribuição eletrônica e momento de dipolo similares aos da ligação peptídica do tipo *trans* (BOCK; HIEMSTRA; VAN MAARSEVEEN, 2006; TRON *et al.*, 2008). Observando-se a disposição dos átomos no anel triazólico, é proposto que o hidrogênio triazólico seja importante como doador de ligação de hidrogênio e que os nitrogênios 2 e 3 possuam uma função de serem aceptores de ligação de hidrogênio, devido aos seus pares de elétrons não ligantes como representado na Figura 12.

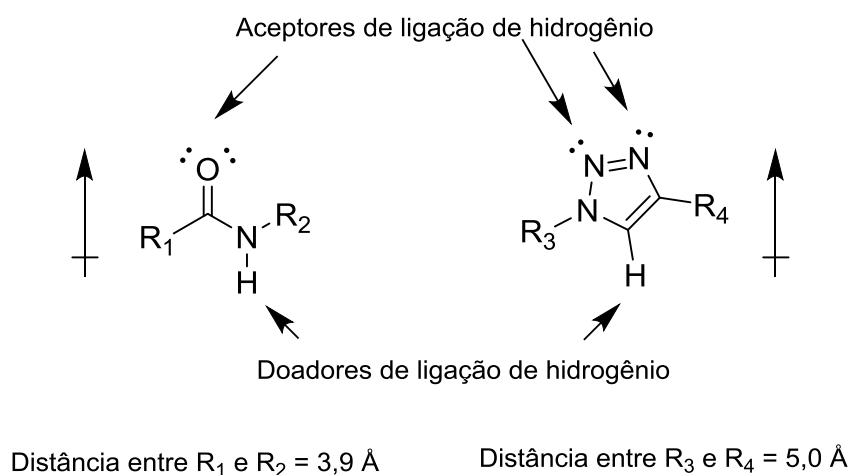


Figura 12 - Relação bioisostérica entre uma ligação amídica do tipo *trans* e um anel triazólico 1,4-disubstituído, adaptada de GUARNA;TRABOCCHI, 2014.



É possível verificar na literatura diversas aplicações das reações do tipo CuAAC, na química de peptídeos. Um exemplo de aplicação é no desenvolvimento de macrocíclicos peptídicos com propriedades antitumorais (DAVIS *et al.*, 2012), sendo que, em alguns casos, a introdução da unidade triazólica possui um objetivo de modulação da resposta farmacológica (VASKO *et al.*, 2010), tendo já sido constatadas melhoras em alguns casos (Figura 13-A, p. 15) (CHEN *et al.*, 2007). Outra aplicação deste tipo de reação é no desenvolvimento e planejamento peptídeos mimética de dobras beta tipo I (Figura 13-B, p. 15) (LIU *et al.*, 2008). Um exemplo interessante do emprego da reação de CuAAC com fins estruturais em espécies peptídicas, foi a conexão de resíduos espaçados por três posições ( $i, i+3$ ) na cadeia peptídica, através da formação de um anel triazólico, o que acarretou na estabilização de um segmento  $\alpha$ -helicoidal na estrutura (HOLUB *et al.*, 2010). Esses resíduos se encontrava, a princípio, espacialmente distantes na cadeia peptídica, mas quando adotam a conformação  $\alpha$ -helicoidal se aproximam espacialmente, de forma que o emprego dessa conexão através do anel triazólico entre favorece a preferência por uma conformação em  $\alpha$ -hélice. Um outro exemplo do emprego da reação de CuAAC na química de peptídeos, é na formação de oligo- ou polipeptídeos, nos quais, ligações peptídicas são substituídas por anéis triazólicos (Figura 13-C, p. 15) (JOCHIM *et al.*, 2009).

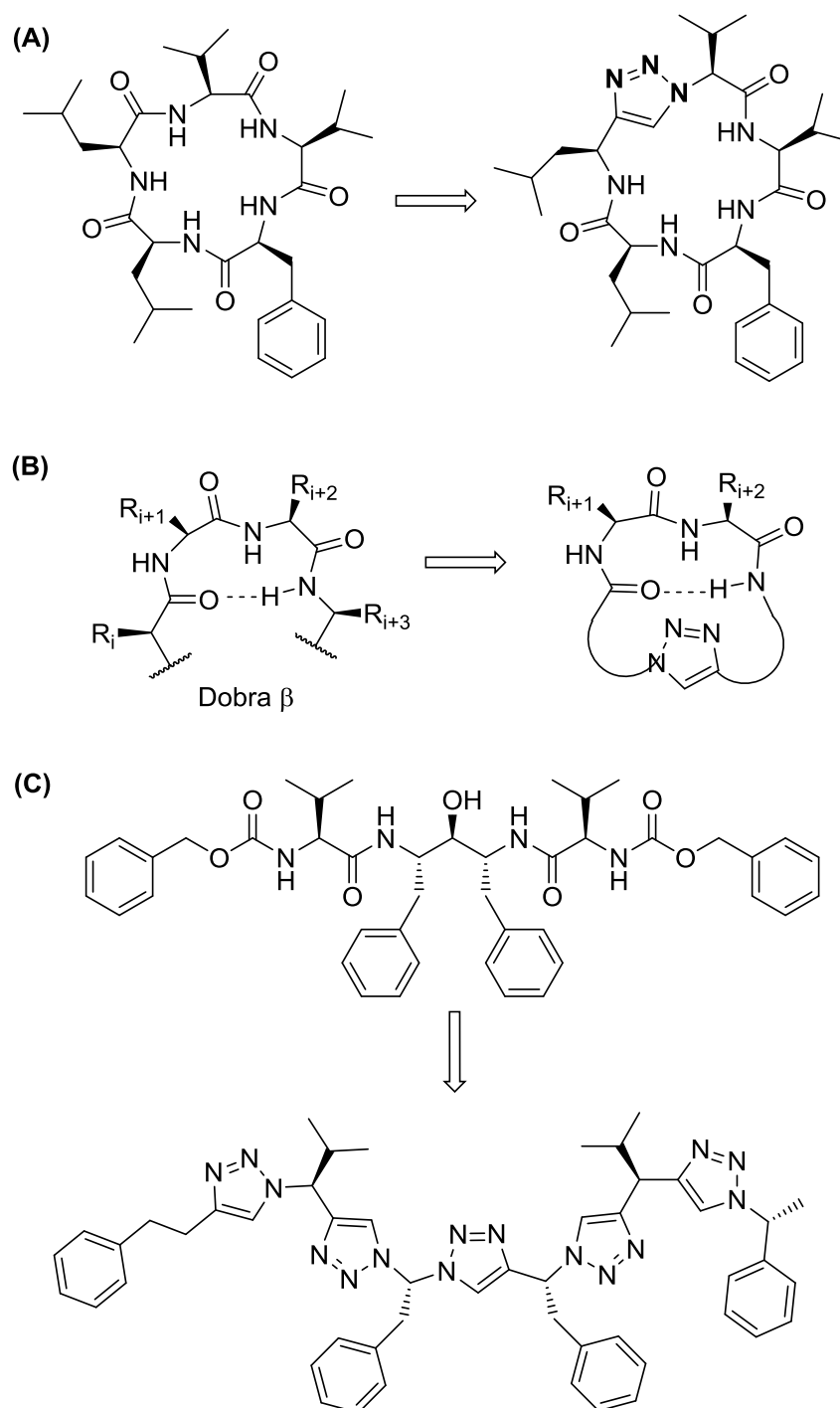


Figura 13 - Exemplos do emprego de anéis triazólicos 1,4-dissubstituídos em química medicinal. (A) Modificação estrutural visando substituir uma ligação peptídica de um macrocíclico. (B) Modificação estrutural objetivando a formação de miméticos de dobras  $\beta$ . (C) Modificação estrutural com o propósito de gerar um peptídeo mimético.

### 1.6 Síntese em fase sólida aplicada à obtenção de Glicopeptídeos

Os carboidratos em glicoproteínas desempenham diversas funções, como – por exemplo – no dobramento e na definição da estrutura tridimensional de certas proteínas, na adesão e diferenciação de células, bem como na metástase de tumores. É importante

destacar que, ao contrário do que ocorre em nucleotídeos, as cadeias de carboidratos em estruturas peptídicas e proteicas não são determinadas geneticamente, mas pelas a atividade de enzimas que irão glicosilar os resíduos de aminoácidos (HOJO; NAKAHARA, 2007).

Em células eucarióticas, bem como em algumas bactérias e em muitas proteínas virais, foram observadas cadeias de carboidratos ligadas por *N*- ou *O*- ligações glicosídicas a cadeias laterais de resíduos de asparigina, serina, treonina, hidroxilisina, tirosina, hidroxiprolina (SHARON; LIS, 1997). Na natureza, *N*-glicoproteínas são formadas pela ligação de um núcleo comum, oligossacarídeo, a uma cadeia peptídica, sendo que, a partir desse núcleo, são realizadas modificações enzimáticas, para se obterem diferentes cadeias glicosídicas. Entretanto, as *O*-glicoproteínas são formadas pela ligação sequencial de cada um dos carboidratos às cadeias glicosídicas, assim não possuindo nenhum núcleo comum como as *N*-glicoproteínas (BROCKHAUSEN; SCHACHTER, 1997). Na Figura 14 são apresentados importantes aminoácidos glicosilados isolados de diversas fontes naturais.

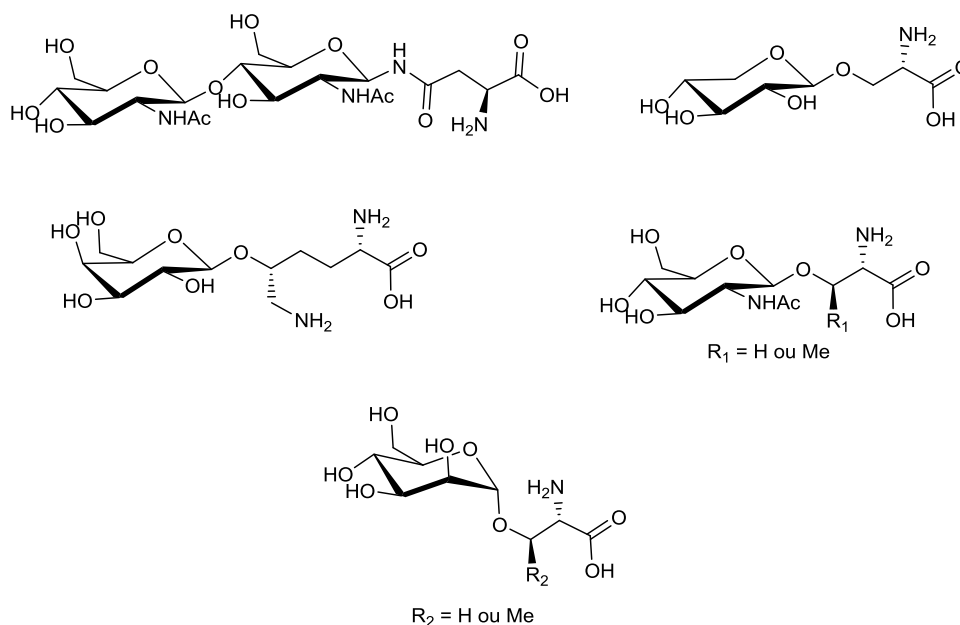


Figura 14 - Exemplos de importantes aminoácidos glicosilados já encontrados em *N*- e *O*-glicoproteínas.

Dois tipos de abordagens sintéticas vêm sendo utilizadas para a síntese de glicopeptídeos utilizando síntese em fase sólida. O primeiro consiste na junção direta do carboidrato à cadeia peptídica; e o segundo se baseia no uso de aminoácidos já glicosilados (CHAN; WHITE, 2000). Devido a problemas de anomerização na formação de glicopeptídeos pelo acoplamento direto dos carboidratos às cadeias

peptídicas (PAUL; KORYTNYK, 1978), bem como à dificuldade de separação desses produtos pelos métodos convencionais, a abordagem que utiliza resíduos já modificados na construção de *O*- e *N*-glicopeptídeos tem sido a estratégia de escolha. Das principais estratégias de SPFS, a considerada mais apropriada para a síntese de glicopeptídeos é a Fmoc. O motivo para tal escolha é que estratégia Boc utiliza ácidos fortes na clivagem do glicopeptídeo da resina, propiciando assim a quebra das ligações glicosídicas, sendo que na estratégia Fmoc é possível utilizar condições ácidas mais brandas. Entretanto, é importante que na estratégia Fmoc sejam utilizadas bases mais brandas nas desproteções, pois bases fortes propiciam reações de eliminação (

Figura 15)(CHAN; WHITE, 2000).

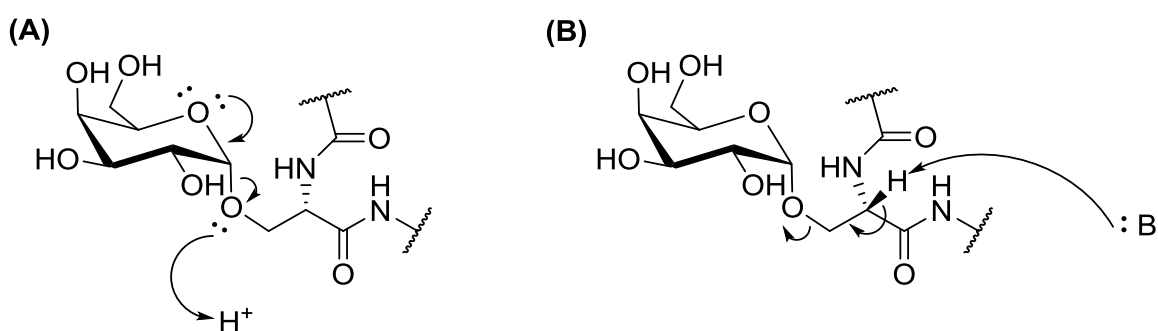


Figura 15 – Exemplos de quebra da ligação glicosídica de *O*-Glicopeptídeos (A) na presença de meio ácido e (B) via reações de eliminação-β na presença de meio básico.

A alta ocorrência de *O*- e *N*-glicopeptídeos na natureza e a importância biológica dessas classes de biomoléculas fazem com que o a síntese orgânica possa ser de grande valia para o desenvolvimento de novos glicopeptídeos com aplicações terapêuticas. Todavia, deve-se ter em mente que estruturas glicopeptídicas podem ser clivadas por diversas glicosidases encontradas em meio biológico. Assim, é estimulado o desenvolvimento de glicopeptídeos miméticos, que sejam catabolicamente estáveis ao metabolismo (MARCAURELLE; BERTOZZI, 1999). Devido a isso, a busca de glicopeptídeos que não são alvos de glicosidases, os *S*-glicopeptídeos e as *S*-glicoproteínas despertaram o interesse da comunidade científica devido às suas estabilidades em meio biológico e por suas resistências ao metabolismo enzimático (DRIGUEZ, 2001; KÄSBECK; KESSLER, 1997; XIANGMING ZHU; KANDASAMY PACHAMUTHU; SCHMIDT, 2003).

### 1.7 Espectroscopia de Dicroísmo circular

A espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular é uma técnica, que permite a caracterização da estrutura secundária de peptídeos e proteínas através de absorções preferenciais de componentes da luz circularmente polarizadas. A princípio, a luz linearmente polarizada é composta por duas componentes circularmente polarizadas e de mesma magnitude, sendo uma correspondente a componente circularmente polarizada à direita ( $E_R$ ) e outra correspondente a componente circularmente polarizada à esquerda ( $E_L$ ). Ao atravessarem um meio opticamente ativo, as componentes  $E_R$  e  $E_L$  são absorvidas em diferentes extensões, apresentando assim diferenças em suas fases e amplitudes, sendo que essas diferenças resultam numa polarização elíptica, que é denominada de luz elipticamente polarizada. A grandeza comumente utilizada nas análises é a elipicidade ( $\theta$ ), esta possui correlação com as componentes  $E_R$  e  $E_L$ , como mostrado na Equação 1.

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (1)$$

Em relação aos peptídeos, a ligação peptídica é o grupo cromóforo de importância, sendo esse observado em análises feitas em comprimentos de onda entre 240 e 190 nm. As absorções analisadas são relativas às transições eletrônicas da ligação peptídica, cujas intensidades e energias intrínsecas são dependentes dos ângulos de rotação  $\Phi$  e  $\Psi$  (Figura 16). Esses ângulos são resultados da conformação adotada pela biomolécula estudada. Peptídeos não estruturados, ou possuindo estruturas secundárias comuns a peptídeos, como – por exemplo –  $\alpha$ -hélice, e conformações- $\beta$  apresentam espectros característicos para cada uma das formas, possibilitando uma análise semi-quantitativa das proporções dos diferentes domínios das estruturas secundárias existentes.

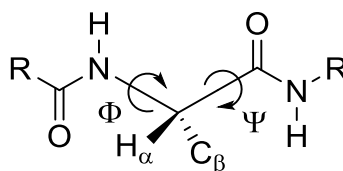


Figura 16 - Estrutura genérica da cadeia principal de uma sequência polipeptídica, com os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  mostrados.

Portanto, as informações obtidas por CD auxiliam no planejamento e realização de experimentos de RMN, pois indicam em quais meios são observadas determinadas

preferências conformacionais. Além disso, a espectroscopia de CD possibilita a investigação estrutural de peptídeos na presença de alguns meios miméticos de membranas inacessíveis à espectroscopia de RMN em solução, como as vesículas fosfolipídicas (BECHINGER; RESENDE; AISENBREY, 2011).

## 1.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

### 1.8.1 RMN bi-dimensional

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma importante técnica na elucidação estrutural de biomoléculas. Um princípio fundamental explorado pela RMN é a capacidade de utilizar os *spins* nucleares como “sondas”, pois os momentos magnéticos dos *spins* nucleares são sensíveis a modificações geradas em sua vizinhança como – por exemplo – alterações no campo magnético de determinado núcleo devido à interação com o campo magnético vizinho gerado por outros núcleos. Essas interações entre os *spins* nucleares podem ser utilizadas na correlação entre diferentes núcleos em uma molécula e, posteriormente, os dados gerados a partir destas correlações podem ser utilizados como base para cálculos de dinâmica molecular. Os *spins* nucleares de uma molécula possuem dois mecanismos principais de interação, sendo eles via ligação química (acoplamento escalar, relacionado a uma constante de acoplamento escalar –  $J$ ) ou pelo espaço (acoplamento dipolar – DD), conforme ilustrado na Figura 17. O mecanismo para que ocorra a transferência de magnetização de um núcleo com spin  $1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , por exemplo) via ligação química é através da polarização dos elétrons das ligações químicas entre os núcleos envolvidos. A transmissão da magnetização via espaço se dá de forma direta entre os *spins* nucleares e sua ação na relaxação dos *spins* é à base do efeito nuclear *Overhauser* ( $nOe$ ), utilizado para estimar distâncias entre os núcleos de hidrogênio.

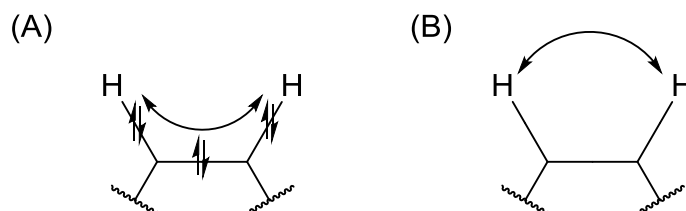


Figura 17 - Representação das transferências de magnetização por ligação química e pelo espaço. (A) Interação escalar *spin-spin* pela transmissão de polarização dos elétrons envolvidos na ligação química. (B) Interação direta dos *spins* pelo espaço. As setas indicam o caminho da transferência da magnetização.

O assinalamento de peptídeos consiste na atribuição das correlações, em um mapa de contornos, aos devidos átomos da sequência peptídica, assim as principais características exploradas nas análises e assinalamentos de espectros de peptídeos estão baseadas nas correlações via ligações químicas e através do espaço (CAVANAGH, 2007). As principais técnicas que exploram a transmissão de magnetização via ligação química são os experimentos de COSY (*Correlation Spectroscopy*) e de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*). Nos experimentos COSY é possível correlacionar núcleos que estejam, em geral, até três ligações de distância. Entretanto nos experimentos TOCSY é possível correlacionar todos os núcleos pertencentes a um determinado sistema de *spins* (Figura 18), podendo-se ocorrerem variações na extensão dessas correlações, devido a diferentes alguns parâmetros experimentais (como tempos de mistura) e a características do sistema em análise que levem a valores variados de constantes de acoplamento escalares entre núcleos.

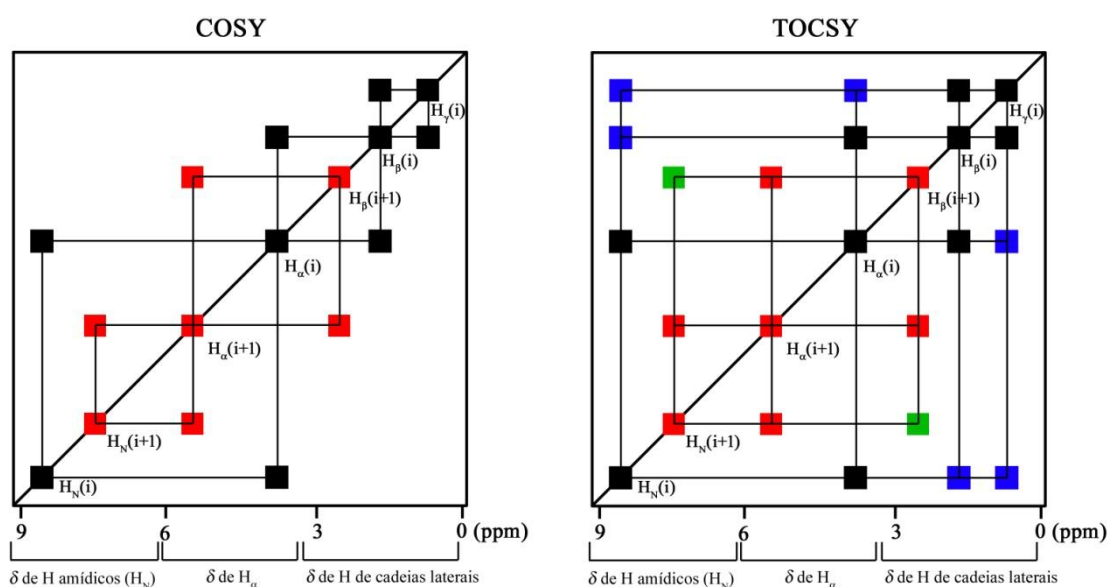


Figura 18 - Exemplos de experimentos bidimensionais de RMN para determinação do sistema de spins de resíduos em uma cadeia polipeptídica. Em preto e vermelho são mostrados as correlações COSY para o resíduo (i) e (i+1), respectivamente. Além das respectivas correlações em preto e vermelho, também acessíveis em espectros de TOCSY, são também observadas correlações em azul e verde para o resíduo (i) e (i+1), respectivamente.

Através dessas técnicas é possível obter padrões de correlações entre pares de átomos, que são característicos para diferentes resíduos de aminoácidos, devido aos respectivos sistemas de *spins*. Dessa forma, é possível se estabelecerem as correlações intra-residuais. Para o auxílio a esses assinalamentos, pode-se utilizar conjuntamente o mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, que correlaciona às ressonâncias de hidrogênios e

carbonos diretamente ligados. Uma das vantagens desse experimento é a maior dispersão dos sinais de ressonância na dimensão do carbono, que possui uma maior janela espectral, o que facilita processo de assinalamentos. Esse tipo de experimento pode empregar sequências de pulso que se utilizam de edições, sendo muito comum as que levam a correlações de CH<sub>3</sub> e CH com fase positiva e de CH<sub>2</sub> com fase negativa (WILLKER *et al.*, 1993).

Um dos experimentos utilizados para determinar as correlações através do espaço é o NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). As informações retiradas destes espectros são a base para a determinação de estruturas de macromoléculas, sendo as mesmas, baseadas no efeito nuclear *Overhauser* (nOe) (WIDER; WÜTHRICH, 1999). Os nOes podem ser detectados para pares de átomos de hidrogênio que estejam até 5 Å de distância. Normalmente, para moléculas pequenas, um mapa de contornos NOESY possui os picos diagonais com fase negativa e os picos cruzados com fase positiva, mas para biomoléculas maiores, como peptídeos (normalmente espécies com massas superiores a 1000 Da) os mapas de contornos NOESY possuem fase negativa para os picos diagonais e para os picos cruzados. A justificativa para tal efeito se encontra na taxa de correlação e sua correlação com o tempo de correlação ( $\tau_c$ ) destas moléculas. Mas para fatores práticos, os mapas de contornos têm as suas fases ajustadas de forma que todos os sinais fiquem positivos. Através de um mapa de contornos NOESY, é possível estabelecer algumas correlações intra-residuais, devido à proximidade dos átomos de hidrogênios de um resíduo, como – por exemplo – a correlação de hidrogênios- $\beta$  e - $\delta$  de resíduos de fenil-alaninas. Todavia, a maior importância desse experimento é associada a correlações entre resíduos diferentes, o que dá informações extremamente relevantes para a determinação de aspectos estruturais relativos à estrutura tridimensional da molécula. Maiores detalhes sobre o assinalamento utilizado neste trabalho serão discutidos no próximo item e na secção 3.3.1.

### **1.8.2 Assinalamento sequencial de peptídeos**

Em 1986, Kurt Wüthrich propôs um método de atribuição sequencial de resíduos de aminoácidos em proteínas, utilizando-se uma combinação de mapas de contornos (WÜTHRICH, 1986), onde COSY e TOCSY são utilizados para estabelecer as conexões intra-residuais via acoplamento escalar (Figura 17, p. 19) e assim estabelecer a identidade de cada resíduo. O mapa de contornos NOESY é utilizado para obter conectividades entre os resíduos espacialmente próximos, podendo-se estabelecer assim,



qual é o próximo resíduo da sequência peptídica e, com isso, atribuir os sinais de ressonância de toda a cadeia polipeptídica. A Figura 19 representa de forma esquemática as informações que podem ser obtidas utilizando-se essa estratégia de assinalamento.

As correlações de *nOe* podem ser convertidas em restrições de distância semi-quantitativas, as quais são empregadas em cálculos de dinâmica molecular, para a determinação das estruturas tridimensionais dos peptídeos em estudo.

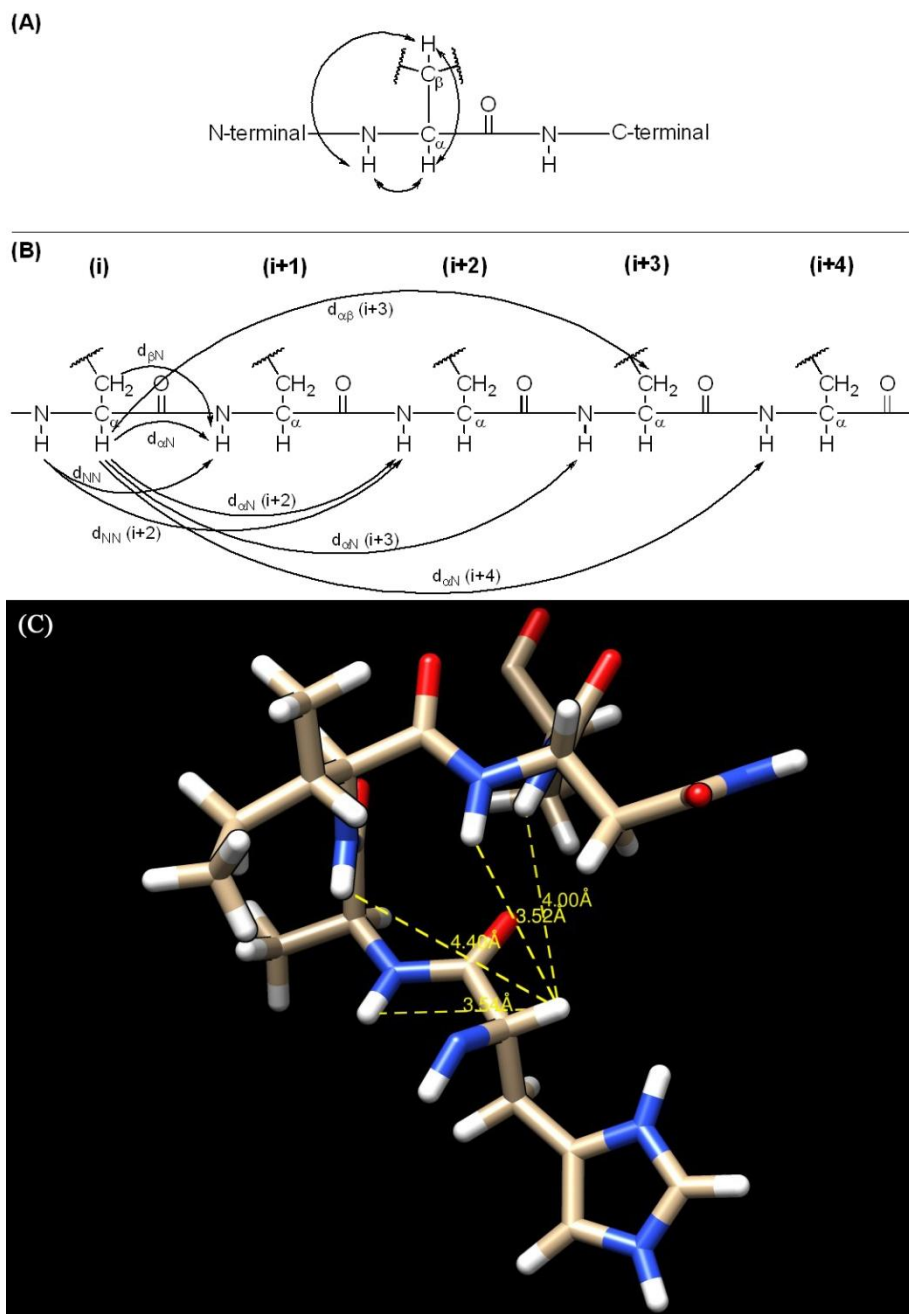


Figura 19 - Representações de *nOe* típicas de estrutura secundária do tipo  $\alpha$ -hélice. (A) Possíveis interações escalares e de *nOe* intra-residuais. (B) Possíveis interação *nOe* inter-residuais, adaptado de WÜTHRICH, 1986. (C) Representação tridimensional de

cinco resíduos em uma  $\alpha$ -hélice, a distancia entre o hidrogênio  $\alpha$  de um resíduo e os hidrogênios amídicos dos quatro resíduos seguintes está assinalada na imagem.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do glicopiranosil-triazol-peptídeo

#### 2.1.1 Síntese da cadeia polipeptídica

A síntese foi planejada para um rendimento máximo que fornecesse 200 mg do GTP, o que corresponde a 0,0948 mmol da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2. Uma resina do tipo Rink amida, com um grau de substituição de 0,52 mmol/g, foi utilizada como suporte sólido.

Para a inserção dos resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica foram utilizados os respectivos Fmoc derivados de resíduos de aminoácidos protegidos ou não nas cadeias laterais, adquiridos da Iris Biotech (Marktredwitz, Alemanha), conforme representado na Figura 20.

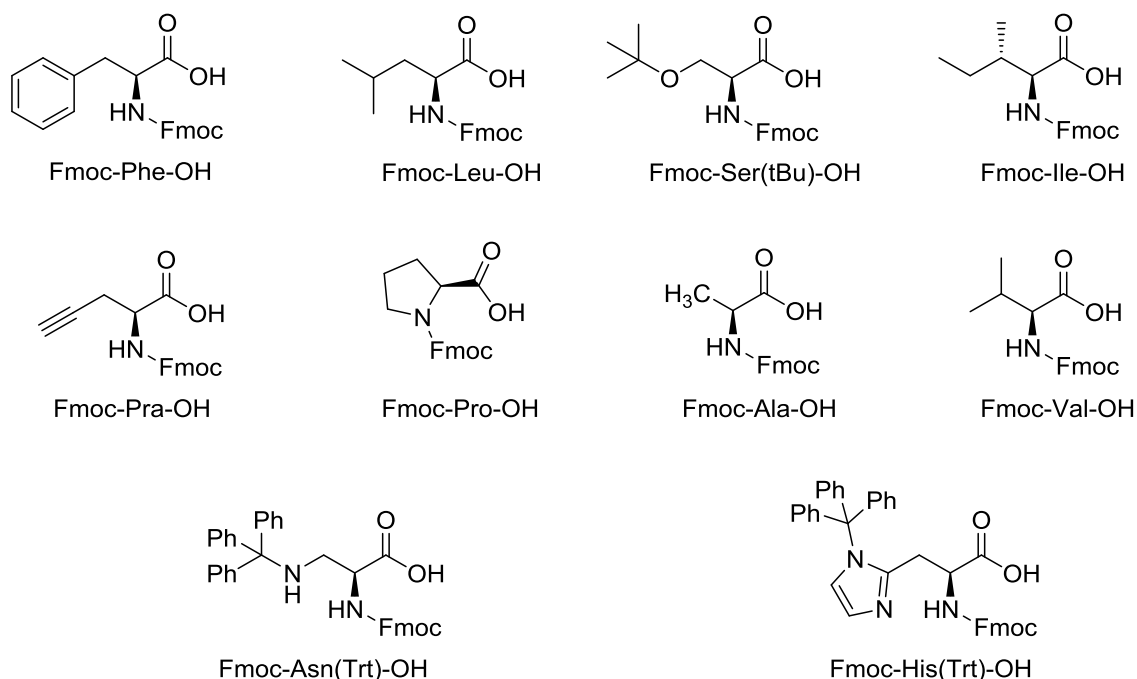


Figura 20 - Fmoc derivados de resíduos de aminoácidos utilizados na síntese do precursor peptídico

Inicialmente foram pesados 182,44 mg (94,86  $\mu\text{mol}$ ) da resina Rink amida (NovaBiochem-Merck) ( $0,52 \text{ mmol.g}^{-1}$ ), sendo essa transferida para um frasco de reação, o qual consiste de uma seringa de 10 mL, equipada com filtros. Esse sistema facilita as etapas de adição de reagentes e de lavagens, bem como a separação do peptídeo da resina na etapa de clivagem, uma vez que as respectivas soluções são

adicionadas por simples sucção e expelidas após concluída a respectiva etapa, permanecendo-se a componente sólida o tempo todo na seringa. Realizou-se um tratamento prévio com a resina, com o objetivo de retirar impurezas e condicionar a resina para a realização dos acoplamentos. Esse tratamento se caracteriza por três lavagens da resina com 4 mL de DCM e, em seguida, foram adicionados 4 mL de DMF e o sistema foi deixado sob agitação mecânica durante 30 minutos.

Após cada etapa de desproteção ou acoplamento, realiza-se um ciclo de lavagens constituído pela adição de 5 mL de DMF (*N,N*-dimetilformamida) e 5 mL API (Álcool isopropílico), de forma alternada, seguidos por duas lavagens com 5 mL de DCM, sendo o excesso de solvente retirado por um sistema de vácuo.

Para realização das desproteções, adiciona-se solução de 20% (v/v) de 4-metilpiperidina em DMF, que permanece em contato com a peptidil-resina sob agitação em vórtex durante 12 minutos. Para os acoplamentos, foi utilizado um excesso de três vezes dos reagentes, ou seja 379,47  $\mu\text{mol}$ . Os reagentes utilizados nos acoplamentos foram *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (379,47  $\mu\text{mol}$ ), 1-hidroxibenzotriazol (379,47  $\mu\text{mol}$ ) e o derivado de aminoácido a ser adicionado (379,47  $\mu\text{mol}$ ). Esses reagentes foram solubilizados em *N,N*-dimetilformamida (1,5 mL) e diclorometano (1,5 mL) e a respectiva solução é succionada pela seringa contendo a peptidil-resina, sendo a mistura reacional deixada sob agitação em vórtex por 180 minutos.

### 2.1.2 Teste de Kaiser

Entre cada etapa de desproteção e acoplamento foi realizado o teste de Kaiser, que consiste em um teste específico para a confirmação da presença de grupos amino livre na peptidil-resina. Esse teste possibilita, através de uma análise qualitativa, a verificação da eficiência das etapas de acoplamento e de desproteção. Em cada teste, uma porção da resina (em média cinco grãos de resina), já previamente lavada e seca, foi transferida para um tubo de ensaio, no qual foi adicionada uma gota de uma solução de ninidrina a 5 % (m/v) em etanol, duas gotas de uma solução de 80 % (v/v) de fenol em etanol e uma gota da solução de piridina 2% (v/v) em solução aquosa de KCN 1 mmol.L<sup>-1</sup>. A mistura foi aquecida por 5 minutos a 100 °C, sendo então observada a coloração da resina. Espera-se resultado positivo (coloração azul/violeta) para uma etapa de desproteção eficiente e resultado negativo (coloração amarela) para uma etapa de acoplamento bem sucedida. No caso de resultados indesejados para o teste, *i.e.*, resultado negativo após etapas de desproteção e resultado positivo após etapa de

desacoplamento, a respectiva etapa deve ser repetida, até que se obtenha o resultado desejado. As condições dessas reações podem ser alteradas, caso tentativas sucessivas venham a apresentar resultados insatisfatórios (CHAN; WHITE, 2000).

### **2.1.3 Acoplamento da porção glicosídica ao precursor peptídico utilizando reações do tipo CuAAC**

Após todos os acoplamentos serem realizados, a incorporação do resíduo de propargilglicina à cadeia polipeptídica, foi preparada uma solução aquosa, aproximadamente 1,5 mL, de sulfato de cobre (II) penta-hidratado (47,43  $\mu\text{mol}$ ) e ascorbato de sódio (56,91  $\mu\text{mol}$ ). A *D*-Glicose per-*O*-acetilada foi solubilizada em 1,5 mL de tetraidrofurano (THF). Cada solução foi succionada pela seringa (frasco de reação) e as soluções foram deixadas em contato com a peptidil-resina sob agitação intensa (Vórtex *Mixer*, modelo VX-200, marca Labnet) durante 48 horas. Ao término da reação, a peptidil-resina foi lavada com soluções de EDTA 10% (m/v) (três vezes) e de THF (três vezes), de forma alternada, sendo realizada uma última etapa de lavagem com água para lavagem da peptidil-resina.

### **2.1.4 Clivagem**

Para a retirada dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, bem como para se promover a clivagem do GTP da resina, foi preparada uma solução de clivagem com 5,6 mL de ácido trifluoracético (Sigma-Aldrich), 0,165 mL de triisopropilsilano (Sigma-Aldrich) e 0,055 mL de água, utilizando a seguinte proporção de TFA:TIS:água 96,0:3,0:1,0 (v/v). Esta solução foi succionada pela seringa contendo a peptidil-resina, a qual foi então deixada sob agitação por 120 minutos. Ao final da reação, a solução foi transferida para um tubo cônico. A seguir, foi efetuada a lavagem do GTP pela a adição lenta de 10 mL de éter gelado (resfriado com nitrogênio líquido) e posterior centrifugação (processo repetido durante quatro vezes). O precipitado foi separado, ressolubilizado em água e liofilizado.

### **2.1.5 Purificação do glicopiranosil-triazol-peptídeo por CLAE-FR e análise por EM**

Esta etapa do trabalho foi realizada pelo colaborador Carlos Filipe Reis Costa Guimarães, que realiza seu doutorado no mesmo grupo de pesquisa.

O GTP liofilizado foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) (Varian modelo *Pro Star* 210, detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star* 335), utilizando uma coluna semipreparativa C18 (Vydac 250 x 10 mm, Albany, OR), empregando-se um gradiente de 0% a 70% de acetonitrila contendo 0,08% de TFA (Solvente B). O solvente A utilizado foi água ultrapura contendo 0,1% de TFA. Utilizou-se um fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup> e a absorbância foi monitorada em 214 nm. A fração coletada no tempo de 16,2 minutos foi liofilizada e submetida a uma nova análise por CLAE-FR, utilizando uma coluna analítica C18 (Vydac 250 x 4,6 mm, Albany, OR), empregando-se um gradiente de 20% a 70% do solvente B (os solventes A e B foram os mesmos utilizados para as condições semipreparativas). Utilizou-se um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e a absorbância foi monitorada em 214 nm. A confirmação da identidade do GTP foi realizada por meio de espectroscopia de massas com *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) em espectrômetro MALDI-ToF/ToF (*autoflex*<sup>TM</sup> III *SmartBeam spectrometer*, Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando como matriz para ionização o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

## 2.2 Preparo de vesículas fosfolipídicas

Para o preparo de vesículas foi transferido uma quantidade correta de fosfolipídeos (*Avanti Polar Lipids*) para um balão e adicionado diclorometano, para a solubilização dos lipídeos, posteriormente o solvente foi retirado sob vácuo e foi observado a formação de um filme na parede do balão. Para a formação de LMV (*Large Multilamellar Vesicles*), este filme foi resolubilizado em água mili-Q e seu conteúdo transferido para um tubo cônico, as soluções a três ciclos de congelamento com nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. Após este tratamento térmico se realizou a extrusão (11 vezes) das soluções através filtros de policarbonato de 100 nm (Whatman Nuclepore, Sigma-Aldrich) em um sistema de extrusão da *Avanti Polar Lipids*, com o objetivo de se formarem as LUV (*Large Unilamellar Vesicles*).

## 2.3 Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco PTC-423L. Os espectros adquiridos foram processados com o software *Spectra Manager* da JASCO

e analisados através pelo software CDPro (SREERAMA; WOODY, 2004) (SREERAMA; WOODY, 2000).

Para analisar a estruturação do glicopeptídeo-triazol em diferentes meios biomiméticos, foram realizados experimentos em soluções de TFE:água em diferentes proporções, na presença de micelas detergentes de DPC e SDS e na presença de vesículas fosfolipídicas de POPC e POPC:POPG (3:1, mol:mol), tendo-se, em todos os experimentos, utilizado uma concentração final de glicopeptídeo-triazol de 40,27  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os espectros foram adquiridos a 20 °C em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 mm, entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, com os seguintes parâmetros de aquisição: velocidade de varredura de 50  $\text{nm.min}^{-1}$ , coleta de dados 0,2 nm, 1 s de resposta, 1 nm de largura de banda, 6 e 8 acumulações foram realizadas para o GTP em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O e na presença de vesículas/micelas, respectivamente.

Nos experimentos realizados em para as soluções de co-solvente, foram utilizadas as seguintes proporções de TFE:água de 0:100, 10:90, 20:80, 40:60 e 60:40. O pH do meio foi ajustado para 7,0 pelo uso de solução tampão fosfato a 5  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

Nos experimentos realizados na presença de micelas, foram utilizadas as seguintes concentrações de detergente: 0, 0,2, 0,5, 2, 3, 5, 10 e 15  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Nos experimentos realizados na presença de em vesículas, foram utilizadas as seguintes concentrações de fosfolipídeos: 0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1 e 1,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

## 2.4 RMN em solução

Foram preparados duas amostras para os espectrômetros de RMN, a saber: (A) GTP a 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), em tampão fosfato pH 7,0 a 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  e (B) solução micelar de DPC-*d*<sub>38</sub> a 400  $\text{mmol.L}^{-1}$ , sendo utilizados 5% (v/v) de D<sub>2</sub>O (99,75%, Merk) em H<sub>2</sub>O. Foram utilizados TFE-*d*<sub>2</sub> da Cambridge Isotope Laboratories, água com padrão de pureza mili-Q no preparo das soluções e DPC-*d*<sub>38</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA). O padrão interno de referencia utilizado para as ressonâncias de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foi o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) a uma concentração final de 0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$  em ambas as amostras.

Anteriormente aos experimentos bidimensionais, foram realizados experimentos unidimensionais de <sup>1</sup>H a fim de calibrarem os pulsos de radiofrequência, determinar a potencia do pulso de pré-saturação e analisar a dispersão dos sinais, bem como as respectivas larguras de linha. Os experimentos de TOCSY, NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-

$^{15}\text{N}$  HSQC, DQF-COSY e os experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  foram realizados em um espectrômetro Bruker Ascend 800, pertencente a Universidade de São Paulo, equipado com criosonda de 5 mm de tripla ressonância ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ), equipada com bobina específica para os pulsos de gradiente de campo, foi utilizada para as aquisições. A saturação do sinal da água foi realizada por pré-saturação (BERGER; BRAUN, 2004; CLARIDGE, 2016). O software TopSpin<sup>®</sup> da Bruker foi empregado durante a aquisição dos experimentos e os espectros obtidos processados posteriormente na suíte de programas NMRPipe<sup>®</sup> (*NMRPipe Spectral Processing and Analysis System*<sup>®</sup>) (DELAGLIO *et al.*, 1995), desenvolvida no *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*. A atribuição dos sinais obtidos foi realizada através do software NMRView<sup>®</sup> (JOHNSON; BLEVINS, 1994), desenvolvida pela *One Moon Scientific, Inc.*

Experimentos de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) foram adquiridos utilizando a sequência de pulso DIPSI2 (RUCKER; SHAKA, 1989; SHAKA; LEE; PINES, 1988). Foram utilizados os seguintes parâmetros: largura espectral de 10.000 Hz, 1024 incrementos em  $t_1$  com 16 (solução de TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$ ) ou 32 (solução micelar de DPC- $d_{38}$ ) transientes de 4096 pontos coletados para cada FID.

Experimentos de NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) foram adquiridos, utilizando-se diferentes tempos de misturas com o objetivo de se verificar efeitos de difusão de *spin*. Para a amostra preparada em solução de TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$  (60:40), utilizaram-se tempos de misturas de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ms. Para a amostra preparada em solução micelar de DPC- $d_{38}$ , utilizaram-se tempos de misturas de 50, 100, 120, 150, 200, 250 ms. Os demais parâmetros utilizados foram: largura espectral de 10.000 Hz, 1024 incrementos em  $t_1$  com 16 (solução de TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$ ) ou 32 (solução micelar de DPC- $d_{38}$ ) transientes de 4096 pontos coletados para cada FID.

Experimentos de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) (WILLKER *et al.*, 1993) foram adquiridos, para cada meio se realizou a aquisição de dois espectros sendo que um deles foi realizado sem edição na região de correlações entre núcleos de átomos aromáticos e o outro editado na região de correlações entre núcleos de átomos alifáticos (correlações de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$  com fase positiva e de  $\text{CH}_2$  com fase negativa). Foram utilizados os seguintes parâmetros: largura espectrais F1 de 10.000 Hz e F2 de 20.000 Hz (correlações entre núcleos alifáticos) ou 16.666 Hz (correlações entre núcleos aromáticos), 200 incrementos em  $t_1$  com 32 (solução de TFE-



$d_2:H_2O$ ) ou 80 (solução micelar de DPC- $d_{38}$ ) transientes de 2048 pontos coletados para cada FID.

Os experimentos de  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) (WILLKER *et al.*, 1993) foram adquiridos. Foram utilizados os seguintes parâmetros: larguras espectrais F1 e F2 de 10.000 Hz e 3.243 Hz, respectivamente, 128 incrementos em  $t_1$  com 128 transientes de 2048 pontos coletados para cada FID.

Devido à acentuada largura dos sinais de ressonância do peptídeo na presença de micelas de DPC- $d_{38}$  a 400 mmol.L $^{-1}$ , o experimento de DQF-COSY (*Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy*) (PIANTINI; SORENSEN; ERNST, 1982) foi adquirido somente para a amostra preparada em solução de TFE- $d_2:H_2O$  (60:40). Foram utilizados os seguintes parâmetros: largura espectral de 10.000 Hz, 1024 incrementos em  $t_1$  com 32 transientes de 4096 pontos coletados para cada FID.

## **2.5 Estrutura do glicopiranosil-triazol-peptídeo a partir de dados de nOe e deslocamento químico.**

As correlações obtidas nos mapas de contornos NOESY, com tempo de mistura de 150 ms para TFE- $d_2:H_2O$  e 120 ms para DPC- $d_{38}$ , tiveram suas intensidades convertidas em restrições de distancia e estas por sua vez foram calibradas segundo algoritmo proposto por Hylbert e co-autores (HYBERTS *et al.*, 1992). Os limites de restrições de distâncias utilizados foram 2,8 (nOe fortes), 3,4 (nOe médios) e 5,0 (nOe fracos). As calibrações foram realizadas com o auxílio do software NMRView<sup>®</sup> (JOHNSON; BLEVINS, 1994). As restrições angulares foram geradas através do programa TALOS+ (DELAGLIO *et al.*, 1995), que utiliza os valores de deslocamento químico dos átomos do esqueleto peptídico para o cálculo das estruturas.

Para otimização das restrições, inicialmente, foram realizados cálculos nos quais as estruturas foram calculadas utilizando o *software* Xplor-NIH, no lugar do resíduo glicopiranosil-triazólico foi utilizado um resíduo de histidina. Através da colaboração com o pesquisador Francisco Gomes Neto, foi optado pela mudança no *software* de cálculo para o CNSsolve, as bibliotecas de parâmetros e topologia foram modificadas pelo colaborador para realização do cálculo do resíduo não padrão glicopiranosil-triazólico. Desta forma os cálculos das estruturas da [pOAcGlc-trz-A $^{14}$ ]PS-2 nos diferentes meios foram realizados com o *software* CNSsolve, versão 1.3 (BRUNGER, 2007). A partir da estrutura estendida, foram geradas 100 estruturas através do algoritmo *simulated annealing*, implementado no CNSsolve, em espaço torsional, com

duas fases de aquecimento e resfriamento. A fase de alta temperatura (50.000 K) foi realizada em 1000 passos com modificação do fator da energia de Van der Waals (repel) de 0.1, para o fator de energia de nOe de 150, energia de ângulos de diedro de 100 e time step da dinâmica molecular de 0,015 segundos. O resfriamento é realizado de 50.000 a 0 K em 1000 passos com fator para energia de Van der Waals de 1, nOe 150 e ângulos diedrais 200, com time step de 0.015 s e decremento da temperatura em passos de 250 K. O segundo resfriamento lento utiliza dinâmica no espaço cartesiano de 2000K para 0 K em 3.000 passos, aumentando o fator da energia de Van der Waals linearmente de 1 para 4, o fator da energia de nOes é mantido em 150 e ângulos diedrais em 200 com passos de 25 K. A minimização final é realizada em 200 passos com fator energia de Van der Waals em 75, para ângulos diedrais em 400 com 10 ciclos para cada passo. O controle estereoquímico das estruturas mais estáveis foi realizado com o programa PROCHECK-NMR (LASKOWSKI *et al.*, 1996). A manipulação, visualização e análise das estruturas tridimensionais obtidas foram realizadas através do programa Chimera, versão 1.11 (PETTERSEN *et al.*, 2004).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção do glicopiranosil-triazol-peptídeo

A síntese do precursor peptídico foi realizada manualmente em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc, empregando DIC e HOBt como agentes de acoplamento. Cada etapa da síntese de fase sólida, desproteção e acoplamento, foi precedida pelo teste de Kaiser (CHAN; WHITE, 2000). Com exceção da etapa de desproteção prévia ao o acoplamento 5 (Leucina), a qual apresentou resultado de teste de Kaiser duvidoso, e que demandou uma repetição da etapa de desproteção, todas as demais etapas de acoplamento e de desproteção foram realizadas com sucesso.

Após todos os acoplamentos, foi realizada a etapa de reação “click”, a qual foi responsável pela formação do anel triazólico e da inserção da unidade glicosídica per-*O*-acetilada, como mostrado na **Figura 21**.

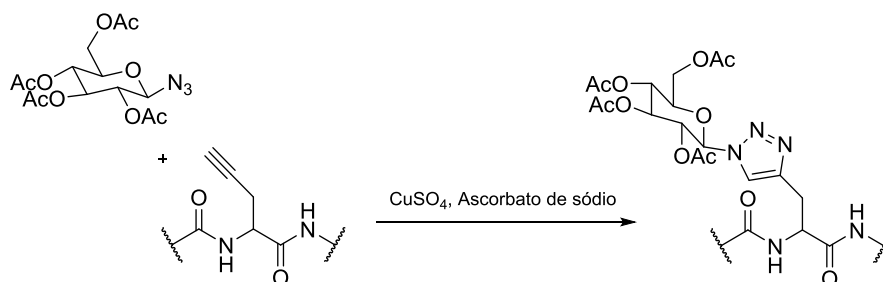


Figura 21 – Representação esquemática da reação de glicosilação utilizando Cu (II) e um agente redutor (Ascorbato de sódio).

Reações do tipo “click” que utilizam o cobre como catalisador possuem uma regioespecificidade na formação de do produto 1,4,5-trisubstituído triazólico (SPITERI; MOSES, 2010)(KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). Assim, é possível a formação de um produto com uma configuração específica, como mostrado na Figura 21.

Após a clivagem e liofilização, foi obtido uma massa do glicopiranosil-triazol-peptídeo de 79,2 mg, que corresponde a um rendimento bruto de 33,64%. A amostra bruta foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), sendo o perfil cromatográfico apresentado na Figura 22 (A) (p. 33). Diversas frações foram coletadas e observou-se que a fração correspondente ao GTP era a coletada com 16,2 minutos. Para se confirmar a eficiência da purificação, a fração coletada foi liofilizada e submetida a uma nova análise por CLAE-FR em condições analíticas, sendo o respectivo cromatograma apresentado na Figura 22 (B) (p. 33). Neste cromatograma foi observado a presença de um único pico (16,4 minutos).

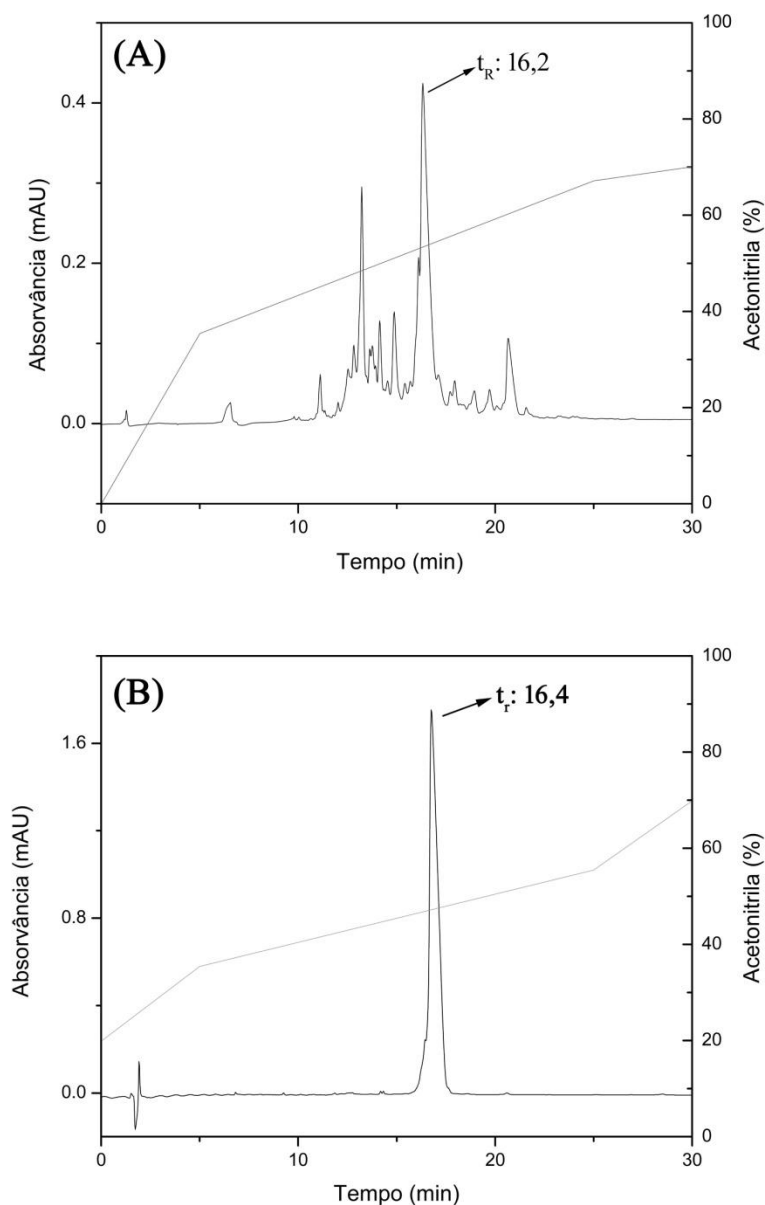


Figura 22 - Perfis de CLAE da amostra bruta (A) (semipreparativa) e da porção coletada ( $t_R: 16,2$  minutos) (B) (analítica). A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}} = 214$  nm. As setas representam o pico referente ao GTP.

Além disso, foi realizada análise por espectrometria de massas MALDI-ToF do GTP purificado, sendo o respectivo espectro apresentado na Figura 23 (p. 34). Neste espectro pode ser observado o sinal do íon molecular em 2482,22 ( $[M+H]^+$ ) referente ao GTP protonado. O erro observado de aproximadamente de 0,06 dalton (valor calculado para a massa monoisotópica do GTP protonado igual a 2482,28 daltons) é atribuído a um problema de calibração do aparelho.

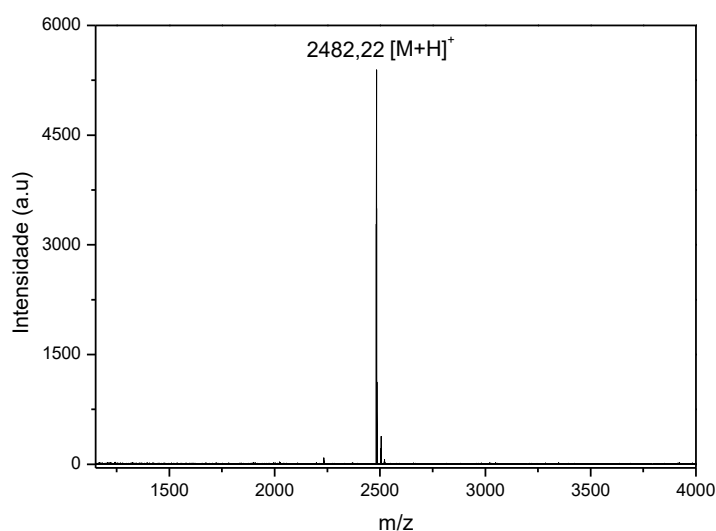


Figura 23 - Espectro de Massas (MALDI-ToF) da fração coletada ( $t_r$ : 16,4 minutos) na análise por CLAE-FR (analítica) da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2.

### 3.2 Dicroísmo circular

Os espectros obtidos por dicroísmo circular (CD) do glicopiranosil-triazol-peptídeo em diferentes meio biomiméticos estão apresentados nas Figuras 24 a 26, onde os respectivos conteúdos de hélice foram calculados como descrito no capítulo 2. No espectro do glicopiranosil-triazol-peptídeo em solução aquosa (Figura 24-B), tem-se um perfil característico de um peptídeo que não apresenta conformação preferencial, o que é evidenciado por um mínimo próximo a 198 nm. Já no espectro do GTP na presença de TFE:H<sub>2</sub>O 20:80, percebem-se os aparecimentos de dois mínimos em aproximadamente 208 e 220 nm e de um máximo próximo a 193 nm, o que indica que o GTP adota uma conformação preferencial em hélice. A proporções maiores de TFE (40 e 60%), percebe-se as intensificações dos mínimos e do máximo, o que está associado ao aumento da helicidade do GTP nesses meios. Perfis espectrais bem similares são observados para o GTP em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 e 60:40, o que indica que à concentração de 40% de TFE, tem-se já um máximo de helicidade alcançado, quando se analisa a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O. Esse tipo de comportamento é bastante característico de peptídeos antimicrobianos, os quais normalmente não apresentam conformação preferencial em meio aquoso, todavia, ao entrarem em contato com meios miméticos de membrana, adotam suas conformações ativas (GUSMÃO *et al.*, 2017; RESENDE *et al.*, 2008). Curiosamente, na proporção

TFE:H<sub>2</sub>O 10:90 é observado um espectro com perfil não usual da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 e isso pode estar associado a algum equilíbrio entre variados arranjos conformacionais e compostos não estruturados. Este mesmo perfil não usual foi observado para a PS-2 (Figura 24-A) (RESENDE, 2008), nas mesmas condições observadas para o GTP.

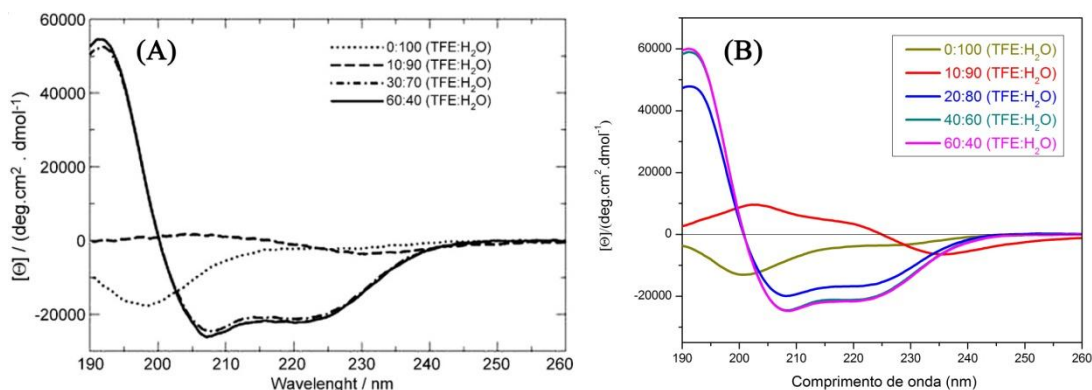


Figura 24 – Espectros de CD da PS-2 (A) e da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 (B) em diferentes proporções de TFE:H<sub>2</sub>O (10,0 mM de tampão fosfato, pH 7,0). Quadro (A) adaptado de Resende *et al*, 2008, reprodução autorizada (ANEXO B).

Os espectros do glicopeptídeo-triazol adquiridos na presença de micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilfosfocolina (DPC) são apresentados na Figura 25 (p. 36). As concentrações de DPC e SDS iguais ou superiores a  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente, são obtidos espectros com perfis helicoidais para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, o que indicam que esse GPT também adota conformações helicoidais bem definidas na presença desses dois tipos de micelas. É possível observar que foram necessárias concentrações maiores de DPC para ocorrer a estruturação do glicopeptídeo-triazol, mostrando assim a importância não só do meio hidrofóbico gerado pelos lipídeos, mas também a importância da carga negativa das moléculas SDS, pois nessas foi observada estruturação a menores concentrações de detergente, quanto comparado com as micelas neutras de DPC. Esses estudos na presença de micelas, quando comparado com aqueles realizados em TFE:H<sub>2</sub>O, se mostram mais acurados, uma vez que possuem características específicas de uma membrana, como a presença de uma interface hidrofílica-hidrofóbica.

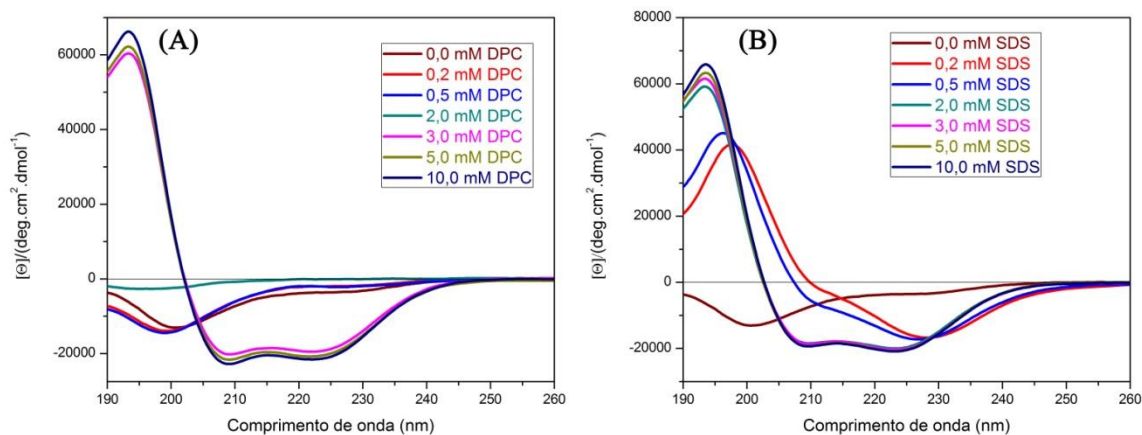


Figura 25 – Espectros de CD da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de DPC (A) e de SDS (B).

Os espectros da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 adquiridos na presença de vesículas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e na presença de vesículas de POPC:1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) na proporção de 3:1 (mol:mol), estão apresentados na Figura 26 (p. 37). Na presença de vesículas aniônicas a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 apresenta estruturação em conformação helicoidal, conforme observado para o GPT na presença de micelas e em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O, sendo um perfil helicoidal já observado para concentração de fosfolipídeos de 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, chegando-se a uma condição de saturação para concentração de lipídeos de 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>, uma vez que não se observa aumento significativo de helicidade para concentrações lipídicas de 1,0 e 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>. Todavia, os perfis espectrais obtidos para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de vesículas zwitteriônicas são consistentes com o de um peptídeo sem conformação preferencial, o que sugere que esse GTP não interage significativamente com vesículas de POPC. Portanto, nos meios biomiméticos de vesículas, fica bastante clara a importância da carga negativa das moléculas de POPG para o processo de interação peptídeo-membrana.

Vale ressaltar que a concentração de lipídeos é um limitante em experimentos de CD de peptídeos na presença de vesículas fosfolipídicas, uma vez que concentrações elevadas (normalmente superiores a 2,0 mmol.L<sup>-1</sup> para vesículas de 100 nm) levam a espalhamento de luz, portanto conclui-se que as interações do GTP para concentração de lipídeos até 1,5 mmol.L<sup>-1</sup> são muito fracas e que o peptídeo está presente majoritariamente em solução aquosa, ao invés de ligado à membrana. Apesar de espectros de CD da PS-2 na presença de vesículas de POPC não terem também apresentado perfil helicoidal, estudos de RMN do estado sólido da topologia e da interação com membranas realizados com a PS-2 reconstituída em bicamadas lipídicas

orientadas de POPC e de POPC:POPS (3:1) indicaram que o peptídeo nativo adota conformação helicoidal em ambos os meios, sendo as topologias de interação com as ambas as membranas a mesma (RESENDE *et al.*, 2014). Todavia, análises de larguras de linhas de ressonância sugerem interações mais fortes entre o peptídeo e a membrana aniônica (RESENDE *et al.*, 2014). Vale a pena ressaltar que nesses experimentos de RMN com o peptídeo reconstituído em bicamadas lipídicas, o peptídeo está em contato direto com a membrana, o que traz como resultado uma análise do peptídeo ligado à bicamada. No caso dos espectros de CD da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de vesículas de POPC, a obtenção de espectros consistentes com conformações randômicas indicam que o peptídeo se encontra em sua maior proporção na forma não ligada, ou seja, em solução aquosa.

Embora se tenham obtidos espectros com perfis helicoidais para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de vesículas de POPC:POPG (3:1), percebe-se um grau de helicidade inferior ao do GTP na presença de soluções micelares e em TFE:H<sub>2</sub>O (60:40). Resultado similar foi obtido para a PS-2 na presença de vesículas aniônicas de POPC:POPS (3:1) (RESENDE *et al.*, 2008), o que sugere o particionamento do peptídeo entre a forma ativa ligada à membrana e a forma randômica não ligada (VOIEVODA *et al.*, 2015).

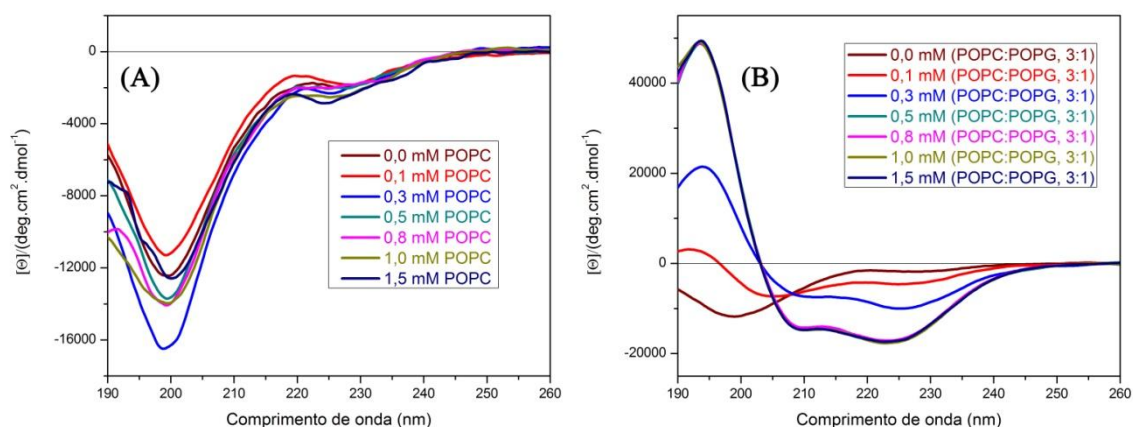


Figura 26 - Espectro da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de vesículas grandes unilamelares de POPC (A) e de (POPC:POPG, 3:1) (B).

### 3.3 RMN em solução

#### 3.3.1 Assinalamento dos sinais de RMN da cadeia polipeptídica

Os experimentos de TOCSY, NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC e <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC foram realizados para o peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) e em solução micelar de DPC-*d*<sub>38</sub> (a 400mmol.L<sup>-1</sup>).



Os assinalamentos foram realizados utilizando todos os mapas de contornos de forma simultânea, com o objetivo de obter o maior conjunto de informações sobre uma determinada correlação e então identificar o(s) respectivo(s) resíduo(s) constituinte(s) da cadeia polipeptídica. O mapa de contornos TOCSY é essencial na determinação da identidade dos resíduos de aminoácidos pois, através da análise desse espectro, é possível conectar todos os sinais dos núcleos de hidrogênio, que façam parte do mesmo sistema de *spins*, sendo possível correlacioná-lo a um tipo de resíduo de aminoácido, visto que diferentes resíduos possuem sistemas de *spins* característicos (WÜTHRICH, 1986). Na Figura 27 (p. 39) é apresentado um exemplo de correlações características para um resíduo de valina, onde no valor do deslocamento químico do respectivo sistema de *spins* é possível se observarem as correlações desse núcleo (hidrogênio amídico – HN) com outros núcleos de hidrogênio do resíduo. Entretanto, vale ressaltar que, para os resíduos com cadeia lateral longa (como lisina e arginina), normalmente não é possível visualizar todas as correlações intra-residuais na região de deslocamento químico amídica, uma vez que para os tempos de mistura comumente empregados a transmissão completa da magnetização por todo sistema de *spins* desses resíduos não é possível.

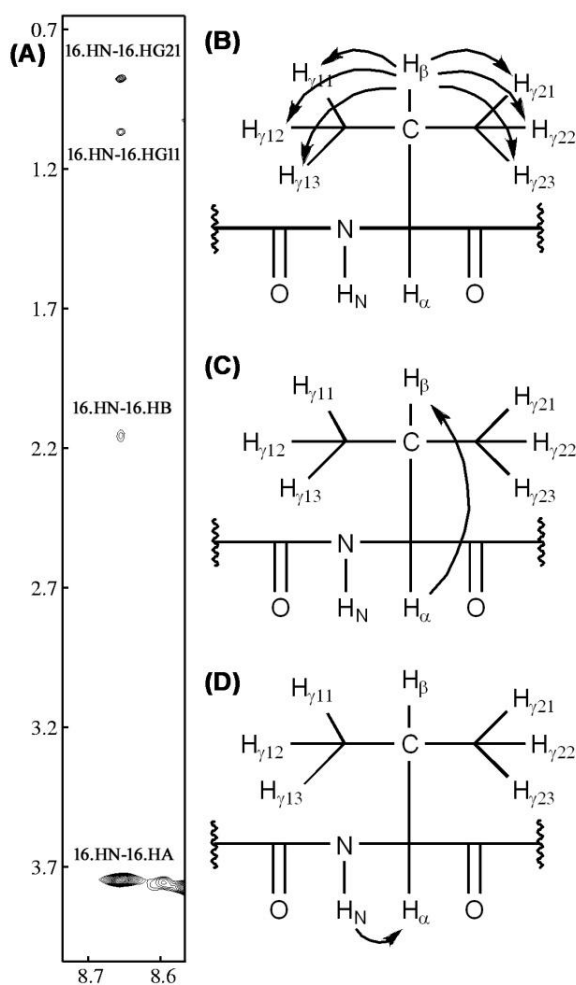


Figura 27 - (A) Ampliação do mapa de contornos TOCSY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na região de deslocamento químico do H amídico com os demais resíduos do sistema de spins da valina-16. Espectro obtido para o GTP em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), pH 7,0 em tampão fosfato 20mmol.L<sup>-1</sup>. As representações (B), (C) e (D) representam as conectividades determinadas nas respectivas correlações.

Apesar da análise de peptídeos por RMN já ser bastante consolidada, as inserção do motivo glicotriazólico na estrutura polipeptídica introduz algumas modificações importantes nos perfis espectrais dessa nova classe de moléculas. Para dar destaque à principais diferenças observadas, na Figura 28 (p. 40) são destacadas as principais regiões de correlações para um glicopiranosil-triazol-peptídeo no mapa de contornos TOCSY. Nesta imagem, observa-se o aparecimento de sinais em uma região não usual para o assinalamento de peptídeos (área em verde na Figura 28 (p. 40)), na qual os sinais dos hidrogênios da glicose correlacionam entre si, formando um sistema de *spins* característico de açúcares. Os hidrogênios do anel da glicose possuem uma relação anti-periplanar, já que todos se encontram em posição axial. Essa informação se mostra relevante na observação do sistema de *spins* da glicose, já que, no experimento TOCSY,

altas constantes de acoplamento favorecem a transmissão da magnetização, sendo assim possível se observar a transmissão da informação de *spin* ao longo de toda a cadeia do carboidrato, para tempos de misturas comumente utilizados em análises de peptídeos. No caso de epímeros da glicose, espera-se uma descontinuidade na transmissão da magnetização ao longo do anel do açúcar, uma vez constantes de acoplamento entre hidrogênios com relações 1,2-axial-equatorial e 1,2-diequatoriais apresentam valores significativamente menores que hidrogênios com relações 1,2-diaxiais.

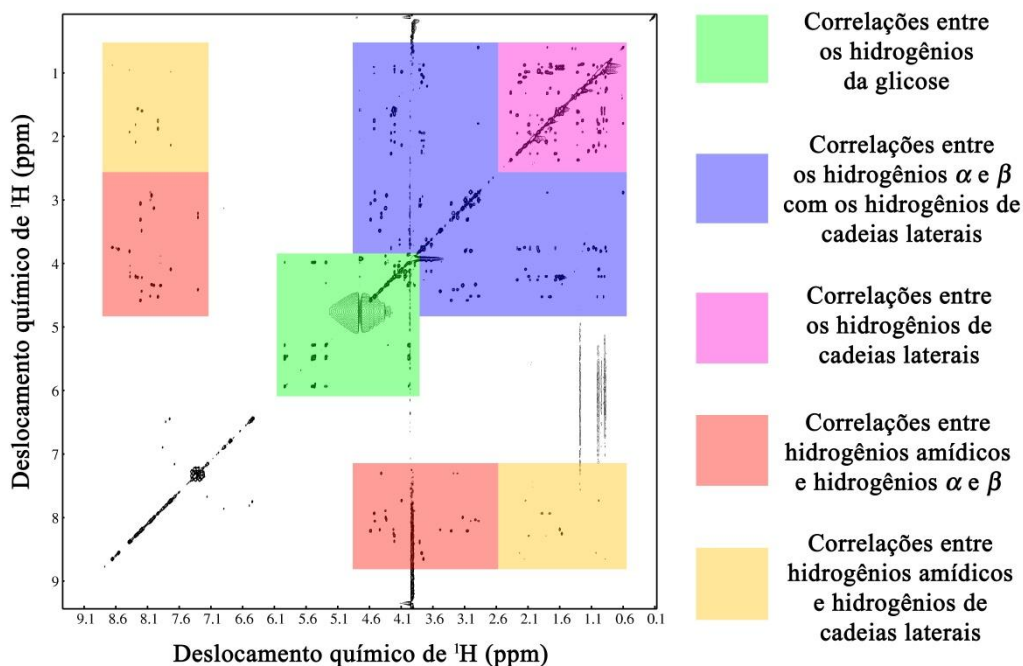


Figura 28 - Mapa de contornos TOCSY do [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>), com as regiões características de correlações destacadas, conforme descrito na própria figura.

A estratégia empregada no início do assinalamento da cadeia polipeptídica foi a determinação dos sistemas de *spins* dos resíduos de alanina, que são do tipo A<sub>3</sub>X-NH, apresentando, portanto, somente duas correlações na região de deslocamento químico amídico. Outro resíduo cujo HN apresenta somente duas correlações é o de glicina, devido à presença de dois hidrogênios alfa (HA), mas o deslocamento químico característico dos hidrogênios beta (HB) da metila ( $\delta_{\text{médio}}$  1,38) da alanina possibilita a diferenciação imediata entre os sistemas de *spins* desses dois resíduos. Portanto, é interessante iniciar o assinalamento dessa cadeia peptídica por essa abordagem, já que na sequência primária são identificados somente dos resíduos de alanina, nas posições 8 e 11. Durante todo o assinalamento dos sinais, além da análise de sistemas de *spins*, foi

utilizada a tabela de deslocamentos químicos do *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, ([http://www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/statful.htm](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm)), com o objetivo de comparação dos resultados experimentais, com as informações contidas nesse banco de dados.

Após realizada a atribuição de um sistema de *spins* através de análise do mapa de contornos TOCSY (conectividades intra-residuais), é iniciada a atribuição de conectividades inter-residuais, sendo utilizado o mapa de contornos NOESY para tal propósito. Através de dados de espectroscopia de CD, obtidos anteriormente aos experimentos de RMN, indicaram que o GTP adota conformações helicoidais nos meios investigados por RMN (ver seção 3.2). Dessa forma, correlações típicas estruturas  $\alpha$ -helicoidais (coforme mostrado na Figura 19, p.22), são esperadas.

Para explicar com é realizada a análise simultânea dos mapas de contorno TOCSY e NOESY é apresentado um exemplo na Figura 29 (p. 42), na qual são aprestandas duas expansões desses mapas de contornos em faixas de deslocamentos químicos idênticas. Na expansão do mapa de contornos TOCSY são observados três sistemas de *spins* diferentes. Iniciando-se pelo deslocamento químico do HN do resíduo 3 (3.HN), é possível observar três correlações intra-residuais através do mapa de contornos TOCSY, sendo essas também reconhecidas no mapa de contornos NOESY. Essas correlações se encontram nos deslocamentos químicos de 4,34, 3,99, 3,88, que são valores particularmente altos para ressonâncias de hidrogênios beta, caracterizando-se então um sistema de *spins* típico de resíduos de serina (deslocamentos químicos de , respectivamente 3.HA, 3.HB1 e 3.HB2). Entretanto, no mapa de contornos NOESY é observada uma correlação adicional, sendo essa do tipo seqüencial, proveniente da correlação de 3.HN com o HA resíduo anterior (2.HA, caracterizando-se uma correlação do tipo  $d\alpha N$ ). Seguindo a análise do mapa de contornos NOESY, é possível se observarem também correlações entre ressonâncias de hidrogênios do resíduo 3 e ressonâncias em deslocamento químico amídico, que não 3.HN. Para se caracterizarem as ressonâncias desse resíduo vizinho, recorre-se novamente ao mapa de contornos TOCSY, sendo então caracterizado o sistema de *spins* do resíduo 4, através da análise das correlações associadas ao deslocamento químico de 4.HN. Para o deslocamento químico de 4.HN se observa, no mapa de contornos NOESY, a correlação intra-residual 4.HN-4.HA e as correlações sequenciais, que envolvem três ressonâncias do resíduo 3, a saber 3.HA, 3.HB1 e 3.HB2, caracterizando-se correlações sequenciais do tipo  $d\alpha N$  e  $d\beta N$ . Além dessas correlações é possível observar uma correlação a média distância do hidrogênio alfa do resíduo 2 (2.HA) no deslocamento químico do hidrogênio amídico 4,

sendo essa uma correlação do tipo  $d\alpha N (i,i+2)$ . Deve-se ressaltar que a análise de outras regiões do mapa de contornos TOCSY possibilita as atribuições das demais ressonâncias dos núcleos de  $^1H$  da cadeia lateral do resíduo 4, que é um resíduo de leucina, estando essas demais ressonâncias em regiões de deslocamento químico entre 1,87, 1,00 e 0,90 ppm (dados não apresentados).

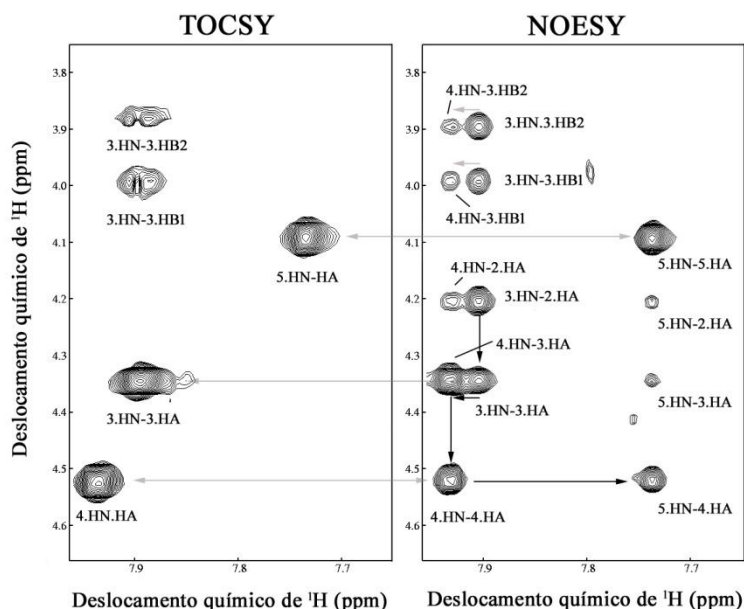


Figura 29 - Mapas de contornos parciais TOCSY (à esquerda) e NOESY (à direita) do [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

Dando continuidade ao assinalamento seqüencial, no mapa de contornos NOESY é possível observada correlação entre as ressonâncias de 4.HA e de outro HN, chegando-se, após análise do mapa de contornos TOCSY, ao sistema de spins do resíduo de isoleucina-5. No mapa de contornos NOESY outras correlações também são para o deslocamento químico de 5.HN, sendo essas a média distância, com as ressonâncias de 2.HA e 3.HA, ou seja correlações do tipo  $d\alpha N (i,i+3)$  e  $d\alpha N (i,i+2)$ , respectivamente.

A análise simultânea dos mapas de contorno TOCSY e NOESY possibilita a atribuição seqüencial dos sinais da cadeia peptídica, mas deve-se ressaltar que, para a determinação confiável de uma conectividade do tipo  $d\alpha N$ , é primordial a identificação dos sistemas de *spins* no mapa de contornos TOCSY, bem como a confirmação de outras correlações seqüenciais comumente presentes no mapa de contornos NOESY, como – por exemplo – conectividades do tipo  $d\beta N$  e  $dNN$ . No caso de motivos estruturais em  $\alpha$ -hélice, a caracterização de correlações a média distância dos tipos

$d\alpha N(i,i+y)_{y=2,3 \text{ e } 4}$  e  $d\alpha\beta(i,i+3)$  também confirmam as atribuições baseadas nas análises sequenciais.

Conforme mencionado anteriormente neste capítulo, a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 possui apenas dois resíduos de alanina em sua sequência, esses localizados nas posições 8 e 11. Devido à simplicidade desses sistemas de *spins*, decidiu-se iniciarem as interpretações pela localização das respectivas ressonâncias no mapa de contornos TOCSY. Uma vez localizados esses dois sistemas de *spins*, iniciou-se a análise do mapa de contornos NOESY, a fim de verificar as vizinhanças espaciais desses dois sistemas de *spins*, para então, atribuir a eles as posições corretas na cadeia polipeptídica para essas correlações associadas aos dois resíduos de alanina. O sinal de HN em  $\delta$  8,19 ppm correlaciona com cinco sinais de HA no mapa de contorno NOESY apresentado na Figura 30(A) (p. 44), sendo, obrigatoriamente, uma correlação intra-residual (que é prontamente reconhecida no mapa de contornos TOCSY) e quatro correlações inter-residuais. Ao se analisarem os sistemas de *spins* desses outros quatro resíduos no mapa de contornos TOCSY ( $\delta_{HN} = 8,25$  ppm), percebe-se que um deles associado ao outro resíduo de alanina, sendo, portanto, o sistema de spins com  $\delta_{HN} = 8,19$  ppm referente às ressonâncias do resíduo de alanina-11 (Figura 30(C) (p. 44)). Voltando à análise do mapa de contorno NOESY, observam-se duas correlações de 11.HN com ressonâncias de HB 3,00 ppm e 2,87 ppm, sendo essas correlações sequenciais do tipo  $d\beta N$  e esses valores de  $\delta_{HN}$  típicos de resíduos de asparagina, caracterizando-se então o sistema de spins do resíduo de asparagina-10, vizinho da alanina-11. A localização e as atribuições dos sistemas de *spins* dos resíduos de His-7 e Ile-9, também apresentados na Figura 30(D) (p. 44) se procederam de forma análoga. Na Figura 30(B) (p. 44), o segmento polipeptídico entre os resíduos 7-11 (HAINA) é representado em uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal, a fim de mostrar a proximidade entre resíduos separados por até quatro posições nesse tipo de motivo estrutural.

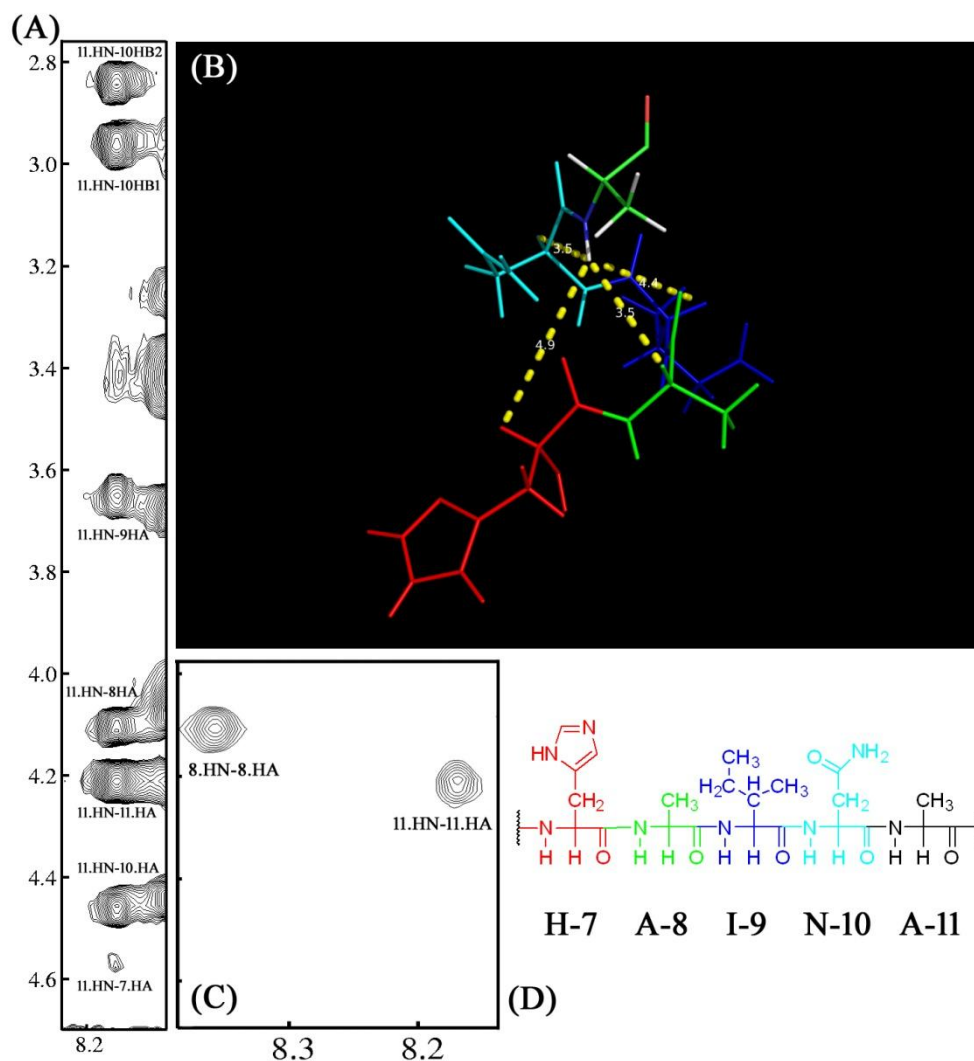


Figura 30 - (A) Mapa de contornos parcial NOESY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>). (B) Representação tridimensional dos resíduos 7 a 11 em uma  $\alpha$ -hélice. (C) Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) (D) Representação dos resíduos 7 a 11 em um segmento  $\alpha$ -helicoidal.

Após as atribuições das ressonâncias desse segmento da cadeia peptídica, procedem-se, de forma análoga, as identificações dos sistemas de *spins*, bem como as respectivas atribuições de seus sinais, de maneira análoga.

As conexões do tipo dNN são obtidas pela análise da expansão simétrica da região de ressonância de hidrogênios amídicos do mapa de contornos NOESY, como mostrado na Figura 31(A) (p. 45). Nesta região é possível se determinarem quais são os dois resíduos vizinhos àquele cujo deslocamento químico é analisado, chegando-se às correlações dNN e dNN(i,i-1). Resíduos de prolina não possuem hidrogênio amídico, todavia correlações análogas às envolvendo o HN de outros resíduos podem ser

observadas para os hidrogênios delta (HD) (WÜTHRICH, 1986). Nas análises sequenciais realizadas neste trabalho foi possível observar correlações dos hidrogênios delta da prolina (6.HD1 e 6.HD2) com os hidrogênios amídicos dos resíduos vizinhos (5.HN e 7.HN).

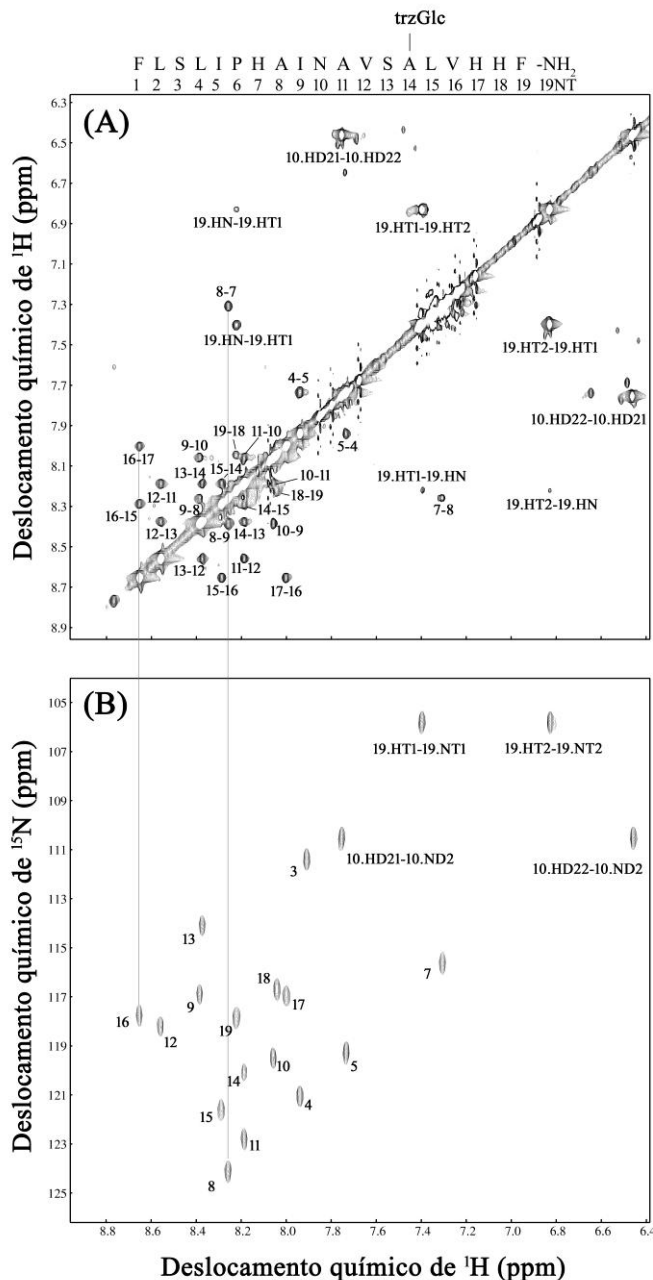


Figura 31 - Mapas de contornos NOESY (A) parcial e <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC (B) do [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-d<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

Outra abordagem também utilizada na determinação da identidade dos resíduos da cadeia peptídica é o uso simultâneo de um mapa de contornos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC. Neste mapa de contornos se observam as correlações entre as ressonâncias dos hidrogênios amídicos (HN) e dos nitrogênios (N) diretamente ligados. O uso deste mapa de



contornos auxilia na atribuição de sinais, uma vez que alguns resíduos ressonam em regiões características de deslocamento químico de nitrogênio. A dispersão dos sinais de HN também é um indício utilizado na constatação de estrutura tridimensional bem definida, pois quando um peptídeo se estrutura, cada resíduo estará exposto a um ambiente químico diferente e assim os sinais de ressonância tendem a apresentar maiores diferenças nas respectivas frequências de ressonância. Ao se analisar o mapa de contornos apresentado na Figura 31(B) (p. 45), é possível observar a conexão direta entre as informações obtidas nos dois tipos de experimentos, conforme ilustrado pelas linhas na que conectam os respectivos sinais de ressonância associados aos resíduos de Ala-8 e Val-16. As ressonâncias de hidrogênios amídicos de cadeias laterais de resíduos de asparagina e glutamina são também observadas no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Uma vez que estes resíduos possuem um grupo  $\text{NH}_2$ , esses hidrogênios são diastereotópicos e, portanto, duas correlações são observadas para a ressonância do respectivo nitrogênio no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. A [pOAcGlc-trz-A $^{14}$ ]PS-2 também é amidada na porção C-terminal e situação similar é observada para as correlações envolvendo as ressonâncias dos núcleos que constituem essa amidação (veja linha pontilhada). A presença destas duas correlações indica que esses hidrogênios experimentam ambientes químicos diferentes e que a cinética de rotação da ligação HN-CO é mais lenta do que a grandeza medida, no caso o deslocamento químico. A atribuição correta dessas correlações é feita com auxílio do mapa de contornos NOESY, uma vez que se observam correlações de nOe fortes dos hidrogênios 10.HD21 e 10.HD22 com os hidrogênios 10.HB1 e 10.HB2, bem como correlações nOe entre os hidrogênios da amidação C-terminal (19.HT1 e 19.HT2) com o hidrogênio amídico 19 (19.HN).

O uso do mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC editado, associado ao mapa de contornos TOCSY, é de extrema utilidade na atribuição dos sinais da cadeia peptídica, uma vez que essa associação facilita na identificação nas correlações TOCSY, pois no  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC os sinais de hidrogênio são dispersos na dimensão do carbono, que possui uma maior janela espectral, quando comparado com o hidrogênio. Outra funcionalidade no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC editado é a possibilidade da diferenciação das ressonâncias provenientes de carbonos metilênicos (fase negativa) das ressonâncias provenientes de carbonos metílicos e metínicos (fase positiva) (WILLKER *et al.*, 1993). Um exemplo do uso das fases na identificação dos resíduos é mostrado na Figura 32 (p. 47), onde é evidente a diferenciação dos sinais de correlações entre carbonos e

hidrogênios  $\beta$  dos resíduos de leucina-4 e isoleucina-5, sendo esses carbonos ligados a dois e um hidrogênio, respectivamente. Sendo de extrema importância na atribuição de sinais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 uma vez que essa possui três resíduos de leucina e dois de isoleucina em sua sequência.

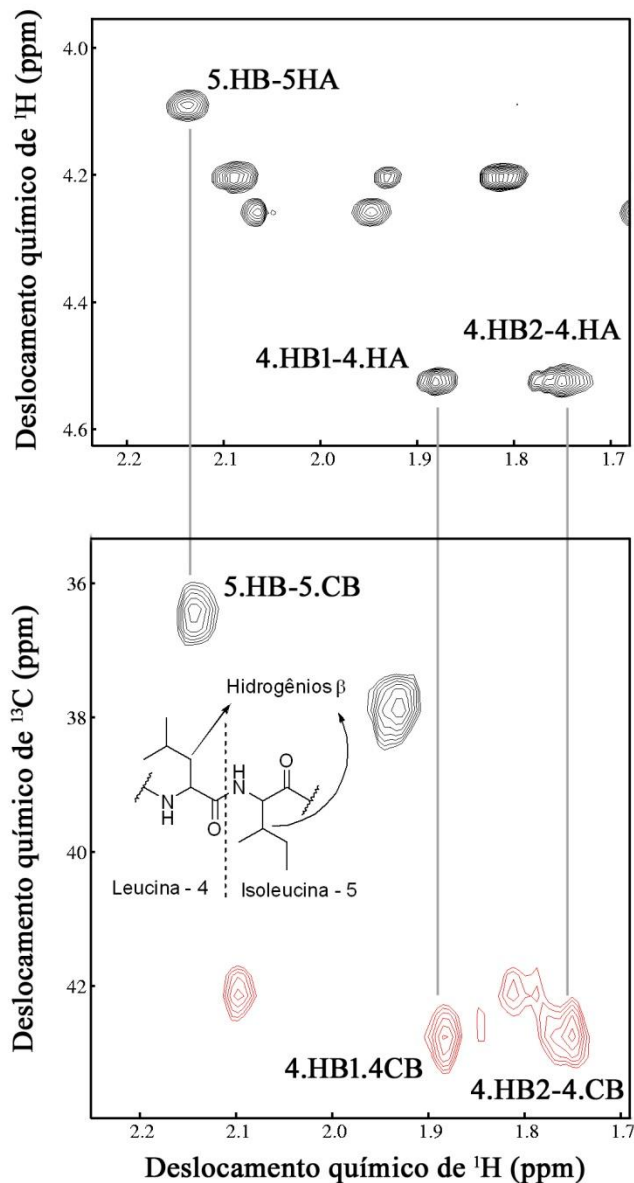


Figura 32 - Mapas de contornos parciais TOCSY (acima) e <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (abaixo) da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

### 3.3.2 Assinalamento dos sinais do resíduo 3-[per-*O*-acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazol]-Alanina

A cadeia glicosídica foi assinalada utilizando uma combinação dos mapas de contornos DQF-COSY, TOCSY, NOESY e <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC editado. A nomenclatura utilizada no assinalamento dos sinais está mostrada na Figura 33 (p. 48).

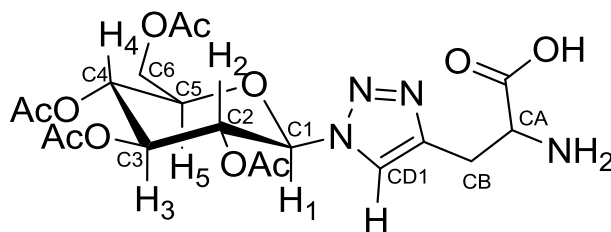


Figura 33 - Representação do resíduo 3-[*per-O*-acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazol]-Alanina, contendo o respectivo índice de nomenclatura.

No assinalamento das correlações provenientes do açúcar foi utilizado o mapa de contornos DQF-COSY para os experimentos realizados em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). Nesse mapa de contornos, verificou-se que no  $\delta$  de 5,93 ppm somente uma correlação era observada e, apresentando multiplicidade de duplete, indicando que o núcleo responsável por este sinal estava acoplado somente a outro hidrogênio. Ao se observar a estrutura da glicose, somente o H1 ou H6 possuem essas características. Ao se correlacionar essa ressonância com a do respectivo carbono no mapa de contornos <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, constatou-se tratar-se de H-1, devido ao  $\delta$  de <sup>13</sup>C característico de carbono anômérico (C1), observado em 88,0 ppm. A partir disso, foi realizado o assinalamento sequencial pelo mapa de contornos DQF-COSY e foi determinada a identidade de todos os hidrogênios da glicose. Entretanto, para os experimentos realizados na presença de solução micelar de DPC- $d_{38}$ , foi utilizado como referência para o assinalamento, os deslocamentos químicos dos carbonos obtidos nos experimentos realizados em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), uma vez que não foram realizados experimentos de DQF-COSY para essa amostra. As comparações e atribuições estão sumariadas na Tabela 2 (p.49). Curiosamente, apenas nos experimentos realizados para o GTP na presença de solução micelar de DPC- $d_{38}$ , é que se observou diferenças entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos de H6, tendo os valores sido coincidentes para o peptídeo em solução TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  determinados para o resíduo glicotriazólico da [pOAcGlc-trz- $A^{14}$ ]PS-2 em TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$  (60:40) e na presença de micelas de DPC- $d_{38}$ .

	$\delta$ de $^1\text{H}$ em TFE- $d_2$	$\delta$ de $^1\text{H}$ em DPC- $d_{38}$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em TFE- $d_2$	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em DPC- $d_{38}$
<b>14.HD11</b>	8,07	7,95	125,3	124,7
<b>1</b>	5,93	6,10	88,0	87,7
<b>2</b>	5,50	5,27	73,3	73,7
<b>3</b>	5,46	5,54	75,3	75,2
<b>4</b>	5,28	5,14	70,1	70,1
<b>5</b>	3,98	4,19	77,3	76,9
<b>6.1</b>	4,30	4,31	64,1	64,3
<b>6.2</b>	4,30	3,89	64,1	64,3

A proximidade entre os hidrogênios do açúcar da glicose com o hidrogênio triazólico (14.HD11) é verificada através de correlações nOe no mapa de contornos NOESY. De forma análoga, a conexão entre o hidrogênio triazólico (14.HD11) e os hidrogênios  $\beta$  é feita pela mesma abordagem. As diferentes regiões espectrais com correlações nOe características envolvendo a porção glicopiranosil-triazólica são mostradas na Figura 34 (p. 50).

Como a o anel de glicose está com todas as suas hidroxilas acetiladas, foram observadas correlações nOe entre os hidrogênios do anel da glicose e os hidrogênios metílicos dos grupos acetil.

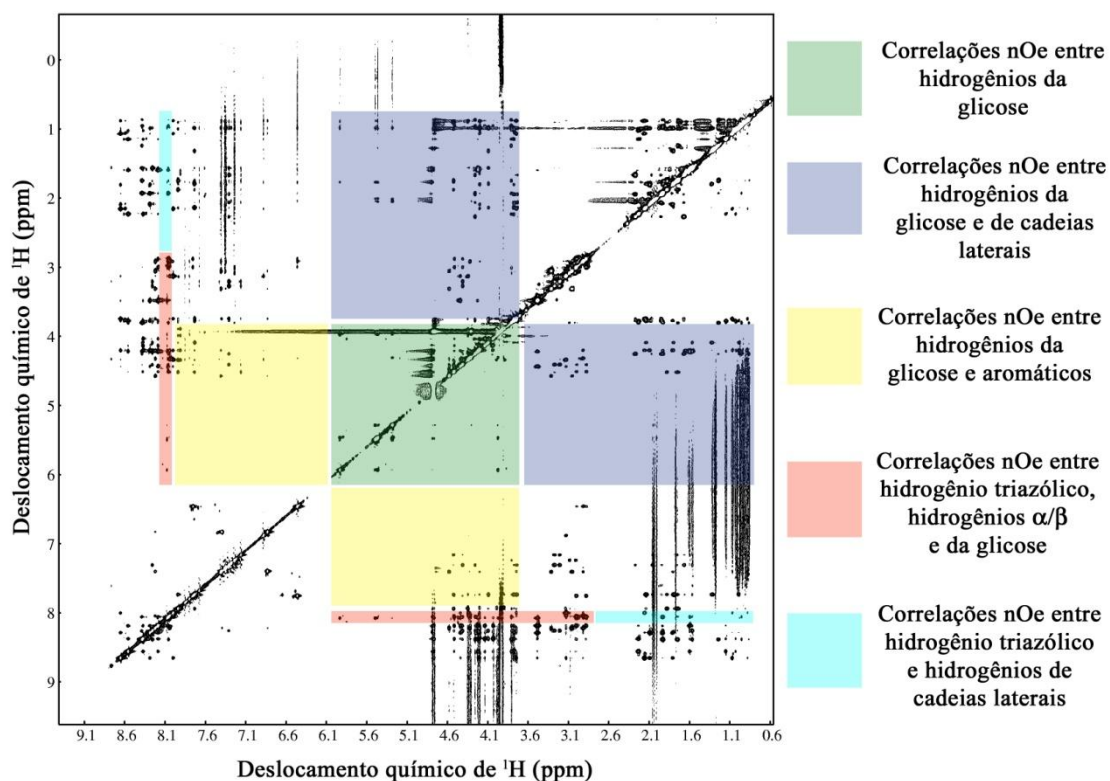


Figura 34 - Mapa de contornos NOESY do [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>), com as regiões características correlação nOe assinaladas.

### 3.3.3 Determinação da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40) por RMN

Devido a otimizações nas topologias e parâmetros utilizadas neste trabalho, o açúcar não se encontra acetilado, pois a sua versão acetilada está em processo final de adequação aos parâmetros CNS.

De acordo com a análise dos dados obtidos por CD para o glicopiranosil-triazol-peptídeo (seção 3.2), observa-se um máximo de helicidade já 40% de TFE, em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O. Entretanto, com o objetivo de se realizar uma análise comparativa entre a estrutura tridimensional de RMN da PS-2 (RESENDE *et al.*, 2008) e a da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, os experimentos com o glicopiranosil-triazol-peptídeo foram realizados com uma amostra preparada em de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O 60:40 (v:v), em pH 7,0, tampão fosfato 20 mmol.L<sup>-1</sup>.

A determinação da estrutura tridimensional, a partir da espectroscopia bidimensional de RMN em solução, foi realizada empregando a metodologia de Wüthrich (WÜTHRICH, 1986). A Figura 35 (p. 51) mostra o mapa de contornos

TOCSY parcial do peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40).

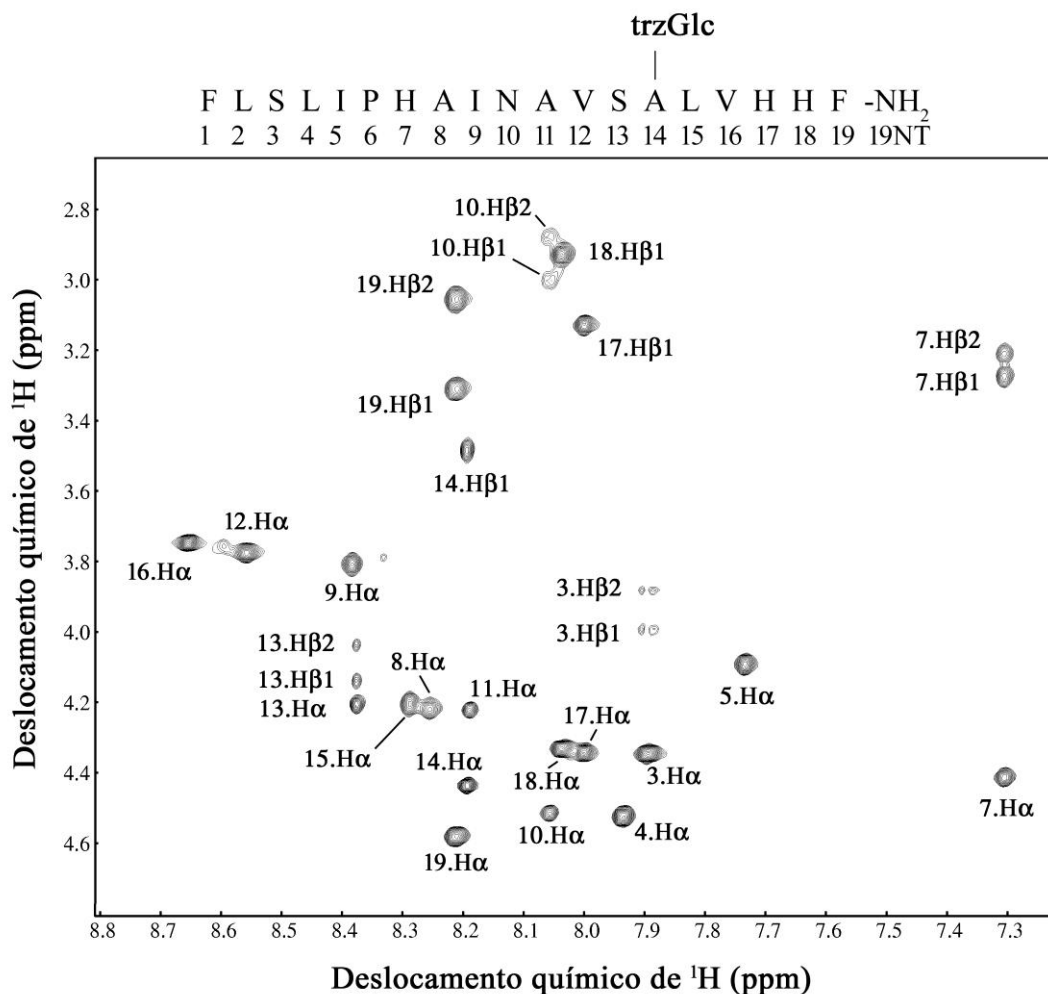


Figura 35 - Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

Neste mapa de contornos TOCSY (Figura 35), observam-se as correlações dos hidrogênios amídicos com os hidrogênios  $\alpha$  dos resíduos 3 ao 19, além de algumas correlações entre hidrogênios amídicos e  $\beta$ , não sendo observado o sistema de *spins* da prolina (resíduo 6), uma vez que esse resíduo não possui hidrogênio amídico. Observam-se ainda que as correlações dos pares de resíduos 9/13 e 11/15 apresentam coincidência nos deslocamentos químicos dos hidrogênios amídicos, irão que impossibilitará, nesses dois casos, atribuições de correlações do tipo  $d\alpha N(i,i+4)$  no mapa de contornos NOESY.

Conforme anteriormente apresentado, as correlações sequenciais foram estabelecidas pelo mapa de contornos NOESY, conforme exemplificado para as correlações dNN na Figura 31(A) (p. 45), merecendo destaque a correlação entre os

hidrogênios da amidação *C*-terminal e 19.HN, o que sugere certa estabilidade estrutural nas proximidades da porção *C*-terminal do GTP.

Na presença de solução de TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40), muitas correlações de nOe a média distância foram observadas, sugerindo um arranjo estrutural efetivo da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2. Na porção *N*-terminal foram observadas correlações do tipo  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ , mostrando que essa região possui um certo caráter de ordenamento estrutural definido. Correlações a média distância do tipo  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ ,  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$  e  $d_{\alpha N}(i,i+4)$  são observadas do quinto resíduo até a amidação *C*-terminal, indicando que o peptídeo apresenta um arranjo helicoidal bem definido para esse segmento. Um sumário das principais correlações sequenciais e a média distância é mostrado na Figura 36.

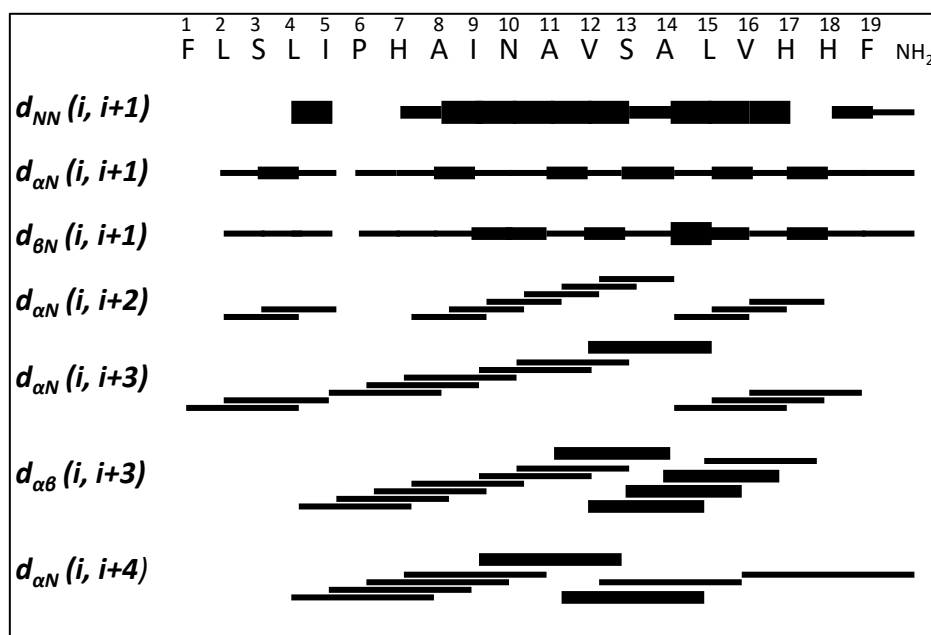


Figura 36 - Sumário das principais conectividades nOe para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

Conforme abordado na metodologia (p. 30), as correlações nOe tiveram suas intensidades convertidas em restrições de distância semi-quantitativas, as quais foram utilizadas nos cálculos estruturais, juntamente com as restrições de ângulos diedros, provenientes dos deslocamentos químicos dos átomos da cadeia peptídica. A Figura 37 (p. 53) apresenta a sobreposição das dez estruturas mais estáveis obtidas para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40).

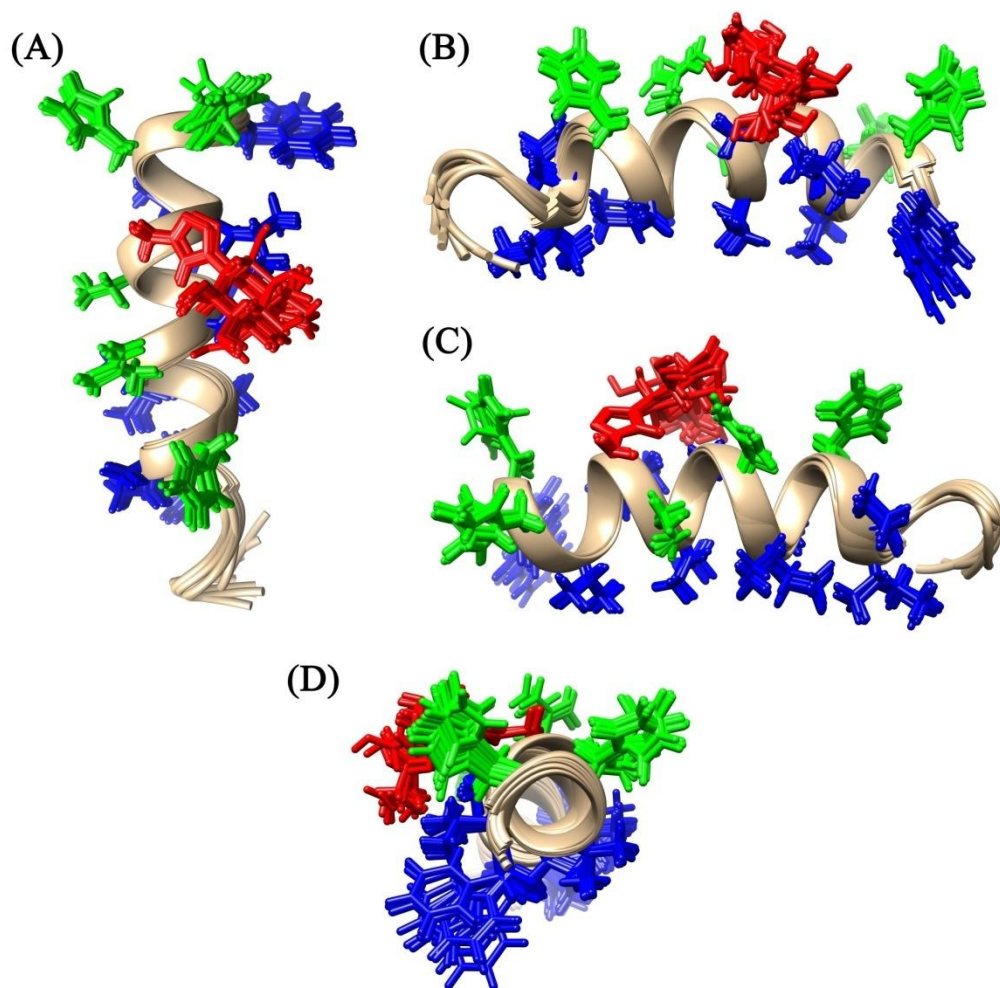


Figura 37 - Dez estruturas de menor energia obtidas para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>). (A) Representação evidenciando os resíduos hidrofílicos. (B) e (C) Representação da interface dos resíduos polares e apolares. (D) Representação da porção C-terminal. As cadeias laterais dos resíduos apolares estão representados em azul e de resíduos polares em verde, sendo o resíduo 14 apresentado em vermelho.

Conforme já esperado pela análise das correlações de nOe a média distância (Figura 36 (p. 52)), as estruturas calculadas evidenciam motivo estrutural de  $\alpha$ -hélice de quinto resíduo até a amidação C-terminal, correspondendo a um teor de hélice de 79%. Outra característica observada pela análise das estruturas é a alta anfipaticidade do glicopiranosil-triazol-peptídeo. Ao se observar o resíduo 14 (representado em vermelho), nota-se que ele possui uma orientação específica na cadeia peptídica e que mesmo sendo um resíduo disposto na face hidrofílica do glicopiranosil-triazol-peptídeo (Figura 37(A)-(D)) parte de sua cadeia lateral parece tender a se voltar para a face hidrofóbica.



Na Figura 38 é apresentada a análise da qualidade estereoquímica dos resíduos de aminoácidos das 10 estruturas mais estáveis obtidas. Com a exceção de apenas um caso, todos os pares angulares  $\Phi$  e  $\Psi$  estão localizados em “regiões mais favoráveis” ou “regiões adicionalmente favoráveis” do diagrama de Ramachandra, estando a grande maioria localiza em “regiões mais favoráveis”. A exceção, localizada em “região proibida” é relacionada ao resíduo de Leucina-2 de uma única estrutura, portanto não se encontra em uma porção estruturada.

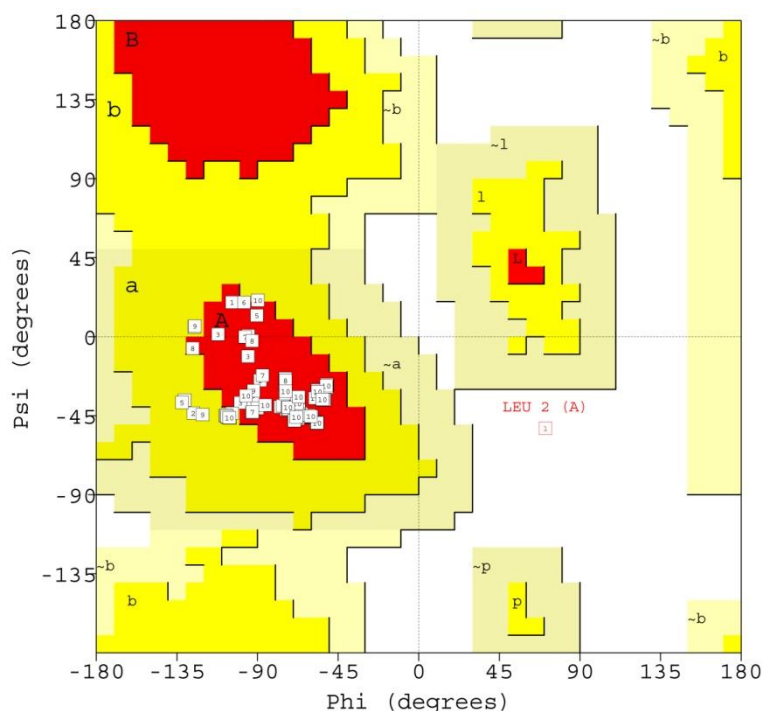


Figura 38 - Qualidade estereoquímica das 10 estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>). "Regiões mais favoráveis" são apresentadas em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" são representadas em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" representadas em bege e "regiões proibidas" representadas em branco. Dados obtidos com o uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI *et al.*, 1996).

As estatísticas das análises estruturais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 estão sumarizadas a seguir na Tabela 3 (p. 55). Os valores obtidos para RMSD (desvio padrão quadrático médio) mostram que as estruturas possuem uma estrutura tridimensional definida e os valores de RMSD são ainda menores quando considerados apenas o segmento helicoidal, não ultrapassando 1,0 Å para todos os átomos.

Tabela 3 - Sumário das estatísticas estruturais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>).

<b>RMSD – Todos os resíduos<sup>a</sup></b>	
Esqueleto	0,58 Å
Esqueleto e átomos pesados	1,09 Å
Todos os átomos	1,51 Å
<b>RMSD – Segmento helicoidal<sup>a,b</sup></b>	
Esqueleto	0,27 Å
Esqueleto e átomos pesados	0,63 Å
Todos os átomos	0,97 Å
<b>Análise do diagrama de Ramachandran</b>	
Resíduos em regiões mais favoráveis	88,1%
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	11,2%
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0,0%
Resíduos em regiões proibidas	0,6%
Número total de restrições de distancia	554
Número de restrições intra-residuais	303
Número de restrições sequencias (i,i+1)	139
Número de restrições a média distâncias (i,i+j) <sub>j=2,3 e 4</sub>	112

a – valores de RMSD obtidos com o uso do programa Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004)

b – dados da Ile-5 a Phe-19

Com o objetivo de realizar uma análise comparativa entre as estruturas da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 com a do peptídeo nativo (PS-2), ambas em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), são inicialmente apresentados ambos os mapas de contornos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC superpostos na Figura 39 (p. 56). A partir da desta imagem é possível observar que alguns sinais em específico mostraram uma relevante modificação no seu deslocamento químico, devido à substituição da T14 pelo resíduo glicopiranosil-triazol, sendo que as modificações de deslocamentos químicos dos sinais dos resíduos 11 e 15 são as mais pronunciadas. Essas modificações associadas à ausência de modificação no deslocamento químico do resíduo 13 sugerem que a unidade glicopiranosil-triazólica possui uma configuração específica no arranjo  $\alpha$ -helicoidal, pois ela está influenciando as ressonâncias do resíduo subsequente, resíduo 15, e no resíduo 11, que se encontra espacialmente próximo devido ao arranjo em  $\alpha$ -hélice possuir em média 3,5 resíduos a cada volta. Se a unidade glicopiranosil-triazólica não possuísse orientação preferencial,

seria de se esperar modificações nos deslocamentos químicos dos núcleos de nitrogênio e hidrogênio amídico do resíduo vizinho de Ser-13.

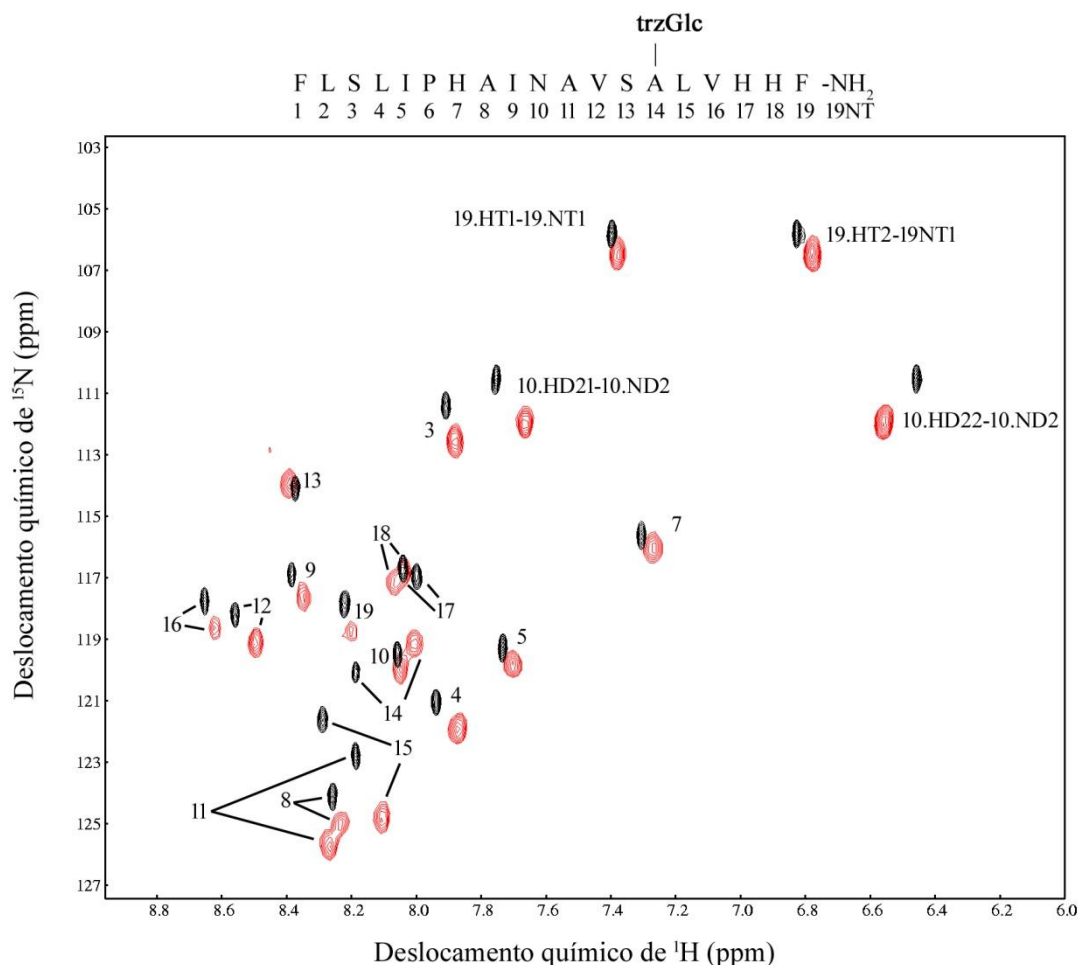


Figura 39 - Superposição dos mapas de contornos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 (em preto) e da PS-2 (em vermelho) em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40), em pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>) (Adaptada de (RESENDE, 2008)).

Com o objetivo de se obter uma análise estrutural comparativa da PS-2 (PDB 2JPY) e da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40), foram selecionadas as estruturas de menor energia para cada um desses peptídeos e se realizou uma sobreposição destas estruturas (Figura 40 (p. 57)). Através da sobreposição dessas estruturas é possível observar que, no geral, as cadeias principais (*backbone*) são similares em aproximadamente em quase toda extensão dos peptídeos, com exceção da porção C-terminal, que é observada uma diminuição entre o espaçamento da hélice para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em relação ao peptídeo nativo, conforme destacado na Figura 40 (p. 57). Outro resíduo que teve sua disposição tridimensional alterada foi o de L-15, vizinho ao resíduo glicopiranosil-triazólico. Embora pequenas modificações possam ser

observadas nas posições relativas das cadeias laterais de outros resíduos, a orientação da cadeia principal é mantida.

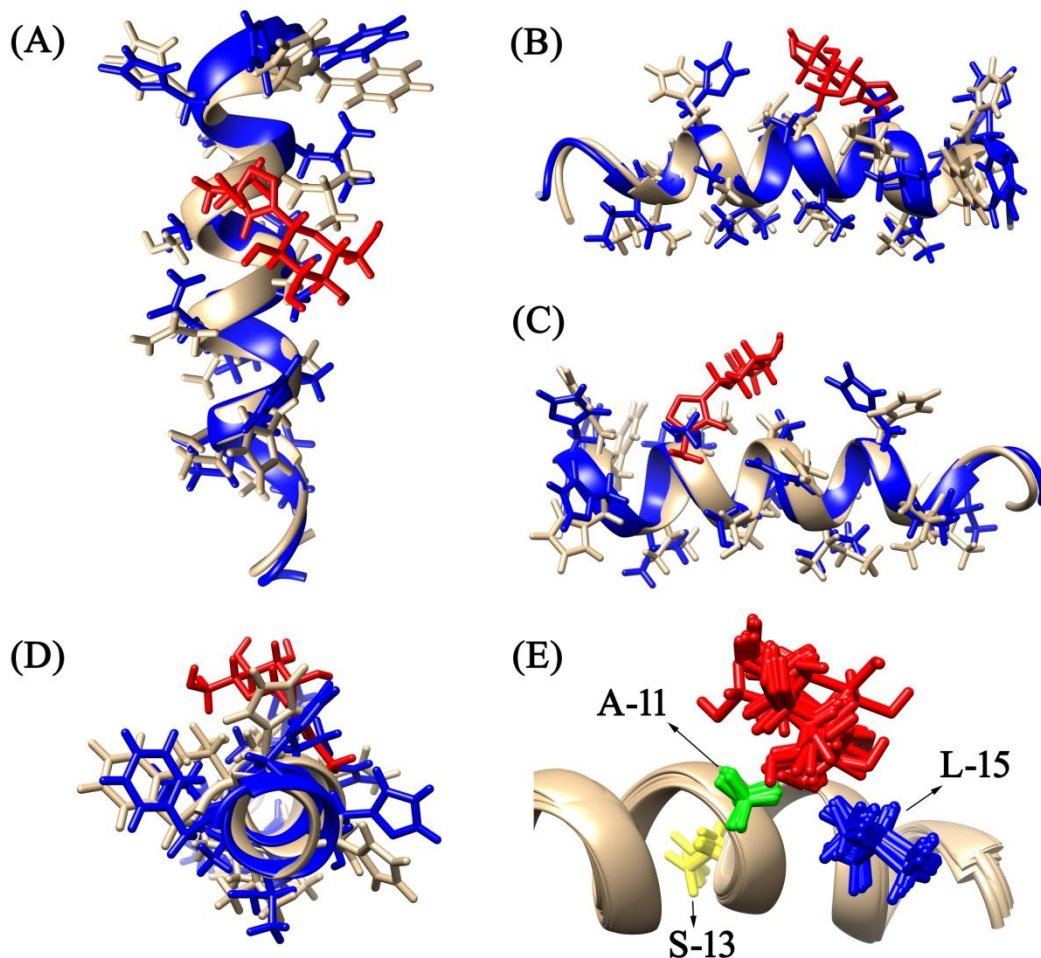


Figura 40 –(A-D) Sobreposição da PS-2 (PDB 2JPY) (azul) e da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 (prata) em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>). (A) Representação evidenciando a porção glicopiranosil-triazólica. (B) e (C) Representação lateral. (D) Representação da porção C-terminal. (E) Representação das dez estruturas mais estáveis apenas da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>). O resíduo 14 da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 é apresentado em vermelho.

Por fim é mostrada na Figura 40 (E) uma ampliação nas dez estruturas mais estáveis apenas da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), com os resíduos A-11 (verde), S-13 (amarelo) e L-15 (azul) destacados. É nítida a maior proximidade espacial da cadeia lateral do resíduo 3-[*per-O*-acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazol]-Alanina, com relação aos resíduos de Ala-11 e Leu-15, tendo-se uma distância considerável em relação ao resíduo de Ser-13. Essa disposição espacial da unidade glicopiranosil-triazólica corrobora as alterações de deslocamentos químicos observadas no mapa de contornos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC da Figura 39 (p. 56), *i.e.*, significativamente

acentuadas para os resíduos de Ala-11 e Leu-15 e insignificantes para o resíduo de Ser-13.

### 3.3.4 Determinação da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) por RMN e sua comparação com a estrutura obtida em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40)

Os experimentos da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) foram adquiridos de forma análoga àquela utilizada para os experimentos realizados em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40). Ao se compararem os respectivos mapas de contornos TOCSY (Figura 35 (p. 51) e Figura 41 (p. 59)), percebem-se sinais significativamente mais largos para o espectro obtido na solução micelar. Outra diferença é a ausência de correlações entre hidrogênios amídicos e hidrogênios das cadeias laterais, sendo observadas, no máximo, correlações até os hidrogênios  $\beta$  nos espectros obtidos para o GTP em solução micelar. Outra diferença observada na análise mapa de contornos TOCSY do peptídeo em solução micelar é a presença de correlações entre o 2.HN com hidrogênios da sua cadeia lateral, correlações essas ausentes no respectivo espectro do peptídeo em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40). Ressalta-se ainda que algumas correlações, por estarem significativamente alargadas, são resolvida de forma mais clara, quando analisadas em lado oposto da diagonal, como correlações dos hidrogênios 14.HA e 17.HA que são mais bem resolvidas na região oposta à mostrada na Figura 41 (p. 59).

Alguns hidrogênios amídicos, a saber 13/16, 4/14/17 e 5/19, apresentam coincidência de deslocamento químico. Com isso, algumas correlações de nOe a média distância, que poderiam ser esperadas para um peptídeo estruturado em  $\alpha$ -hélice, (por exemplo correlação 16.HN-13.HA do tipo  $d\alpha N (i,i+3)$ ) não podem ser resolvidas.

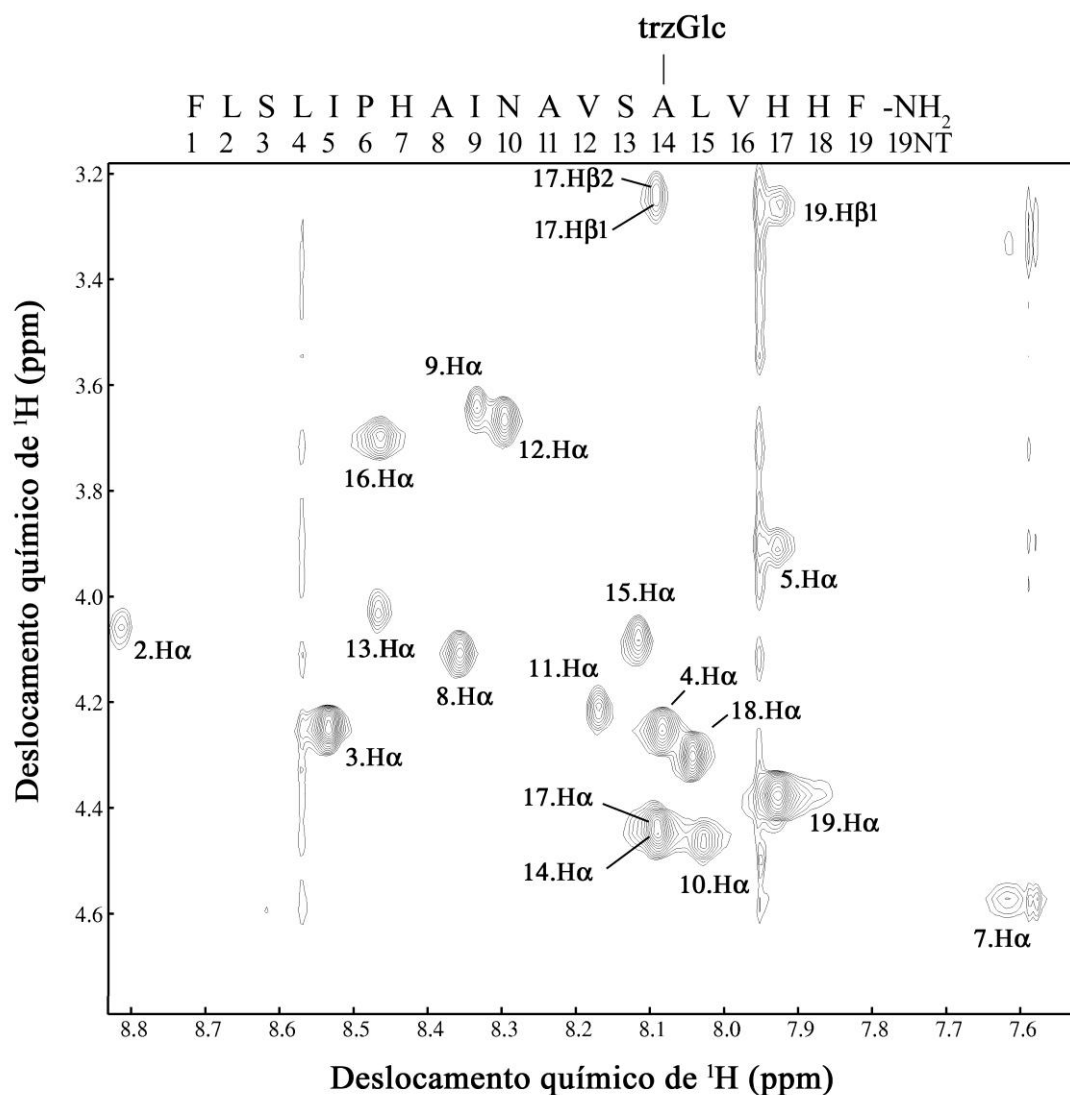


Figura 41 - Mapa de contornos parcial TOCSY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>).

Através do mapa de contornos NOESY foram estabelecidas correlações sequenciais (Figura 42 (p. 60)). Devido à proximidade dos deslocamentos químicos amídicos de alguns hidrogênios e ao alargamento das linhas de ressonância, algumas correlações nOe do tipo dNN não foram observadas. Uma correlação nOe não usual entre o hidrogênio amídico do resíduo de Leu-2 com o hidrogênio delta do resíduo de Phe-1 é observada no mapa de contornos NOESY.

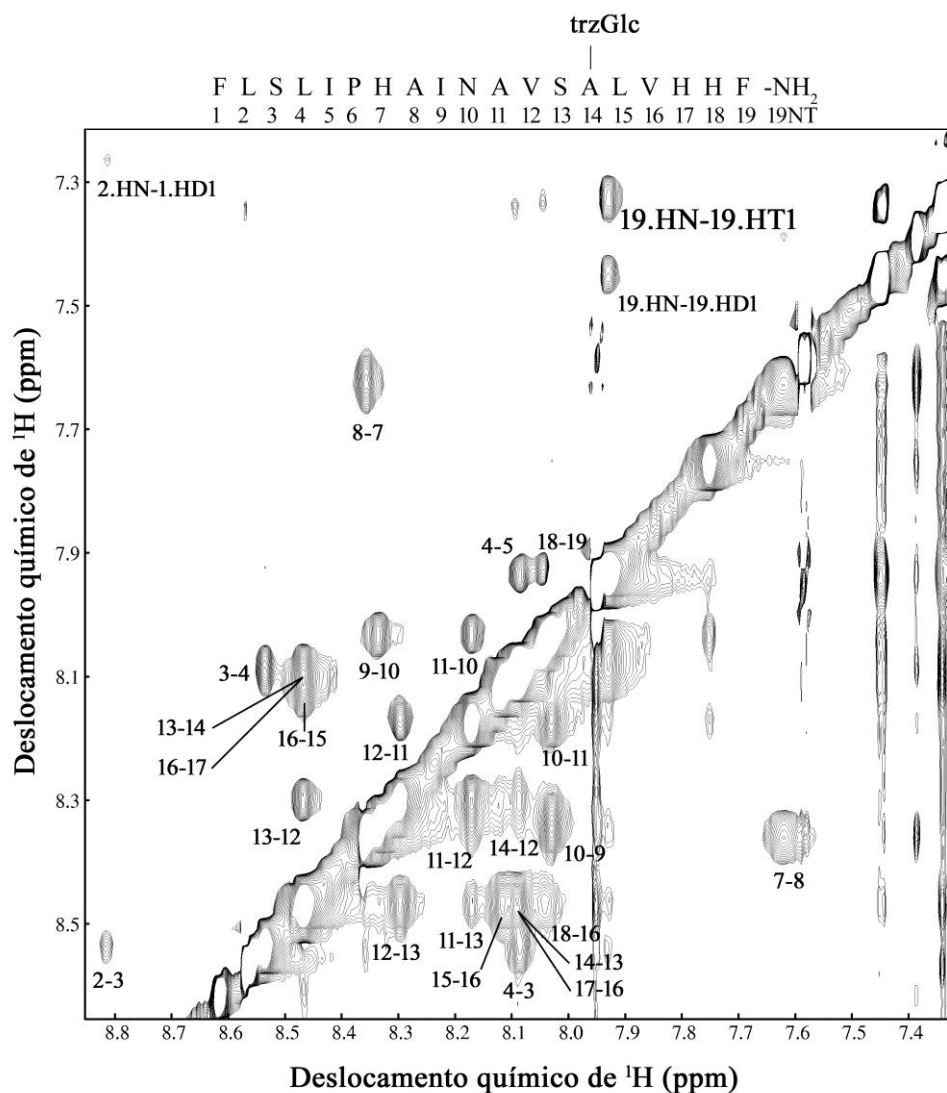


Figura 42 - Mapa de contornos parcial NOESY da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>).

Para o GTP na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>), muitas correlações de nOe a média distância foram observadas, sugerindo um arranjo estrutural efetivo da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2. Igualmente ao ocorrido para o GTP em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), foram observadas correlações do tipo  $d\alpha\text{N}(i,i+3)$  na porção *N*-terminal, indicando assim um certo caráter de ordenamento estrutural definido para essa região. Correlações a média distância do tipo  $d\alpha\text{N}(i,i+3)$ ,  $d\alpha\beta(i,i+3)$  e  $d\alpha\text{N}(i,i+4)$  são observadas do quarto resíduo até a amidação *C*-terminal. Um sumário das principais correlações sequenciais e a média distância é mostrado na Figura 43 (p. 61).

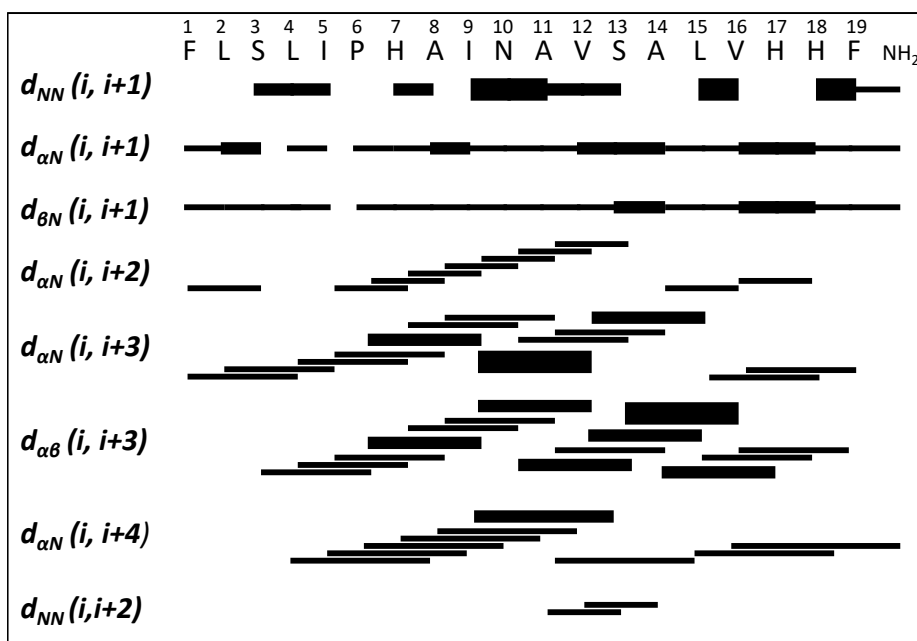


Figura 43 - Sumário das principais conectividades nOe para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>)

As correlações nOe tiveram suas intensidades transformadas em restrições de distância, as quais foram utilizadas, juntamente com as restrições de ângulos diedros provenientes dos deslocamentos químicos da cadeia peptídica, em rotinas de *simulated annealing* para determinação da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 na presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>). A sobreposição das dez estruturas mais estáveis obtidas é apresentada na Figura 44 (p. 62).

Para representação das estruturas mostradas, foi utilizado o programa Chimera, este programa possui um algoritmo de reconhecimento de motivos estruturais baseados em energias da ligação de hidrogênio dos átomos da cadeia da principal e de quantos resíduos constituem cada motivo estrutural (KABSCH; SANDER, 1983). Assim, não são mostradas para essas estruturas as representações características de  $\alpha$ -hélice (*ribbon*), mesmo que constatadas pelo sumário de nOe (consistente com  $\alpha$ -hélice do resíduo 5 até a porção C-terminal). Uma outra comprovação que esta é uma característica de análise do algoritmo deste programa, é que, quando esse conjunto de estruturas é analisado pelo programa Pymol, utilizando os parâmetros de geometria e força da ligação de hidrogênio dos átomos da cadeia principal, as representações de  $\alpha$ -hélice do 5 resíduo até, aproximadamente, a amidação C-terminal são observadas Figura 44 (F) (p. 62).



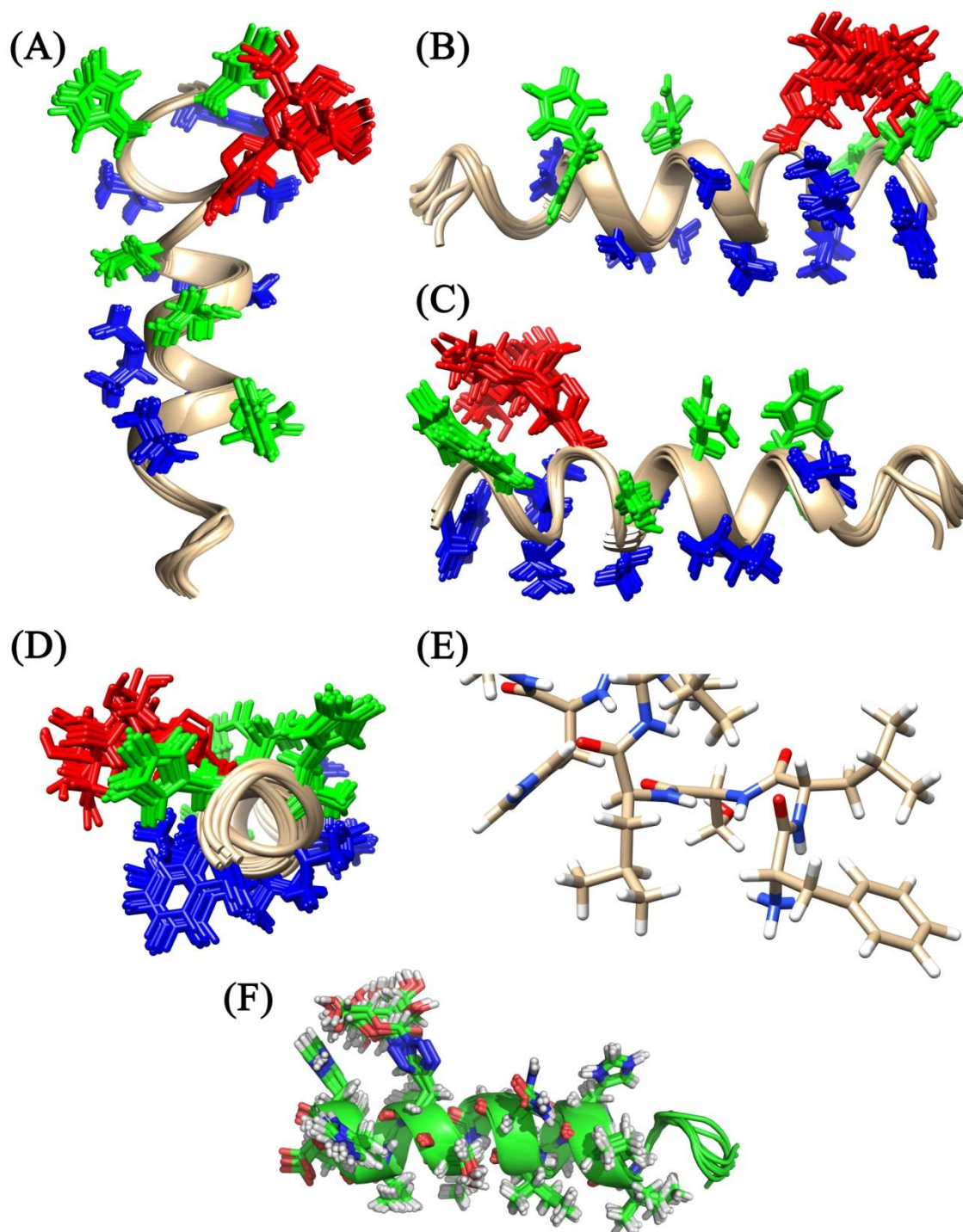


Figura 44 - (A-D) Dez estruturas de menor energia obtidas para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) (A) Representação evidenciando os resíduos hidrofílicos. (B) e (C) Representação da interface dos resíduos polares e a apolares. (D) Representação da porção C-Terminal. (E) Representação da porção N-terminal da estrutura de menor energia. As cadeias laterais dos resíduos apolares estão representadas em azul e de resíduos polares em verde, sendo o resíduo 14 apresentado em vermelho. (F) Representação da estrutura tridimensional gerada pelo *software* Pymol evidenciando a descrição da  $\alpha$ -hélice.

Apesar do GTP apresentar significativo caráter anfipático, percebe-se uma pequena descontinuidade na face hidrofílica, que expõe parcialmente o resíduo hidrofóbico de Ile-15 (Figura 44 (A) e (D) (p. 62)). Curiosamente, ao se analisar em detalhes o alinhamento do resíduo 3-[*per-O*-acetil- $\beta$ -Glicopiranosil-1,4-triazólico]-Alanina (representado em vermelho), percebe-se sua aproximação a cadeia lateral do resíduo de His-18, o que indica uma orientação específica desta unidade glicopiranosil-triazólica na cadeia peptídica.

A seguir é apresentada a Figura 45, na qual é mostrada a análise da qualidade estereoquímica dos resíduos de aminoácidos das dez estruturas mais estáveis obtidas. A maioria dos pares angulares  $\Phi$  e  $\Psi$  estão localizados em “regiões mais favoráveis” e “regiões adicionalmente favoráveis” do diagrama de Ramachandran.

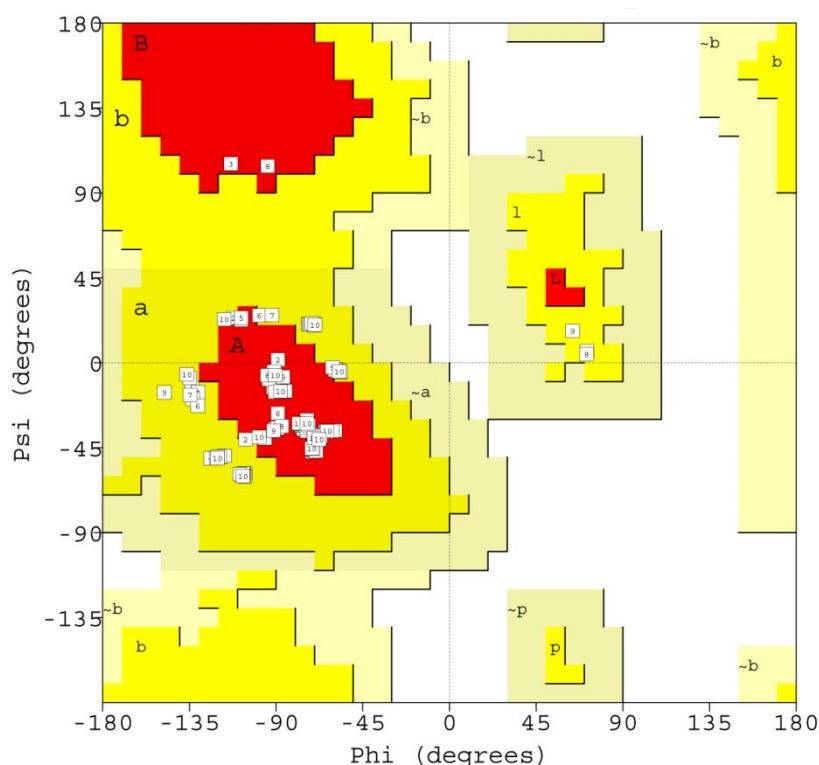


Figura 45 - Qualidade estereoquímica das dez estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>). "Regiões mais favoráveis" são apresentadas em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" são representadas em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" representadas em bege e "regiões proibidas" representadas em branco. Dados obtidos com o uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI *et al.*, 1996).

As estatísticas das análises estruturais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) estão sumariadas a seguir na Tabela 4 (p. 64). Os valores obtidos para RMSD sugerem que as estruturas possuem uma flexibilidade

conformacional (1,19 Å), sendo que, quando considerada somente a porção helicoidal, não se nota diminuição considerável no valor do RMSD, diferentemente do observado para as estruturas calculadas em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40).

Tabela 4 - Sumário das estatísticas estruturais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em presença de micelas de DPC- $d_{38}$  (400 mmol.L<sup>-1</sup>).

<b>RMSD – Todos os resíduos<sup>a</sup></b>	
Esqueleto	0,56 Å
Esqueleto e átomos pesados	1,19 Å
Todos os átomos	1,53 Å
<b>RMSD –Segmento helicoidal<sup>a,b</sup></b>	
Esqueleto	0,42 Å
Esqueleto e átomos pesados	1,10 Å
Todos os átomos	1,41 Å
<b>Análise do diagrama de Ramachandran</b>	
Resíduos em regiões mais favoráveis	65,6%
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	34,4%
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0,0%
Resíduos em regiões proibidas	0,0%
Número total de restrições de distancia	533
Número de restrições intra-residuais	299
Número de restrições sequencias (i,i+1)	152
Número de restrições a média distâncias (i,i+j) <sub>j=2,3 e 4</sub>	132

a – valores de RMSD obtidos com o uso do programa Chimera (PETERSEN *et al.*, 2004)

b – dados da Ile-5 a Phe-19

Com o objetivo de realizar uma análise comparativa entre as estruturas da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em solução de TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60:40) e em presença de micelas de DPC- $d_{38}$  (400 mmol.L<sup>-1</sup>) são apresentados os respectivos mapas de contornos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC superpostos na Figura 46 (p. 65). São observadas algumas diferenças, como a presença da correlação amídica do resíduo de Leu-2 apenas no mapa de contornos obtido para o GTP em presença de micelas, sugerindo maior organização que para a porção N-terminal, uma vez que esse hidrogênio não está envolvido em um processo de troca que não possibilite o aparecimento da sua correlação. Essa maior organização estrutural também é observada nas análises estatísticas, uma vez que, quando se considera somente a região helicoidal, não se observam variações grandes nos valores de RMSD com relação aos obtidos quando se analisam todos os resíduos.

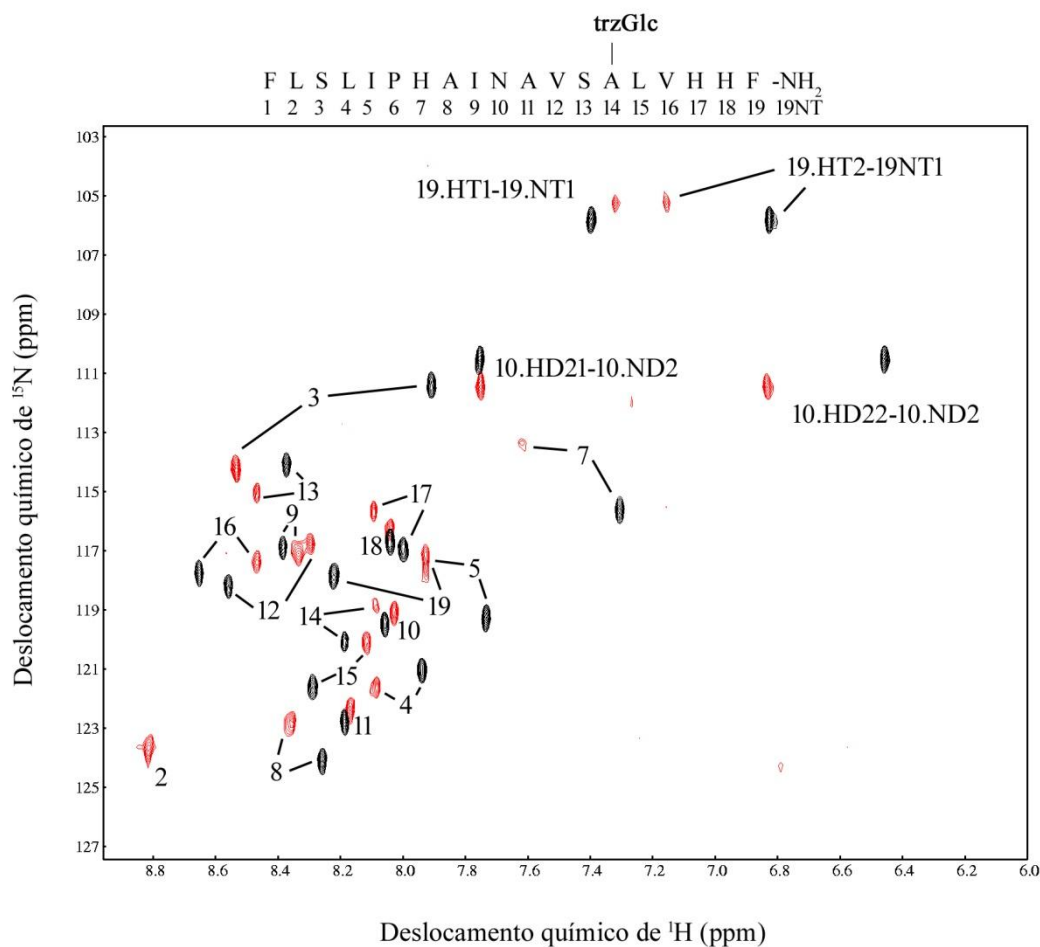


Figura 46 - Superposição dos mapas de contornos <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), em pH 7 (tampão fosfato 20,0 mmol.L<sup>-1</sup>) (em preto) e em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>) (em vermelho).

As estruturas de menor energia obtida para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em cada um desses meios são apresentadas de maneira sobreposta na Figura 47 (p. 66). As maiores alterações nas duas estruturas são observadas na porção *C*-terminal, onde distorções na cadeia principal são observadas. Uma outra diferença evidente é na disposição da unidade glicopiranosil-triazólica, que está disposta preferencialmente em direção dos resíduos 11 e 15 para o GTP na presença do co-solvente, ao passo que, esse resíduo está orientado para a interface hidrofílica para o GTP em presença de micelas de DPC, ficando disposto mais próximo à cadeia lateral do resíduo de His-18.

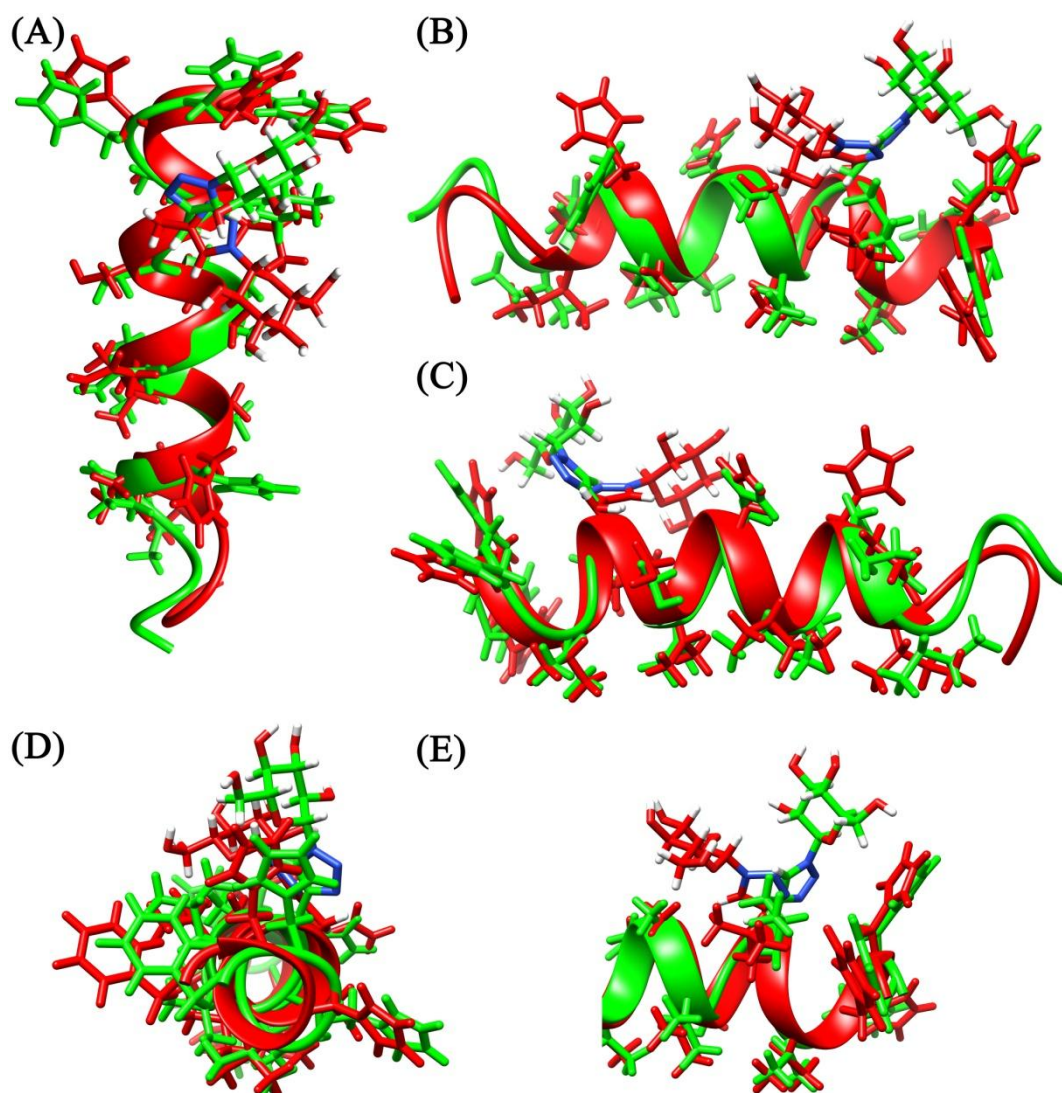


Figura 47 - Sobreposição das estruturas mais estáveis da  $[p\text{OAcGlc-trz-A}^{14}]\text{PS-2}$  em  $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$  (60:40), pH 7 (tampão fosfato  $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (em vermelho) e em presença de micelas de  $\text{DPC-}d_{38}$  ( $400 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (em verde). (A) Representação evidenciando a porção glicopiranosil-triazólica. (B) e (C) Representação lateral. (D) Representação da porção C-terminal. (E) Representação das diferenças da porção glicopiranosil-triazólica com a porção C-terminal.

Alguns estudos na literatura retratam a estabilização da porção C-terminal através de interações do dipolo da hélice com cadeias laterais positivamente carregadas (ARMSTRONG; BALDWIN, 1993; CAFFREY; CUSANOVICH, 1991). Em estudos anteriores com a PS-2 em solução de  $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$  (60:40) (RESENDE *et al.*, 2008) propuseram a presença de um *stacking* aromático entre os resíduos H-18 e F-19, baseado na proximidade dos resíduos nas estruturas calculadas para este meio. Para a  $[p\text{OAcGlc-trz-A}^{14}]\text{PS-2}$  em presença de micelas de  $\text{DPC-}d_{38}$  ( $400 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foram observadas correlações nOe entre o hidrogênio 18.HD2 e hidrogênios do anel aromático



do resíduo F-19 (Figura 48). Outra informação que aponta uma aproximação dessas duas cadeias aromáticas é o valor incomum de deslocamento químico de hidrogênio para o 18.HD2 (5,85 ppm). Se propõe que essa diferença de deslocamento químico pode ser atribuída ao campo anisotrópico gerado pelo anel aromático do resíduo de Phe-19 (CLARIDGE, 2016).

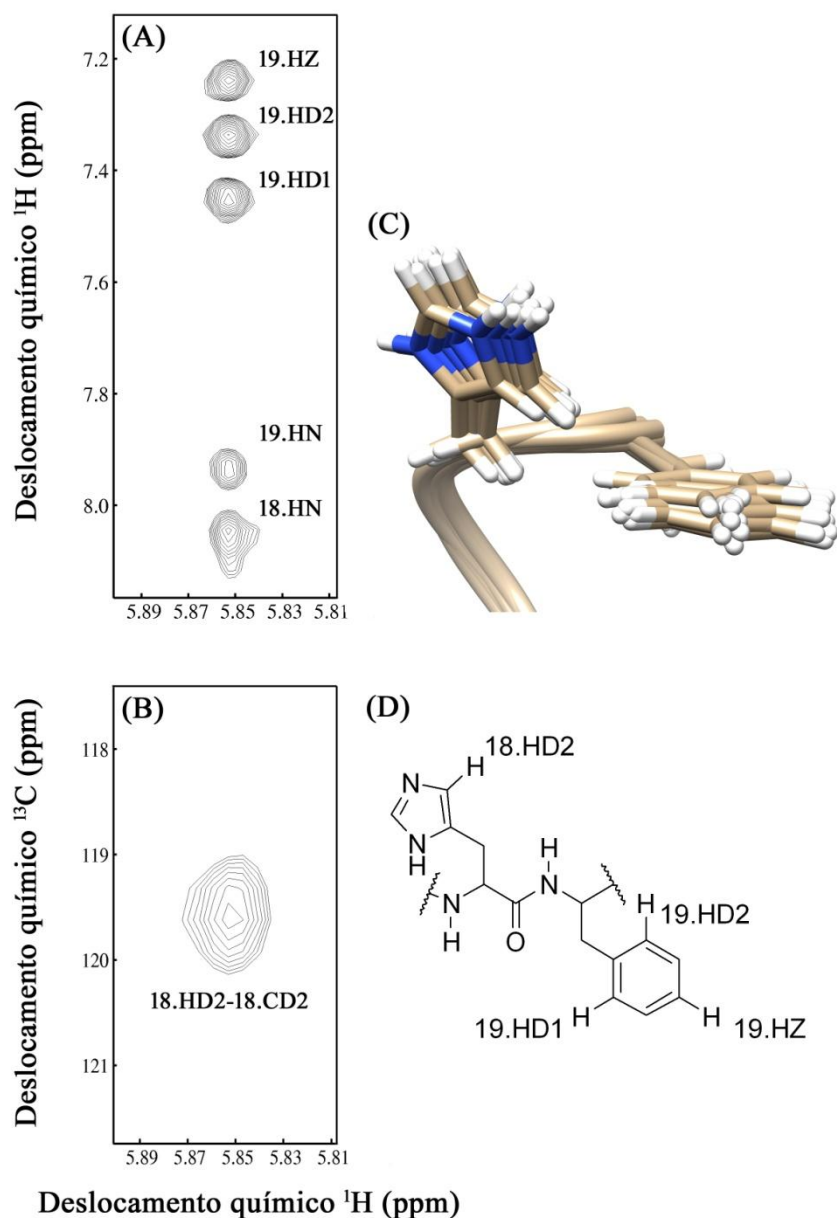


Figura 48 - Mapas de contornos (A) NOESY e (B)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC parciais da [pOAcGlc-trz-A $^{14}$ ]PS-2 em presença de micelas de DPC- $d_{38}$  (400 mmol.L $^{-1}$ ). (C) Representação dos resíduos H-18 e F-19 das dez estruturas mais estáveis da [pOAcGlc-trz-A $^{14}$ ]PS-2 em presença de vesículas de DPC- $d_{38}$  (400 mmol.L $^{-1}$ ). (D) Representação dos resíduos 18 e 19 com os nomes dos átomos indicados.

## 4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram efetuados diversos estudos estruturais e da interação com meios miméticos de membranas do glicopiranosil-triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2. O GTP usado neste trabalho foi obtido via estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, sendo que sua glicosilação foi realizada por meio de reação “*click*” aplicada à fase sólida. A purificação do glicopiranosil-triazol-peptídeo (GTP) foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e a obtenção do produto de interesse confirmada por análise de espectrometria de massas.

Os estudos das preferências conformacionais desse GTP foram realizados via a espectroscopia de dicroísmo circular. Os resultados mostraram uma ausência de estruturação bem definida do GTP em meio aquoso. Entretanto, em diferentes proporções de TFE:H<sub>2</sub>O, observou-se que o GTP adota estruturas helicoidais. Não obstante, observou-se que o GTP, na presença de micelas de SDS e DPC, também apresentou segmentos helicoidais, sendo que foram necessárias concentrações mais altas de DPC quando comparada às de SDS para o aparecimento de um perfil helicoidal bem definido. Ao se analisar o comportamento do GTP na presença de vesículas de POPC e POPC:POPG (3:1), fica bastante clara a importância da carga negativa das vesículas de POPC, uma vez que foi observada a estruturação em  $\alpha$ -hélice na presença de vesículas aniônicas, não tendo sido observada estruturação bem definida na presença de vesículas zwitteriônicas em nenhuma das concentrações analisadas. Misturas de TFE:H<sub>2</sub>O, bem como na presença de micelas de DPC/SDS e vesículas fosfolipídicas, são meios conhecidos por mimetizarem o ambiente de membranas e, portanto, esses resultados sugerem que a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2, apesar de não possuir estrutura bem definida em meio aquoso, adquire conformações helicoidais quando em contato com a superfície desses meios miméticos de membranas. Esse comportamento é comum para peptídeos antimicrobianos, uma vez que tais compostos sofrem estruturação em conformações bem definidas, quando em contato com superfícies de membranas e então exercem suas atividades antimicrobianas.

O conhecimento da estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em ambientes de membrana é essencial para a compreensão do possível mecanismo de ação deste composto. Dessa forma, procedeu-se a determinação das estruturas tridimensionais da [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 em meios que mimetizam os ambientes de

membrana, *i.e.* TFE:H<sub>2</sub>O (60:40) e na presença de micelas de DPC (400 mmol.L<sup>-1</sup>). Os resultados de RMN em solução apontam para a existência de segmentos helicoidais do GTP nos meios analisados, o que foi confirmado pelo uso de cálculos estruturais que empregam a rotina de *simulated annealing*, que leva em consideração variadas restrições impostas pelos dados experimentais de RMN. As estruturas geradas mostraram segmentos helicoidais bem definidos, sendo possível observar um alto caráter anfipático na disposição dos resíduos nos arranjos tridimensionais determinados para as estruturas.

Mesmo que o processo de otimização do resíduo glicopiranosil-triazólico não esteja totalmente finalizado, importantes informações já podem ser observadas a partir dos modelos calculados. As estruturas obtidas para o GTP em solução de TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40) mostraram que o resíduo glicopiranosil-triazólico está localizado na face hidrofílica; porém, parte de sua cadeia lateral está voltada para a face hidrofóbica do GTP. Este arranjo estrutural bem definido está de acordo com os dados de RMN (<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC) que comparam os respectivos deslocamentos químicos das correlações obtidas para a PS-2 e para a [pOAcGlc-trz-A<sup>14</sup>]PS-2 nas mesmas condições. Entretanto, para as estruturas calculadas em presença de micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (400 mmol.L<sup>-1</sup>), foram observadas modificações estruturais quando comparadas com as estruturas calculadas para GTP em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (60:40), o que sugere uma maior flexibilidade conformacional, sendo que as maiores modificações foram observadas na porção C-terminal. Essas modificações são observadas, tanto no arranjo da cadeia principal neste seguimento, quanto pela disposição das cadeias laterais que sugerem interações de *stacking* aromático entre os resíduos H-18 e F-19 que não eram observadas de forma tão pronunciada nas análises em TFE-*d*<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O, bem como à mudança de disposição do resíduo glicopiranosil-triazólico, que agora possui toda sua cadeia lateral voltada para a face hidrofílica do GTP.

Até o ponto que sabemos, este trabalho investiga, de forma inédita, aspectos estruturais de um GTP pelo uso das espectroscopias de CD e RMN, tendo sido observados aspectos estruturais importantes, quando se comparam as estruturas tridimensionais do GTP e do peptídeo nativo.



## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLARD, M. *et al.* Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239–254, 2006.

ARMSTRONG, K. M.; BALDWIN, R. L. Charged histidine affects  $\alpha$ -helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges. **Biophysics**, v. 90, p. 11337–11340, 1993.

BECHINGER, B. Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 271–292, maio 2004.

BECHINGER, B.; RESENDE, J. M.; AISENBREY, C. The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments. **Biophysical Chemistry**, v. 153, n. 2–3, p. 115–125, 2011.

BERGER, S.; BRAUN, S. **200 and more NMR experiments : a practical course**. [s.l.] Wiley-VCH, 2004.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 1, p. 51–68, jan. 2006.

BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H. Glycosyltransferases Involved in N- and O-Glycan Biosynthesis. In: **Glycosciences**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1997. p. 79–113.

BRUNGER, A. T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2728–2733, out. 2007.

CAFFREY, M. S.; CUSANOVICH, M. A. Lysines in the amino terminal  $\alpha$ -helix are important to the stability of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *c*<sub>2</sub>. **Biochemistry**, v. 30, n. 38, p. 9238–9241, set. 1991.

CAVANAGH, J. **Protein NMR spectroscopy: principles and practice.** [s.l.] Academic Press, 2007.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach.** 1. ed. [s.l.: s.n.].

CHEN, J. *et al.* **Design and synthesis of a new, conformationally constrained, macrocyclic small-molecule inhibitor of STAT3 via “click chemistry”** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* [s.l.: s.n.].

CHEN, T. *et al.* Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2129–2136, 2006.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry.** [s.l.: s.n.].

D’COSTA, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457–461, 31 ago. 2011.

DAVIS, M. R. *et al.* Synthesis of sansalvamide A peptidomimetics: triazole, oxazole, thiazole, and pseudoproline containing compounds. **Tetrahedron**, v. 68, n. 4, p. 1029–1051, 2012.

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

DRIGUEZ, H. Thiooligosaccharides as Tools for Structural Biology. **ChemBioChem**, v. 2, n. 5, p. 311–318, 4 maio 2001.

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**, v. 23, n. 1, p. 4, 2017.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8856–61, 1 ago. 2000.

HOJO, H.; NAKAHARA, Y. Recent progress in the field of glycopeptide synthesis. **Biopolymers**, v. 88, n. 2, p. 308–324, 2007.

HOLUB, J. M. *et al.* Tricks with clicks: modification of peptidomimetic oligomers via copper-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1325, 2010.

HUISGEN, R.; GRASHEY, R.; SAUER, J. Cycloaddition reactions of alkenes. In: **The Alkenes: Vol. 1 (1964)**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1964. p. 739–953.

HYBERTS, S. G. *et al.* The solution structure of eglin c based on measurements of many NOEs and coupling constants and its comparison with X-ray structures. **Protein Science**, v. 1, n. 6, p. 736–751, jun. 1992.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, jul. 2006.

JOCHIM, A. L. *et al.* Evaluation of triazolamers as active site inhibitors of HIV-1 protease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. [s.l: s.n.].

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

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983.

KÄSBECK, L.; KESSLER, H. Synthesis of S- $\alpha$ -D-Glucosylated L-Cysteine – A Novel S-Glycosyl Amino Acid. **Liebigs Annalen**, v. 1997, n. 1, p. 165–167, jan. 1997.

KATES, S. A. *et al.* Optimized preparation of deca(L-alanyl)-L-valinamide by 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) solid-phase synthesis on polyethylene glycol-polystyrene (PEG-PS) graft supports, with 1,8-diazobicyclo [5.4.0]-undec-7-ene (DBU) deprotection. **Peptide research**, v. 9, n. 3, p. 106–13, 1996.

KIM, K.-H.; SEONG, B. L. Peptide amidation: Production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 244–251, ago. 2001.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 1 jun. 2001.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1128–1137, 2003.

LASKOWSKI, R. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, p. 477–486, dez. 1996.

LEITE, J. R. S. A. *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565–573, 2005.

LIU, Y. *et al.* Design and synthesis of cyclo[-Arg-Gly-Asp-Ψ(triazole)-Gly-Xaa-] peptide analogues by click chemistry. **Tetrahedron**, v. 64, n. 47, p. 10728–10734, 2008.

LIVERMORE, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. Supplement 1, p. i29–i36, 1 set. 2009.

LORIN, C. *et al.* The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity *in vitro*. **Virology**, v. 334, n. 2, p. 264–275, 2005.

MARCAURELLE, L. A.; BERTOZZI, C. R. New Directions in the Synthesis of Glycopeptide Mimetics. **Chemistry - A European Journal**, v. 5, n. 5, p. 1384–1390, 3 maio 1999.

MARSTON, H. D. *et al.* Antimicrobial Resistance. **JAMA**, v. 316, n. 11, p. 1193, 20 set. 2016.

MERKLER, D. J. C-Terminal amidated peptides: Production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 6, p. 450–456, jun. 1994.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, jul. 1963.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principios de bioquímica de Lehninger**. [s.l.] Omega, 2015.

PAUL, B.; KORYTNYK, W. Synthesis of 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -d-glucopyranosylamine and dimer formation. **Carbohydrate Research**, v. 67, n. 2, p. 457–468, 1978.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PIANTINI, U.; SORENSEN, O. W.; ERNST, R. R. Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 24, p. 6800–6801, dez. 1982.

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, n. 10, p. 1633–1644, 2008.

RESENDE, J. M. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos ab-initio de tensores de blindagem**. [s.l.: s.n.].

RESENDE, J. M. *et al.* Membrane interactions of phylloseptin-1, -2, and -3 peptides by

oriented solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 4, p. 901–911, 2014.

RUCKER, S. P.; SHAKA, A. J. Broadband homonuclear cross polarization in 2D N.M.R. using DIPSI-2. **Molecular Physics**, v. 68, n. 2, p. 509–517, 10 out. 1989.

SABERWAL, G.; NAGARAJ, R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1197, n. 2, p. 109–131, jun. 1994.

SHAKA, A. .; LEE, C. .; PINES, A. Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 77, n. 2, p. 274–293, abr. 1988.

SHARON, N.; LIS, H. Glycoproteins: Structure and Function. In: **Glycosciences**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1997. p. 133–162.

SPITERI, C.; MOSES, J. E. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Regioselective Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted 1,2,3-Triazoles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 1, p. 31–33, 4 jan. 2010.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. **Protein Science**, v. 13, n. 1, p. 100–112, 1 jan. 2004.

STEWART, J. M. Solid Phase Peptide Synthesis. **Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry**, v. 10, n. 1–2, p. 259–288, 5 jan. 1976.

TRON, G. C. *et al.* Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. **Medicinal research reviews**, v. 28, n. 2, p. 278–308, mar. 2008.

VASKO, R. C. *et al.* Mechanistic Studies of Sansalvamide A-Amide: An Allosteric Modulator of Hsp90. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 4–8, 8 abr. 2010.

VOIEVODA, N. *et al.* Thermodynamic and Biophysical Analysis of the Membrane-Association of a Histidine-Rich Peptide with Efficient Antimicrobial and Transfection Activities. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 30, p. 9678–9687, 30 jul. 2015.

VRANKEN, D. VAN; WEISS, G. A. **Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology**. [s.l.] Garland Science, 2012.

WIDER, G.; WÜTHRICH, K. NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 5, p. 594–601, 1999.

WILLKER, W. *et al.* Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 287–292, mar. 1993.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175–186, mar. 2007.

WÜTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**. [s.l.] Wiley, 1986.

XIANGMING ZHU; KANDASAMY PACHAMUTHU, A.; SCHMIDT, R. R. Synthesis of S-Linked Glycopeptides in Aqueous Solution. 2003.

## ANEXO A

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Mar 06, 2017

---

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

License Number	4063081197457
License date	Mar 06, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biophysical Journal
Licensed Content Title	Membrane Interactions of Phylloseptin-1, -2, and -3 Peptides by Oriented Solid-State NMR Spectroscopy
Licensed Content Author	Jarbas M. Resende, Rodrigo M. Verly, Christopher Aisenbrey, Amary Cesar, Philippe Bertani, Dorila Piló-Veloso, Burkhard Bechinger
Licensed Content Date	19 August 2014
Licensed Content Volume	107
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	11
Start Page	901
End Page	911
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?	No
Order reference number	
Original figure numbers	5
Title of your thesis/dissertation	Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil- triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A14 ]PS-2 em meios miméticos de membrana.
Expected completion date	Mar 2017
Estimated size (number of pages)	97
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Marco Wust Avenida Presidente Antonio Calos 6627  Belo Horizonte, 31270-901 Brazil Attn: Marco Wust
Total	0.00 USD



**ANEXO B****ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 06, 2017

---

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

License Number	4063081438056
License date	Mar 06, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Peptides
Licensed Content Title	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
Licensed Content Author	Jarbas M. Resende, Cléria Mendonça Moraes, Maura V. Prates, Amary Cesar, Fabio C.L. Almeida, Nathália C.C.R. Mundim, Ana Paula Valente, Marcelo P. Bemquerer, Dorila Piló-Veloso, Burkhard Bechinger
Licensed Content Date	October 2008
Licensed Content Volume	29
Licensed Content Issue	10
Licensed Content Pages	12
Start Page	1633
End Page	1644
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
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?	No
Order reference number	
Original figure numbers	1
Title of your thesis/dissertation	Estudos estruturais por RMN do Glicopiranosil- triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A14 ]PS-2 em meios miméticos de membrana.
Expected completion date	Mar 2017
Estimated size (number of pages)	97
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Marco Wust Avenida Presidente Antonio Calos 6627  Belo Horizonte, 31270-901 Brazil Attn: Marco Wust
Total	0.00 USD