

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

CARLOS FILIPE REIS COSTA GUIMARÃES

Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos

Belo Horizonte

2017

CARLOS FILIPE REIS COSTA GUIMARÃES

Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos

Tese 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 Doutor em Ciências - Química.

Belo Horizonte

2017

G963s
2017
T

Guimarães, Carlos Filipe Reis Costa

Síntese de peptídeos [manuscrito]: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeo / Carlos Filipe Reis Costa Guimarães. 2017. [xix], 183 f.: il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.

Coorientadora: Dorila Piló Veloso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Peptídios - Síntese - Teses 3. Peptídios - Teses 4. Triazóis - Teses 5. Cinética química - Teses 6. Carboidratos - Teses I. Resende, Jarbas Magalhães, Orientador II. Veloso, Dorila Piló, Coorientadora III. Título.

CDU 043

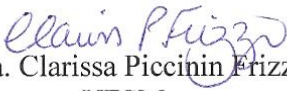
"Síntese de Peptídeos: Cinética de Dimerização via Formação de Ligação de Dissulfeto, Obtenção e Estudos Biofísicos de Glicotriazol-Peptídeos"

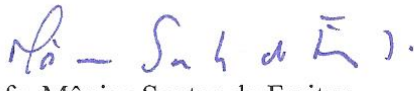
Carlos Filipe Reis Costa Guimarães

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

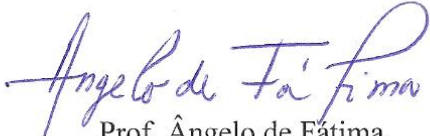

Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador
UFMG


Profa. Dorila Piló Veloso - Coorientadora
UFMG


Profa. Clarissa Piccinin Frizzo
UFSM


Profa. Mônica Santos de Freitas
UFRJ


Prof. Diogo Montes Vidal
UFMG


Prof. Ângelo de Fátima
UFMG

Belo Horizonte, 25 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Durante a vida, não construímos nada sozinho. Sempre tem aqueles que, de alguma forma, colaboram para o nosso sucesso. Por isso, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Jarbas Magalhães Resende, pela boa relação durante esses anos de convívio, pela amizade, pela orientação e, principalmente, pelos ensinamentos que permitiram a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Verly que, ao longo dos últimos seis anos, tem sido uma peça chave na minha formação profissional. Agradeço pela amizade, parceria e o incentivo para a continua valorização do trabalho realizado.

À Profa. Dorila Piló-Veloso, pelas sugestões e ensinamentos. Sua influência profissional, sem dúvida, ainda inspira aqueles que passam pelo laboratório e corredores do DQ.

Ao Prof. Tiago Brandão, pela colaboração no desenvolvimento do projeto “Estudos cinéticos de dimerização da Htr-M em Htr via ligação de dissulfeto”. O seu conhecimento foi fundamental para o êxito nessa parte do projeto.

Ao Prof. Ricardo José Alves e ao Dr. Lucas Lopardi, por terem colaborado com a síntese dos azido-açúcares e com os primeiros passos na síntese dos glicotriazol-peptídeos, o que foi de extrema importância para o início do projeto “Glicopeptídeos”

Às Profas. Helen Matos e Kelly, do Departamento de Farmácia da UFVJM, pelos ensaios antimicrobianos.

Ao Dr. Daniel Santos pelas inúmeras análises de massa realizadas durante a caracterização dos peptídeos e seus derivados glicotriazólicos.

Ao Prof. Marcelo Bemquerer, por ter me recebido no laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA – CENAGEM, em Brasília, para a realização das análises de MS e de MS/MS. Sua experiência, sugestões e conhecimento ajudaram, sem dúvida, na minha formação.

Ao Departamento de Química da UFVJM, em especial ao LASEB, que abriram as portas para a execução de grande parte dos experimentos deste projeto.

Ao Departamento de Química da UFMG pela infraestrutura concedida durante a realização do projeto de doutorado.

Ao CNPq pela concessão da minha bolsa de doutorado.

Aos colegas de laboratório Virgílio, Lídia, Marco, Karla e Breno. Vocês foram fundamentais durante o tempo de convívio e, cada um, colaborou de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Vou sentir saudade dos dias em que parávamos para organizar o laboratório!

Aos colegas do Departamento de Química, os quais proporcionaram boas conversas pelos corredores e possibilitaram a fundação da “peladinha da química”, que nos permitiu fazer novas amizades.

Agradeço também aos meus grandes amigos Victor Hugo, Osvaldo Landes, Antônio Carlos e Dênio Emanuel por incorporarem o verdadeiro significado da amizade, sendo como irmãos no meu dia-a-dia.

E, por fim, à família, pelo amor e carinho. Em especial à minha mãe, Marilene, por me ensinar a voar e ter me dado a liberdade para seguir o meu caminho, sempre me incentivando e apoiando nas decisões mais difíceis.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita".

Mahatma Gandhi

RESUMO

Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos

Diante ao grande potencial biológico dos peptídeos, o conhecimento mais detalhado da química envolvida nos processos de obtenção dessas substâncias se tornou de grande relevância e atinge, a cada ano, um maior grau de maturidade. Este trabalho está relacionado a estudos de síntese química e biofísicos de uma importante classe de peptídeos, os antimicrobianos. Em uma primeira etapa é descrito, minuciosamente, o estudo cinético da síntese do peptídeo homotarsinina (Htr), um raro homodímero isolado originalmente do anuro *Phyllomedusa tarsius*, que apresenta um grande potencial biológico. Foram realizadas várias reações de dimerização via formação de ligação dissulfeto da cadeia monomérica Htr-M em diferentes condições e meios reacionais, de modo a se compreenderem os aspectos mecanísticos, bem como de se avaliarem os perfis cinéticos obtidos nas diferentes condições de reação. Em um segundo momento, foi feita uma proposta de síntese, associando-se duas metodologias interessantes: a cicloadição [3+2] catalisada por Cu (I) entre azidas e acetilenos e a síntese de peptídeos em fase sólida. Essa associação sintética visa a obtenção de glicotriazol-peptídeos derivados de quatro peptídeos antimicrobianos, as filoseptinas -1, -2 e -3, e a hilaseptina 1. As três filoseptinas foram originalmente isoladas do anuro *Phyllomedusa hypochondrialis* e a hilaseptina 1 do anuro *Hyla punctata*. No caso das filoseptinas, foram feitas glicosilações pontuais e realizados alguns estudos biofísicos preliminares, para se avaliarem a estruturação e a interação com modelos miméticos de membranas, utilizando-se a espectroscopia de dicroísmo circular e a microcalorimetria de titulação isotérmica. No caso da hilaseptina 1, os estudos biofísicos foram realizados utilizando-se o espalhamento de luz dinâmico e as espectroscopias de dicroísmo circular, de ressonância plasmônica de superfície e de fluorescência, sendo que os dados estruturais e de interação obtidos auxiliaram também na avaliação da sua atividade antimicrobiana. Juntamente com os ensaios biofísicos, estudos de inibição da biossíntese de ergosterol auxiliaram na compreensão da ação antifúngica das unidades de carboidrato e triazólica dos glicotriazol-peptídeos derivados da hilaseptina 1. Portanto, os resultados descritos neste trabalho tratam da investigação de alguns temas, que ainda são pouco explorados na literatura e, por isso, atingem proporções inéditas e de relevância para a comunidade científica da área.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, síntese de peptídeos, modificações químicas de peptídeos, peptídeos diméricos, ligação de dissulfeto, glicotriazol-peptídeos, reação “click”, interação peptídeo-membrana.

ABSTRACT

Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.

In face of the enormous biological potential of peptides, the detailed knowledge of the chemistry involved in the preparation of these compounds has acquired high relevance and it has reached over the years a high degree of maturity. This thesis is related to the chemical synthesis of antimicrobial peptides, which is a relevant class of these compounds. This work addresses two main topics: the kinetics of peptide dimerization through disulfide bond formation and the preparation and biophysical studies of glycotriazole-peptides. Firstly, the synthesis of homotarsinin (Htr), a rare homodimeric peptide originally isolated from the three-frog *Phyllomedusa tarsius*, is investigated in detail. Several dimerization reactions of the peptide monomeric chain Htr-M have been performed in different media and at different experimental conditions, in order to elucidate the kinetics of disulfide bond formation and to figure out the mechanistic aspects of this reaction. A synthetic approach for obtaining glycotriazole-peptides is also presented and it takes the advantage of two particularly interesting methodologies: the copper (I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction and the Fmoc solid-phase peptide synthesis. Glycotriazole derivatives of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, -3 and hylaseptin-P1 have been prepared. The three phylloseptins have originally been isolated from the three-frog *Phyllomedusa hypochondrialis*, whereas hylaseptina 1 have been isolated from the three-frog *Hyla punctata*. In the case of the three phylloseptins and their glycoforms, some preliminary investigations of their membrane interactions have been performed by circular dichroism spectroscopy and isothermal titration calorimetry. The membrane interactions of hylaseptina 1, a triazole derivative and two glycoforms have been investigated in more details by different biophysical approaches, namely: dynamic light scattering, fluorescence, plasmon surface resonance and circular dichroism spectroscopies. The antibacterial and antifungal activities of these compounds were also investigated along with their potential of inhibiting ergosterol biosynthesis. In conclusion, the increased fungicidal activity of the glycotriazole-peptides seems to be the result of (A) more pronounced membrane-disruptive properties, which is related to presence of a saccharide ring, together with (B) the inhibition of ergosterol biosynthesis, which seems to be related to the presence of both the monosaccharide and the triazole rings.

Keywords: Antimicrobial peptides, peptide synthesis, chemical modifications of peptides, dimeric peptides, disulfide bond, glycotriazole-peptides, click reaction, peptide-membrane interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estruturas tridimensionais de PAMs selecionadas a partir de diferentes classes estruturais.	28
Figura 1.2: Mecanismos prováveis de ação dos peptídeos antimicrobianos.	30
Figura 1.3: Representação esquemática dos modelos de membranas mais utilizados nos estudos de interações..	33
Figura 1.4: (A) Representação esquemática de uma micela e (B) uma bicela	35
Figura 1.5: Esquema geral do funcionamento de um sistema de SPR.	38
Figura 1.6: Esquema geral de funcionamento de um equipamento de ITC.	40
Figura 1.7: Medida da intensidade da luz espalhada por um ângulo θ	43
Figura 1.8: Gráfico da variação do fator de correlação G em função do tempo.	45
Figura 1.9: Esquema de formação do efeito de dicroísmo circular	47
Figura 1.10: Sistema $R_1-(C=O)-NH-R_2$ com suas respectivas transições eletrônicas.....	48
Figura 1.11: Espectros de dicroísmo circular típicos de conformações peptídicas	49
Figura 1.12: Representação da cadeia peptídica pela formação de uma ligação amídica	50
Figura 1.13: Esquema geral da SPFS	53
Figura 1.14: Esquema geral mostrando o mecanismo de remoção do grupo Fmoc na etapa de desproteção do resíduo de aminoácido	56
Figura 1.15: Exemplos de suportes sólidos e ligantes mais utilizados na SPFS.	59
Figura 1.16: Alguns dos reagentes utilizados na ativação do grupamento carbonila nas etapas de acoplamento em SPFS.	61
Figura 1.17: Mecanismo de racemização na etapa de ativação na SPFS	64

Figura 1.18: Formação de DKP na SPFS.	65
Figura 1.19: Epimerização e formação de aspartimida.	67
Figura 1.20: Estrutura de novos protetores da cadeia lateral do Asp	68
Figura 1.21: Sítios de possíveis modificações estruturais na cadeia peptídica.	69
Figura 1.22: Formação da ligação de dissulfeto entre dois resíduos de Cys, formando um resíduo de cistina.	70
Figura 1.23: Estrutura da glicose	72
Figura 2.24: Estrutura primária da Htr	76
Figura 2.25: Espectros de CD do peptídeo [S^{23}]Htr-M	77
Figura 2.26: Estratégia de Fmoc-SPFS	79
Figura 2.27: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada da Htr-M (A) e da Htr (B)	83
Figura 2.28: Percentual de conversão de Htr-M em Htr.....	85
Figura 2.29: Cromatografia por exclusão de tamanho realizada para Htr-M (em preto), Htr (azul) e Dtn (vermelho) em meio aquoso, à temperatura ambiente.....	86
Figura 2.30: Processo de duas etapas principais para a dimerização de Htr-M	87
Figura 2.31: Ajuste do percentual de conversão de Htr-M em Htr	89
Figura 2.32: Estruturas de RMN da (A) Htr-M em solução de TFE:H ₂ O 30:60 e da (B e C) Htr em tampão fosfato aquoso, pH 7	91
Figura 2.33: Estrutura de RMN da distinctina em meio aquoso [PDB 1XKM] (Raimondo et al., 2005).....	93
Figura 2.34: Interação das cadeias monoméricas Htr-M com as micelas de SDS	95

Figura 2.35: Percentual de conversão de Htr-M em Htr.....	97
Figura 3.36: Representação esquemática da formação de triazol-peptídeos via CuAAC	99
Figura 3.37: Mecanismo de reação da CuAAC	100
Figura 3.38: Topologias dos peptídeos filoseptina-1, -2, -3 reconstituídos em bicamadas lipídicas de POPC.....	104
Figura 3.39: Processo realizado na síntese dos GtPs.....	106
Figura 3.40: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada dos produtos sintéticos HSP1-NH ₂ e de seus derivados.....	116
Figura 3.41: Esquema ilustrando a constituição da parede celular dos fungos	119
Figura 3.42: Espectros de CD da HSP1-NH ₂ e de seus derivados na presença de 500 µM de LUVs POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) em soluções aquosas de tampão Tris-HCl 10 mmol·L ⁻¹ , pH 8,0	121
Figura 3.43: Sensogramas indicando as interações entre HSP1-NH ₂ e seus derivados com as LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) imobilizadas na superfície de um sensor chip de SiO ₂	122
Figura 3.44: Cinética de liberação de CF das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) na presença de (A) HSP1-NH ₂ , (B) [trz-A ¹]HSP1-NH ₂ , (C) [pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂ e (D) [pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	123
Figura 3.45: (A) Porcentagem de liberação de CF e (B) constante de velocidade observada , k _{obs} , da liberação de CF em função da razão molar P/L	124
Figura 3.46: Efeito da adição de HSP1-NH ₂ e de seus derivados no diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1).....	125
Figura 3.47: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada dos peptídeos sintéticos (A) PS-1, (C) -2, (E) -3 e dos respectivos glicotriazol-peptídeos.....	130

Figura 3.48: Estrutura química geral das quebras mais prováveis de um peptídeo durante a fragmentação	131
Figura 3.49: Região ampliada do espectro MS/MS, mostrando o fragmento dipeptídico de Phe-Leu- assinalado e da porção N-terminal da PS-2 (série -b, “-FL-” linha superior em azul) ..	131
Figura 3.50: (A) Região ampliada do espectro da [pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-1 mostrando a diferença do íon molecular [M+H] ⁺ subtraído do íon de razão m/z 2039,2 e do íon de razão m/z = 1884,2, correspondente ao fragmento do triazol-peptídeo e do peptídeo até o resíduo de His18 (linha preta).....	132
Figura 3.51: Mecanismo de fragmentação proposto para o segmento glicotriazólico no sequenciamento dos GtPs por MS/MS.	133
Figura 3.52: Calorimetria de Titulação Isotérmica da (A) PS-1, (B) PS-2, (C) PS-3 e de seus respectivos GtPs (D) [pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-1, (E) [pOAcGlc-trz-A ¹⁴]PS-2 e (F) [pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-3 com as LUVs, a 25 °C.....	136
Figura 3.53: Espectros de CD obtidos para os peptídeos PS-1, -2 e -3 (A, C e E, respectivamente) e seus respectivos derivados glicotriazol-peptídicos – 25 µM (B, D e F) ..	138
Figura 3.54: Fração helicoidal (%) em função da razão molar L/P, obtida por desconvolução dos espectros de CD.	139
Figura 3.55: Isotermas de ligação obtidas para as PS-1, PS-2, PS-3 e seus respectivos GtPs.	142
Figura 3.56: Análises das isotermas de ITC, utilizando o modelo de isoterma de ligação de Langmuir	143
Figura 3.57: Dados obtidos pela diferença da isoterma de Langmuir e a isoterma obtida nos experimentos de ITC	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: PAMs em desenvolvimento clínico que apresentam potencial com atividade antimicrobiana	26
Tabela 1.2: Sequências mais sensíveis à formação de aspartimida. Asp-Aminoácido X	66
Tabela 2.3: Percentual de conversão da Htr-M em Htr em diferentes tempos de reação.....	84
Tabela 2.4: Parâmetros cinéticos para a dimerização de Htr-M em meio aquoso, TFE:H ₂ O (40:60 v/v) e solução micelar de SDS (350 mM) em pH 8,5 (tampão Tris-HCl 100 mM) a 25 °C	89
Tabela 3.5: Sequência primária da HSP1 na forma nativa (HSP1) e da sua forma amidada (HSP1-NH ₂).....	102
Tabela 3.6: Sequência primária dos PAMs PS-1, -2 e -3 e dos seus respectivos glicotriazol-peptídeos obtidos	103
Tabela 3.7: Concentração inibitória mínima (MIC) determinada para HSP1-NH ₂ , [trz-A ¹]HSP1-NH ₂ , [pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂ na presença de bactéria e <i>Candida spp</i> (ATCC)	118
Tabela 3.8: Resultados das curvas ajustadas para os dados obtidos para HSP1-NH ₂ e seus derivados utilizando um modelo de ligação de dois estados (<i>two-state binding model</i>).....	123
Tabela 3.9: Inibição da biossíntese de ergosterol em células de <i>C. krusei</i> cultivadas na presença de HSP1-NH ₂ , [trz-A ¹]HSP1-NH ₂ , [pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂ , após 48 h de incubação	127
Tabela 3.10: Parâmetros termodinâmicos obtidos pela espectroscopia de CD	141
Tabela 3.11: Parâmetros termodinâmicos corrigidos obtidos pela ITC	145

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1: Processo de dimerização da Htr-M em Htr nos diferentes meios reacionais. (i) meio aquoso, (ii) (ii) em solução do co-solvente TFE:H ₂ O 40:60 (v/v) e (iii) na presença de micelas de SDS 350 mmol·L ⁻¹	81
Esquema 3.2: Representação das etapas sintéticas para a obtenção dos glicotriazol-peptídeos e do triazol-peptídeo. Esse esquema utilizou como exemplo a cadeia peptídica da [Pra ¹]HSP1-NH ₂ , no entanto, os outros derivados foram glicosilados em posições distintas.	107

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

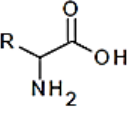
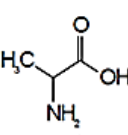
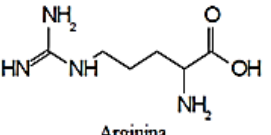
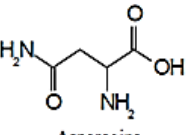
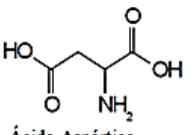
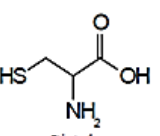
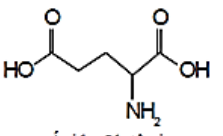
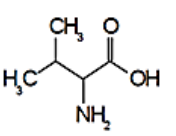
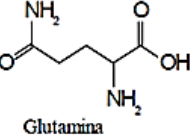
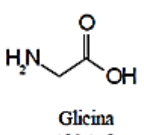
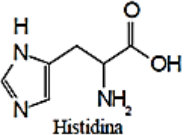
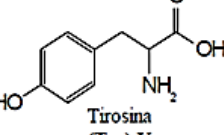
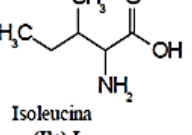
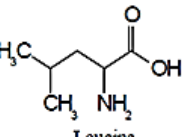
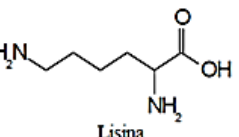
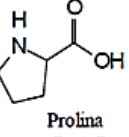
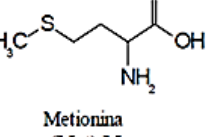
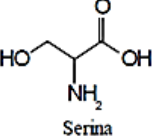
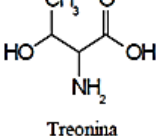
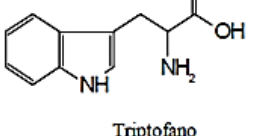
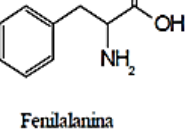
ACN	Acetonitrila
Acm	Acetamidometil
AFM	Microscopia de Força Atômica, do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>
AscNa	Ascorbato de Sódio
Bno	5-Butil-5-nonil
Boc	terc-Butiloxicarbonila
CD	Dicroísmo Circular, do inglês <i>Circular dichroism</i>
CF	Carboxifluoresceína
CL	Cardiolipina
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
CMC	Concentração Micelar Crítica
CuAAC	Cicloadição [3+2] entre azidas e alcinos catalisada por Cu(I)
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
DHPC	1,2-Diexanoil-glicero-3-fosfocolina
DIC	Diisopropilcarbodiimida
Die	1,1-Diisopropil-etil
DKP	Dicetopiperazina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
Dmb	2,4-Dimetoxibenzil
DMF	Dimetilformamida
DMPC	1,2-Dimiristoil-glicero-3-fosfocolina

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxirribonucleic acid</i>
DPC	Dodecil fosfocolina
Dtn	Distinctina
DTT	Ditiotreitol
DVB	Divinilbenzeno
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura, do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EM	Espectrometria de Massas
EDT	Etano-1,2-ditiol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Epe	3-Etil-3-pentil
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonila
FTIR	Infravermelho em transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
Glc	D-Glicose
GlcNAc	N-Acetilglicosamina
GUVs	Vesículas gigantes unilamelares, do inglês <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
HATU	Hexafluorofosfato de N-[1H-benzotriazol-1-il(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanamínio
Hmb	2-Hidroxi-4-metoxibenzil
Hmnb	2-Hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenzil
HOAt	1-Hidroxi-7-azobenzotriazol
HOBt	1-Hidroxi-7-azobenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Htr	Homotarsinina
Htr-M	Cadeia monomérica da Homotarsinina
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica, do inglês <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
LUVs	Vesículas grandes unilamelares, do inglês <i>Large Unilamellar Vesicles</i>

MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>Minimum inhibitory concentration</i>
MLVs	Vesículas multilamelares, do inglês <i>Multilamellar Vesicles</i>
N ₃ -Glc	D-Glicose funcionalizada com azida
N ₃ -GlcNAc	N-Acetilglicosamina funcionalizada com azida
NCL	Ligação química nativa, do inglês <i>Native Chemical Ligation</i>
NMP	N-Metilpirrolidina
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PIPE	Piperidina
PM-IRRAS	Infravermelho por Reflexão e Absorção com Polarização Modulada, do inglês <i>Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy</i>
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanilamina
POPG	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilglicerol
Pra	L-Propargilglicina
PS-1, 2 e 3	Filoseptinas 1, 2 e 3
PTM's	Modificações pós-translacionais
PyAOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)fosfônio
PyBOP	Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-hexafluorofosfato de fosfônio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS	Dodecil sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl sulphate</i>
SIMS	Espectrometria de Massas de Íon Secundário, do inglês <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>

SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>
SPS	Síntese de Peptídeos em Solução
SUVs	Vesículas pequenas unilamelares, do inglês <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
<i>t</i> -Bu	terc-Butoxicarbolil
TFA	Ácido trifluoroacético, do inglês <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
TFMSA	Ácido trifluormetanossulfônico, do inglês <i>Trifluormetanosulfonic Acid</i>
THF	Tetraidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>Time of Flight</i>
<i>t</i> RNA	RNA transportador
Trt	Tritil
trz	1,2,3-Triazol
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
UV	Ultravioleta
[S ²³]Htr-M	Cadeia monomérica análogo à Htr-M com substituição do resíduo de cisteína-19 por uma serina
4M-PIPE	4-Metilpiperidina

TABELA DE L-AMINOÁCIDOS

 Nome (Abreviação) Símbolo	 Alanina (Ala) A	 Arginina (Arg) R	 Asparagina (Asn) N	 Ácido Aspártico (Asp) D
	 Cisteína (Cys) C	 Ácido Glutâmico (Glu) E	 Valina (Val) V	 Glutamina (Gln) Q
	 Glicina (Gly) G	 Histidina (His) H	 Tirosina (Tyr) Y	 Isoleucina (Ile) I
	 Leucina (Leu) L	 Lisina (Lys) K	 Prolina (Pro) P	 Metionina (Met) M
	 Serina (Ser) S	 Treonina (Thr) T	 Triptofano (Trp) W	 Fenilalanina (Phe) F

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ESQUEMAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS.....	xv
TABELA DE L-AMINOÁCIDOS	xix
CAPÍTULO 1	25
REVISÃO DA LITERATURA	25
1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	25
1.1.1 Mecanismo de Ação	29
1.1.2 Modelos Miméticos de Membrana	32
1.1.3 Abordagens Biofísicas no Estudo Estrutural e de Interação Peptídeo-Membrana ..	36
1.1.3.1 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	36
1.1.3.2 Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	38
1.1.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	43
1.1.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	46
1.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS.....	49
1.2.1 Síntese Biológica de Peptídeos.....	50

1.2.2 Síntese Química de Peptídeos	51
1.2.2.1 Síntese de Peptídeo em Solução (SPS).....	51
1.2.2.2 Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS).....	52
1.2.2.2.1 Estratégia Boc.....	54
1.2.2.2.2 Estratégia Fmoc	55
1.2.2.2.3 Boc- versus Fmoc-SPFS	57
1.2.2.2.4 Componentes e Aspectos Importantes da Fmoc-SPFS	58
1.2.2.3 Modificações Estruturais de Peptídeos.....	69
CAPITULO 2.....	74
SÍNTESE DO PEPTÍDEO HOMODIMÉRICO HOMOTARSININA: ESTUDOS CINÉTICOS DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO VIA FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO DISSULFETO.....	74
2.1 INTRODUÇÃO.....	74
2.2 OBJETIVO	78
2.2.1 Geral	78
2.2.2 Específicos.....	78
2.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	79
2.3.1 Síntese da Htr-M.....	79
2.3.2 Síntese da Htr a Partir da Dimerização da Htr-M.....	80
2.3.3 Monitoramento da Formação da Htr	81
2.3.4 Variação da Concentração de Htr-M na Dimerização.....	81

2.3.5 Cromatografia por Exclusão de Tamanho	82
2.3.6 Determinação do Rendimento da Dimerização	82
2.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	82
2.4.1 Sínteses da Htr-M e da Htr	82
CAPITULO 3	98
SÍNTESE DE DERIVADOS GLICOTRIAZÓLICOS DAS FILOSEPTINAS 1, 2 E 3 E DA HILASEPTINA 1: EFEITOS DA GLICOSILAÇÃO NA INTERAÇÃO COM MEMBRANAS E NO POTENCIAL BIOLÓGICO	98
3.1 INTRODUÇÃO.....	98
3.2 OBJETIVOS	104
3.2.1 Geral	104
3.2.2 Específicos.....	105
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	105
3.3.1 Síntese dos Azido-Açúcares Per-O-acetilados	105
3.3.2 Síntese dos Peptídeos, Triazol-Peptídeo e dos Glicotriazol-Peptídeos	106
3.3.3 Preparação das Vesículas Fosfolipídicas	109
3.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	110
3.3.5 Medidas de Extravasamento de Marcador Químico Incorporado em Vesículas Fosfolipídicas	110
3.3.6 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta (ζ).....	111
3.3.7 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície.....	111

3.3.8 Calorimetria de Titulação Isotérmica	112
3.3.9 Ensaios Antimicrobianos	113
3.3.10 Biossíntese de Ergosterol.....	114
3.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	115
3.4.1 Síntese dos Azido-açúcares per-O-acetilados	115
3.4.2 Glicotriazol-peptídeos Derivados da HSP1-NH ₂ : Síntese, Estudos Biofísicos e Avaliação do Potencial Biológico	115
3.4.2.1 Síntese do Peptídeo e seus Derivados	115
3.4.2.2 Ensaios Antibacterianos e Antifúngicos.....	117
3.4.2.3 Experimentos Biofísicos.....	119
3.4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta (ζ).....	124
3.4.2.5 Biossíntese de Ergosterol.....	127
3.4.3 Glicotriazol-peptídeos Derivados das PS-1, -2 e -3: Síntese, Avaliação da Influência da Glicosilação nas Estruturas e nas Interações com Modelos Miméticos de Membrana	129
3.4.3.1 Síntese dos Peptídeos e de seus Derivados.....	129
3.4.3.2 Estudos Biofísicos	134
CONCLUSÃO.....	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
ANEXOS E APÊNDICES.....	170

APÊNDICE A1 - Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H ₂ O (40:60, v/v), a partir de solução mais concentrada (36,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de Htr-M.....	170
APÊNDICE A2 - Espectro de massas (MALDI-ToF) para os picos coletados relativos aos tempos de retenção de 14,9 e 15,3 min.....	171
APÊNDICE B1 – Espectros de massa obtidos no modo MS/MS mostrando o perfil de fragmentação das PS-1 (A), -2 (B), -3 (C) e dos seus derivados GtPs [pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-1 (D), [pOAcGlc-trz-A ¹⁴]PS-2 (E) e [pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-3 (F).	172
APÊNDICE C1 – Trabalhos apresentados em eventos	174
APÊNDICE C2 – Artigos produzidos durante o doutorado.....	176
ANEXO A1: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.2	177
ANEXO A2: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.3	178
ANEXO A3: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.4	179
ANEXO A4: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.5	180
ANEXO A5: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.9	181
ANEXO A6: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 3.38	182
ANEXO A7: Autorização para uso de Direitos Autorais do Capítulo 2, para o conteúdo referente à HSP1-NH ₂ e seus derivados.	183

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos são substâncias presentes em praticamente todas as formas de vida munidas de sistema imunológico inato e, dentre os peptídeos com atividades biológicas já comprovadas, mais de 2800 apresentam atividade antimicrobiana (Zasloff, 2002; Jenssen, H.; *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Wang, 2011; Wang *et al.*, 2016). Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) naturais têm sido isolados e caracterizados de praticamente todos os organismos vivos, abrangendo desde seres procarióticos a até organismos superiores complexos, com destaque para aqueles isolados das secreções de anfíbios que, durante séculos, a medicina tradicional chinesa e egípcia tem utilizado para o tratamento de diversas patologias (Bevins e Zasloff, 1990; Laux-Biehlmann *et al.*, 2013; Rahnamaeian e Vilcinskis, 2015). Essas secreções têm uma diversidade química extraordinária, que foi gerada ao longo do processo evolutivo pela frequente exposição a diversos fatores ambientais, incluindo fatores físicos, predadores, parasitas e microrganismos, que geralmente circundam o *habitat* natural desses animais. Por isso, a estrutura e funções biológicas dos PAMs encontrados nessas espécies tem sido bastante exploradas nas últimas décadas e é, sem dúvida, um objeto de estudo de extrema importância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Xu e Lai, 2015).

Na maioria das vezes, os PAMs apresentam ação rápida e um amplo espectro de atividade contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, fungos, parasitas, além de vírus envelopados e células tumorais, o que torna essas moléculas aptas a combater uma série de patologias relacionadas com os microrganismos (Lohner, 2017). Todavia, o potencial imunogênico dessas substâncias faz com que elas não sejam aptas a serem utilizadas como drogas injetáveis e sua susceptibilidade a peptidases presentes no trato digestivo reduz a sua eficácia quando administradas via oral. Apesar disso, os PAMs geralmente agem por interações com os fosfolipídios das membranas, não demandando receptores específicos, o que torna o desenvolvimento de resistência microbiana menos provável, quando comparado aos antibióticos convencionais. Essas características fazem dos PAMs substâncias valiosas nas investigações por novas moléculas terapêuticas, especialmente como dermacêuticos em formulações tópicas (loções, cremes, shampoos) e curativos de feridas, por exemplo (Rahnamaeian e Vilcinskis, 2015). Mesmo não sendo originalmente aprovados como fármacos,

eles são excelentes protótipos que, felizmente, já estão rendendo algumas moléculas que logo estarão sendo utilizadas para o tratamento de diversas patologias (Wang *et al.*, 2012; Zasloff, 2016; Lohner, 2017). Portanto, alguns peptídeos com propriedades antimicrobianas já estão em fase de testes clínicos e a perspectiva é que avancem para serem comercializados num futuro muito próximo (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: PAMs em desenvolvimento clínico que apresentam potencial com atividade antimicrobiana

Nome/Companhia	Descrição	Uso médico	Fase Clínica	Ref.
HB1345/ HelixBiomedix	lipohexapeptídeo sintético	Antibiótico de amplo espectro, acne	Pré-clínica	(Steinstraesser <i>et al.</i> , 2011)
XOMA 629 / XOMA	Derivado do BPI	Impetigo	IIa	(Easton <i>et al.</i> , 2009)
hLF1-11 /AM Pharma	Sequência 1-11 de aminoácidos N-terminal da lactoferrina humana	Bacteremia, infecções associadas a transplantes	II	(Dijkshoorn <i>et al.</i> , 2004)
OP-145 / OctoPlus	Derivado do LL-37	Infecção do ouvido médio	II	(Malanovic <i>et al.</i> , 2015)
Isegran / Ardea Biosciences	Derivado da protegrina-1	Mucosite oral	III	(Toney, 2002)
Omiganan (MX-226) / Migenix	Derivado da indolicidina	Infecções de cateter, acne severa	III	(Easton <i>et al.</i> , 2009)
Pexiganan (MSI 78) / MacroChem	Derivado da magainina 2	Úlcera do pé de diabéticos	III	(Ge <i>et al.</i> , 1999)
Plectasina (NZ2114) / Sanofi-Aventis/Novozymes	Isolada de fungo <i>Pseudoplectanianiigrella</i>	Antibiótico	*	(Mygind <i>et al.</i> , 2005)
Brilacidina	Sintético com propriedades semelhantes às da magainina	Tratamento de infecções tópica e sub tópica	III	(Mensa <i>et al.</i> , 2014)

*Sem informação desde 2011.

A maioria dos PAMs catalogados são extremamente diversificados em sua composição e tamanho, o que dificulta definir uma sequência padrão, que poderia servir como um modelo ideal para o desenvolvimento dos mais eficientes antibióticos. No entanto, é possível apontar algumas propriedades, que se mostram importantes para grande parte das moléculas ativas, como a presença de carga líquida positiva e a hidrofobicidade, o que os habilita a serem atraídos eletrostaticamente pelas cargas negativas das membranas celulares dos microrganismos e

geralmente define suas características membranolíticas e de penetração celular. Esse conteúdo hidrofóbico aumentado em uma cadeia peptídica está fortemente correlacionado com a baixa seletividade e toxicidade de tais moléculas em células de mamíferos (Haney *et al.*, 2017).

Devido à grande diversidade de origem e às propriedades químicas, físicas e biológicas, essa classe de moléculas pode ser dividida em subgrupos, com base em vários critérios de classificação (Wang, 2015). Dentre os principais, vale destacar o subgrupo que leva em conta o alvo molecular, subdividindo-se em duas famílias: peptídeos que têm como alvo a superfície celular, como as nisinas e temporinas (Scocchi *et al.*, 2016), e peptídeos que agem de forma intracelular, como os peptídeos ricos em prolina (Benincasa *et al.*, 2017).

Os PAMs tipicamente não apresentam estrutura definida em solução aquosa e normalmente adotam uma conformação anfipática ativa, quando interagem com membranas biológicas ou com meios, que as mimetizam. Essa habilidade de se estruturar e de adotar arranjo anfipático é atribuída geralmente à abundância tanto de resíduos de aminoácidos catiônicos quanto de resíduos hidrofóbicos, que compõem a sequência da cadeia peptídica (chamada de estrutura primária ou sequência primária), que também influencia diretamente na conformação específica adquirida durante a interação com a membrana (Waghu *et al.*, 2014). Dessa forma, eles também podem ser subdivididos, considerando-se os motivos de estruturas secundárias, com base nos tipos de estrutura tridimensional predominantemente adotadas. A Figura 1.1, p. 28, ilustra alguns padrões de estruturas que são observados em PAMs.

Dentre os grupos estruturais, os PAMs que apresentam motivos em conformações β e hélice α são os mais comuns, sendo os últimos os mais estudados até o momento (Wang, 2015). A família α consiste naqueles com estrutura helicoidal, como é o caso da magainina e LL-37. Os peptídeos em conformações β são compostos por pelos menos dois segmentos de fitas β , que podem estar conectadas devido a ligações de dissulfeto e por interações de hidrogênio entre grupamentos muito polares presentes em ambas as fitas (Powers e Hancock, 2003; Sudheendra *et al.*, 2015). A alfa-defensina humana e a lactoferrina B (Figura 1.1, p. 28) são exemplos clássicos desse tipo de estruturação. Enquanto a maioria dos PAMs pertence a pelo menos um desses dois grupos estruturais, alguns apresentam tanto segmentos em hélice α , quanto em conformações β na mesma estrutura tridimensional, como pode ser visto nas beta-defensinas (defensina de planta Psd1) (Uteng *et al.*, 2003). Muitos PAMs são estabilizados pela formação de ligação de dissulfeto inter ou intramolecular, o que permite a formação de peptídeos

enovelados (em forma de “loop”), diméricos e cíclicos, o que normalmente limita a flexibilidade estrutural e mantem tais peptídeos em uma conformação relativamente restrita (Wang *et al.*, 2016). Por sua vez, peptídeos com a prevalência de certos aminoácidos, como prolina (Pro), arginina (Arg) e glicina (Gly), adotam uma estrutura específica chamada de poliprolina helicoidal, enquanto outros PAMs mantêm uma forma linear estendida, para ter sua atividade biológica otimizada, como a indolicidina bovina (Rozek *et al.*, 2000).

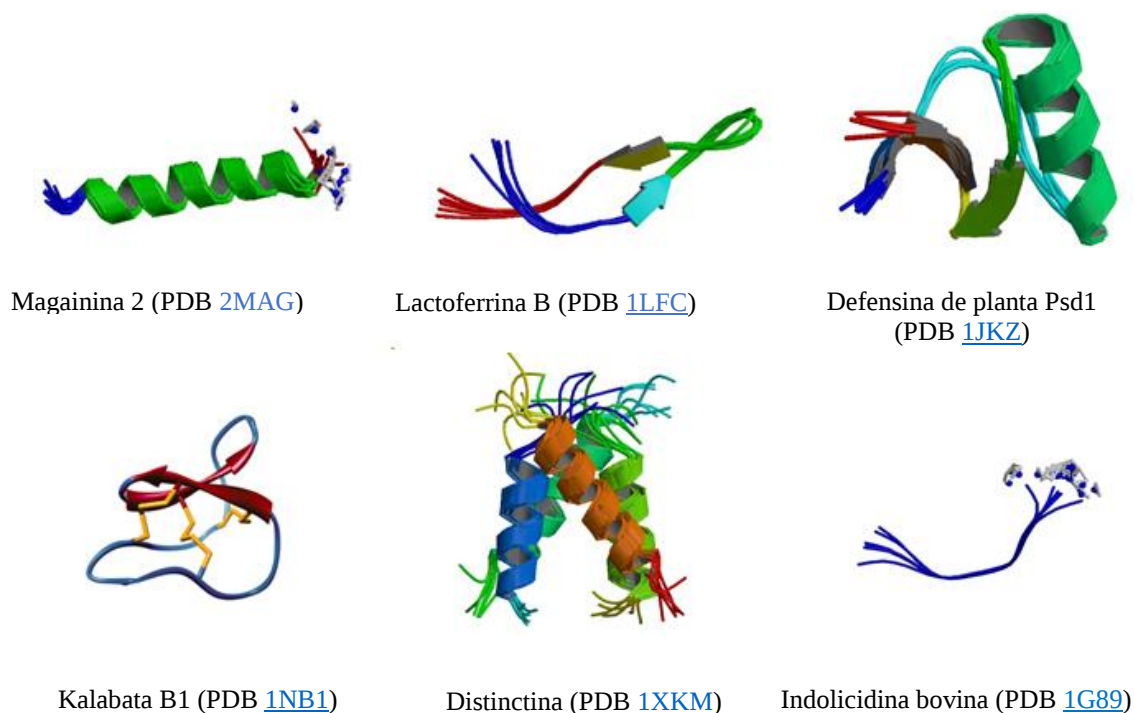


Figura 1.1: Estruturas tridimensionais de PAMs selecionadas a partir de diferentes classes estruturais.

Resultados de muitos estudos estruturais envolvendo os PAMs sugerem que conformações dinâmicas ou inerentes aos peptídeos definem substancialmente os seus modos de ação e também a citotoxicidade. No entanto, deve-se manter em mente que todas as características mencionadas como a carga, conformação, anfipaticidade e hidrofobicidade, dentre outras, estão individualmente correlacionadas com cada PAM, o que leva a se presumir que a modificação de um desses parâmetros pode levar a uma alteração subsequente da estrutura e influenciar diretamente no resultado da atividade biológica, além das propriedades químicas e físicas de cada peptídeo (Schmidtchen *et al.*, 2014).

1.1.1 Mecanismo de Ação

Com o descobrimento dos PAMs ao longo dos anos, muitos esforços foram empreendidos para elucidar o mecanismo de ação dessas biomoléculas (Bechinger e Gorr, 2016). Sabe-se que a maioria deles exerce suas atividades pela interação com as membranas biológicas, de modo a alterar, principalmente, a sua permeabilidade. Com base no efeito final da interação dos PAMs com as membranas alvo, os mecanismos atualmente propostos podem ocorrer baseando-se em dois grandes grupos gerais. O primeiro e mais abundante é representado pelos peptídeos que agem permeabilizando a membrana com consequente ruptura e extravasamento de material celular (Sani e Separovic, 2016). Nesse caso, pode ocorrer formação de poro transmembrana – via mecanismo do tipo toroidal ou barril de aduela – com solubilização dos fosfolipídios e destruição da membrana – via mecanismo do tipo tapete. Já o segundo envolve os peptídeos não membranolíticos, que afetam os alvos intracelulares para exercer sua atividade microbicida. Nos dois casos, ocorrem interações eletrostáticas com os grupos fosfatos negativamente carregados dos lipopolissacarídeos (em bactérias *Gram*-negativas) ou com o ácido lipoteicoico (em bactérias *Gram*-positivas). Esse processo é adicionalmente suportado pelas interações hidrofóbicas e pelo processo de estruturação do peptídeo quando em contato com a membrana (Figura 1.2, p. 30).

Os peptídeos que atuam dentro da célula, penetram a membrana estão aptos a atravessá-las, sem romper suas integridades, cobrindo a superfície celular e agregando-se como um complexo tipo micelar de lipídio-peptídeo, mas sem adotar alguma estrutura em particular (Figura 1.2A, p. 30), acumulando-se dentro da célula alvo e inibindo processos celulares essenciais (Benincasa *et al.*, 2017). Foi encontrado ainda que, alguns dos peptídeos membranolíticos também estão aptos a interagir com alvos intracelulares, quando usados em concentrações sub inibitórias mínimas (Li *et al.*, 2012; Kosikowska e Lesner, 2016).

O modelo de barril de aduelas (do inglês, *barrel-stave model*) foi o primeiro mecanismo de indução de poro por peptídeo a ser de fato proposto - Figura 1.2C (Yang *et al.*, 2001). Esse modelo de formação de poro ocorre em três etapas. Na primeira, os peptídeos interagem com a superfície da membrana, provavelmente na forma de monômeros. Na segunda, os peptídeos entram numa fase de transição conformacional, o que força para os lados as cabeças polares dos fosfolipídios, promovendo um afinamento naquela região da membrana. Nesse ponto, com o posicionamento dos resíduos de aminoácidos carregados positivamente próximos às cabeças

fosfolipídicas, a porção hidrofóbica do peptídeo se insere no interior da membrana. Durante a terceira etapa, os monômeros agregam-se e se inserem profundamente, formando uma espécie de núcleo na membrana (oligomerização). Para que ocorra a oligomerização, é necessário um limiar de concentração do monômero e um mínimo de exposição dos resíduos hidrofílicos no interior da membrana hidrofóbica, uma vez que o peptídeo adota a configuração transmembrana. Dessa forma, com o acúmulo contínuo dos monômeros no núcleo transmembrana formado, o tamanho do poro tende a aumentar continuamente.

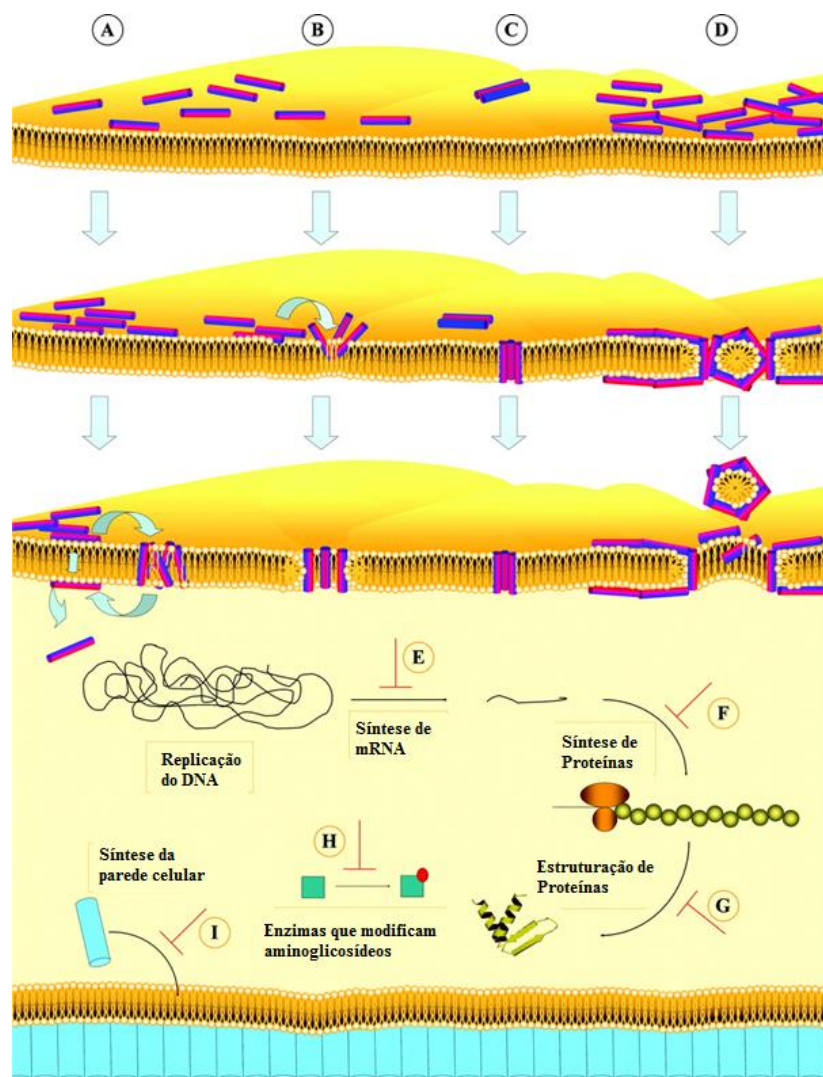


Figura 1.2: Mecanismos prováveis de ação dos peptídeos antimicrobianos. A membrana celular do microrganismo é representada pela bicamada amarela e os peptídeos em cilindros, onde a região hidrofílica está em vermelho e a hidrofóbica em roxo. As moléculas de peptidoglicanos associados à parede celular estão representados em azul claro. Os modelos para explicar os mecanismos de permeabilização da membrana estão indicados de (A) a (D) e o modelo para explicar o mecanismo de PAMs que agem no interior da célula estão indicados de (E) a (I). Figura extraída de (Jenssen, Håvard *et al.*, 2006) com autorização da *American Society for Microbiology* – ASM (Anexo A1, p. 177).

O modelo de poro toroidal (do inglês, *toroidal pore model*) é um dos mecanismos de interação mais bem caracterizados, deduzido principalmente por experimentos usando peptídeos α helicoidais, incluindo a magainina e a PGLa - Figura 1.2B, p. 30 (Yang *et al.*, 2001; Sengupta *et al.*, 2008). A formação do poro toroidal também ocorre em três fases. Inicialmente, moléculas peptídicas no meio extracelular interagem com a membrana carregada e hidrofóbica do microrganismo, adotando, neste caso, uma estrutura α -helicoidal, que se orienta de forma paralela à superfície da membrana. Esse evento abala a integridade da superfície da bicamada lipídica, tornando-a mais vulnerável. A partir daí, em um limiar de razão peptídeo-lipídeo que varia para cada PAM, as cadeias peptídicas se orientam perpendicularmente à membrana e as hélices formadas começam a se associar de tal maneira que seus resíduos polares ficam expostos não muito longe da parte hidrofóbica da membrana, formando assim uma espécie de composto multimérico e transitório, que culmina num complexo dinâmico supramolecular de peptídeo-lipídeo ou, simplesmente, no poro toroidal. Devido à desintegração do poro, alguns peptídeos podem se mover para a parte interna, em contato com o folheto citoplasmático da membrana, sugerindo que uma desmontagem do poro toroidal pode ser o mecanismo chave para que os peptídeos adentrem no citoplasma microbiano para acessar alvos intracelulares em potencial. Diferentemente do poro formado pelo modelo barril de aduela, os poros toroidais são compostos por peptídeos intercalados com lipídeos; portanto, esta estrutura tem sido referência para representar um poro formado pela própria membrana, que é revestido com a superfície polar dos peptídeos em interação com os grupos de cabeças fosfolipídicas.

O modelo tipo carpete (do inglês, *Carpet-like model*) tem como principal característica a ação detergente dos peptídeos, permeabilizando a membrana de forma não específica e relativamente difusa - Figura 1.2D, p. 30 (Bechinger e Lohner, 2006). A interação peptídeo-membrana ocorre com alta densidade de agregados peptídicos na superfície da membrana alvo. Os peptídeos inicialmente se orientam paralelamente à superfície da membrana e não se inserem na parte hidrofóbica. Essa orientação desestabiliza o empacotamento da bicamada e causa a ruptura da membrana, devido à concentrada camada de monômeros peptídicos na superfície. De fato, o deslocamento do fosfolipídio modifica a fluidez da membrana e/ou diminui a eficácia da barreira, o que leva à sua ruptura. De forma alternativa, os peptídeos também podem inicialmente se ligar à membrana, principalmente via interações eletrostáticas, cobrindo a bicamada fosfolipídica. Quando a densidade peptídica alcança um certo limiar, a membrana passa a ser desfavorecida energeticamente, o que culmina na perda da sua integridade, levando à formação de estruturas micelares. A partir dessa perspectiva, a dissolução da membrana

ocorre de forma tipo dispersão, que não envolve a formação de um canal, e os peptídeos não se inserem necessariamente no interior hidrofóbico da membrana. A cecropina e a indolicidina são exemplos de PAMs que agem via esse mecanismo (Carnicelli *et al.*, 2013).

Devido à grande complexidade das membranas biológicas, vários sistemas artificiais simplificados têm sido desenvolvidos para mimetizarem a bicamada lipídica da membrana celular, de modo a viabilizar uma série de investigações biofísicas, que ajudam a elucidar o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.

1.1.2 Modelos Miméticos de Membrana

Modelos miméticos de membrana são sistemas com uma organização que melhor descrevem o arranjo lipídico das membranas plasmáticas naturais. Três sistemas biomiméticos são geralmente utilizados no estudo da interação entre peptídeos e membranas (Knobloch *et al.*, 2015). São eles as monocamadas lipídicas, bicamadas lipídicas suportadas e os lipossomas ou vesículas fosfolipídicas (Figura 1.3, p. 33).

As monocamadas lipídicas são modelos simples que mimetizam apenas uma das duas metades da bicamada da membrana (Figura 1.3A, p. 33). Uma monocamada lipídica é obtida, geralmente, em uma cuba de Langmuir, pelo espalhamento homogêneo de fosfolipídios da membrana de interesse na interface entre o ar e uma subfase aquosa tamponada. Esses fosfolipídios assumem uma orientação típica em que as cabeças polares estão em contato com a subfase aquosa e as cadeias acila estão em contato com a fase gasosa (ar). A solução do peptídeo é levemente injetada na subfase e suas moléculas são gradativamente transferidas para a monocamada insolúvel na interface ar-água. À medida em que as moléculas são inseridas, ocorre um aumento da área superficial da monocamada e, conseqüentemente, mudanças na pressão superficial lateral, que é geralmente detectada por um sensor. Essa variação da pressão é o parâmetro chave revelado para o desmembramento dos estudos. Portanto, além de outras aplicações, as monocamadas lipídicas têm sido muito úteis em estudos que avaliam a habilidade dos peptídeos de interagirem com as membranas fosfolipídicas, o que, juntamente com outras informações, permite obter resultados que ajudarão a caracterizar a interação em questão (Junghans *et al.*, 2010).

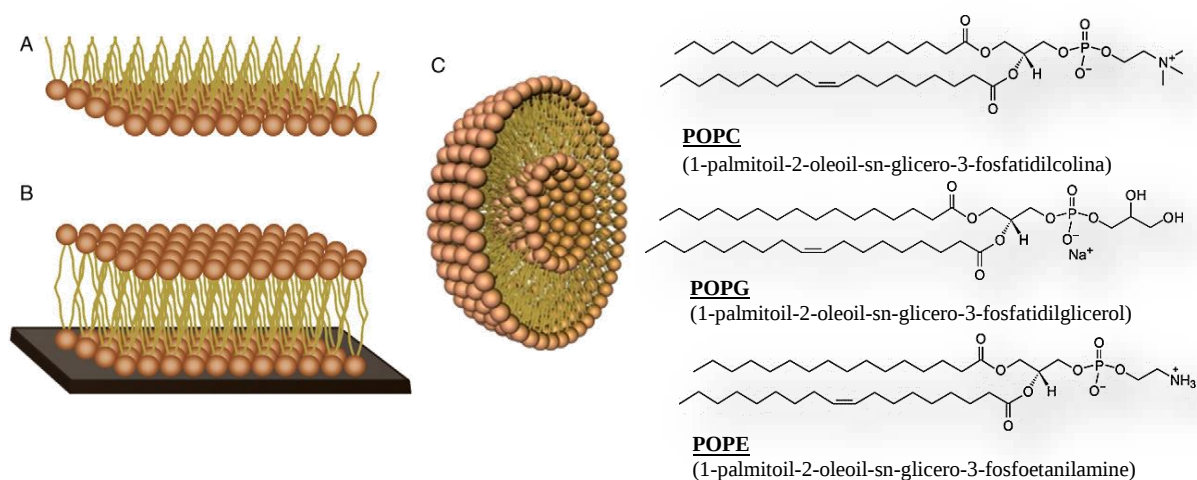


Figura 1.3: Representação esquemática dos modelos de membranas mais utilizados nos estudos de interações. (A) monocamada lipídica, (B) bicamada lipídica suportada e (C) lipossoma. À direita, alguns dos fosfolipídios utilizados nesses modelos. Figura extraída de (Deleu *et al.*, 2014), com autorização da Elsevier (Anexo A2, p 178).

As bicamadas lipídicas suportadas são modelos biomiméticos de membrana constituídos de uma bicamada lipídica plana suportada por uma superfície sólida, que pode ser mica, vidro ou pastilha de óxido de silício; por isso, somente uma face da bicamada está exposta à solução - Figura 1.3B (Richter *et al.*, 2006). Uma das grandes vantagens das bicamadas suportadas é sua estabilidade, o que permite que os experimentos durem por semanas ou até mesmo meses (Purrucker *et al.*, 2001). Esses sistemas tipicamente não só permitem a investigação de interações de peptídeos com os fosfolipídios como também prever o comportamento da fase e a organização paralela das moléculas, que compõem as membranas. Eles podem ser preparados pela técnica de Langmuir-Blodgett, pela fusão de vesículas lipídicas, ou pela depleção de surfactante a partir de soluções de micelas compostas por uma mistura de surfactantes e fosfolipídios. Quando comparadas às vesículas fosfolipídicas, que estão livres em solução, as bicamadas lipídicas suportadas são modelos muito mais fáceis de serem caracterizadas pelo fato de estarem fixas na superfície de um suporte sólido. Por isso, uma grande variedade de técnicas que são sensíveis às superfícies pode ser utilizada para essa caracterização. São elas a microscopia de força atômica (AFM), espectrometria de massas de íon secundário (SIMS), microscopia de fluorescência, elipsometria ótica, micro balança de cristal de quartzo, refletividade de raio-X, refletividade de nêutrons e a ressonância plasmônica de superfície (SPR) e ressonância magnética nuclear (RMN) do estado sólido (Castellana e Cremer, 2006).

Sistema modelo de biomembranas mais popular, as vesículas lipídicas ou lipossomas são bastante versáteis e muito utilizados no estudo *in vitro* de diversas propriedades das membranas em geral (Chan e Boxer, 2007). Apresentam aplicações na bioquímica e biologia molecular – estudo de propriedades biofísicas das membranas, do reconhecimento molecular e de adesão celular e modo de ação de peptídeos – e em tecnologia farmacêutica, principalmente na incorporação de compostos para transporte. Enquanto as monocamadas lipídicas são constituídas somente por um folheto de lipídeos e, portanto, não refletem a complexidade da estrutura da membrana biológica, vesículas lipídicas são compostas por dois folhetos, que estão arrançados de forma similar às membranas biológicas. Esse conjunto de lipídeos encerra uma superfície interna hidrofílica (pequeno compartimento aquoso) e é originado pela associação espontânea entre as “caudas” hidrofóbicas dos fosfolipídios em uma dispersão aquosa. Esse tipo de agregado tende a se reorganizar rapidamente formando vesículas multilamelares (MLVs), que são estruturas com uma maior estabilidade termodinâmica. A partir de uma suspensão de MLVs é possível se preparar vesículas unilamelares com dimensões mais controláveis e essas são classificadas como vesículas unilamelares pequenas (SUVs, do inglês, *small unilamellar vesicles* – com diâmetro entre 25 e 50 nm), vesículas unilamelares grandes (LUVs, do inglês, *large unilamellar vesicles* – com diâmetro entre 50 e 500 nm), ou vesículas unilamelares gigantes – GUVs, do inglês, *giant unilamellar vesicles*, com diâmetros que chegam a 1 μm (Olson *et al.*, 1979).

As LUVs são muito utilizadas em estudo de interação com os PAMs. A atividade de permeabilização da membrana causada pelos PAMs pode ser estimada utilizando-se lipossomas que contêm fosfolipídios de membranas de bactérias *Gram*-negativas e positivas, carregando em seu interior alguma molécula fluorescente, como a calceína, a carboxifluoreceína ou a dextrana. Para esse propósito, as composições lipídicas mais utilizadas são fosfatidiletanolamina/fosfatidilglicerol (PE/PG 7:3, m/m) para reproduzir a membrana de *Gram*-negativa (*E. Coli*, por exemplo) e fosfatidilglicerol/cardioplipina (PG/CL 6:4, m/m) para mimetizar a membrana de *Gram*-positiva – *S. aureus*, por exemplo (Lohner, 2017).

Outros modelos biomiméticos também são bastante utilizados, porém com aplicações mais restritas. Embora não tenha uma estrutura de bicamada lipídica, as micelas detergentes são outro modelo que é comumente utilizado em estudos biofísicos, principalmente em abordagens mais estruturais (Seddon *et al.*, 2004; Bechinger *et al.*, 2011). Em solução aquosa esses sistemas são estruturas esféricas formadas por um agregado de moléculas anfipáticas com ação

detergente, os surfactantes. Acima de uma determinada concentração crítica (CMC), essas moléculas se organizam de tal forma, que as cabeças hidrofílicas ficam expostas ao solvente aquoso e suas “caldas” hidrofóbicas ficam voltadas para o centro, evitando o contato com as moléculas de água (Figura 1.4A). Outro sistema biomimético que pode ser usado são as bicelas. Esse modelo combina, tipicamente, a estrutura lisa da bicamada lipídica com a curvatura do tipo micelar, graças à utilização de dois fosfolipídios com tamanhos de cadeias hidrofóbicas diferentes (uma longa e outra mais curta). Assim, é formado um rearranjo molecular que blinda o centro da bicamada contra as moléculas circundantes do solvente (Figura 1.4B). As micelas e as bicelas pequenas são muito menores que os lipossomas, sendo muito utilizadas em experimentos de ressonância magnética nuclear em solução, onde vesículas maiores, normalmente, não são uma boa opção (Cavagnero *et al.*, 1999; Bechinger *et al.*, 2011).

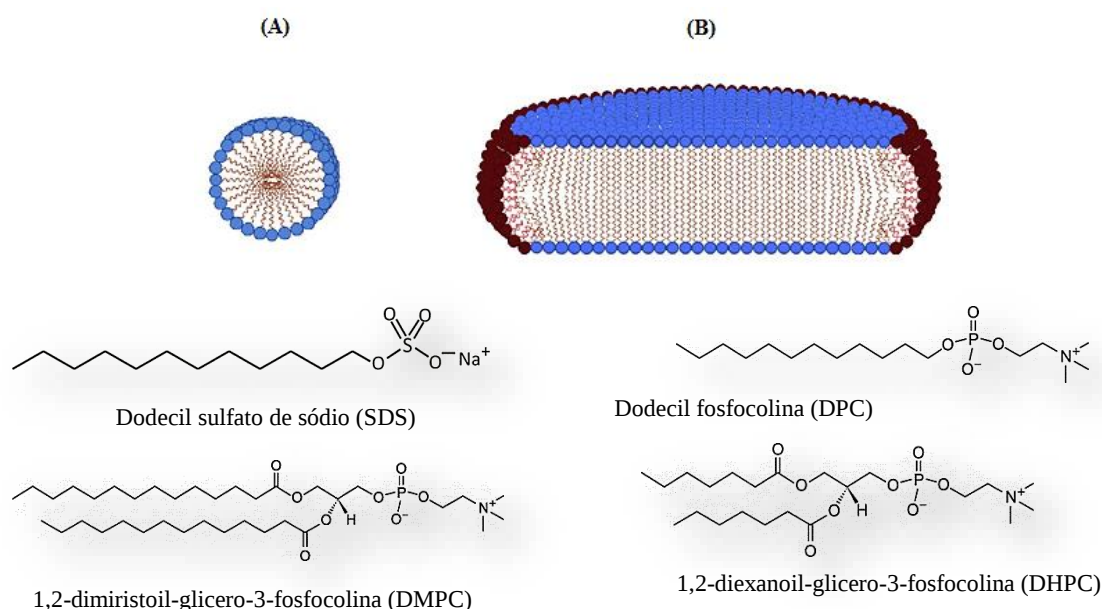


Figura 1.4: (A) Representação esquemática de uma micela e (B) uma bicela. Abaixo, os surfactantes mais utilizados para as micelas, o dodecilssulfato de sódio (SDS) e a dodecil fosfocolina (DPC), e para a bicela, o 1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfocolina (DMPC, cadeia longa) e o 1,2-diexanoil-glicero-3-fosfocolina (DHPC, cadeia curta). Desenhos da micela e da bicela foram retiradas e adaptadas de (Bechinger *et al.*, 2011) com autorização da Elsevier (Anexo A3, p 179).

Dessa forma, esses modelos biomiméticos permitem uma aproximação relativamente adequada ao tipo de membrana biológica existente, sendo, portanto, representativos e apropriados para aplicações nas diferentes técnicas utilizadas em estudos biofísicos, os quais visam a elucidação tanto das estruturas adquiridas na interação, quanto dos mecanismos de ação que os PAMs podem exercer.

1.1.3 Abordagens Biofísicas no Estudo Estrutural e de Interação Peptídeo-Membrana

Vários métodos biofísicos têm sido usados para estudar as características estruturais dos peptídeos e suas interações com modelos miméticos de membranas. A interação peptídeo-membrana está relacionada a parâmetros físico-químicos fundamentais existentes em um ambiente complexo e que são muito importantes para uma variedade de processos biológicos. Na obtenção das mais abrangentes informações, várias técnicas biofísicas podem ser empregadas, tais como a espectroscopia de fluorescência e imagem, a microscopia de força atômica (AFM), a espectroscopia de dicroísmo circular (CD), espectroscopia no infravermelho (FTIR e PM-IRRAS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{31}P , ^2H , ^{15}N , ^{13}C , ^1H), cristalografia de raios-X, refletividade de nêutrons, espectrometria de massa de íons secundários (SIMS), espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície (SPR), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), calorimetria de titulação isotérmica (ITC), calorimetria diferencial de varredura (DSC), além de abordagens *in silico* (Deleu *et al.*, 2014). A utilização conjunta dessas técnicas, bem como seus desenvolvimentos, tem permitido a realização de estudos mais confiáveis, além de uma abordagem mais racional e rigorosa na resolução de problemas, tanto estruturais no nível atômico/molecular, quanto sobre a interação peptídeo-membrana.

1.1.3.1 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A SPR é uma técnica muito sensível a superfícies, que tem sido aplicada para o estudo de sistemas de membranas, permitindo o monitoramento em tempo real de vários parâmetros como afinidade, seletividade e cinética, os quais estão intrinsecamente relacionados à interação envolvendo estes sistemas e biomoléculas (Patching, Simon G, 2014). Essa técnica tem surgido como uma ferramenta poderosa para o estudo da dinâmica de interação entre um peptídeo e a superfície lipídica, fornecendo informações preciosas sobre mudanças na ligação do peptídeo, na conformação, orientação e na organização lipídica.

A SPR explora o fenômeno da geração da ressonância de plasmon na superfície de um fino filme de metal e a reflexão interna total da luz na interface solução-superfície, para produzir um filme eletromagnético ou uma onda extremamente pequena, que percorre uma curta distância (até 300 nm) através da solução, o que permite a medida em tempo real da ligação da biomolécula à superfície de membranas biomiméticas, sem a aplicação de uma marcação específica (Figura 1.5, p. 38). Nessa tecnologia, a superfície de um chip é formada por um filme

fino de ouro em um suporte de vidro, formando-se a base de uma célula, por onde passa um fluxo contínuo de solução aquosa de volume muito pequeno (menor que 100 nL). Para se detectar a ligação de uma molécula de analito a uma molécula receptora, esta última é imobilizada na superfície do sensor chip e o analito é injetado na solução aquosa, que passa continuamente pela célula de fluxo. Uma fonte emite uma luz polarizada direcionada através de um prisma para a base de um filme fino de ouro, onde o plasmon da superfície é gerado a um determinado ângulo crítico em relação à luz incidente (Figura 1.5A, p. 38). Esse ângulo crítico é dependente do índice de refração do meio intimamente próximo (300 nm acima da superfície do filme de ouro) e muda quando moléculas do analito se ligam às moléculas do receptor imobilizado (Figura 1.5B, p. 38). Ocorre reflexão da luz e um detector capta a variação da intensidade da luz que refletiu. Se a interação entre as moléculas do receptor imobilizado e as moléculas do analito ocorre, o índice de refração da superfície do filme de ouro muda e isto é visualizado como um aumento da intensidade do sinal. A resposta é dada em tempo real na forma de sensograma e são usadas as unidades de ressonância ou resposta (RU) para descrever o aumento no sinal (Figura 1.5C, p 38).

No início do experimento, as moléculas do receptor imobilizadas no suporte de ouro não são expostas e o valor de RU ainda corresponde ao ângulo crítico inicial a . Quando as moléculas do analito são injetadas na célula de fluxo, caso haja ligação às moléculas imobilizadas no suporte, existirá uma fase de associação, durante a qual os sítios de ligação se tornarão ocupados e a forma da curva obtida pode ser usada para medir a taxa de associação (K_{on}). Quando um estado de estabilidade é alcançado, o valor de RU passa a ser máximo e corresponde a uma mudança final de ângulo crítico b . Esse máximo RU está relacionado ao equilíbrio entre as moléculas de receptor imobilizadas e de analito, podendo, então, ser usado para medir a afinidade de ligação (K_a) ou dissociação (K_d). A partir daí, quando as moléculas do analito são removidas do fluxo contínuo, existirá uma fase de dissociação, que é quando os sítios de ligação se tornam desocupados e a forma desta curva pode ser usada para medir a taxa de dissociação (K_{off}). Por fim, a superfície de ouro é, então, regenerada e retorna ao ângulo crítico a , sendo que o experimento pode, portanto, ser reiniciado (Patching, Simon G., 2014).

A SPR tem sido explorada para o estudo de PAMs e, dentre os mais estudados, podem ser destacados os peptídeos lineares anfipáticos catiônicos melitina, magainina, cecropina, dermaseptina e uma grande variedade de análogos destes peptídeos (Hall *et al.*, 2003). Também existem exemplos do uso da SPR para analisar PAMs cíclicos (Kamimori *et al.*, 2005),

glicopeptídeos antibióticos (Butler *et al.*, 2014) e proteínas citolíticas (Hall *et al.*, 2003), o que demonstra o grande potencial da técnica para fornecer informações sobre as propriedades de ligação de vários tipos de peptídeos com membranas celulares.

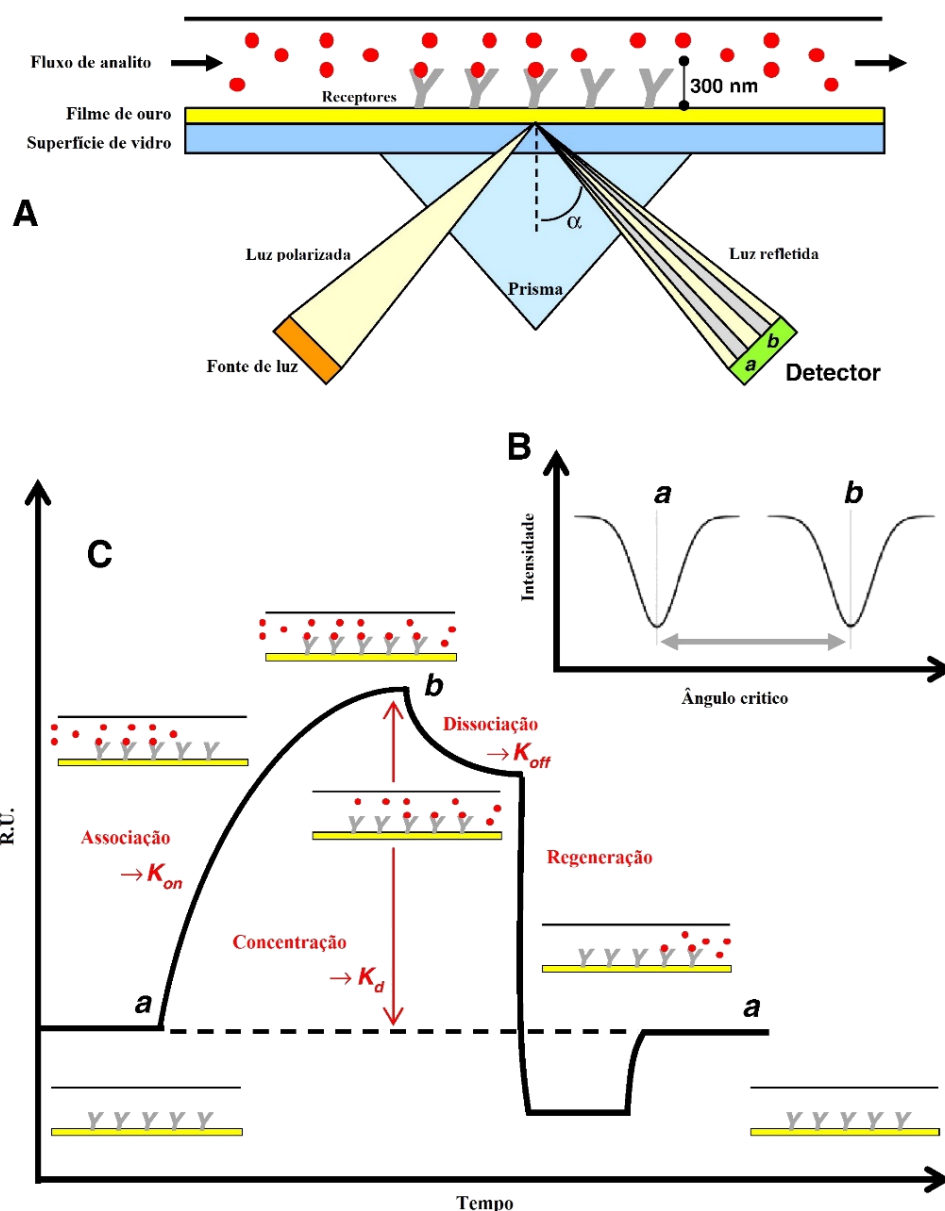


Figura 1.5: Esquema geral do funcionamento de um sistema de SPR. (A) mecanismo de funcionamento de SPR, (B) ângulo crítico formado pela luz refletida e (C) sensograma mostrando as etapas de interação. Figura extraída da referência (Patching, Simon G, 2014) com autorização concedida pela Elsevier (Anexo A4, p 180).

1.1.3.2 Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A ITC (do inglês, *isothermal titration calorimetry*) é uma das técnicas mais empregadas para descrição termodinâmica de diferentes sistemas biomoleculares. Assim como em outras

técnicas, a ITC permite o estudo em ambientes muito similares ao de membranas biológicas, como vesículas fosfolipídicas e micelas (Rajagopalan e Hiemenz, 1997; Seelig, 2004). O crescente uso da ITC pode ser atribuído principalmente a três fatores: *i*) o desenvolvimento de calorímetros de alta-sensibilidade, que permitem a medida de interações em concentrações na ordem de micro molar (Wiseman *et al.*, 1989); *ii*) o fato de que os processos químicos e físicos ocorrem por absorção ou liberação de calor, podendo ser monitorados diretamente por estes fenômenos sem o emprego de espectroscopia específica ou de marcações isotópicas (Turnbull e Daranas, 2003); *iii*) por último, à capacidade de medir diretamente a entalpia de interação (ΔH^0) do sistema (Simon e McIntosh, 2002).

A principal aplicação da ITC se dá no estudo dos parâmetros termodinâmicos de uma reação de ligação. Ela não somente permite a medida da entalpia de ligação ΔH^0 , como também realiza uma completa análise termodinâmica da interação, incluindo a energia livre de ligação ΔG^0 , a entropia de ligação ΔS^0 , a variação da capacidade calorífica ΔC^0 e, também, a determinação da isoterma de partição/ligação (Seelig, 1997; 2004). Tais parâmetros podem resultar ainda em informações como constantes de interação (K), estequiometria (N ou n) ou, até mesmo, evidências que permitem inferir sobre o mecanismo de interação do sistema em estudo (Broecker *et al.*, 2011). Além disso, a ITC tem sido usada para estudar processos secundários, que acompanham a interação peptídeo-membrana, isto é, a permeabilização de membrana induzida por peptídeo, mudanças na fase lipídica, associação peptídeo-peptídeo induzida por membrana, reações de protonação na superfície da membrana e mudanças conformacionais do peptídeo (Heerklotz e Seelig, 2000; Heerklotz, 2004; Andreev *et al.*, 2007; Deleu *et al.*, 2014).

Considerando que a interação de peptídeos com bicamadas lipídicas de membranas envolve a quebra e a formação de interações intermoleculares, a ITC utiliza como sonda a medida direta do fluxo de calor associado a esses fenômenos, tornando essa técnica muito útil nas investigações de interações peptídeos-membranas (Verly *et al.*, 2008).

Na Figura 1.6, p. 40, é representado um esquema de funcionamento básico para um experimento de ITC. O microcalorímetro funciona basicamente com um núcleo térmico equipado com duas células, uma de referência e a outra contendo a amostra. As duas células são definidas para a temperatura experimental desejada. O titulante é carregado em uma seringa, que está encaixada em um dispositivo de injeção muito preciso e, quando esse titulante é

injetado em uma série de pequenas alíquotas na célula contendo o titulado, é gerada uma perturbação energética que evolui durante um intervalo de tempo (t^1_i) caso ocorra alguma interação, até que a reação de ligação atinja o equilíbrio (Figura 1.6B). No exemplo da Figura 1.6, cada sinal representa a mudança de calor causada por uma simples injeção do titulante – que no caso, é exotérmica e, portanto, o sinal é representado por uma deflexão negativa. À medida que a temperatura das duas células se torna igual, o sinal retorna para sua posição inicial (t^2_i). Os primeiros picos são largos por causa da maioria do titulante injetado estar ligado ao titulado. Uma vez que o titulado se torna saturado com o titulante, menos titulante irá se ligar com o passar das injeções e, portanto, menos calor será gerado. No final do experimento, muito pouco titulante está ligado e a pequena quantidade de calor gerada é devida ao calor de diluição.

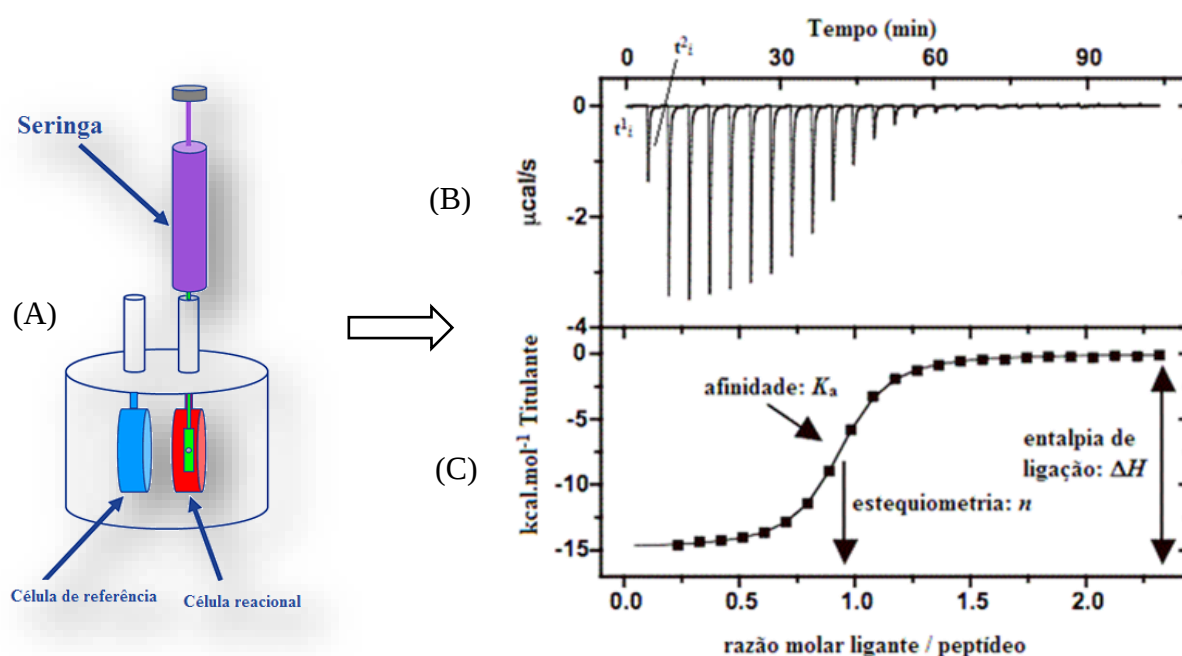


Figura 1.6: Esquema geral de funcionamento de um equipamento de ITC. (A) ilustração dos componentes básicos utilizados. (B e C) Fluxo de calor em função do tempo para uma titulação calorimétrica. Nesse exemplo, a deflexão negativa da mudança de calor representa a liberação energética sob a ligação de um ligante (titulante) à uma macromolécula (titulado) no tempo de t^1_i a t^2_i , isto é, o calor de ligação é exotérmico.

Quando todos os dados do ITC obtidos a partir da curva de calor são carregados no software de análise de dados do equipamento, a área de cada sinal é integrada (Equação 1.1, p 41) e modelos matemáticos são aplicados, gerando automaticamente uma linha de base, que é plotada como função da razão molar do titulante por molécula titulada na célula (Figura 1.6C). Cada ponto preto na curva representa um sinal de calor individual. A linha sólida preta representa o melhor ajuste para o algoritmo de ligação utilizado no *software*, a partir da qual se

determina a entalpia de interação, a estequiometria (valor de N ou n), referente ao ponto médio da curva) e a afinidade (K_a) ou dissociação (K_d) – relacionada à concentração e a forma sigmoidal dos dados (Turnbull e Daranas, 2003).

$$\overline{\Delta_{\text{comp}}H} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{\text{tot}}} \right)_p = \int_{t_{li}}^{t_{2i}} F dt, \quad (1.1)$$

onde a quantidade de calor medido está na proporção direta em relação ao valor do ligante injetado e X é razão molar de titulante.

Para a interação entre peptídeo e os fosfolipídios, geralmente dois experimentos diferentes de titulação podem ser feitos: (A) um no qual o peptídeo é o titulante e o fosfolipídio é o titulado e que visa obter a entalpia da reação; e (B) o outro, o fosfolipídio é o titulante e o peptídeo é o titulado e que visa a obtenção da isoterma de ligação (Seelig, 2004).

Titulação de peptídeo em fosfolipídio

A entalpia de reação ΔH^0 é obtida através de um único experimento, no qual a célula de amostra conterá uma suspensão de vesículas de fosfolipídios, normalmente na faixa de concentração entre 10 e 20 mmol·L⁻¹. Nesse mesmo experimento, uma solução do peptídeo com um fator de diluição entre 100 e 200 em relação à concentração de fosfolipídio é colocada na seringa e pequenas alíquotas (5-10 μL) serão adicionadas à suspensão em intervalos de tempo fixos. A razão molar fosfolipídio-peptídeo na célula de reação será então na ordem de 10.000. Quando a afinidade entre fosfolipídio e peptídeo é suficientemente forte, pode-se considerar que todo o peptídeo injetado estará completamente ligado às vesículas. A entalpia de interação ΔH^0 poderá ser calculada, dividindo-se o calor de injeção pela quantidade molar de peptídeo injetado (Seelig, 1997).

Titulação de lipídeo em peptídeo

A isoterma da interação peptídeo/fosfolipídio será obtida pelo experimento inverso ao anterior. Neste caso, peptídeo e fosfolipídio serão dispostos inversamente no calorímetro, de forma que a célula de reação seja preenchida com uma solução do peptídeo (6-40 μM), enquanto que a suspensão do lipídeo ficará contida na seringa de injeção do calorímetro (1-40 mM). Assim, após cada injeção de uma pequena alíquota de lipídeo, a concentração de peptídeo livre em solução diminuirá, devido à interação deste com as vesículas fosfolipídicas. Assim sendo,

um aumento do número de injeções reduzirá a quantidade de moléculas de peptídeo livre na solução e o calor de injeção também diminuirá. Normalmente, o resultado deste processo é uma isoterma de interação caracterizada por uma curva que apresenta diferentes valores de calor de injeção e que diminuem até um patamar, permanecendo então, constantes (Figura 1.6C, p. 40) (Seelig, 2004).

O modelo matemático mais comumente utilizado neste caso é o denominado isoterma de Wiseman, que descreve uma curva de titulação calorimétrica sigmoidal (Wiseman *et al.*, 1989). A Equação 1.2 relaciona a entalpia molar parcial de complexação ($\overline{\Delta_{\text{comp}}H} = dQ/d[X]$) à pressão constante, com a razão molar de titulante (X) e titulado (M), a qualquer ponto durante o curso da titulação.

$$\overline{\Delta_{\text{comp}}H} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{\text{tot}}} \right)_P = \Delta_{\text{int}}H^0 V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right], \quad (1.2)$$

onde $X_R = [X]/[M]_t$; $\Delta_{\text{int}}H^0$ e V_0 são, respectivamente, a entalpia molar padrão de complexação e volume efetivo da solução na célula de titulação; r é uma variável de composição $r = 1/[M]_t$. K_{eq} , onde K_{eq} é a constante de equilíbrio. O ponto de inflexão da curva é numericamente igual ao coeficiente estequiométrico n do sistema (Figura 1.6C, p. 40).

Com o valor de K_{eq} obtido pelo ajuste dos pontos à Isoterma de Wiseman, é possível calcular a variação da energia-livre de Gibbs padrão do processo ΔG^0 por meio da relação $\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{eq}}$. Com o valor de $\Delta_{\text{int}}H^0$ obtido pelo tratamento descrito acima e pelo uso da equação $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$, calcula-se o termo entrópico ΔS^0 .

Um estudo termodinâmico completo envolve, além dos parâmetros descritos acima, a variação da capacidade calorífica ΔC_p . No estudo da interação ou reação entre dois sistemas distintos por ITC, cuja interação seja significativa a ponto de ser detectada pelo equipamento, todos os parâmetros termodinâmicos anteriormente descritos são obtidos e propiciam informações das forças que direcionam o processo. A caracterização da entalpia e da entropia de ligação fornece *insights* sobre o mecanismo de ligação, incluindo o envolvimento de ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e mudanças conformacionais que ocorrem durante a interação. A termodinâmica e a afinidade são usadas para descrever a especificidade e informação estrutural relacionadas à ligação.

1.1.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Também chamado de espectroscopia de fóton correlação ou espalhamento de luz quasi-elástica, o espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma das mais populares técnicas de espalhamento de luz, devido ao tamanho das partículas analisadas, que pode chegar a escalas nanométricas (Kaszuba *et al.*, 2008). As aplicações típicas dessa técnica são para emulsões, micelas, polímeros, proteínas, nano partículas ou coloides. Recentemente, o DLS tem sido muito empregado no estudo do efeito de peptídeos sobre o tamanho de vesículas fosfolipídicas. Essa aplicação foi possível graças à sensibilidade dessa técnica a mudanças na forma e no tamanho das partículas e, por isso, agregados de peptídeos ou de vesículas fosfolipídicas podem ser facilmente detectados (Chu, 2008; Gabriel *et al.*, 2008; Mendoza-Espinosa *et al.*, 2008).

O DLS é uma técnica óptica, baseada num princípio prático relativamente simples: um laser incide sobre a amostra e a intensidade do feixe espalhado por um ângulo θ é medida ao longo do tempo, conforme ilustrado na Figura 1.7.

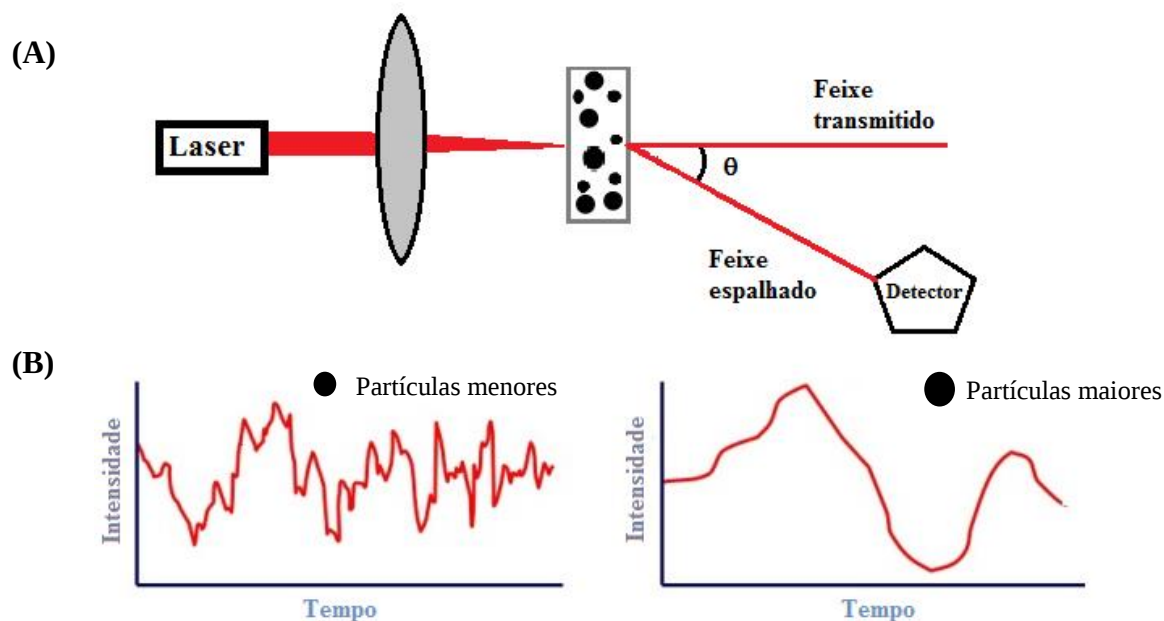


Figura 1.7: Medida da intensidade da luz espalhada por um ângulo θ . (A) Esquema geral de funcionamento do DLS e (B) a detecção de partículas maiores (direita) e das partículas menores (esquerda).

Quando em solução, macromoléculas estão constantemente em choque com as moléculas do solvente e isso leva a um movimento molecular chamado de movimento Browniano. Nesse ambiente, as partículas apresentam tamanhos diferentes e, portanto, se movem com velocidades diferentes, de forma que as menores irão se mover com velocidade

maior do que as partículas maiores. Isso faz com que as partículas menores apresentem um coeficiente de difusão (D) maior. Portanto, a escala de tempo da flutuação da intensidade medida será tão menor quanto maior for a difusividade das partículas no fluido, que pode ser calculada pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_h}, \quad (1.3)$$

onde η é a viscosidade, T temperatura constante, k é a constante de Boltzmann e D_h o diâmetro hidrodinâmico das partículas (de sistemas formados considerando apenas partículas esféricas).

A fonte de luz monocromática, incidida na cubeta contendo a solução, se dispersa pelas macromoléculas em movimento e é espalhada aleatoriamente com o passar do tempo, o que causa variações na intensidade devido a interferências construtivas e destrutivas. Considerando-se um sistema formado apenas por partículas pequenas, a flutuação da intensidade de luz espalhada é maior, pois elas se movimentam mais rapidamente, o que permite que elas cruzem a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo (Figura 1.7B, p. 43). Portanto, essa variação de intensidade em um determinado intervalo de tempo está relacionada com o tamanho das partículas.

Para obter informações sobre o diâmetro hidrodinâmico e a distribuição do tamanho de moléculas ou agregados supramoleculares através dos dados de espalhamento dinâmico da luz, deve-se realizar algumas análises estatísticas das curvas obtidas. Nos equipamentos mais modernos, tais análises são feitas automaticamente por softwares, os quais utilizam algoritmos que permitem a obtenção de distribuições complexas de tamanhos através da expansão das funções de autocorrelação em séries de decaimentos exponenciais (Gabriel *et al.*, 2008; Mendoza-Espinosa *et al.*, 2008). Para tanto, é útil definir neste momento algumas grandezas e funções que serão fundamentais.

Como mostrado na Equação 1.4, é possível descrever a flutuação da intensidade de espalhamento com o tempo, através de uma função de autocorrelação temporal $G(t)$, onde $I(t_0)$ é a intensidade de luz incidente e $I(t_n)$ a intensidade de luz espalhada.

$$G(t) = \langle I(t_0) \cdot I(t_n) \rangle \quad (1.4)$$

A partir de deduções matemáticas para a obtenção de $G(t)$, pode-se esperar que a função de autocorrelação temporal decaia de seu valor inicial $I(t_0)$ para um valor mínimo, assim que as funções $I(t_0)$ e $I(t_n)$ estejam mais correlacionadas. Isto acontecerá quando o intervalo de tempo “ n ” se tornar muito maior do que a escala de tempo típica da flutuação. Logo, a função de autocorrelação temporal da intensidade decairá de forma exponencial, como mostrado na Figura 1.8. Para uma dispersão de partículas pequenas, observa-se um decaimento mais rápido na função de autocorrelação $G(t)$, do que no caso de dispersões contendo partículas grandes (Robert, 1985; Everett, 1988).

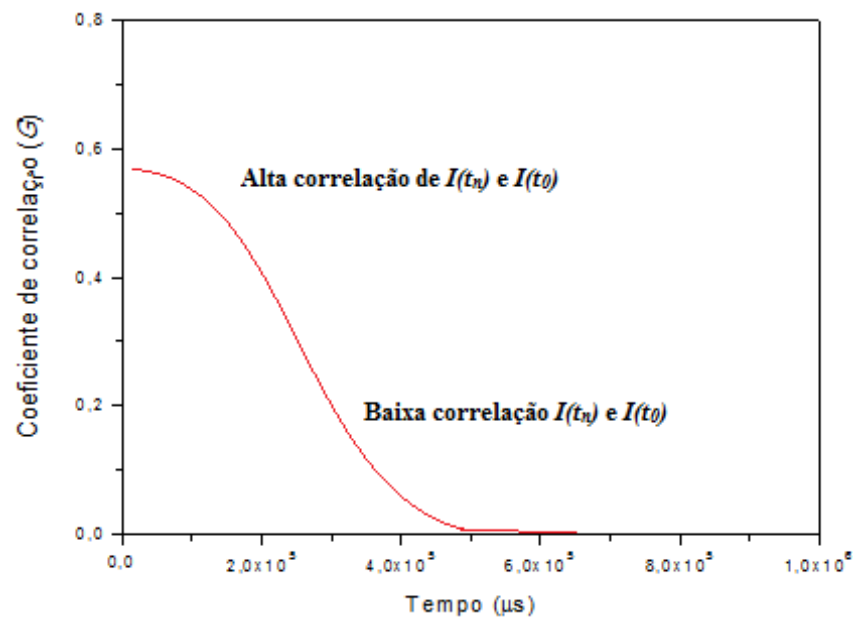


Figura 1.8: Gráfico da variação do fator de correlação G em função do tempo. Representação do decaimento da função de auto correlação $G(t)$.

Para o caso de soluções de partículas esféricas e monodispersas, pode-se associar o tempo de correlação da flutuação na intensidade de luz espalhada com as grandezas obtidas até aqui, por meio da relação:

$$G(t) = e^{-\Gamma t}, \quad (1.5)$$

onde t é o tempo de análise e Γ é a razão de decaimento da curva exponencial obtida da função de auto correlação, que é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão D e pode ser dada por:

$$\Gamma = Dq^2, \quad (1.6)$$

onde q é o vetor de onda da luz espalhada, dado por:

$$q = (4\pi\eta / \lambda_0) \sin(\theta/2), \quad (1.7)$$

onde η é o índice de refração do meio, λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente e θ é o ângulo no qual o detector está localizado.

Atualmente, muitos equipamentos utilizam-se de *softwares*, os quais encontram uma curva de decaimento, que melhor se ajusta aos pontos gerados pela função de autocorrelação (I) (Instruments, 2004). Com valor de I , o valor de D pode ser obtido e, finalmente, o diâmetro hidrodinâmico médio das D_h partículas através da equação de Stokes-Einstein.

1.1.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma das técnicas mais valiosas em estudos biofísicos envolvendo peptídeos e fornece importantes informações a respeito da conformação geral e do percentual de estrutura de biomoléculas livres em soluções aquosas ou também quando em interação com algum meio biomimético de membrana (Bakshi *et al.*, 2014).

Uma luz linearmente polarizada pode ser vista como uma superposição de luz circularmente polarizada de igual amplitude e fase, porém girando em sentidos contrários: uma em sentido horário (vetor E_R) e outra em sentido anti-horário (vetor E_L). Uma projeção dessas amplitudes combinadas, perpendiculares à direção de propagação, produz, uma linha, como mostrado na Figura 1.9A, p. 47.

Os sinais de CD surgem somente quando ocorre absorção de radiação por parte de grupos cromóforos. Quando essa luz passa através de um cromóforo de uma amostra opticamente ativa com uma absorbância A , que, devido à assimetria do meio, é diferente para os dois componentes circulares, a amplitude do componente mais fortemente absorvido será menor do que a do componente menos absorvido. A consequência é que uma projeção da amplitude resultante produz uma elipse em vez da linha usual, sendo esta radiação resultante ($E_R + E_L$) denominada de luz elipticamente polarizada (Figura 1.9B, p. 47, à direita). Note que a direção de polarização não mudou.

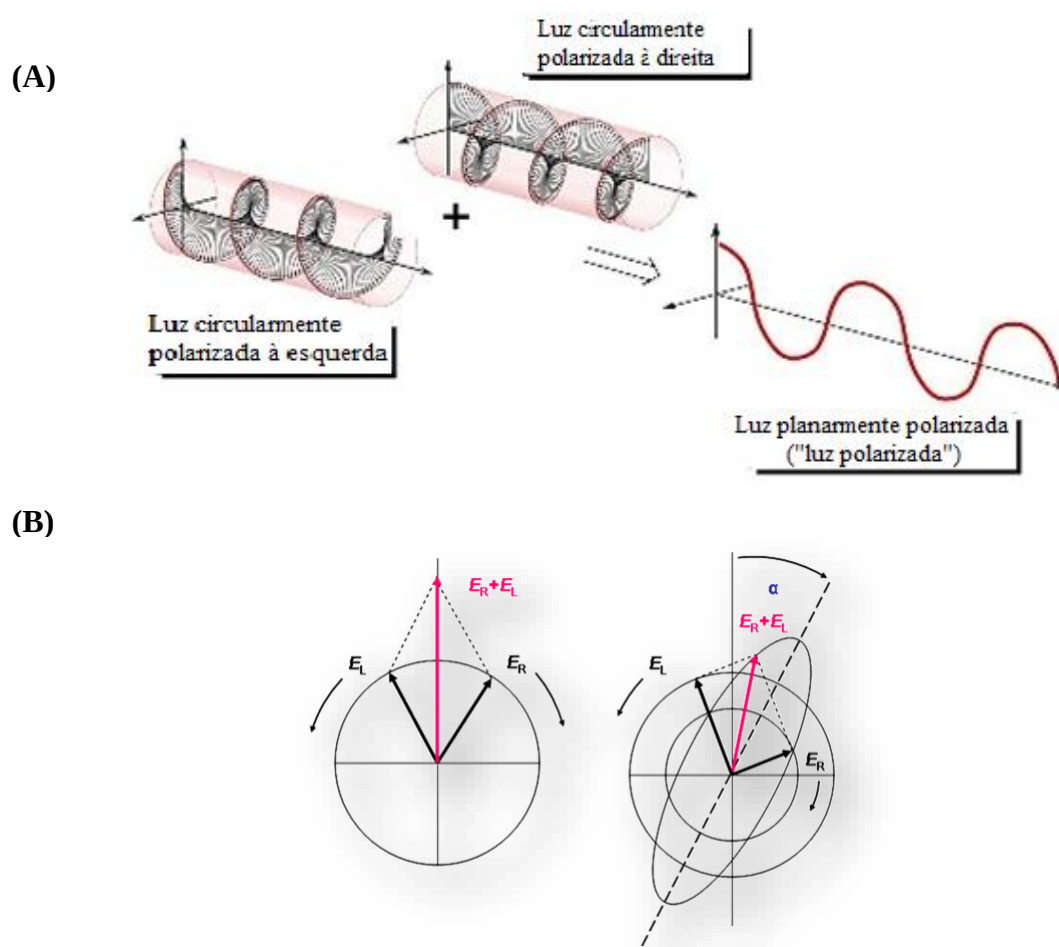


Figura 1.9: Esquema de formação do efeito de dicroísmo circular. (A) e (B, esquerda, de forma frontal) luz planarmente polarizada pode ser vista como uma superposição das luzes circularmente polarizadas opostas de igual amplitude e fase. (B, direita) diferentes absorções dos componentes polarizados para direita e para esquerda levando à elipticidade (CD) e à rotação ótica (OR). Figura (A) foi extraída do site (<http://Glosarios.Servidor-Alicante.Com/>, 2017), sem a necessidade de autorização, e (B) foi extraída com autorização do Prof. Bernhard Rupp – Anexo A5, p. 181 (Rupp, 2009).

Portanto, em termos gerais, o espectropolarímetro de CD mede a diferença de absorção, A , das componentes circularmente polarizadas da luz linearmente polarizada, em função do comprimento de onda (λ) (Johnson Jr, 1988):

$$CD = \Delta A = A(\lambda)_E - A(\lambda)_D \quad (1.8)$$

O efeito de dicroísmo circular é simplesmente a ocorrência dessa elipticidade da projeção (θ), que é a tangente obtida da razão entre o menor e o maior eixo da elipse:

$$\theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (1.9)$$

Como observado na Equação 1.9, p. 47, a elipticidade pode assumir tanto valor positivo quanto negativo, dependendo de qual componente da luz é preferencialmente absorvida.

Nos estudos estruturais de peptídeos e proteínas, o efeito de CD é geralmente pequeno, correspondendo a um valor de ΔA na ordem de 3×10^{-4} (Kelly e Price, 2000). Dessa forma, é imprescindível saber a concentração molar (M) da amostra de peptídeo ou proteína para a determinação da elipticidade molar em um comprimento de onda λ ($[\theta]_{\text{molar}, \lambda}$) – Equação 1.10.

$$[\theta]_{\text{molar}, \lambda} = \frac{100 \times \theta_{\lambda}}{M \times d}, \quad (1.10)$$

onde θ é a elipticidade observada (em graus) no comprimento de onda λ e d é o comprimento do caminho ótico (cm).

Os grupamentos amida das ligações peptídicas são os cromóforos mais importantes nos estudos de CD de amostras peptídicas (Figura 1.10). Os ângulos de rotação ϕ e ψ desse grupamento definem as condições de coplanaridade dos orbitais envolvidos na ligação peptídica, sendo característicos para cada tipo de estrutura secundária (Waltho *et al.*, 1993). O estado de agregação e das interações que a molécula pode fazer com o solvente ou com outras espécies (*e.g.*, surfactantes ou fosfolipídios) influenciam diretamente na rotação desses ângulos.

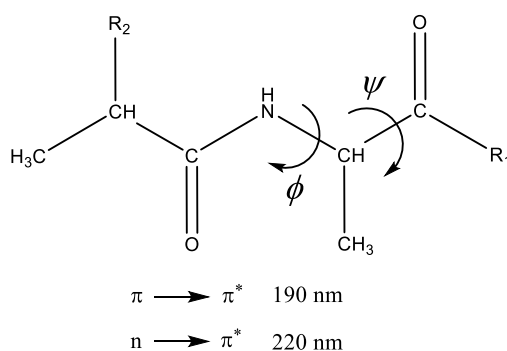
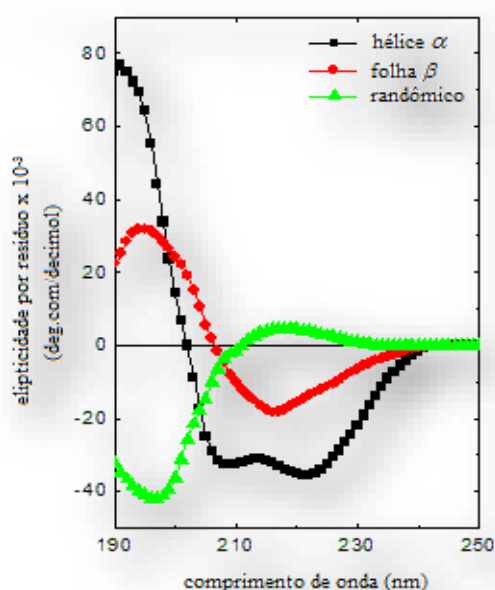


Figura 1.10: Sistema $R_1-(C=O)-NH-R_2$ com suas respectivas transições eletrônicas.

Essas influencias alteram as intensidades e energias intrínsecas das transições eletrônicas na ligação peptídica, que ocorrem devido à absorção de comprimentos de onda (λ) menores que 240 nm. Dessa forma, bandas espectrais devido às absorções características associadas aos ângulos ϕ e ψ de cada estrutura secundária podem ser facilmente atribuídas a diferentes conformações do peptídeo.

Os espectros de CD dos padrões para estruturas canônicas (hélice α , folha β e randômica) podem ser visualizados na Figura 1.11, juntamente com os principais comprimentos de onda de absorção e as respectivas transições eletrônicas para cada tipo de estrutura.

Finalmente, os dados obtidos pelas análises de CD possibilitam a determinação do teor de estrutura secundária média e a quantificação do conteúdo de estruturação pode ser realizada por meio de cálculos de deconvolução (Sreerama, Narasimha e Woody, Robert W, 2000; Lees *et al.*, 2004). Como as informações obtidas por CD indicam as preferências conformacionais do peptídeo em um dado meio e como as análises são relativamente rápidas e demandam pequena quantidade de amostra, é prática comum utilizar essa técnica para se investigar e antecipar condições ideais para a realização de experimentos de RMN, o que demonstra a sua importância nos estudos estruturais e biofísicos de biomoléculas.



Estrutura	Transição	λ /nm
Randômica	$n \rightarrow \pi^*$	Positivo a 212
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 195
Folha- β	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 196
	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 218
hélice α	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 192
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 209
	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 222

Figura 1.11: Espectros de dicroísmo circular típicos de conformações peptídicas. A tabela à direita apresenta os principais comprimentos de onda de absorção e as respectivas transições eletrônicas, representativos de cada tipo de estrutura.

1.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

A síntese de peptídeos é caracterizada pela formação de uma ligação amídica (ou peptídica) entre pelo menos dois aminoácidos, levando a uma cadeia crescente, que pode atingir uma sequência de vários resíduos de aminoácidos (Figura 1.12, p. 50). O primeiro relato de acoplamento entre dois aminoácidos foi realizado via cloreto de acila por Emil Fischer em 1903

(Fischer e Otto, 1903). No entanto, nesta época, nenhum tipo de grupo protetor foi utilizado, tornando inviável a união de mais aminoácidos para a obtenção de cadeias maiores. Com o passar dos anos, novos avanços nas metodologias de síntese contornaram as dificuldades de se obter conjuntos maiores de aminoácidos até que, pela primeira vez, foi sintetizado o nonapeptídeo ocitocina, um hormônio neural produzido pela glândula hipófise, o que rendeu a du Vigneaud o prêmio Nobel de 1955 (Vigneaud *et al.*, 1953). A partir de então, a síntese química de peptídeos e proteínas tem conseguido avanços extremamente significativos em suas metodologias, causando grande impacto na pesquisa e no desenvolvimento de vários fármacos baseados nessas biomoléculas.

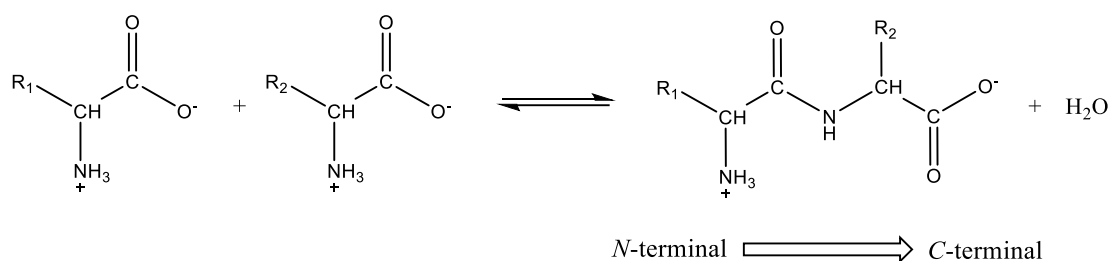


Figura 1.12: Representação da cadeia peptídica pela formação de uma ligação amídica. Abaixo do dipeptídeo formado é ilustrada a direção da cadeia peptídica da porção N- para a C-terminal.

Como mencionado anteriormente, os peptídeos antimicrobianos são encontrados em praticamente todos os organismos vivos. Contudo, um dos grandes problemas na utilização dessas biomoléculas é a baixíssima concentração em que eles são isolados de suas fontes naturais, o que traz a necessidade de obtenção desses compostos em escalas maiores, para o suprimento da crescente demanda por parte dos laboratórios de pesquisa. Com base nesses avanços, serão apresentados neste tópico importantes aspectos da síntese de peptídeos, como as metodologias mais comuns de síntese e os pontos fortes e limitações das respectivas estratégias, com um destaque maior para a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

1.2.1 Síntese Biológica de Peptídeos

Dentre as estratégias utilizadas na produção de peptídeos, os sistemas recombinantes *in vitro* ou *in vivo*, nos quais se emprega o DNA plasmidial ou fragmentos de DNA que codificam a proteína ou peptídeo de interesse, são utilizados. Essa estratégia é uma das mais comumente empregadas para a síntese biológica de peptídeos (Vlieghe *et al.*, 2010). As sínteses *in vivo* são usualmente alcançadas recorrendo-se à bactéria *Escherichia coli*, que pode ser facilmente

escalonada para grandes volumes de fermentação, embora o uso de plantas também seja uma estratégia comumente usada e, mesmo em menor extensão, outros organismos, como os protozoários, também têm sido utilizados (Breitling *et al.*, 2002; Bommarius *et al.*, 2010; Lico *et al.*, 2012). Contudo, esses sistemas têm o problema de exigir passos eficientes na etapa de purificação pois, comumente, sistemas de expressão produzem misturas complexas de diferentes biomoléculas. Além disso, não é possível incorporar de forma significativa aminoácidos não naturais (Goodwin *et al.*, 2012). Não obstante, essa limitação pode ser contornada por meio de técnicas de expressão *in vitro*, tais como o uso de anticódon de tRNAs ou a incorporação de aminoácidos contendo os grupos alcino e azida para o aumento da estabilidade estrutural e proteolítica (Fernandez e Freed, 2017). Comparado ao isolamento de fontes naturais e de síntese química, essa abordagem sintética pode ser mais rentável para produção em larga escala de peptídeos, embora a maioria dos fármacos baseados em peptídeos, tanto na pesquisa como na indústria, sejam produtos de síntese química (Bray, 2003; Li, 2011; Goodwin *et al.*, 2012).

1.2.2 Síntese Química de Peptídeos

Peptídeos naturais, que são difíceis de serem expressos em bactérias, podem ser obtidos por síntese química pois, com essa metodologia, vários aminoácidos não naturais são passíveis de serem incorporados, além de possibilitar a síntese de cadeias com D-aminoácidos e modificações da cadeia peptídica/proteica (Behrendt *et al.*, 2016).

As cadeias peptídicas lineares podem ser sintetizadas quimicamente com base em duas metodologias principais: a de síntese “clássica” em solução (SPS) ou por estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (Merrifield, 1963; Sakakibara, 1999). Apesar disso, também tem sido utilizada a combinação de diferentes estratégias (síntese híbrida), como é o caso da SPS, a partir da ligação quimioseletiva e ligação química nativa (NCL), com a SPFS, e da síntese química com a biológica, chamada de semi-síntese (Bray, 2003; Leadbetter *et al.*, 2004; Durek e Becker, 2005; Guzmán *et al.*, 2007; Drucker *et al.*, 2010; Goodwin *et al.*, 2012; Parra *et al.*, 2014; Da Costa *et al.*, 2015).

1.2.2.1 Síntese de Peptídeo em Solução (SPS)

Primeiramente descrito em 1953 por du Vigneaud, a síntese de peptídeos em solução é a abordagem mais clássica para a obtenção de peptídeos e consiste na dissolução de todos os

reagentes em um solvente no meio reacional (Vigneaud *et al.*, 1953). Ela ainda é bastante utilizada e tem sido empregada para a síntese de pequenos fragmentos de peptídeos com cerca de dez resíduos de aminoácidos e é muito útil na síntese convergente, quando duas cadeias peptídicas diferentes são unidas para formar peptídeos maiores (Khan, 2016). Uma das desvantagens dessa metodologia é a necessidade de um grupo protetor na porção C-terminal do primeiro derivado de aminoácido, protegendo o grupamento carboxi de reagir de forma indesejada. Lentidão e o emprego de vários procedimentos longos são outras desvantagens consideráveis. Apesar disso, mesmo o produto sendo isolado da solução reacional, os intermediários formados podem ser analisados e purificados em cada etapa do processo de síntese, permitindo, assim, a detecção de reações paralelas e a formação de coprodutos, o que pode render produtos finais com alta pureza (Tsuda e Okada, 2012).

1.2.2.2 Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS)

A SPFS foi introduzida em 1963 por Robert Bruce Merrifield, sendo ele agraciado com o prêmio Nobel em Química no ano de 1984, em decorrência de suas contribuições na área. Essa então nova metodologia de síntese teve um impacto enorme no desenvolvimento da química de peptídeos pois, nesse caso, a molécula é construída sobre uma matriz sólida insolúvel, sendo liberada da mesma apenas ao final do processo (Merrifield, 1963).

O suporte sólido utilizado nessa metodologia de síntese consiste em pequenas esferas porosas formadas por material polimérico (muito comumente chamadas de resinas) e responsáveis pela sustentação física do material de partida da molécula em formação. Dessa forma, reações de acoplamento podem ser realizados mais rapidamente e com melhores rendimentos, usando excessos de derivados de aminoácidos ativados, que são removidos no final ao final de cada etapa da reação por simples lavagem da fase sólida. Portanto, essa metodologia oferece importantes vantagens em relação à síntese em solução (Chan, W. e White, P. D., 2000). O princípio geral da SPFS está ilustrado na Figura 1.13, p. 53.

O processo geral para a síntese de peptídeos no suporte sólido começa pela ligação da porção C-terminal do primeiro derivado de aminoácido às subunidades funcionais conectadas à resina, chamadas de ligantes (do inglês, *linkers*). Depois de acoplado o primeiro derivado de aminoácido, o conjunto resina-peptídeo (peptidil-resina) é filtrado e lavado de modo a remover o excesso de reagente e de subprodutos formados durante a etapa de acoplamento.

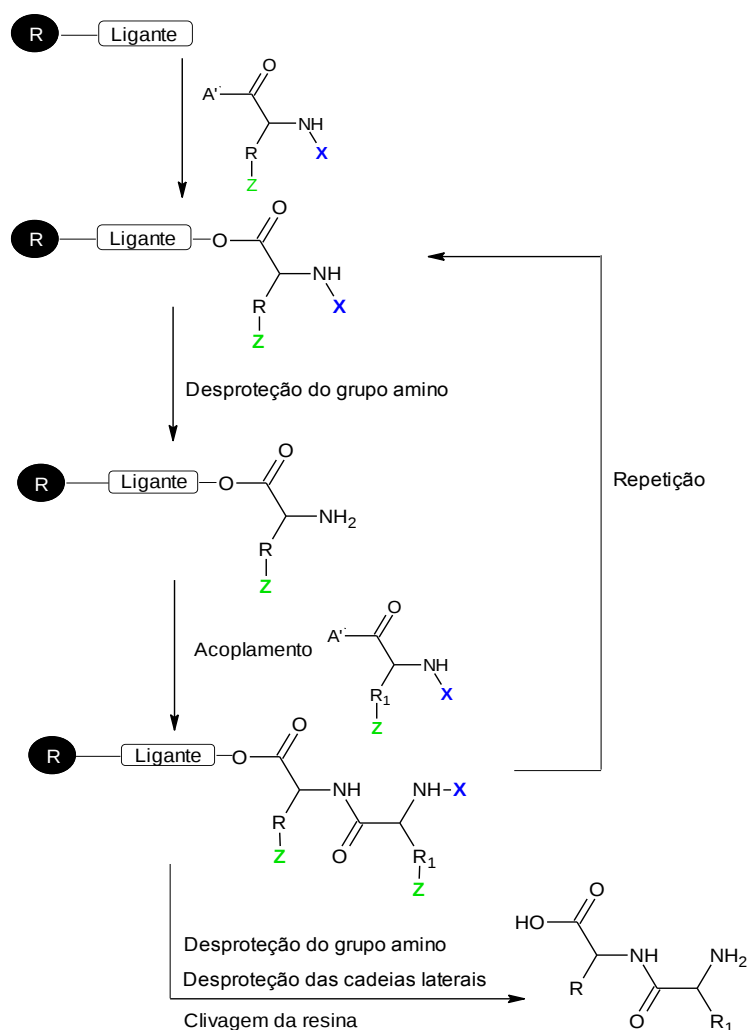


Figura 1.13: Esquema geral da SPFS. Z (em verde) representa o grupo protetor permanente da cadeia lateral do resíduo de aminoácido. X (em azul) representa o grupo protetor temporário.

Para evitar possíveis reações paralelas que prejudicariam a síntese, o grupamento amino α e os grupos reativos da cadeia lateral dos aminoácidos são geralmente protegidos. Os grupos protetores das cadeias laterais têm a função de proteger as cadeias laterais ao longo de toda a síntese e, por isso, são denominados de grupos protetores permanentes, sendo escolhidos de modo que não sejam removidos nas condições reacionais empregadas durante a etapa de acoplamento. Já os grupos protetores dos grupamentos amino α dos derivados de aminoácidos são seletivamente removidos antes de cada etapa de acoplamento, sendo então denominados de grupos protetores temporários.

A próxima etapa consiste justamente na remoção do protetor do grupo amino α do primeiro resíduo acoplado, deixando-o livre para reagir com um segundo derivado de aminoácido (etapa de desproteção). Depois de desprotegida, a peptidil-resina é filtrada e lavada

novamente, preparando-a para uma nova etapa de acoplamento, que consiste na introdução de um novo derivado de aminoácido. Após um dado tempo reacional, a solução utilizada no acoplamento é removida por filtração e a peptidil-resina lavada. Ao final da etapa de acoplamento, o grupamento amino da peptidil-resina encontra-se protegido novamente e é removido para o acoplamento do terceiro derivado de aminoácido. Dessa forma, é estabelecido um ciclo de repetições, que envolve desproteção do grupamento amino α , lavagem da peptidil-resina após a desproteção, reação de acoplamento de um novo derivado de aminoácido protegido e lavagem da peptidil-resina após a reação de acoplamento, até a obtenção da sequência peptídica desejada. Ao final da síntese, os grupos protetores das cadeias laterais são removidos e o peptídeo é liberado do suporte sólido, sendo esta etapa denominada de clivagem.

Como a metodologia de fase sólida consiste em uma síntese linear, é necessária a execução satisfatória de cada etapa de acoplamento, pois a etapa global desta reação determinará o rendimento do produto final. O mais importante a se considerar é a obtenção do máximo de rendimento por etapa. Por exemplo, se cada etapa de acoplamento tiver 99% de rendimento, um peptídeo de 26 resíduos de aminoácidos seria sintetizado em um rendimento final de 77% (assumindo um rendimento de 100% em cada desproteção); se o rendimento de cada acoplamento for 95%, a síntese teria somente 25% de rendimento global. Portanto, visando à máxima eficiência no acoplamento, é comum empregar grande excesso de reagentes de ativação dessa etapa e de derivados de aminoácidos (Howl, 2005).

De forma ideal, a resina e os grupos protetores das cadeias laterais devem ser escolhidos de forma que a remoção dos grupos protetores amino α , durante a etapa de desproteção, e a remoção dos grupos permanentes das cadeias laterais, que ocorre durante a clivagem, ocorram em condições reacionais completamente diferentes, tais como condições básicas para remover o grupo protetor amino α e ácidas para remover os grupos protetores das cadeias laterais. Esse esquema de proteção é chamado de proteção “ortogonal” (Chan, W. e White, P. D., 2000).

1.2.2.2.1 Estratégia Boc

O grupo protetor tertbutoxicarbonila (Boc) já foi muito utilizado para proteção temporária do grupo amino α , sendo sua remoção feita em meio ácido moderado, normalmente empregando-se solução de ácido trifluoroacético (TFA). Essa estratégia é conhecida como Boc-SPFS e foi inicialmente utilizada por Merrifield na introdução da síntese em fase sólida (Merrifield, 1963). A clivagem do peptídeo da resina e a desproteção das cadeias laterais são

também realizadas em meio ácido, porém em condições ácidas que demandam maiores cuidados do que aquelas utilizadas na remoção do grupo temporário Boc; geralmente para a clivagem são empregadas soluções de ácido fluorídrico (HF) ou ácido trifluormetanossulfônico (TFMSA) (Chan, W. e White, P. D., 2000). Dessa forma, devido ao emprego de condições reacionais extremamente agressivas na etapa final da síntese, é necessária a utilização de aparatos especiais nos processos de clivagem e de remoção dos grupos protetores das cadeias laterais. Além disso, essas condições favorecem diversas reações secundárias, como alquilação das cadeias laterais, hidrólise de ligações peptídicas, rearranjos, entre outras ocorrências. A utilização da estratégia Boc, no entanto, pode fornecer resultados superiores quando a sequência peptídica está sujeita à agregação, como as cadeias peptídicas da HIV-1 protease (Schnölzer *et al.*, 2007), em algumas sínteses complexas e na síntese de análogos não naturais de peptídeos que podem ser sensíveis ao meio básico, como é o caso dos depsipeptídeos (Coin *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Estratégia Fmoc

A introdução do grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupamento amino α , permitiu que todo o processo de SPFS fosse realizado aplicando-se condições mais brandas (Carpino e Han, 1970; Kenner *et al.*, 1971). Inicialmente, o sucesso da chamada estratégia Fmoc-SPFS foi devido à rápida adaptação de pesquisadores não químicos aos procedimentos, que puderam preparar, de forma prática e viável, peptídeos para a produção de anticorpos usando aparatos mais baratos e evitando o uso de reagentes mais complicados como o HF anidro (Behrendt *et al.*, 2016).

Nessa estratégia, tem-se o esquema ortogonal de remoção dos grupos protetores, onde o Fmoc é removido por eliminação β sob condições básicas, ao passo que o grupo protetor permanente é removido por condições ácidas na etapa final de clivagem. Dessa forma, a remoção dos grupos protetores temporários e permanentes ocorre por mecanismos químicos completamente diferentes.

A Figura 1.14, p. 56, mostra o esquema de remoção do Fmoc do resíduo de aminoácido terminal da peptidil-resina. A possibilidade de estabilização por processo de aromatização da base conjugada do anel fluoreno, faz com que o hidrogênio no carbono β seja passível de abstração por uma base relativamente fraca. Dessa forma, para a desproteção do resíduo de aminoácido, normalmente é feito um tratamento da peptidil-resina com uma solução de piperidina (PIPE) ou 4-metilpiperidina (4M-PIPE) 20-50%, v/v, em dimetilformamida (DMF)

ou *N*-metilpirrolidina (NMP). O processo leva à eliminação β e à formação de dibenzofulveno e dióxido de carbono (Fields e Noble, 1990). O dibenzofulveno é uma espécie que poderia atacar, prontamente e de forma irreversível, a amina desprotegida se ele não fosse capturado. Por isso, aminas secundárias como a PIPE são tipicamente usadas, tanto para remover o grupo Fmoc, quanto para capturar o coproduto dibenzofulveno, formando assim um estável e pouco reativo aduto (Luna *et al.*, 2016). Esse coproduto da desproteção absorve fortemente na região do ultravioleta em 300 nm e, por isso, alguns sistemas automatizados de síntese monitoram a absorbância do dibenzofulveno e automaticamente estabelecem um tempo para a reação de desproteção, até o momento em que nenhuma formação do aduto seja detectada (Amblard *et al.*, 2006).

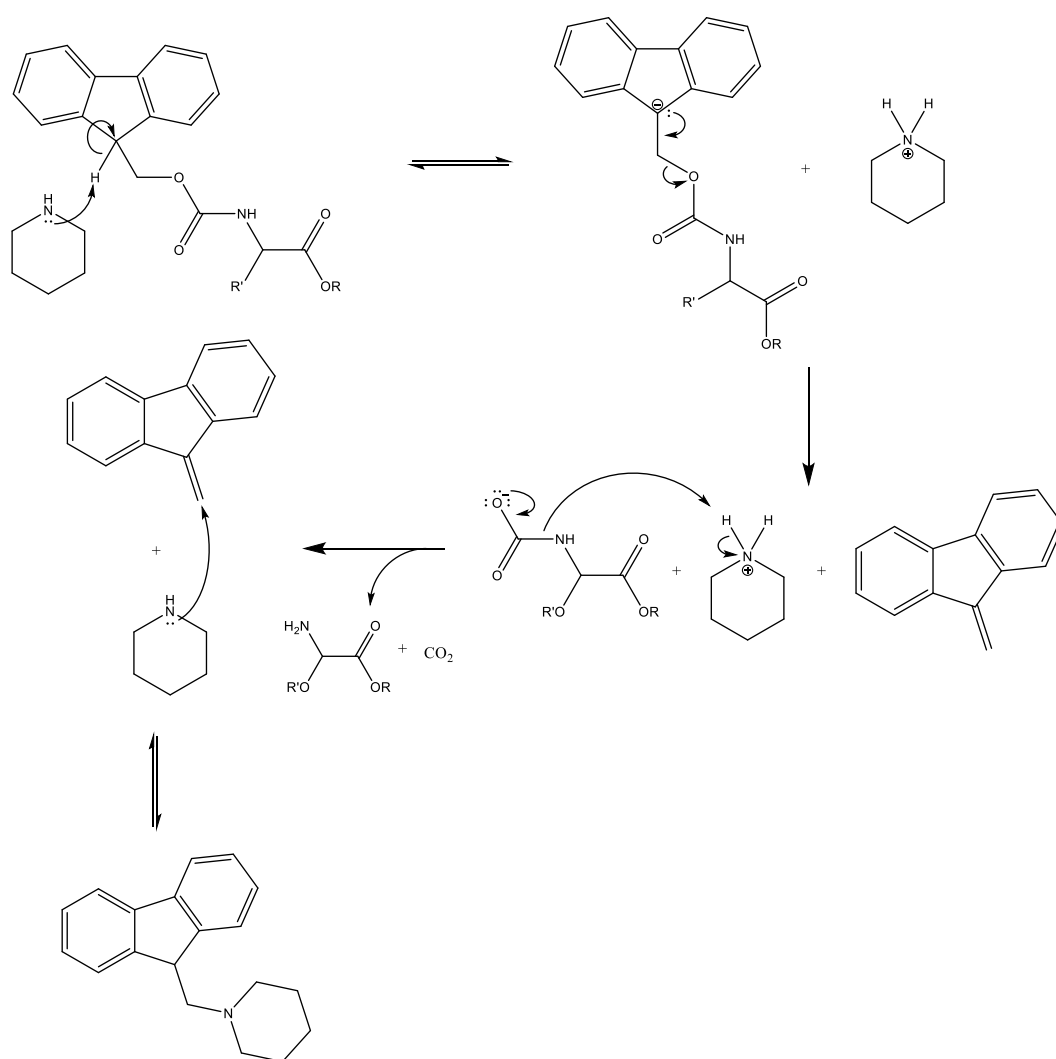


Figura 1.14: Esquema geral mostrando o mecanismo de remoção do grupo Fmoc na etapa de desproteção do resíduo de aminoácido. -R' se refere à cadeia lateral do resíduo de aminoácido e -R a cadeia peptídica crescente.

A SPFS utilizando a estratégia Fmoc foi facilmente automatizada pelo fato de não ser necessário o uso de reagentes corrosivos nos ciclos sintéticos empregados, bem como pela etapa de desproteção liberar um grupamento fluoreno, que possui uma propriedade de forte absorção no ultravioleta, o que fornece um indicador muito útil para o sucesso do processo automatizado da síntese.

Nessa estratégia a etapa de clivagem ocorre geralmente em meio contendo uma solução concentrada de TFA (90 a 95% v/v), que remove simultaneamente o peptídeo da resina e os grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Urban *et al.*, 1996). Nessas condições, carbocátions relativamente estáveis são gerados, podendo reagir com grupos nucleofílicos de cadeias laterais de vários resíduos, o que levaria a subprodutos indesejados (King *et al.*, 1990). Dessa forma são preparadas soluções de clivagem contendo, além do TFA, reagentes capazes de “capturar” esses carbocátions, o que minimiza drasticamente essas reações indesejadas. Essas soluções são preparadas de acordo com as características particulares de cada sequência peptídica e muitas dessas soluções têm sido preparadas à base de derivados de silanos que, além de apresentarem bons resultados, possuem odor menos desagradável do que aqueles reagentes baseados em tióis (Pearson *et al.*, 1989).

1.2.2.2.3 Boc- versus Fmoc-SPFS

Muitas desvantagens relacionadas às condições limitadas empregadas na metodologia Boc- foram contornadas pela introdução da química Fmoc-SPFS.

Na estratégia Boc, a falta de uma diferenciação completa entre as condições reacionais empregadas na remoção do grupo protetor temporário Boc e as empregadas para a remoção dos grupos permanentes das cadeias laterais, tem sido uma das grandes preocupações (Parra *et al.*, 2009). Com o uso de TFA a cada etapa de desproteção ao longo de toda a síntese, pequenas quantidades de grupos protetores das cadeias laterais podem ser removidas e o peptídeo pode ser progressivamente removido do suporte polimérico. Em contraste, a estratégia Fmoc fornece uma combinação ortogonal dos grupos protetores temporários e permanentes. O TFA é utilizado somente na etapa de clivagem e, por ser facilmente volatilizado e de manuseio bem mais simples que os reagentes empregados na estratégia Boc, ele pode ser removido por simples evaporação e não necessita de instrumentação especial, o que tem facilitado a adaptação dessa estratégia para a síntese de peptídeos em muitos laboratórios de grupos de pesquisa que não contam com químicos. Desde de que as componentes das cadeias laterais desprotegidas sejam

compatíveis com a química Fmoc-SPFS, o que é satisfeito também no caso de algumas modificações, tais como peptídeos fosforilados e glicosilados, essa metodologia tem proporcionado condições excelentes e viáveis de síntese de peptídeos, razão pela qual esta estratégia tem ganhado força e se popularizado cada vez mais entre profissionais e laboratórios de pesquisa de diferentes áreas do conhecimento.

1.2.2.2.4 Componentes e Aspectos Importantes da Fmoc-SPFS

Depois de discutidas as metodologias de síntese, é bastante válido abordar, de forma individual, componentes e situações importantes que geralmente fazem parte de toda a química envolvida na SPFS.

Suporte sólido

Os suportes sólidos são formados por resinas poliméricas insolúveis, geralmente de ligação cruzada, produzidas na forma de pequenos grãos esféricos de elevada porosidade, o que permite a difusão dos solventes e reagentes no interior dos grãos poliméricos, deixando os “sítios ativos” mais acessíveis para o processo reacional (Figura 1.15, p. 59). Essas resinas devem apresentar propriedades físico-químicas favoráveis, como ser insolúveis em solventes orgânicos, resistentes a altas pressões e inertes a todos os reagentes e solventes empregados na síntese. Dessa forma, a resina, quando preenchida, exerce um forte efeito solvatante na cadeia peptídica e permite que sua formação ocorra também no interior da rede polimérica (Kent, 1988).

As resinas poliméricas mais comumente utilizadas na SPFS são feitas de poliestireno, mas suportes sólidos com outras matrizes poliméricas, como o poliacrilato, poliacrilamida e polietilenoglicol, têm se tornado boas opções no planejamento da síntese (Hewage, 2016). A maioria dos suportes poliméricos usados contém 1 ou 2% do agente de ligação cruzada divinilbenzeno (DVB) (Figura 1.15, p. 59, superior), fazendo com que estes suportes sejam praticamente insolúveis nos solventes utilizados na SPFS.

A resina de poliestireno apresenta boas características de intumescimento, quando em contato com solventes orgânicos (como DMF e DCM), de difusão dos reagentes e de acessibilidade dos sítios reacionais dos ligantes presentes na matriz (Eg Souza *et al.*, 2015). As resinas baseadas em poliamidas com ligação cruzadas e as resinas mistas baseadas em

poliestireno e polietilenoglicol são suportes muito mais hidrofílicos, exibindo propriedades físicas diferentes das resinas de poliestireno no nível micro e macroscópico. Esses suportes representam uma boa alternativa para a síntese de algumas sequências complexas, passíveis de agregação e de peptídeos com cadeias maiores (Hewage, 2016).

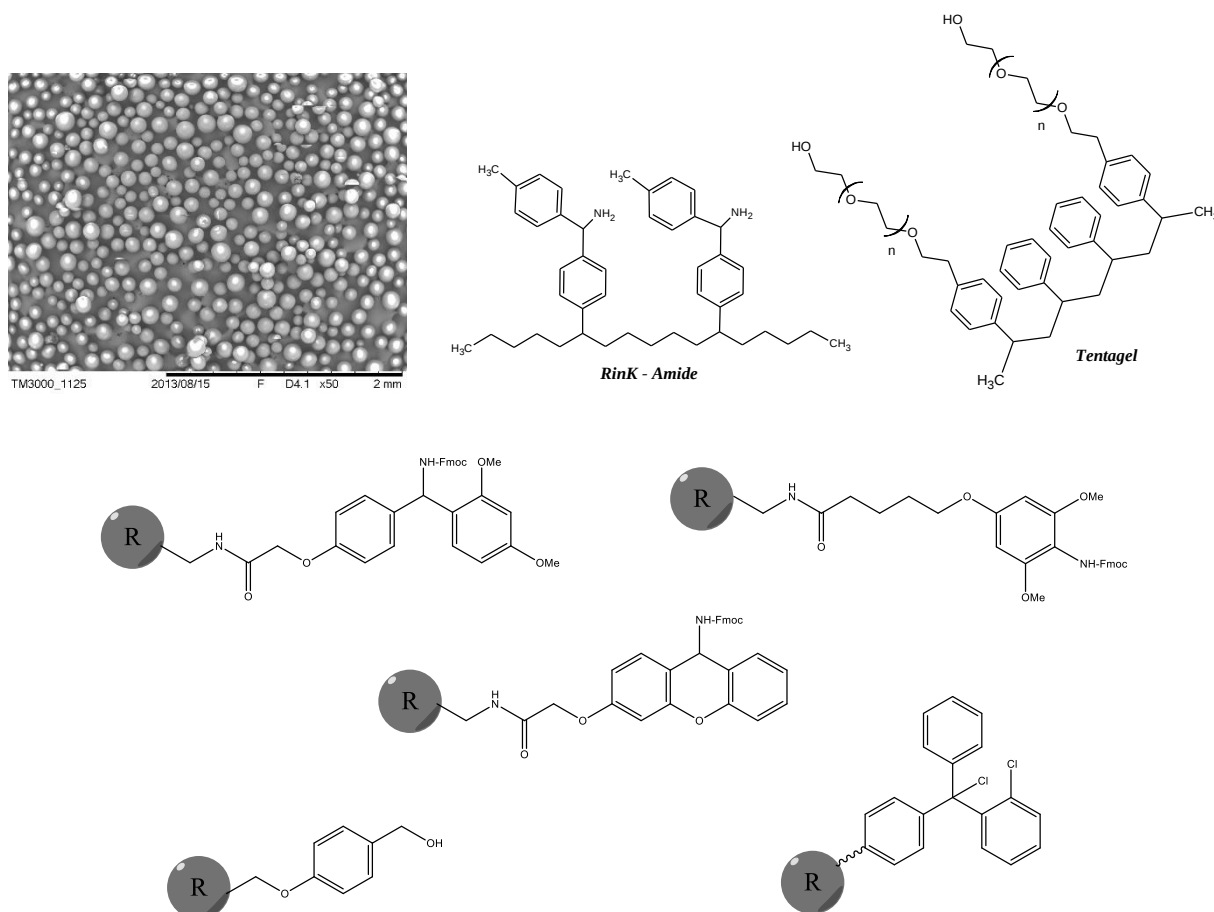


Figura 1.15: Exemplos de suportes sólidos e ligantes mais utilizados na SPFS. Acima, suporte sólido de poliestireno (Rink-Amide) e polietilenoglicol (Tentagel) e abaixo ligantes para peptídeos amidados e carboxilados na porção C-terminal. No canto superior à esquerda, microscopia dos grãos de suporte sólido polimérico constituído de poliestireno.

Parte da massa total das resinas corresponde a unidades funcionais, os chamados ligantes (do inglês, *linkers*), os quais promovem ligações eficientes e a fixação da matriz polimérica com o primeiro resíduo de aminoácido da cadeia peptídica crescente, atuando como agentes “ancorantes” ou “sítios de ligação” (Palomo, 2014). Dependendo do grupo funcional C-terminal do peptídeo a ser sintetizado, o primeiro resíduo de aminoácido *N*-protegido é ancorado ao ligante do suporte sólido via uma ligação éster ou uma ligação amídica e a maioria dessas resinas funcionalizadas com tais ligantes já são comercialmente disponíveis (Figura

1.15, p. 59). Essa estrutura intermediária contida no suporte polimérico, acaba por ter como função, além de ligar o primeiro derivado de aminoácido, proteger o grupo C-terminal durante todo o processo de síntese da cadeia peptídica.

Grupos Protetores das Cadeias Laterais

Mais da metade dos aminoácidos comumente encontrados nas proteínas apresenta cadeias laterais que contêm grupos funcionais reativos. Estes grupos potencialmente reativos são protegidos para evitar reações secundárias e, conseqüentemente, alcançar elevados níveis de eficiência durante toda a síntese peptídica. Para sínteses rotineiras, frequentemente são empregados grupos protetores de fácil remoção na presença de TFA e que permitam que o peptídeo seja inteiramente desprotegido durante a etapa de clivagem. No entanto, para modificações seletivas ou a utilização de um resíduo em particular no suporte sólido, como na ciclização pela cadeia lateral e biotinilação de peptídeos, por exemplo, há a necessidade da utilização de grupos protetores especiais e de um esquema ortogonal de síntese (Isidro Llobet *et al.*, 2009).

Reagentes de Acoplamento

A utilização de reagentes ativadores ajuda a suprimir a epimerização de alguns resíduos de aminoácidos e inibir problemas relacionados à geração de nitrilas, que ocorre devido a desidratação da cadeia lateral carboxamida de resíduos como a asparagina e a glutamina, além de aumentar a eficiência na etapa de acoplamento (Al-Warhi *et al.*, 2012). Essa ativação do grupamento carboxila do derivado de aminoácido é realizada *in situ* e pode ser feita com as carbodiimidas solubilizadas em DMF, DCM e, mais recentemente em tetraidrofurano (THF) e acetonitrila (ACN) (Jad *et al.*, 2015). Exemplos típicos dessa classe de ativadores é a diciclohexilcarbodiimida (DCC) e diisopropilcarbodiimida (DIC), sendo mais conveniente a utilização desta última, devido ao coproduto ureia formado durante a etapa de acoplamento, apresentar problemas de solubilidade para a DCC (Chan, W. e White, P. D., 2000). Para aumentar a eficiência do acoplamento mediado pelas carbodiimidas, é comum o uso de ativadores adicionais, como o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) ou o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), além dos sais de fosfônio e aminio/urônio, como benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-hexafluorofosfato de fosfônio (PyBOP), hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)fosfônio (PyAOP), hexafluorofosfato de *N*-[1*H*-benzotriazol-1-il(dimetilamino)metileno]-*N*-metilmetanamínio (HATU), tetrafluoroborato de *O*-

(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) e hexafluorofosfato *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)urônio (HBTU) (Jad *et al.*, 2016).

Recentemente, a 2-ciano-2-(hidroximino)acetato de etila (Oxima) tem apresentado resultados mais satisfatórios, quando comparada a alguns desses ativadores adicionais. Isso tem feito dela uma boa opção como aditivos nas reações de acoplamento, quando se utiliza a estratégia Fmoc de SPFS (El-Faham *et al.*, 2009). Alguns desses agentes ativadores estão representados na Figura 1.16.

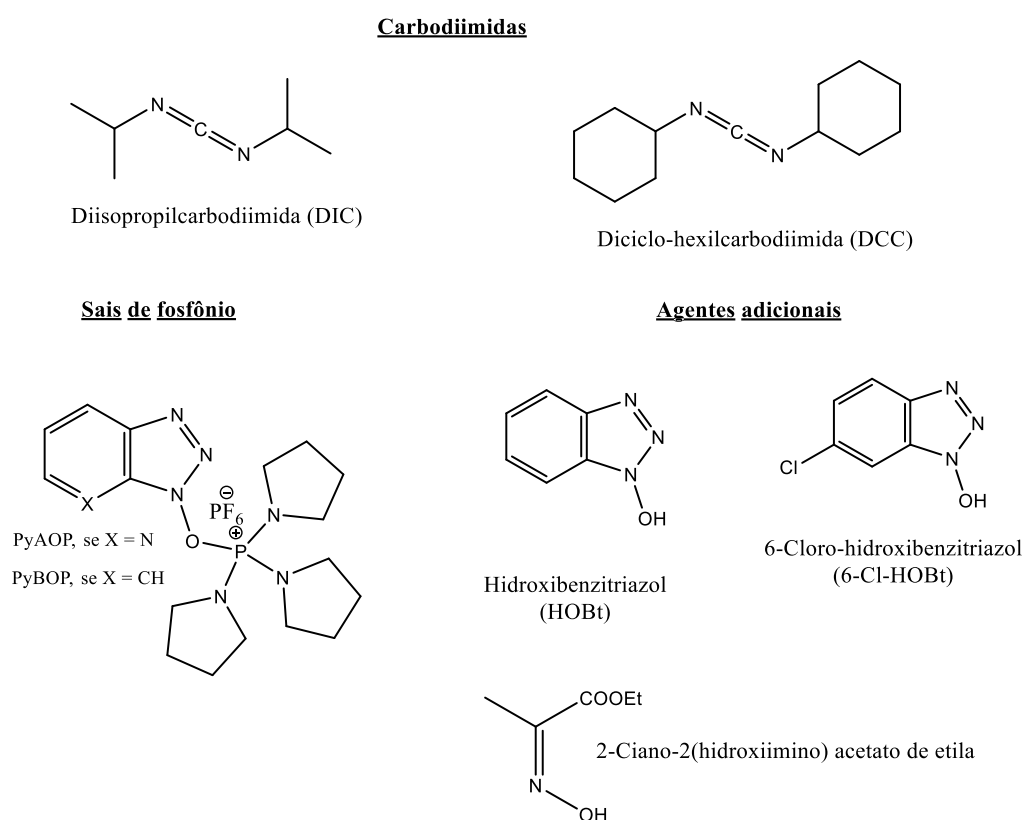


Figura 1.16: Alguns dos reagentes utilizados na ativação do grupamento carbonila nas etapas de acoplamento em SPFS.

Monitoramento da evolução da SPFS

O monitoramento da SPFS é extremamente importante no sucesso da síntese de peptídeos e um número considerável de testes qualitativos tem sido desenvolvido. Um ensaio historicamente muito utilizado é o teste de Kaiser, que é baseado na reação da ninidrina com aminas. Aminas primárias produzem uma cor azul/roxa intensa, ao passo que aminas secundárias, tais como prolina *N*-terminal, produzem uma coloração vermelho-amarronzada

menos intensa (Fields, 1997). No entanto, em algumas situações, outros testes alternativos para a prolina *N*-terminal são recomendados, como o teste do cloranil (Vojkovsky, 1994) e o teste da isatina (Fields, 1997), que produzem uma coloração azul com a prolina *N*-terminal desprotegida. Outras alternativas incluem os testes de azul de bromofenol e o de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico, que são baseados na reação ácido-base de um indicador com o grupo amino básico (Howl, 2005). Serão detectados, portanto, aminas secundárias, tais como prolina ou aminoácidos *N*-metilados e aminas primárias. A peptidil-resina deve ser cuidadosamente lavada antes da realização desses testes, para remover qualquer reagente básico ou ácido que possa interferir nos resultados.

Desproteção Incompleta, Agregação, Racemização e Reações Paralelas

Avanços recentes nas estratégias de síntese química de peptídeos têm sido descritos na literatura com o intuito de tentar contornar a maioria dos problemas relacionados à SPFS, os quais são responsáveis por uma série de produtos indesejados formados e acumulados em todas as etapas ao longo do processo (Paradís-Bas *et al.*, 2016).

i. Desproteção Incompleta

Durante a SPFS é comum ocorrer a remoção incompleta do grupo Fmoc, principalmente em cadeias longas, onde é frequente o processo de agregação peptídica (Larsen e Holm, 1994). Mesmo na presença de concentrações elevadas de PIPE, é aconselhável o aumento do tempo usado na desproteção. Além disso, o 1,8-diazobiciclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) pode ser usado como alternativa, quando a desproteção for lenta ou incompleta, podendo melhorar o desempenho da desproteção e aumentar o rendimento do produto desejado (Ralhan *et al.*, 2015). O DBU não é uma base nucleofílica e não irá reagir com o coproduto dibenzofulveno e, por isso, a PIPE é frequentemente adicionada apenas para reagir com este coproduto. No entanto, o DBU não deve ser usado quando resíduos de ácido aspártico fazem parte da peptidil-resina, pelo fato de o DBU catalisar a formação de aspartimida na presença de PIPE. Outras alternativas a essas bases ainda podem ser utilizadas para remoção do grupo Fmoc, como a utilização de condições neutras de hidrogenação, nas quais acetonitrila é utilizada para acelerar o processo (Maegawa *et al.*, 2009).

ii. Agregação

Quando as etapas de desproteção do grupamento amino e de acoplamento de aminoácido não se completam ou apresentam baixo rendimento, estas reações devem ser repetidas e ter seu tempo aumentado para tentar contornar estes problemas (Howl, 2005). No entanto, isso nem sempre é suficiente. A causa dessa falha geralmente é a auto associação da cadeia peptídica ou inter-cadeia, devido à formação de interações de hidrogênio ou hidrofóbicas intermoleculares, o que leva à incompleta solvatação da peptidil-resina e inacessibilidade dos reagentes ao grupamento *N*-terminal do resíduo de aminoácido. Apesar de ser dependente da sequência peptídica, esse fenômeno não pode ser previsto com precisão, embora seja propenso para sequências contendo altas proporções de resíduos hidrofóbicos e geralmente pode começar a partir do quinto resíduo acoplado.

De forma geral, alguns métodos podem ser usados para romper a formação de estruturas secundárias e agregação. O primeiro consiste da mudança do ambiente de síntese, que pode ser feito pela adição de sais caotrópicos, (tais como tiocianato de potássio, perclorato de sódio ou cloreto de lítio a 0,4 M). Podem ainda ser adicionados surfactantes não iônicos ou carbonato de etileno a 1% (v/v), ou solventes como dimetilsulfóxido (DMSO), NMP, trifluoroetanol (TFE) e hexafluoroisopropanol ao meio reacional. Outra alternativa é o aumento de temperatura do meio reacional pelo emprego direto das micro-ondas (Howl, 2005; Collins *et al.*, 2014).

A segunda abordagem envolve um conjunto de estratégias, que visa a introdução de elementos estruturais na cadeia principal propriamente dita (Behrendt *et al.*, 2016). Essa ação tende a romper as interações inter-cadeia (principalmente ligações de hidrogênio) e pode ser muito efetiva em contornar problemas de síntese associados a sequências complexas ou muito grandes. Por exemplo, no caso de sequências que contenham resíduos de serina ou treonina, pode ser preparado um depsipeptídeo correspondente, a partir da esterificação destes resíduos, sendo que, após a síntese, a desesterificação pode ser facilmente proferida em condições básicas brandas (Carpino *et al.*, 2004). Grupos protetores da cadeia principal ligados ao grupamento amino α do resíduo de aminoácido, como o 2-hidroxi-4-metoxibenzil (Hmb) e 2,4-dimetoxibenzil (Dmb), geralmente previnem a formação de ligações de hidrogênio e são muito eficientes quando incorporados a cada 6-7 resíduos (Packman, 1995; Cardona *et al.*, 2008). Considerando que a prolina é, em uma sequência peptídica, conhecida por promover o rompimento da agregação, pseudoprolinas derivadas de resíduos de Cys, Ser e Thr podem ser

utilizadas como estratégia para contornar esse problema, além de tornar as etapas de sínteses muito mais viáveis (Wöhr *et al.*, 1996; Abedini e Raleigh, 2005; Stathopoulos *et al.*, 2013). Ao reduzir a agregação, essas estruturas também podem levar à desassociação estrutural, o que aumenta a solubilidade do peptídeo clivado e facilita sua purificação. Depois de purificado, o peptídeo desejado é submetido a um simples tratamento, que fornece a forma nativa do peptídeo de interesse. No caso da formação dos depsipeptídeos, um simples tratamento do peptídeo bruto em meio básico brando rearranja a cadeia para o peptídeo nativo. Tanto os grupos Hmb e Dmb, quanto as pseudoprolinas são removidos ou desfeitos durante a etapa de clivagem usando TFA, restabelecendo, então, a suas respectivas formas nativas.

iii. Epimerização

A ativação de derivados de aminoácidos pode resultar em algum grau de racemização (Kemp, 2014) da cadeia peptídica. A epimerização ocorre a partir da formação da 5(4*H*)-oxazolona e está relacionada com a potência do agente ativador utilizado e com as propriedades do grupo *N*-acil ligado ao R_1 -CO-. Dessa forma, o potencial nucleofílico do oxigênio carbonílico pode ser aumentado dependendo de R_1 -, o que promove o ataque à carbonila ativada para formar um intermediário oxazolona. Esse intermediário está em um equilíbrio tautomérico e, portanto, sujeito à epimerização, que deve ocorrer quando uma amina desprotegida de um derivado de aminoácido presente em solução, ataca a carbonila, culminando no outro enantiômero (Figura 1.17).

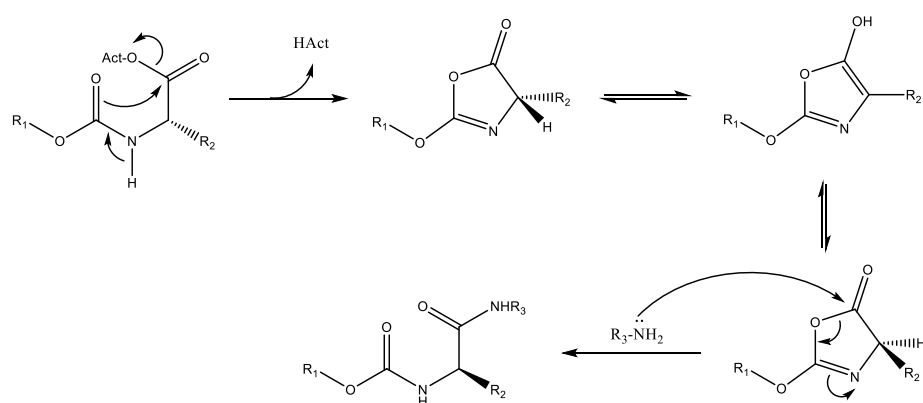


Figura 1.17: Mecanismo de racemização na etapa de ativação na SPFS. Act: agente ativador de acoplamento.

O uso de HOBt, 6-Cl-HOBt, HOAt, ou, recentemente, as oximas, geralmente suprime esse processo (Jad *et al.*, 2014). Cadeias com resíduos de His e Cys na porção *C*-terminal são especialmente propensas a esse problema. A proteção do nitrogênio imidazólico da cadeia

lateral da His com o grupo metoxibenzil reduz muito a racemização. Para o acoplamento do derivado de Cys, é recomendado o uso de resina de base trítal, que auxilia na manutenção da integridade quiral (Wöhr *et al.*, 1996; Heinlein *et al.*, 2011). No caso de resinas em que o sítio de ancoragem é um grupo hidroxila, o processo é frequentemente acompanhado por epimerização, devido às fortes condições para levar a efeito esta esterificação.

i. Reações Paralelas

A maioria das reações indesejadas ocorre em decorrência das características da sequência peptídica a ser sintetizada, ou mesmo das características individuais de alguns resíduos de aminoácidos inseridos nessas cadeias. Das várias reações paralelas que podem ocorrer, serão destacadas a formação de dicetopiperazina e da aspartimida, apesar de que outras reações mais específicas e menos comuns também têm sido relatadas e podem ocorrer ao longo das etapas envolvidas na SPFS (Yang, 2015).

a. Formação de Dicetopiperazina (DKP)

Essa reação paralela ocorre no estágio da síntese, em que se tem um dipeptídeo formado na resina (ou seja, na segunda reação de acoplamento), apresentando maior frequência na estratégia Fmoc-SPFS, especialmente quando prolina é um dos dois primeiros resíduos acoplados (Figura 1.18). A formação de DKP pode ser suprimida, de preferência, pela utilização da resina cloreto de 2-clorotritila, que possui um volume suficientemente grande para inibir, por impedimento estérico, a formação desse subproduto. Outra alternativa é o acoplamento direto de uma unidade dipeptídica, contendo, necessariamente, dois resíduos subsequentes da sequência peptídica no lugar do segundo ou terceiro resíduos de aminoácido. No entanto, essa estratégia é limitada pela disponibilidade do dipeptídeo apropriado. Outra alternativa é acoplar um derivado de aminoácido *N*-protegido com um grupo trítal na segunda posição, que, por impedimento estérico, inibe o processo reacional de formação da DKP (Pedroso *et al.*, 1986; Fischer, 2003).

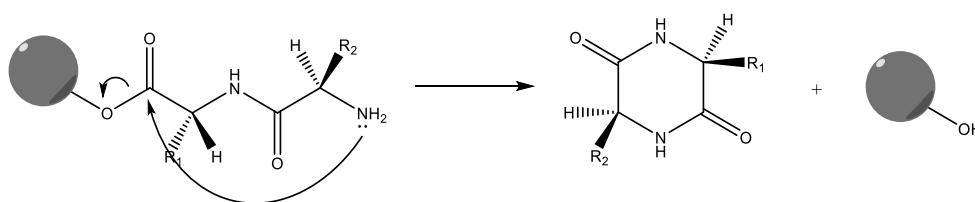


Figura 1.18: Formação de DKP na SPFS.

b. Formação de Aspartimida

Durante a síntese da cadeia peptídica, algumas sequências de aminoácidos têm apresentado maior propensão à formação de subprodutos decorrentes dessa reação paralela, o que mostra a importância da proteção não só do grupo carboxílico do Asp, como também de outras cadeias laterais (Offer *et al.*, 1996). A Tabela 1.2 mostra as principais sequências dipeptídicas sensíveis à formação desse tipo de reação.

Tabela 1.2: Sequências mais sensíveis à formação de aspartimida. Asp-Aminoácido X

Aminoácido X	Grau de formação da aspartimida
Gly	+++++
Asn(Trt)	+++
Asp(OtBu)	++
Arg(Pbf)	++
Ser ou Thr	++
Cys(Acm)	++
Cys(Trt)	+
Thr(tBu)	+
Ala	+
Altamente sensível (+++++) para pouco sensível (+)	

A reação paralela de formação da aspartimida pode ocorrer em condições básicas ou ácidas e pode acarretar em uma mistura de peptídeos nas formas alfa e beta, o que ocorre normalmente na etapa de desproteção, pela ação da PIPE – Figura 1.19, p. 67 (Mergler e Dick, 2005).

A adição de aditivos levemente ácidos pode reduzir esse problema na SPFS. Além da adição de HOBt à solução de desproteção contendo PIPE, que já é conhecida há mais tempo, as oximas adicionadas em solução 20% de PIPE em DMF (v/v) reduzem o nível de impurezas relacionadas à aspartimida. Além disso, a formação desse subproduto pode ser bloqueada pela incorporação de um grupo protetor no grupamento amino α do aminoácido precedente ao ácido aspártico na sequência sensível.

Os grupos Hmb e Dmb têm sido utilizados na prevenção da formação da aspartimida durante a Fmoc-SPFS e são facilmente removidos durante a clivagem do peptídeo pelo tratamento da peptidil-resina com TFA (Packman, 1995; Cardona *et al.*, 2008). Mais

recentemente, a introdução de um derivado do Hmb, o 2-hidroxi-4-metoxi-5-nitrobenzil (Hmnb) também foi efetiva no bloqueio da formação de aspartimida e melhorando a síntese de peptídeos propensos à agregação. Alguns dipeptídeos e reagentes para a preparação do Hmnb são facilmente obtidos comercialmente (Abdel-Aal *et al.*, 2016).

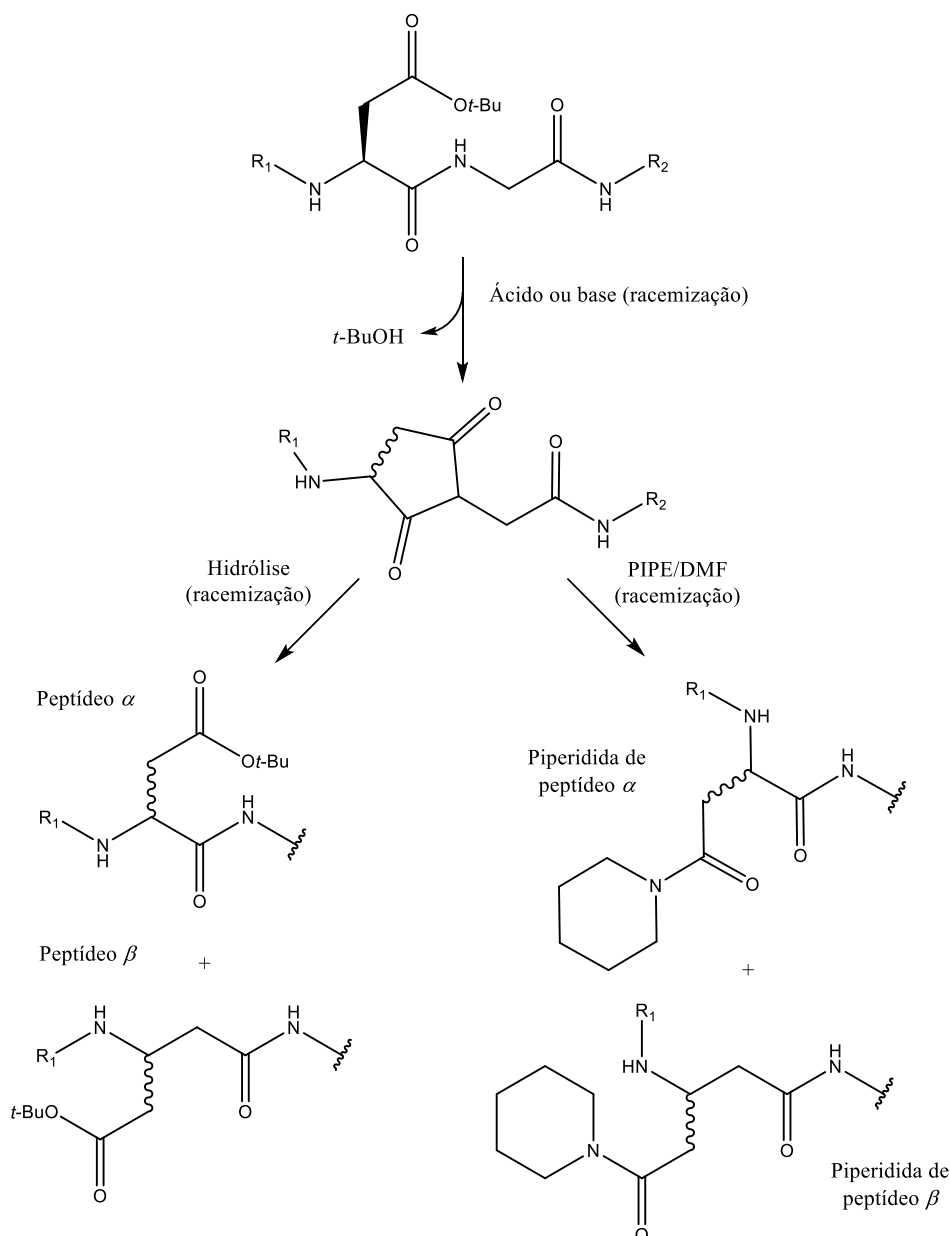


Figura 1.19: Epimerização e formação de aspartimida.

Nos últimos anos, novos derivados têm sido desenvolvidos para evitar esse tipo de reação. Esses derivados incorporam os grupos 3-etil-3-pentil (Epe), o 1,1-diisopropil-etil (Die) e o 5-butil-5-nonil (Bno), que são ésteres baseados no grupo trialquilcarbinol e oferecem uma excelente proteção contra reações paralelas (Figura 1.20, p. 68). Uma boa revisão sobre

derivados de N^α -aminoácidos e avanços no desenvolvimento de proteção de cadeias laterais para a SPFS pode ser encontrada na referência Behrendt *et al.*, 2016.

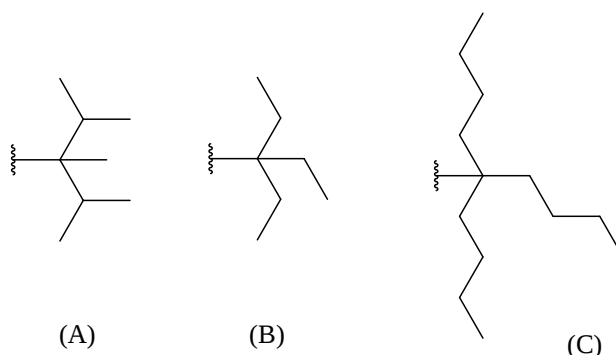


Figura 1.20: Estrutura de novos protetores da cadeia lateral do Asp. (A) 1,1-diisopropil-etil (Die), (B) 3-etil-3-pentil (Epe), (C) 5-butil-5-nonil (Bno).

Uso do aquecimento na SPFS

Desde a inserção da SPFS, o aumento da temperatura tem sido utilizado para reduzir o tempo reacional e suprimir a agregação das cadeias peptídicas ao longo da síntese (Collins *et al.*, 2014; Simon *et al.*, 2014). O aquecimento pode ser aplicado convencionalmente, pelo uso de micro-ondas ou irradiação infravermelha. O uso de aquecimento por micro-ondas em combinação com grupos protetores da cadeia peptídica tem sido aplicado para a síntese de sequências de polipeptídios amilóides e da hemaglutinina do vírus da influenza, que são reconhecidamente sujeitas a agregação (Sampson *et al.*, 1999). No entanto, estudos de comparação mostraram que a proteção da cadeia peptídica foi mais efetiva do que o aquecimento na prevenção de agregação de sequências complexas (Huang *et al.*, 2015).

Uma das maiores preocupações quando se usa o aquecimento durante a síntese é a formação de aspartimida. Isso ocorre parcialmente quando se substitui a PIPE pela piperazina com a utilização de aditivos ácidos na solução de desproteção (Palasek *et al.*, 2007). No entanto, apesar das medidas preventivas, a formação de aspartimida continua sendo evidente juntamente com outros problemas associados ao excesso de aquecimento, como perda de peptídeo ao longo da síntese, racemização de cisteína e histidina, além de níveis elevados de eliminação β em sequências dipeptídicas contendo Ser e Ser-glicanos (Bacsá *et al.*, 2008).

1.2.2.3 Modificações Estruturais de Peptídeos

Diversas modificações químicas podem ser feitas nas estruturas peptídicas, de modo a agregar melhorias nas suas propriedades, sejam elas químicas, físicas ou biológicas. Vários aminoácidos têm sido modificados com foco na introdução de estruturas não naturais, tais como grupos fluoróforos, D-aminoácidos, aminoácidos não naturais, aminoácidos marcados isotopicamente, ligantes, espaçadores, além de modificações como peguilação, biotinilação e polisialização (Gregoriadis *et al.*, 2005; Veronese e Mero, 2008). As modificações pós-translacionais (PTM's), que naturalmente ocorrem *in vivo*, também podem ser obtidas via síntese química, para mimetizar características que ocorrem nos peptídeos naturais. Dentre essas, podem ser destacadas reações de glicosilação e fosforilação, embora PTM's menos comuns, como a palmitoilação, citrulinação, succinilação, metilação e miristoilação possam também ser obtidas (Andrews *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 2003; Martin e Zhang, 2005; Vlieghe *et al.*, 2010; Cieśla *et al.*, 2011; Rothbart *et al.*, 2012; Lautrette *et al.*, 2016).

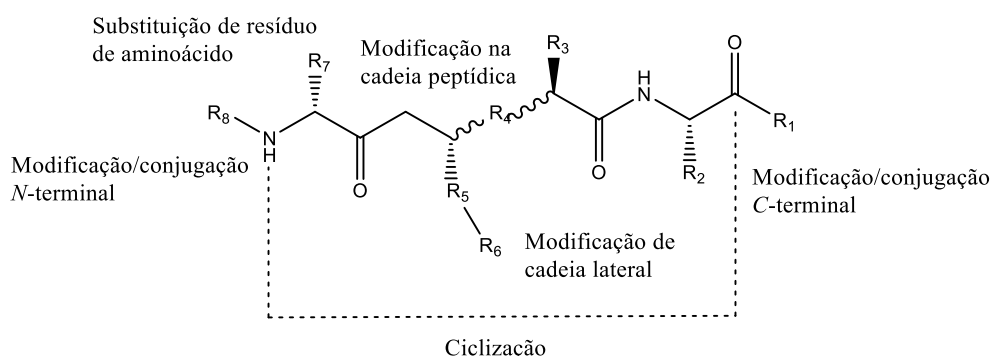


Figura 1.21: Sítios de possíveis modificações estruturais na cadeia peptídica.

A SPFS aparece como uma ferramenta muito prática na obtenção da maioria dessas modificações. No entanto, muitas PTM's e modificações estruturais não são estáveis às condições de clivagem que empregam o HF. Por isso, a Fmoc-SPPS é geralmente a metodologia de escolha mais adaptável para a síntese de tais peptídeos, como os glicosilados e fosforilados, por exemplo. A química mais branda dessa estratégia permite que quase todas as modificações sejam introduzidas em posições estratégicas durante a construção da cadeia peptídica, de modo a permitir também ciclizações e formação de ligações de dissulfeto intra- e inter-cadeias – Figura 1.21 (Goodwin *et al.*, 2012).

Ligação dissulfeto

A formação de ligação dissulfeto em peptídeos ocorre naturalmente, como uma modificação endógena e pós-translacional específica. Peptídeos contendo esse tipo de ligação são frequentemente isolados de venenos de micróbios, animais e plantas, bem como de animais não venenos (Sewald e Jakubke, 2015).

No entanto, derivados de Cys têm sido inseridos em sequências peptídicas para formar esse tipo de ligação e esse procedimento oferece uma série de benefícios, tais como a restrição da conformação em determinadas moléculas de peptídeos, ajudando a mantê-los em sua forma nativa como potentes bloqueadores de canais iônicos, inibidores de proteases e antimicrobianos (Northfield *et al.*, 2014). Por isso, peptídeos contendo ligações dissulfeto estão se tornando mais dominantes no desenvolvimento de derivados terapêuticos.

A formação dessas ligações ocorre espontaneamente em condições suaves, pela aproximação física dos grupos tióis (R-SH) de diferentes resíduos de Cys, sendo a oxidação proferida por O₂ ou por outro agente oxidante. Essa ligação covalente leva ao resíduo de cistina – R-S-S-R' (GóNgora-Benítez *et al.*, 2013). A Figura 1.22 ilustra essa reação.

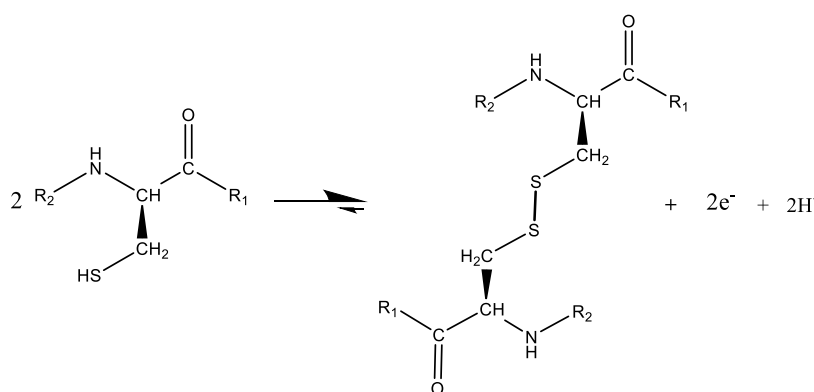


Figura 1.22: Formação da ligação de dissulfeto entre dois resíduos de Cys, formando um resíduo de cistina.

As ligações de dissulfeto podem ser intramoleculares, como ocorre em ciclotídeos e/ou inter-cadeias, como ocorre em peptídeos antimicrobianos diméricos e em algumas estruturas quaternárias de proteínas. A oxitocina, endotelina, defensinas, hepcidina e a kalabata B1 possuem uma ou mais ligações intramoleculares. Já a insulina, relaxina, além de uma ligação intramolecular, possuem uma ou mais ligações dissulfeto inter-cadeias, assim como a distinctina (Postma e Albericio, 2014).

Glicosilação

A glicosilação é uma das mais prevalentes PTM's de proteínas e peptídeos, tendo um impacto bastante significativo nas suas estruturas e funções. Muitas das proteínas e peptídeos envolvidos na resposta imunológica inata ou adaptativa, incluindo citocinas, quimiocinas e PAMs, são glicosilados, o que contribui para seu amplo espectro de ação. Mesmo com tamanha ubiquidade de glicoconjugados na natureza, pouco é conhecido sobre como a glicosilação afeta a função e a atividade dos peptídeos e proteínas, considerando a grandiosidade do seu papel em diferentes processos biológicos. O que se sabe é que a glicosilação pode resultar em melhoras significativas em algumas propriedades como o aumento de meia-vida, tolerância e resposta a algumas terapias de drogas baseadas em peptídeos, além de melhorar a solubilidade de determinados derivados (Moradi *et al.*, 2016; Bednarska *et al.*, 2017).

A expressão recombinante ainda é uma forma bastante utilizada para produzir essas glicoformas (Finkelstein, 2007). No entanto, ainda são encontrados importantes problemas relacionados a esse tipo de processo, estando eles relacionados, principalmente, à obtenção de formas heterogêneas de glicopeptídeos e à presença de restos celulares ou de vírus, o que torna a purificação do produto final bastante complicada e custosa. Apesar disso, grandes esforços têm sido feitos para o avanço da expressão recombinante de glicoformas. Um bom exemplo é o uso de inibidores de enzimas, como as glicosidases, que geralmente obliteram o desenvolvimento de sistemas biológicos mais robustos para a biossíntese dessas biomoléculas (Dalziel *et al.*, 2014).

Várias opções tecnológicas bem interessantes da síntese química podem ser utilizadas para se contornar as complicações encontradas na expressão recombinante. Dentre algumas das vantagens, a síntese química permite a produção de glicoformas mais homogêneas e uniformes, além de permitir adaptações ao processo de glicosilação de peptídeos e tornar o custo de produção um pouco mais competitivo (Crucho *et al.*, 2015). A disponibilidade atual de tecnologias sintéticas no campo da glicoengenharia fazem possível a “personalização” da glicosilação de várias formas, utilizando-se açúcares, que aprimorem ou que até introduzam novas propriedades, tais como uma maior interação entre moléculas (K_a), estabilidade e homogeneidade. Esses efeitos levam a aprimoramentos nas propriedades farmacológicas, como tempo de meia-vida, melhora na farmacocinética de vários fármacos e aumento da bioatividade e seletividade de receptor (Moradi *et al.*, 2016). No caso dos PAMs, as glicosilações podem

introduzir melhoras consideráveis na estabilidade, potencial microbicida, especificidade a patógenos, tecidos ou alvo celular e imunomodulação (Bednarska *et al.*, 2017). Dessa forma, glicoconjugados sintéticos são agora usados para responder uma série de questões biológicas relacionadas a eles, o que tem proporcionado a produção de novos agentes terapêuticos contra o câncer, vírus e infecções bacterianas (Haase e Seitz, 2006).

Os carboidratos são estruturas complexas com múltiplos grupos funcionais, os quais podem ser acoplados a estruturas lineares e poliméricas ramificadas por reações químicas (Figura 1.23). As unidades monoméricas podem ser acopladas por dois *links* stereoquímicos (α e β), sendo que cada monossacarídeo pode existir em duas formas tautoméricas: piranose e furanose. Além disso, a complexidade dessas moléculas pode ser aumentada por funcionalizações como metilação, sulfonação, fosforilação ou acilação em algum dos grupos hidroxila (Boons e Hale, 2008).

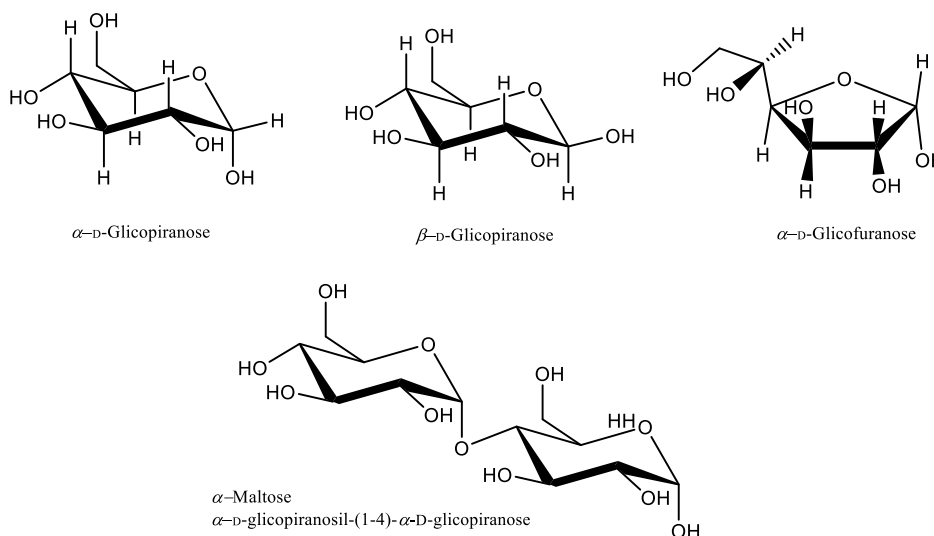


Figura 1.23: Estrutura da glicose. Três isômeros da D-glicose e um dos 73 dissacarídeos possíveis de serem formados por duas unidades de glicose.

Glicopeptídeos com unidades bem definidas de carboidratos têm sido preparados por várias estratégias (Herzner *et al.*, 2000; Kent, 2009). Uma delas é a montagem linear pela inserção de derivados de aminoácidos glicosilados na sequência peptídica pela SPFS convencional. No entanto, como já visto, peptídeos com sequências muito grandes podem ser difíceis de se obter, devido aos baixos rendimentos e ao acúmulo de coprodutos provenientes dos acoplamentos incompletos e epimerização. Tais fatores têm dificultado muito o desenvolvimento da SPFS para a síntese total glicopeptídeos de cadeia longa (Kent, 2009). Para

contornar essa dificuldade, a aplicação de estratégias híbridas que empregam a SPFS e a SPS (pela condensação convergente de blocos com mais de um resíduo de aminoácido obtidos pela SPFS) tem se mostrado outra alternativa. No entanto, essas metodologias sofrem, ocasionalmente, com a labilidade ácida e básica da ligação glicosídica, principalmente nas condições requeridas para a desproteção final dos grupos protetores individuais dos resíduos de aminoácidos e para a liberação do peptídeo da resina (Kunz, 1987). Por outro lado, a O-glicosilação direta de cadeias peptídicas previamente preparadas é frequentemente acompanhada por baixos rendimentos, devido ao tamanho dos açúcares e à baixa solubilidade de peptídeos sob as condições químicas utilizadas nessas reações (Kent, 2009).

Uma outra estratégia que pode ser empregada é o acoplamento direto de uma glicosilamina a uma cadeia peptídica já sintetizada, que contenha resíduo de ácido aspártico (Miller *et al.*, 2003; Kaneshiro e Michael, 2006). A maior vantagem dessa abordagem é sua convergência, pois se trabalha pouco com a proteção e desproteção do carboidrato, acoplando diretamente pequenos fragmentos. Alguns problemas dessa estratégia têm sido contornados pelo ajuste fino das condições reacionais e pela aplicação de reagentes de acoplamento mais potentes (Miller *et al.*, 2003). Tais problemas envolvem a eficiência da etapa de acoplamento devido ao impedimento estérico entre o oligossacarídeo e os componentes do peptídeo, bem como reações paralelas indesejadas, devido à formação de aspartimida intramolecular ocorrer mais comumente para *N*-glicopeptídeos.

Estratégias de ligações quimioseletivas, como a NCL, bem como a utilização de técnicas “click” de conjugação, têm também emergido como boas alternativas às abordagens clássicas de glicosilação, que, geralmente, requerem unidades de açúcares protegidos, condições estritamente anidras e a presença de promotores ou catalizadores baseados em metais (Hojo, 2014; Crucho *et al.*, 2015).

É importante apresentar essa gama de informações sobre a síntese de peptídeos, pois vale salientar que, modificações estruturais nos peptídeos fazem parte do contexto desse projeto e, por isso, serão abordados dois dos mais importantes processos químicos na síntese de peptídeos: a formação da ligação de dissulfeto (Capítulo 2) e a glicosilação de PAMs (Capítulo 3), esta última utilizando uma das técnicas químicas mais interessantes de síntese em solução, a reação “click”.

CAPITULO 2

SÍNTESE DO PEPTÍDEO HOMODIMÉRICO HOMOTARSININA: ESTUDOS CINÉTICOS DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO VIA FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO DISSULFETO

2.1 INTRODUÇÃO

Por apresentarem características peculiares, que podem aumentar o potencial antimicrobiano e melhorar algumas propriedades quando comparados a peptídeos de cadeias lineares, alguns PAMs diméricos têm despertado grande interesse da comunidade científica e, cada vez mais, tem-se dado maior importância aos estudos dessa classe de moléculas.

Um exemplo muito estudado nos últimos anos é o peptídeo heterodimérico distinctina, um raro membro dessa classe, que é um dos poucos isolados naturalmente de secreções da pele de anfíbios, neste caso, da perereca *Phyllomedusa distincta* (Batista, C. V. *et al.*, 2001). Ele é constituído por duas cadeias monoméricas lineares distintas, interligadas por uma ligação de dissulfeto. Essa estrutura heterodimérica possui características muito peculiares devido às interações inter-cadeias, uma vez que o arranjo tridimensional adotado por esse peptídeo em meio aquoso leva a importantes propriedades, tais como elevada resistência a peptidases, aumento na afinidade por membranas fosfolipídicas e aumento em seu potencial antimicrobiano, quando comparado às suas cadeias monoméricas isoladas (Batista, C. V. *et al.*, 2001; Raimondo *et al.*, 2005; Dalla Serra *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2009; Evaristo *et al.*, 2012; Mullen *et al.*, 2012). Devido à raridade e ao potencial desse tipo de estrutura, peptídeos diméricos têm sido desenvolvidos de forma artificial e cadeias lineares naturais têm sofrido adaptações para serem sintetizadas na forma de dímeros. Os peptídeos LLP1, a batenecina, a aureína 1.2, a noplina e RW (Liu *et al.*, 2017), VG16KRKP (Datta *et al.*, 2016), peptídeo 1037 (Thamri *et al.*, 2017), análogos da magainina, mag-N22C e MSI-78, e do CTx-Ha (Lorenzón *et al.*, 2012), quando na forma de dímeros, apresentam um aumento em suas atividades antimicrobianas quando comparados a suas cadeias monoméricas individualmente (Tencza *et al.*, 1999; Dempsey *et al.*, 2003; Porcelli *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Lorenzón *et al.*, 2013). Os análogos diméricos di-Tat(W)-C e di-Tat(W)-K do fragmento proteico Tat(48-60) se assemelham a seus precursores quanto às atividades antimicrobianas, entretanto a eficiência cinética de sua atividade bactericida é maior em algumas cepas de bactérias (Zhu e Shin, 2009). Em contraste, outros derivados diméricos apresentam diminuição nas suas atividades

antimicrobianas e aumento nas suas citotoxicidades, como é o caso de outros análogos do CTx-Ha (Lorenzón *et al.*, 2012) e do dímero da arenicina, que, apesar de manter sua atividade antibacteriana, tem sua atividade citotóxica aumentada (Panteleev *et al.*, 2017).

Como discutido no Capítulo 1, apesar de atividades bastante pronunciadas, os peptídeos antimicrobianos são encontrados apenas em baixas concentrações em suas fontes naturais, sendo então necessária a obtenção desses compostos e/ou de seus análogos através da síntese química, que é, na maioria das vezes, a opção tecnológica mais adequada para a obtenção dessas biomoléculas em maiores escalas (Kimmerlin e Seebach, 2005). Dessa forma, geralmente, as cadeias monoméricas são obtidas por SPFS e, grande parte dos dímeros, são obtidos através de reações de oxidação dessas cadeias monoméricas, que contenham pelo menos um resíduo de cisteína. Nesses casos, a oxidação do grupo tiol da sua cadeia lateral da cisteína leva à formação de ligação de dissulfeto inter-cadeias (Tam *et al.*, 1991; Monera *et al.*, 1993; Dempsey *et al.*, 2003; Bulaj, 2005; Raimondo *et al.*, 2005; Dalla Serra *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2009; Zhu e Shin, 2009; Evaristo *et al.*, 2012; Ronga *et al.*, 2013; Calce *et al.*, 2015).

No entanto, as diferentes combinações dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias monoméricas possibilitam a obtenção de diferentes propriedades conformacionais e físico-químicas, tornando peculiar o comportamento que cada peptídeo assume em soluções, que mimetizam ambientes de membranas biológicas (Barnham *et al.*, 1999; Munishkina *et al.*, 2003). Por isso, pensando na síntese dos peptídeos diméricos via formação de ligação dissulfeto, é crucial a compreensão dos processos correlacionados à dimerização das cadeias lineares relacionadas. Esses processos são constituídos por uma complexa rede de micro eventos, que ainda é subdividida em etapas e reações elementares, as quais, apesar de desafiadoras, são a chave para a compreensão no nível molecular desse tipo de reação. O melhor entendimento do processo pode levar a condições que forneçam uma cinética mais eficiente, bem como rendimentos mais satisfatórios para essas reações de dimerização.

Em vista da pequena quantidade de informações relacionadas à síntese de peptídeos diméricos, nesta parte do trabalho foi realizado um estudo detalhado da cinética envolvida na síntese do peptídeo dimérico homotarsinina (Htr) em diferentes meios biomiméticos, pela reação de dimerização de sua cadeia monomérica (Htr-M, ou cadeia monomérica da homotarsinina). A Htr é um dos raros peptídeos antimicrobianos naturalmente isolado na forma de dímero na natureza e, no caso deste peptídeo, ele é obtido na forma de homodímero da

espécie de anuro *Phyllomedusa tarsius*, que habita as florestas brasileiras – Figura 2.24 (Prates, 1999). Sua estrutura é composta por 48 resíduos de aminoácidos, sendo constituída por duas cadeias iguais de 24 resíduos, que estão conectadas por uma ligação dissulfeto.



Peptídeo	Sequência primária
Htr	NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂ NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂
Htr-M	NLVSD IIGSK KHMEKLISIHKCR-NH ₂

Figura 2.24: Estrutura primária da Htr. À esquerda, foto do anuro *Phyllomedusa tarsius*, de onde a Htr é isolada na natureza. À direita, as sequências primárias da Htr e da sua cadeia monomérica Htr-M. *-NH₂ representa a amidação da porção C-terminal, sendo essa funcionalização de ocorrência natural na Htr. A figura da espécie foi extraída e referenciada conforme exigência de citação e autorização dos autores (Lima, 2012).

Até o ponto que sabemos, não há ainda na literatura artigos científicos envolvendo estudos de reações de dimerização de peptídeos em meios micelares, a não ser resultados prévios de um trabalho de tese e um de dissertação realizados em parceria pelos grupos de pesquisa da UFMG e da UFVJM (Verly, 2010; Guimarães, 2013). Embora esses estudos tenham fornecido algumas informações de caráter mais qualitativo, não foram aplicados aos mesmos conceitos e fundamentos estabelecidos de cinética química, bem como não foram realizados controles parametrizados e acurados do tempo de coleta de dados, o que foi a grande motivação desta parte do presente trabalho de tese: explorar importantes ferramentas cinéticas para a compreensão de vários microprocessos e estágios individuais envolvidos no processo de dimerização, para uma síntese mais eficiente e rentável de PAMs homodiméricos.

Até o momento, os trabalhos realizados em parceria pelos grupos de pesquisa da UFMG e da UFVJM focaram no quanto os aspectos estruturais da cadeia monomérica poderiam influenciar na eficiência e no rendimento da reação de dimerização (Guimarães, 2013; Verly *et al.*, 2017). Com base nos resultados de CD obtidos nesses trabalhos, foi possível analisar as condições dos respectivos meios a serem empregados nas reações de dimerização e que viessem a propiciar maior estruturação do monômero Htr-M (Guimarães, 2013). Para se ter resultados de CD mais confiáveis, foram realizados experimentos com o peptídeo análogo à Htr-M, que teve seu resíduo de Cys-23 substituído por um resíduo de Ser ([S²³]Htr-M). Essa modificação

na sequência peptídica foi importante para se garantir que não ocorreria reação de dimerização durante os estudos conformacionais, o que poderia levar a valores superestimados dos conteúdos helicoidais (Figura 2.25).

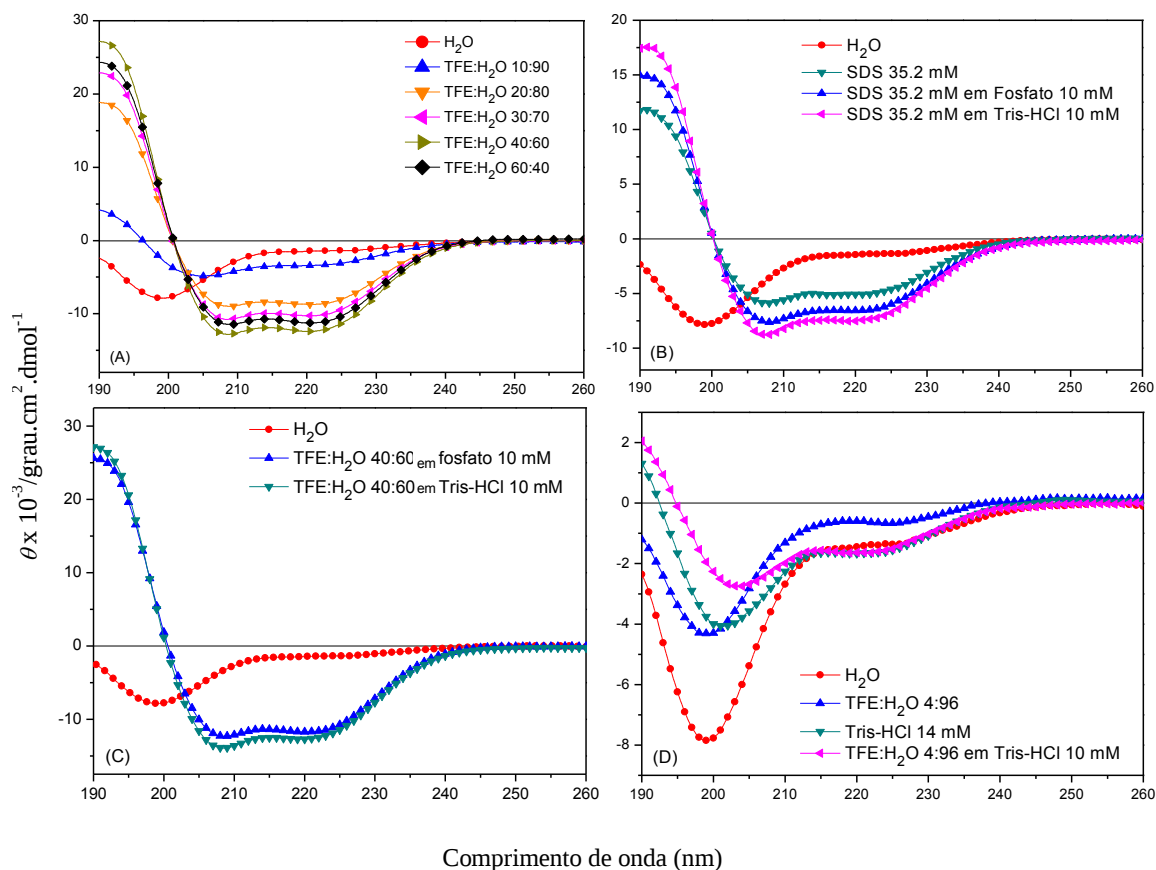


Figura 2.25: Espectros de CD do peptídeo [S²³]Htr-M. (A) na presença de soluções de TFE:H₂O em diversas proporções (v/v), (B) na presença de micelas de SDS a diferentes concentrações em tampão fosfato 10 mmol·L⁻¹ e em tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,5, (C) TFE:H₂O 40:60 (v/v) em tampão fosfato 10 mmol·L⁻¹ e em tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,5 e (D) TFE:H₂O 4:96 (v/v) em tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹ pH 8,5 e em Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,5. Figura extraída de Guimarães, 2013.

Como esperado, os resultados da Figura 2.25 indicam que o peptídeo não se estruturou em solução aquosa. Todavia, a 10% de TFE, já se percebe um perfil de espectro condizente com o de um peptídeo α -helicoidal, que é caracterizado pelo aparecimento de mínimos próximos a 208 e 222 nm, e de um máximo próximo a 193 nm. O deslocamento e a intensificação desses mínimos e máximos ocorrem com o aumento da proporção de TFE, chegando-se, então, a um máximo de conteúdo de hélice para a mistura TFE:H₂O (40:60, v/v), que, surpreendentemente, é consistente com um conteúdo de hélice superior ao observado em solução contendo 60% de TFE:H₂O (60:40 v/v). Portanto, decidiu-se utilizar como co-solvente orgânico na síntese, o meio constituído por TFE:H₂O (40:60, v/v). Para os experimentos na

presença de micelas de SDS, percebeu-se que, mesmo a menores concentrações do surfactante, ocorre a estruturação do peptídeo (dados não mostrados). Entretanto, resultados já obtidos pelo presente grupo de pesquisa, indicam que o homodímero perturba significativamente o empacotamento de bicamadas lipídicas em bicelas (Barbosa, 2016), tendo-se optado então, nesta tese, pela realização da reação de dimerização na presença de micelas, para concentrações mais altas de SDS, a saber, $350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, o que também mantém a proporção [peptídeo]/[surfactante] utilizadas nos experimentos de CD.

Os espectros obtidos nessa mesma razão molar, são apresentados na Figura 2.25B, p. 77, tendo sido observada uma estruturação significativa para o monômero na presença de micelas de SDS a essa concentração. Ressalta-se que, a essa concentração de SDS ($35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), já é observada a saturação dos espectros de CD (dados da titulação não apresentados).

2.2 OBJETIVO

2.2.1 Geral

A etapa referente a este capítulo da tese tem como proposta o estudo e a compreensão, com base em evidências experimentais e teóricas, da influência de diversos fatores na cinética envolvida na reação de dimerização da cadeia monomérica Htr-M, para obtenção do peptídeo homodimérico Htr. Tendo-se uma melhor compreensão dessa reação e das condições mais interessantes do meio reacional, pretende-se implementar uma metodologia de síntese, que poderá ser amplamente utilizada para a produção de outros peptídeos diméricos, esperando-se, portanto, produzir avanços importantes na síntese de peptídeos a partir da produção de tecnologia, que possa apresentar aplicação direta e imediata na área de bioquímica e em outras relacionadas.

2.2.2 Específicos

- i. Realizar a reação de dimerização da Htr-M em meio aquoso, em meio contendo o co-solvente orgânico 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e na presença de micelas de SDS, monitorando-se o progresso da reação em intervalos curtos e bem definidos ao longo de 72 horas.
- ii. Verificar a influência da concentração da Htr-M na cinética e no rendimento da síntese.
- iii. Verificar a capacidade de formação de agregados da Htr-M ao longo da reação.

iv. Propor um modelo cinético para a dimerização da Htr-M.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Síntese da Htr-M

Acoplamento e desproteção

A cadeia monomérica Htr-M foi sintetizada manualmente, utilizando-se a estratégia Fmoc de SPFS, conforme metodologia já protocolada pelo Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos – LASEP (Chan, W. C. e White, P. D., 2000), sendo obtida com a sua porção C-terminal amidada, devido à utilização da resina de poliestireno Fmoc-Rink Amide (1-2% de DVB), grau de substituição de $0,63 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. Tanto a resina quanto os Fmoc-resíduos de aminoácidos utilizados durante a síntese foram obtidos da Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanha). As etapas de síntese do peptídeo foram realizadas em uma seringa de poliestireno do tipo dosador oral, adaptada com um filtro poroso de poliuretano (Figura 2.26).

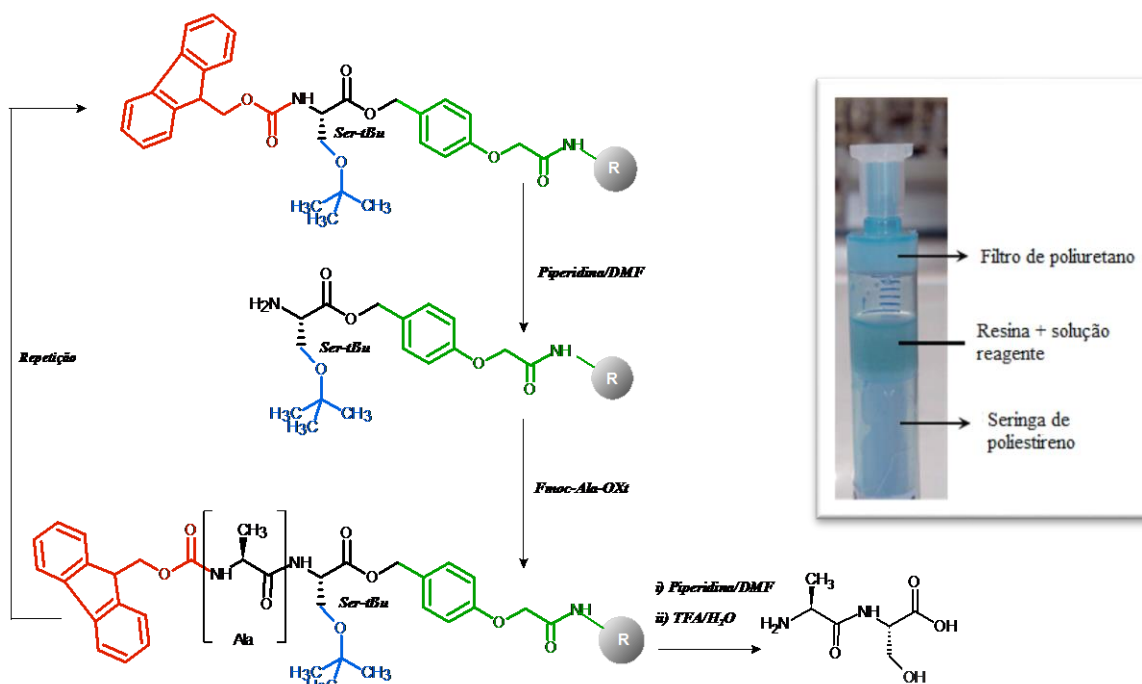


Figura 2.26: Estratégia de Fmoc-SPFS. A síntese começa com o acoplamento do primeiro derivado de aminoácido na resina polimérica. Em seguida, é feita a remoção do grupo Fmoc (em vermelho), protetor do grupamento amina do resíduo de aminoácido, o que permite o acoplamento do segundo derivado. Esse ciclo se repete até a síntese da sequência desejada. Por fim, a cadeia peptídica é submetida à reação de clivagem, quando são removidos os grupos protetores da cadeia lateral. No detalhe, foto mostrando uma das seringas utilizadas na Fmoc-SPFS.

Primeiramente, a resina (0,091 mmol) foi colocada dentro da seringa e tratada com DCM por aproximadamente 30 min. As etapas de acoplamento foram realizadas empregando-se 4 equiv. de derivados de aminoácidos ativados por tratamento com DIC (4 equiv.) e HOBt (4 equiv.) em mistura de DMF:DCM (1:1 v/v), durante 2 horas com agitador do tipo Vórtex (450 rpm). As etapas de desproteção do grupo Fmoc foram feitas pelo tratamento com 20% de 4M-PIPE em DMF (2 x 15 min, 450 rpm). No intervalo de cada etapa de acoplamento ou de desproteção, a peptidil-resina foi submetida a três lavagens alternadas com DMF e álcool isopropílico (IPA, 3 x 3 mL cada) e, finalmente, a três lavagens com DCM (3x3 mL). A DMF foi obtida da Vetec (Duque de Caxias, Brasil), a DIC da Fluka (Saint Louis, EUA) e o HOBt da Nova Biochem-Merck (Darmstadt, Alemanha).

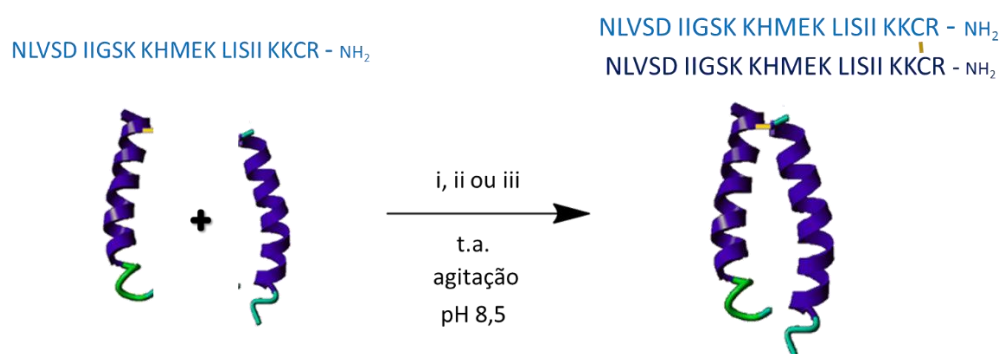
Clivagem, caracterização e purificação

Para a clivagem da Htr-M, foi utilizada uma solução ácida contendo etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), na proporção TFA:H₂O:EDT:TIS de 95:1:2:2 (v/v) na seringa, que foi deixada sob agitação (450 rpm) por 2,5 h. A solução de clivagem contendo o peptídeo clivado teve o excesso de TFA removido, tendo sido o peptídeo então precipitado em éter diisopropílico gelado, posteriormente dissolvido em água e então liofilizado. O TFA e o TIS foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e o éter diisopropílico da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). O peptídeo bruto liofilizado foi, então, caracterizado e purificado por CLAE-FR (Instrumento Varian ProStar[®] 210, Walnut Creek, EUA) usando uma coluna VYDAC[®] 218TP semi-preparativa de fase-reversa (10 mm x 250 mm C18, Grace Corporate, Columbia, Maryland, EUA) equilibrada com 0,1% de solução aquosa de TFA e eluída com gradiente linear de 0,08% de TFA em acetonitrila (ACN). Um fluxo de 2,0 mL·min⁻¹ foi usado e o peptídeo detectado a 214 nm (detector na região do ultravioleta, modelo ProStar[®] 330). Os produtos purificados foram caracterizados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, usando um espectrômetro Bruker Daltonics[®] Autoflex III ou Ultraflex *Extreme* III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

2.3.2 Síntese da Htr a Partir da Dimerização da Htr-M

Depois de purificada, a cadeia monomérica Htr-M (36,3 mmol·L⁻¹) foi colocada em béquer sob leve agitação magnética, à temperatura ambiente, na presença de três meios distintos. Assim, a reação de dimerização foi feita em: (i) meio aquoso, (ii) em solução do co-solvente TFE:H₂O 40:60 (v/v) e, por fim, (iii) na presença de micelas de SDS 350 mmol·L⁻¹

(Esquema 2.1). O volume final dos meios reacionais foi de 3,0 mL e todos eles foram tamponados com Tris-HCl $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, a pH 8,5. Uma vez obtido, o homodímero Htr foi caracterizado e purificado conforme, descrito acima para a Htr-M.



Esquema 2.1: Processo de dimerização da Htr-M em Htr nos diferentes meios reacionais. (i) meio aquoso, (ii) (ii) em solução do co-solvente TFE:H₂O 40:60 (v/v) e (iii) na presença de micelas de SDS $350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3.3 Monitoramento da Formação da Htr

A formação da Htr em todos os meios utilizados foi monitorada, coletando-se alíquotas de $20 \mu\text{L}$ do recipiente reacional e injetando-as diretamente no cromatógrafo Varian ProStar[®]210 (Walnut Creek, EUA). As injeções foram realizadas em intervalos de 30 min nas 10 primeiras horas de reação, de duas em duas horas até às 24 horas, depois em 36, 48, 60 e 72 horas de reação. Esse acompanhamento foi feito por CLAE-FR em coluna analítica VYDAC[®] C18 5μ (250 x 4,6 mm, Grace Corporate, Columbia, Maryland, EUA), utilizando-se gradientes de água Milli-Q[®] (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha) acidulada com 0,1% de TFA (fase A) e de acetonitrila grau UV/HPLC contendo TFA a 0,08% (fase B). O gradiente utilizado teve como condições de eluição 35% de ACN de 0 a 10 minutos, aumentando-se para 66% até o tempo total de 30 minutos de análise.

2.3.4 Variação da Concentração de Htr-M na Dimerização

Metade da concentração de Htr-M ($18,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) utilizada nos experimentos originais (condição iii, seção 2.3.2, p. 80) foi empregada no experimento em 3 mL de solução micelar de SDS a $350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, em Tris-HCl a $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8,5. O monitoramento da reação foi feito segundo o item 2.3.3.

2.3.5 Cromatografia por Exclusão de Tamanho

Esses ensaios foram realizados para 2 mg/mL dos peptídeos Htr-M, Htr e Dtn em solução aquosa à temperatura ambiente, em equipamento Varian ProStar®330 (Varian Inc, Palo Alto, EUA), utilizando-se uma coluna de dextrana Superdex® *Peptide* Tric.10/300 GL (1.5 x 50 cm, GE *Health Care Division*, Reino Unido), com limite de exclusão entre 100 e 7000 Da. Os experimentos foram conduzidos a um fluxo de 0,3 mL/min de fase móvel, constituída por solução aquosa de tampão fosfato 20 mmol·L⁻¹, pH 7,0, contendo NaCl 0,3 mol·L⁻¹.

2.3.6 Determinação do Rendimento da Dimerização

Após a constatação da pureza por EM e CLAE-FR, cada solução contendo Htr-M e Htr foi padronizada para o fornecimento adequado dos dados experimentais obtidos nas reações de dimerização realizadas. Essa padronização foi realizada a partir da absortividade molar (ϵ_m , em L·mol⁻¹·cm⁻¹), obtida pela análise de aminoácidos feita por Verly, 2010, para esses peptídeos (Verly, 2010). De posse das absortividades molares da Htr-M e da Htr, pôde-se fazer uma curva de calibração de peptídeos, tendo-se, a partir do valor da absorbância A obtidos na respectiva injeção do monitoramento da dimerização, a concentração c (mol·L⁻¹) real, pela aplicação da lei de Lambert-Beer (Equação 2.1), onde b é o caminho ótico (1 cm):

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (2.1)$$

2.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com base nos resultados de CD previamente obtidos (Figura 2.25, p. 77, e Guimarães, 2013), foram realizados no presente trabalho reações de dimerização em diferentes condições: (i) em meio aquoso, (ii) em presença de co-solvente orgânico TFE:H₂O (40:60, v/v) e (iii) em presença de micelas de SDS 350 mmol·L⁻¹. Todos esses experimentos foram realizados em soluções tamponadas com Tris·HCl 100 mmol·L⁻¹, em pH 8,5.

2.4.1 Sínteses da Htr-M e da Htr

Primeiramente foi obtida a cadeia monomérica Htr-M pela SPFS via estratégia Fmoc (Chan, W. e White, P. D., 2000), com rendimento aproximado de 70%. O espectro de massas do produto confirmou a obtenção do peptídeo com alto grau de pureza, com o íon molecular $[M + H]^+$ de valor igual a 2752,1 (Figuras 2.27A, p. 83).

A síntese do peptídeo homodimérico Htr consiste na oxidação dos grupamentos tiol dos resíduos de cisteína de duas cadeias monoméricas de Htr-M, formando-se uma ligação dissulfeto. Assim, depois de purificada, a cadeia monomérica foi submetida à reação de dimerização nas três condições já descritas anteriormente, *i.e.*, em meio aquoso, em TFE:H₂O (40:60 v/v) e na presença de micelas de SDS a 350 mmol·L⁻¹, tamponados com Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 8,5. Essa reação foi conduzida com o monitoramento feito em intervalos curtos e definidos ao longo de 72 h, conforme descrito no item 2.3.3, p. 81. Ao final das 72 horas de reação, o homodímero formado foi purificado e obtido com alta pureza, conforme constatado pelo íon molecular $[M + H]^+$ com valor igual a 5504,2 no espectro da Figura 2.27B.

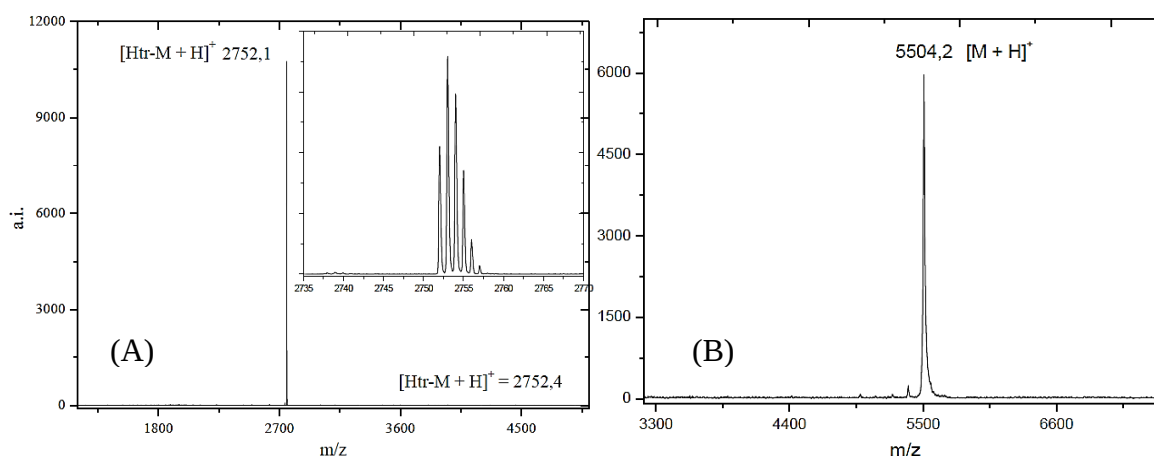


Figura 2.27: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada da Htr-M (A) e da Htr (B). O $[M + H]^+$ para a Htr-M foi obtido em 2752,1 (valor de m/z experimental) e o valor teórico é de 2752,4 Da. O espectro da Htr foi obtido a partir da reação de dimerização da Htr-M em solução TFE:H₂O 40:60 (v/v), tamponado com Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 8,5 e o $[M + H]^+$ foi obtido em 5504,2 (valor de razão m/z experimental), o valor teórico é de 5504,8 Da.

2.4.2 Estudos Cinéticos da Dimerização

Monitoramento da formação da Htr

Os resultados do monitoramento da dimerização por CLAE-FR obtidos geraram um conjunto de dados, que revelaram perfis bem definidos no sentido de formação do homodímero para cada meio reacional. A Tabela 2.3 (p. 84) sumaria os resultados obtidos em cada experimento, que estão apresentados na forma de rendimentos percentuais (%) em função do tempo de reação (h).

Tabela 2.3: Percentual de conversão da Htr-M em Htr em diferentes tempos de reação

Tempo de Reação (h)	Porcentagem de Conversão em Htr (%)		
	TFE:H ₂ O	Aquoso	SDS
0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	*	*	*
1,0	2,0	0,6	7,3
1,5	3,9	1,1	16,1
2,0	5,0	1,4	23,4
2,5	6,8	1,8	26,7
3,0	8,5	2,0	30,3
3,5	10,3	2,4	36,0
4,0	11,7	2,9	41,0
4,5	13,0	4,0	46,9
5,0	14,0	4,7	50,8
5,5	15,7	6,0	53,1
6,0	16,8	7,5	55,3
6,5	18,6	9,0	55,7
7,0	19,4	11,0	56,2
7,5	21,6	14,0	57,0
8,0	23,1	16,0	57,5
8,5	24,8	18,5	*
9,0	28,0	21,0	58,1
9,5	30,0	23,0	*
10,0	34,0	26,5	58,7
12,0	38,0	36,5	58,7
14,0	48,0	41,2	59,4
16,0	52,0	47,0	*
18,0	60,0	53,2	60,0
20,0	66,0	58,0	*
22,0	71,2	61,4	59,5
24,0	75,7	62,5	60,0
36,0	82,8	65,0	60,6
48,0	84,0	66,0	61,1
60,0	85,0	65,5	61,1
72,0	84,5	66,0	60,6

* Não houve precisão na integração das áreas dos picos nos cromatogramas, então resultados não foram relatados, por não serem confiáveis.

Os dados da dimerização obtidos em meio aquoso indicam que a saturação da reação ocorre a partir de 24 h, variando de 62,5 a 66,0% do produto até as 48 h. Para a síntese realizada

na presença de micelas de SDS, aparentemente é observada uma velocidade inicial de reação significativamente superior, chegando-se a um ponto de saturação após 6 h (55,3% de Htr), ao passo que valores próximos de 60,0% de conversão são obtidos após 8h, não havendo conversão expressiva após esse tempo de reação. Em TFE:H₂O (40:60, v/v), observou-se um ponto de saturação em 36 h, chegando-se a uma conversão de 82,8%, não sendo este valor alterado, significativamente, até 72 h de reação.

Os dados da Tabela 2.3, p. 84, foram plotados em um gráfico de percentual de conversão em Htr (%) *versus* tempo de reação (h) e as curvas obtidas são mostradas na Figura 2.28. O comportamento sigmoidal observado nessas curvas é típico para reações que dependem de um período de indução e é característico para uma série de fenômenos químicos, dentre eles, a formação de agregados peptídicos em processos fisiológicos (Yamaguchi *et al.*, 2010; Dovidchenko *et al.*, 2014; Meisl *et al.*, 2014; Selivanova *et al.*, 2014).

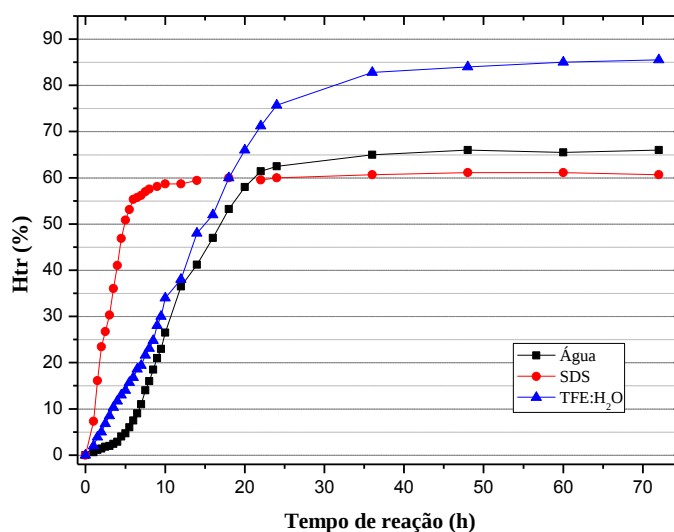


Figura 2.28: Percentual de conversão de Htr-M em Htr. A reação de dimerização em meio aquoso está representada em preto (■), TFE:H₂O em azul (▲) e na presença de micelas de SDS, em vermelho (●).

Cromatografia por exclusão de tamanho

Devido às evidências da existência de agregados peptídicos formados pela Htr-M em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo (Guimarães, 2013), realizou-se no presente trabalho uma análise cromatográfica por exclusão de tamanho para Htr-M, Htr e para a distinctina (Dtn), com o intuito de se verificar a capacidade de formação de agregados da Htr-M e da Htr em solução, o que é muito importante para se iniciar o entendimento dos processos envolvidos na dimerização (Figura 2.29, p. 86).

Em trabalho realizado por Raimondo *et al.*, 2005 (Raimondo *et al.*, 2005), foi provado que a Dtn existe como um dímero de dímeros em meio aquoso, adotando, portanto, uma estrutura globular em um feixe de quatro hélices (estrutura tetramérica). Em concordância com esses resultados, é observado no cromatograma da Dtn (em vermelho) um pico menos intenso em $t_r = 23,3$ min, que corresponde a uma molécula de dímero isolada, todavia é observado um pico bem mais intenso em $t_r = 11,5$ min, que corresponde ao arranjo tetramérico do dímero de dímeros, que é eluído bem mais rapidamente. Já o homodímero Htr apresenta um pico de eluição em $t_r = 22,8$ min, o que sugere que este peptídeo, ao contrário da Dtn, não se agrega em solução, existindo como uma única molécula isolada. Essa diferença entre os dois dímeros se dá pelo fato de que as cadeias hidrofóbicas estão internalizadas em uma única estrutura da Htr, ao passo que tal internalização demanda o arranjo de dímero de dímeros (tetramérico) da Dtn, conforme comprovado pelas estruturas tridimensionais desses peptídeos determinadas por RMN em solução (Raimondo *et al.*, 2005; Verly *et al.*, 2017). Curiosamente, ao se observar o cromatograma obtido para a Htr-M, existem dois picos, um deles em um t_r pouco maior que o da Htr e outro em t_r ligeiramente inferior (25,6 e 22,2 min, respectivamente). Esses resultados indicam que o monômero Htr-M parece se agregar e podem sugerir que essas interações intercadeias estejam relacionadas à formação de um complexo intermediário, que pode ser importante para a dimerização do peptídeo.

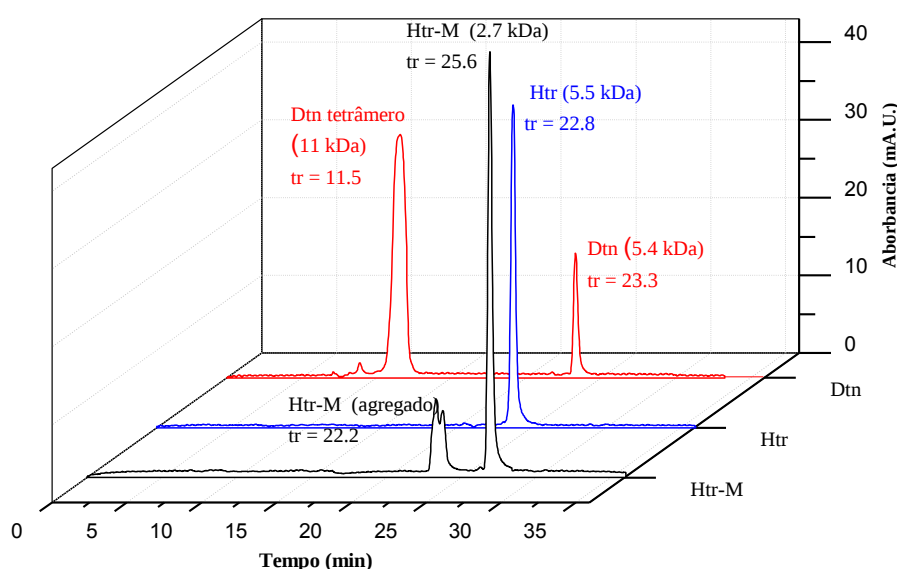


Figura 2.29: Cromatografia por exclusão de tamanho realizada para Htr-M (em preto), Htr (azul) e Dtn (vermelho) em meio aquoso, à temperatura ambiente. Coluna Superdex® Peptide Tric. 10/300 GL (1,5 x 50 cm) equilibrada com 20 mmol·L⁻¹ de solução aquosa de tampão fosfato contendo NaCl 3 mol·L⁻¹. Um fluxo de 0,3 mL/min foi empregado e a absorbância foi média a 214 nm.

Modelo cinético para a reação de dimerização

O modelo escolhido para o ajuste dos resultados experimentais, foi originalmente proposto pelo cientista Melvin Avrami, em uma série de trabalhos publicados no final da década de 1930 e no início da década 1940. Originalmente, essa teoria foi desenvolvida para descrever a formação da estrutura cristalina de metais, a partir de um período de nucleação, que envolve uma determinada cinética de mudança de fase, seguido por um período de crescimento do núcleo formado, que vai até a formação do cristal, quando ocorre a desaceleração do processo (Avrami, 1939; 1940; 1941). Seus princípios foram expandidos e, ao longo dos anos, passaram por algumas adaptações, tendo sido a teoria aplicada no ajuste de curvas tipo sigmóides obtidas para diferentes sistemas, como em processos biológicos (Cope, 1976) e químicos (Irzhak *et al.*, 2008; Finney e Finke, 2009), que apresentam mudanças de fase ou pseudofase (Gualtieri *et al.*, 1997).

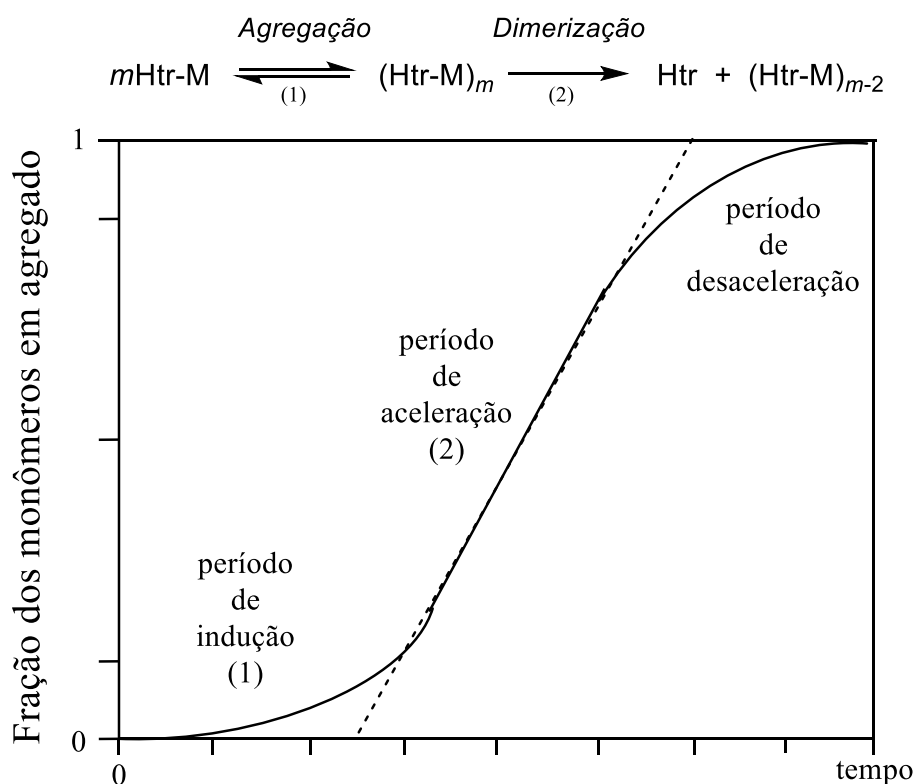


Figura 2.30: Processo de duas etapas principais para a dimerização de Htr-M. No topo da figura, o esquema mostra a etapa de agregação (1), seguida da etapa de dimerização (2). O gráfico representa visualmente os períodos envolvidos em (1) e (2), com a fração de monômeros em agregados em função do tempo.

A reação de dimerização parece ocorrer em dois estágios principais. Em um primeiro momento, ocorre um período de indução (ou período de maturação), relacionado às horas

iniciais, no qual deve acontecer a formação de vários agregados. Em seguida, ocorre um segundo período, que envolve um evento exponencial rápido, chamado de período de aceleração, quando ocorre a dimerização. Finalmente, chega-se a um período onde há uma desaceleração da formação do homodímero. A Figura 2.30, p. 87, ilustra esses eventos.

No presente trabalho, a investigação do referido processo de dimerização consistiu no monitoramento da fração F de conversão das cadeias monoméricas Htr-M no homodímero Htr, que é dependente do tempo t . A equação de Avrami, escolhida para a descrição desse processo, apresenta a seguinte forma:

$$F = 1 - e^{-(kt)^n}, \quad (2.2)$$

onde k é uma constante de velocidade global e n é o índice de Avrami (Avrami, 1939; 1940; 1941).

A constante k está relacionada à velocidade de dimerização e depende dos processos que precedem a formação do produto final (*i.e.*, nucleação, agregação, etc.), bem como da dimensionalidade no espaço onde esses processos ocorrem. O índice n está relacionado à dimensionalidade do fenômeno químico no espaço, sendo que valores entre 1-2, 2-3 e 3-4 representam mudanças uni, bi e tridimensionais, respectivamente (Tanaka *et al.*, 1995). Em trabalho mais recente, Finney e Finke (Finney e Finke, 2009) mostraram que n possui uma dependência exponencial inversa com estados de agregação e uma dependência linear com as transformações químicas, que procedem esses estados. Dessa forma, um aumento de n nos dados cinéticos indica que a agregação se torna menos importante, à medida em que vai ocorrendo a conversão no processo de dimerização.

A Equação 2.2 pode ser reescrita como:

$$\text{Htr}_t = \text{Htr}_o F, \quad (2.3)$$

onde Htr_t é a fração da conversão percentual de homodímero no tempo t em função de sua fração de conversão percentual total Htr_o .

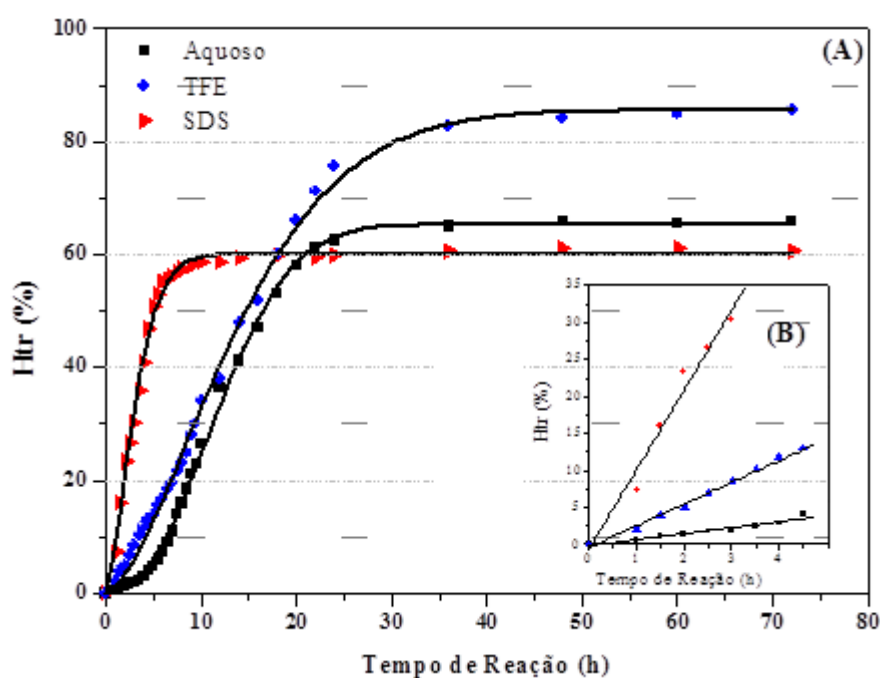


Figura 2.31: Ajuste do percentual de conversão de Htr-M em Htr utilizando a Equação 2.3. (A) O perfil cinético para a obtenção da Htr via dimerização da Htr-M foi realizado em meio aquoso (preto), em TFE:H₂O (40:60, v:v, azul) e na presença de micelas de SDS (vermelho). As linhas sólidas estão ajustadas de acordo com a Equação 2.3, p. 88. No inserto (B), o gráfico mostra o comportamento linear nas primeiras horas da dimerização, nos três meios empregados.

Os dados do monitoramento da dimerização (Figura 2.28, p. 85) foram ajustados com base nos *fits* obtidos a partir da Equação 2.3, p. 88, utilizando-se o *software* Origin[®] Pro 8, e as curvas resultantes estão em boas concordâncias com os dados experimentais ($R > 0,996$), como mostra a Figura 2.31. Os respectivos parâmetros cinéticos obtidos são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Parâmetros cinéticos para a dimerização de Htr-M em meio aquoso, TFE:H₂O (40:60 v/v) e solução micelar de SDS (350 mM) em pH 8,5 (tampão Tris-HCl 100 mM) a 25 °C

PARÂMETROS				
CONDIÇÃO	Htr ₀ (%) ^a	k (10 ⁻² h ⁻¹) ^a	n ^a	$\Delta[\text{Htr}]/\Delta t$ ^{a, b}
Meio aquoso	65,2±0,5	7,2±0,1	2,3±0,1	0,81±0,06
TFE:H ₂ O	85,6±0,9	6,3±0,1	1,6±0,1	2,90±0,2
SDS	60,0±0,4	28,5±0,5	1,5±0,1	10,80±0,9

^a Os erros são os desvios padrões.

^b Valores gerados a partir de um ajuste linear dos dados obtidos nas primeiras sete horas de reação.

O valor de n mais alto em meio aquoso ($n = 2,3$) revela que o processo de dimerização nesse meio depende da formação de vários agregados no período de indução, que parecem ser importantes na estruturação em hélice α das cadeias monoméricas de Htr-M. Na realidade, uma inspeção visual das curvas (Figura 2.31A, p. 89) indicam nitidamente a necessidade de um maior tempo de maturação para a reação em meio aquoso, tendo-se uma cinética de formação do homodímero bem mais lenta nas primeiras horas de reação, conforme constatado pela inclinação significativamente menos acentuada para a reação nesse meio (Figura 2.31B, p. 89). Estudos por espectroscopias de CD e de RMN indicam que a Htr-M adota conformações α -helicoidais bem definidas em solução de TFE:H₂O e na presença de micelas detergentes, todavia o peptídeo não adota conformação preferencial em meio aquoso (Verly, 2010; Guimarães, 2013; Verly *et al.*, 2017). Desta forma, na solução de TFE:H₂O, existem cadeias monoméricas previamente estruturadas e livres, sem estarem agregadas, e o n mais baixo indica que a dimerização não depende significativamente da agregação. Esse fato também é observado na presença de micelas de SDS, onde a formação de hélice é facilmente alcançada e a agregação tem uma influência marginal no processo de dimerização. Esses resultados podem ser racionalizados, avaliando-se a cinética inicial de formação do homodímero a partir de um ajuste linear dos dados obtidos nas primeiras quatro horas e meia de reação ($\Delta[\text{Htr}]/\Delta t$, Figura 3.31B, p. 89). Percebe-se, então, uma velocidade inicial 3,6 vezes maior para a reação conduzida em TFE:H₂O, em relação à reação conduzida no meio aquoso, ao passo que a reação realizada na presença de micelas de SDS apresenta uma velocidade inicial de dimerização que é 3,7 vezes maior que a da reação realizada na presença do co-solvente orgânico, *i.e.*, ela é 13,3 vezes mais eficiente que no meio aquoso. Nesse período, a maior eficiência da cinética inicial na reação em TFE:H₂O em relação à dimerização em meio aquoso pode ser atribuída à estruturação prévia das cadeias monoméricas nesse meio, o que não ocorre em meio aquoso, devido à dependência da formação de agregados para que a reação ocorra. Esses agregados certamente auxiliam a estruturação em hélice α , o que parece ser de grande importância para a dimerização (ver seção 2.1, p. 76 a 78, e Guimarães, 2013). Nesse sentido, estudos de RMN realizados pelos grupos de pesquisa da UFMG e da UFVJM mostraram que, em solução de TFE:H₂O (30:60, v/v), a cadeia monomérica Htr-M apresenta estruturação α -helicoidal com caráter anfipático. Entretanto, esse caráter é descontinuado pela presença do resíduo carregado de Lys-10 na face hidrofóbica da hélice, como pode ser visto na Figura 2.32A, p. 91 (Verly *et al.*, 2017). A importância estrutural dessa descontinuidade é prontamente reconhecida, ao se analisar a estrutura tridimensional de

RMN do homodímero, a qual apresenta estrutura terciária em super-hélice, que é mantida pelas interações hidrofóbicas inter-cadeias, além de interações iônicas entre o resíduo de Lys-10' de uma cadeia e os resíduos de Asp-5 e Ser-9 da outra cadeia (Figura 2.32B e C).

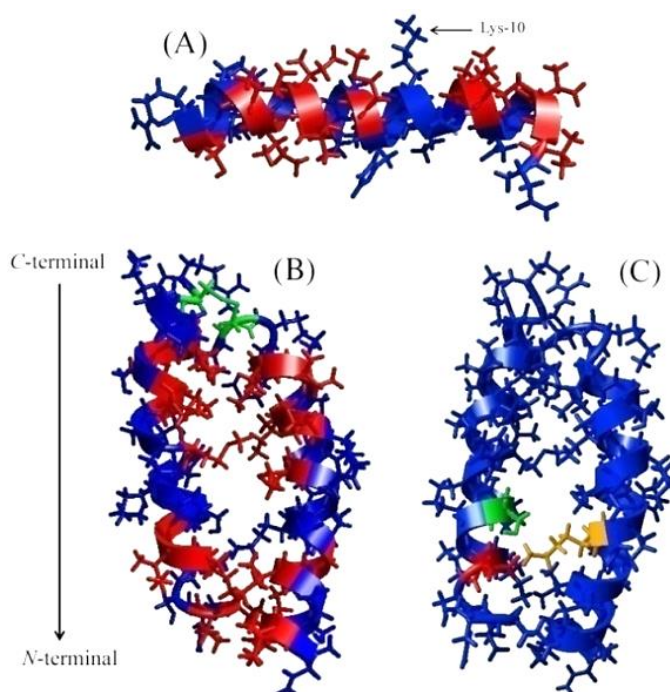


Figura 2.32: Estruturas de RMN da (A) Htr-M em solução de TFE:H₂O 30:60 e da (B e C) Htr em tampão fosfato aquoso, pH 7. Em (A) e (B) os resíduos hidrofóbicos são apresentados em vermelho e os hidrofílicos em azul, ao passo que em (B) o resíduo dimérico de cistina é destacado em verde. Em (C) os resíduos de Lys-10', Asp-5 e Ser-9, que estão envolvidos na interação iônica que estabiliza a super-hélice, são representados, respectivamente, em laranja, vermelho e verde, sendo os demais resíduos representados em azul. Adaptado de Verly *et al.*, 2017.

Tanto as interações hidrofóbicas quanto as iônicas envolvendo o resíduo de Lys-10' estão localizadas no interior da super-hélice e elas são propiciadas e maximizadas pelo arranjo α -helicoidal de cada uma das cadeias na estrutura do homodímero. Esses resultados estruturais, aliados aos dados de cinética de dimerização até aqui apresentados, sugerem que a estruturação prévia das cadeias monoméricas em TFE:H₂O (40:60, v/v) possibilitam, ao passo que duas hélices livres se aproximam, a formação dessas interações hidrofóbicas e iônicas. Essas interações inter-cadeia favorecem a formação de um complexo intermediário ativo (esquema da Figura 2.30, p. 87), o que parece diminuir a barreira energética a ser vencida durante o processo de formação da ligação dissulfeto. Isso pode explicar a cinética inicial de reação mais eficiente para a dimerização realizada em solução de TFE:H₂O, onde, no período de indução inicial, as cadeias monoméricas já se encontram estruturadas em hélice α e têm suas geometrias

otimizadas para que as interações inter-cadeia sejam favorecidas. Por outro lado, nenhum arranjo conformacional preferencial é observado em meio aquoso, o que torna a dimerização nesse meio mais dependente da formação de um estado agregado, que induza e auxilie na estruturação das cadeias de Htr-M, para que, a partir daí, ocorra uma orientação que possibilite a indução das interações inter-cadeias.

Curiosamente, os estudos de CD já tinham revelado um maior conteúdo de hélice quando se usou uma proporção TFE:H₂O (40:60, v/v, $H = 51\%$) em relação ao conteúdo obtido em TFE:H₂O (60:40, v/v, $H = 46\%$) – veja seção 2.1, p. 77. Esse comportamento já foi observado em outros estudos, que indicaram uma maior capacidade de formação de agregados entre moléculas de outros peptídeos em soluções contendo 40% de TFE, mostrando que esses agregados resultam na estabilização das estruturas helicoidais (Kuprin *et al.*, 1995; Gast *et al.*, 2001; Othon *et al.*, 2009; Anderson e Webb, 2012). Além disso, durante o monitoramento cinético da síntese da Htr por CLAE-FR em experimentos de dimerização da Htr-M previamente realizados pelos grupos de pesquisa da UFMG e da UFVJM, quando utilizadas maiores concentrações de monômero, notou-se a presença de um terceiro pico (além dos picos do dímero e do monômero) de intensidade variável, observado entre o período entre 12 e 48h de reação (Apêndice A1, p. 170 e Guimarães, 2013). As componentes referentes aos picos em tempos de retenção de 14,9 e 15,3 min foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os espectros obtidos foram muito semelhantes em relação aos valores de razão m/z , comprovando assim a presença de Htr-M ($[M + H]^+ = 2753,5$) e Htr ($[M + H]^+ = 5504,1$) nos dois picos cromatográficos, o que sugere a existência de agregado peptídico ao longo do processo de dimerização (Apêndice A2, p. 171 e Guimarães, 2013). Essa análise sugere a rápida formação de oligômeros resultantes da agregação entre moléculas do monômero Htr-M e do homodímero Htr na presença do co-solvente TFE, o que torna a cinética inicial mais eficiente em relação ao meio aquoso nas primeiras sete horas de reação. Esses resultados sugerem que a solução de TFE:H₂O (40:60) induz a formação instantânea desses arranjos diméricos ou oligoméricos, o que está relacionado a um período de maturação muito curto, em comparação com aquele observado para a reação em solução aquosa.

Todos os pontos discutidos acima sugerem que efeitos associados a interações inter-cadeia otimizadas e à agregação desempenham importante papel na cinética inicial de reação mais rápida em TFE:H₂O, quando comparada à cinética reacional em meio aquoso. A importância dessas interações inter-cadeias na síntese de peptídeos diméricos via formação de

ligação dissulfeto entre resíduos de cisteína pode ser reconhecida na síntese do peptídeo heterodimérico Dtn (Resende *et al.*, 2009). Esse peptídeo é formado por duas cadeias monoméricas distintas, conhecidas como cadeia monomérica 1 (CH1) e cadeia monomérica 2 (CH2) (Batista, C. V. F. *et al.*, 2001). Estudos de RMN (Raimondo *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2009) aliados a experimentos de cromatografia por exclusão de tamanho (Figura 2.29, p. 86) indicam que a Dtn existe como um dímero de dímeros em meio aquoso, que é estabilizada por interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos apolares, os quais se localizam na parte interna do feixe de quatro hélices (Figura 2.33). Surpreendentemente, quando se colocam as duas cadeias monoméricas para reagir, o que se observa é uma formação expressiva do heterodímero (CH1–CH2), ao passo que apenas proporções muito pequenas dos homodímeros (CH1–CH1 e CH2–CH2) são obtidas no processo (Resende *et al.*, 2009; Calce *et al.*, 2015). Estatisticamente haveria de se esperar a formação equimolar dos três dímeros; entretanto, a maior proporção obtida para o heterodímero em relação aos homodímeros indica que as interações inter-cadeia, responsáveis pela estabilização da estrutura do peptídeo nativo, exercem um papel catalítico muito importante no processo de formação da ligação dissulfeto, uma vez que essas interações existentes no feixe de quatro hélices da Dtn não são esperadas de ocorrerem nas estruturas dos respectivos homodímeros.

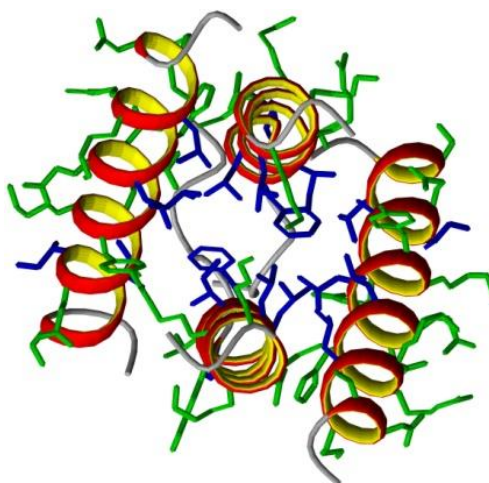


Figura 2.33: Estrutura de RMN da distinctina em meio aquoso [PDB 1XKM] (Raimondo *et al.*, 2005). Os resíduos hidrofílicos são apresentados em verde e os hidrofóbicos em azul. A estrutura de dímero de dímeros é estabilizada pelas interações hidrofóbicas existentes no interior do feixe de quatro hélices. Adaptado de Resende, *et al.*, 2009.

A despeito da cinética inicial mais eficiente para a dimerização na presença do co-solvente, pelos dados da Tabela 2.4, p. 89, a constante de velocidade global mostra que a

cinética de dimerização em meio aquoso ($k = 7,2$) é mais eficiente que a em TFE:H₂O ($k = 6,3$), o que permite inferir que as cadeias monoméricas Htr-M parecem envolver estados intermediários de orientação comparáveis nos instantes que precedem a dimerização. As cadeias livres de Htr-M em solução, em algum momento, se aproximam e são formadas interações que induzem à formação de vários agregados. Esse microambiente promove a formação de estruturas α -helicoidais e aumenta essas interações inter-cadeia, que orientam a formação da ligação de dissulfeto. A aparente necessidade da conformação (helicoidal) ativa para a dimerização faz com que a velocidade inicial para a reação em meio aquoso seja 4,0 vezes menor do que em TFE:H₂O, pois em água ocorre uma formação muito mais lenta dos agregados e das resultantes estruturas helicoidais. Entretanto, uma vez estabelecida a formação do estado agregado, a reação parece seguir uma ordem diferente, sendo a cinética da etapa de aceleração e, por fim, a cinética global, mais eficientes para a reação conduzida no meio aquoso (Figura 2.31, p. 89). A estrutura terciária em super-hélice da homotarsinina internaliza os resíduos hidrofóbicos, ao passo que a maioria dos resíduos hidrofílicos e carregados se encontram na porção externa do dímero, sendo estabilizados por interações eletrostáticas com as moléculas do solvente. Como o 2,2,2-trifluoroetanol possui uma constante dielétrica significativamente menor do que a da água, são esperadas interações solvente-peptídeo bem mais fortes no meio aquoso, de forma que interações de solvatação mais fortes podem diminuir a barreira energética da segunda etapa da reação (esquematizada na Figura 2.30, p. 87), acarretando em uma cinética global mais eficiente para esse meio.

Por outro lado, a cinética global da reação de dimerização da Htr-M na presença de micelas de SDS é 4,5 e 4,0 vezes mais eficiente do que a reação análoga feita em TFE:H₂O e em meio aquoso, respectivamente (Figura 2.31 e Tabela 2.4, p. 89). Conforme discutido anteriormente (seção 2.1, p. 76 a 79), a Htr-M também adota um arranjo α -helicoidal bem definido na presença de micelas de SDS, sendo esperada, portanto, a existência de efeitos similares aos mencionados para a síntese em TFE:H₂O, no sentido de que as interações inter-cadeia, que ocorrem durante a aproximação das mesmas, sejam importantes para a formação da ligação de dissulfeto. A despeito desses efeitos, a interação dos peptídeos com as micelas detergentes faz com que as cadeias monoméricas, adsorvidas nas micelas, estejam espacialmente próximas, o que implica em uma eficiência catalítica ainda maior. Considerando-se que as micelas de SDS em tampão Tris·HCl possui um raio de aproximadamente 1,75 nm (Duplâtre *et al.*, 1996), as faces hidrofóbicas estarão fisicamente próximas e serão forçadas a interagirem entre si, o que aumenta a eficiência da cinética em meio contendo micelas de SDS

e reflete no parâmetro global k significativamente maior (Figura 2.34, p. 95). Não obstante, a velocidade inicial $\Delta[\text{Htr}]/\Delta t$, bem maior na solução micelar (3,7 e 13,3 vezes mais rápida que em TFE:H₂O e que em água, respectivamente), indica um tempo de maturação extremamente curto, o que se deve justamente à aproximação das cadeias na estrutura micelar.

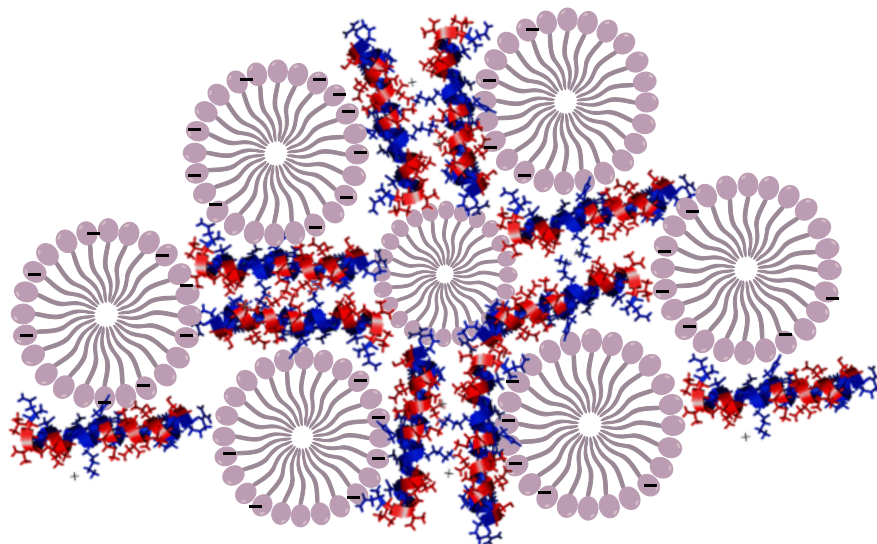


Figura 2.34: Interação das cadeias monoméricas Htr-M com as micelas de SDS. Ao permanecerem ligadas na superfície das micelas, as cadeias monoméricas estão espacialmente próximas e são forçadas a interagirem entre si, aumentando a eficiência catalítica desse meio na dimerização.

O percentual total de Htr formado (Htr_0) varia com a condição empregada e é de 65,2% para a dimerização em meio aquoso, 85,6% em TFE:H₂O e 60,0% na presença de micelas de SDS (Tabela 2.4, p. 89). Apesar de não ter se mostrado como o meio cineticamente mais rápido, a reação de dimerização em solução de TFE:H₂O (40:60, v/v) foi a que apresentou rendimento mais significativo dentre os meios testados. Acredita-se que o maior rendimento esteja diretamente relacionado ao efeito de agregação (Macphee *et al.*, 1997; Munishkina *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 2011; Ebanks, 2011) que ocorre até o final do período de aceleração, neste meio com constante dielétrica reduzida. Estudos de agregação realizados com a melitina, constituída por 26 resíduos de aminoácidos, indicaram que esse peptídeo apresenta maior grau de agregação em solução de TFE:H₂O (40:60, v/v), proporção na qual a helicidade do peptídeo também é máxima (Othon *et al.*, 2009). Entretanto, em proporções de TFE superiores a 50%, foi constatado que o tamanho dos agregados de melitina são relativamente menores. No caso da Htr-M, como consequência da oligomerização, ocorre uma aproximação adequada entre os resíduos de cisteína das cadeias monoméricas, favorecendo a formação da ligação de dissulfeto. Além disso, a formação desses agregados parece influenciar no direcionamento do equilíbrio,

no sentido da formação do homodímero (esquema da Figura 2.30, p. 87), já que maiores rendimentos são observados. Esses agregados podem se formar mesmo a pequenas concentrações do monômero, o que explica o maior rendimento da dimerização em TFE.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que, apesar de apresentar uma cinética mais rápida, a reação de dimerização conduzida na presença de micelas de SDS a $350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ levou a um rendimento da ordem de quase 10% menor que a reação conduzida em meio aquoso, sendo ainda esse valor menor (da ordem de 25%) que a reação conduzida em TFE:H₂O (40:60, v/v). Estudos de titulação do homodímero Htr em vesículas fosfolipídicas por Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS (Verly *et al.*, 2017), bem como estudos de RMN da interação do peptídeo com bicelas de DMPC:DHPC magneticamente orientadas realizados pelo grupo de pesquisa da UFMG, mostraram que, mesmo a concentrações muito baixas, o homodímero, além de interagir fortemente com as bicamadas lipídicas, provoca um desordenamento significativo do empacotamento das bicamadas (Barbosa, 2016). Isso sugere que o aumento gradativo da concentração de Htr no decorrer da síntese acarreta na perturbação expressiva do ordenamento das micelas de SDS, o que possivelmente leva, em uma concentração limite de homodímero, à estagnação do processo de dimerização. Após pouco mais de três horas de reação, alcança-se uma conversão limite do monômero no dímero de 60,0%, ponto a partir do qual não ocorre mais conversão expressiva no produto da reação (Figura 2.31 e Tabela 2.4, p. 89). Dessa forma, acredita-se que esse limite corte, que está associado a uma concentração do homodímero de aproximadamente $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, oblitera permanentemente o processo de dimerização, devido ao desordenamento imposto pelo dímero ao sistema micelar.

Para se confirmar essa proposta, foi também realizado neste trabalho um acompanhamento da cinética de dimerização em meio micelar, utilizando-se metade da concentração de Htr-M, *i.e.*, $18,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Surpreendentemente, obteve-se nesse ensaio um índice de conversão superior aos 60,0% obtidos anteriormente, a saber 70,9% (Figura 2.35, p. 97). Esse rendimento é mais alto que o obtido para a reação em meio aquoso (65,2%). Isso sugere que a perturbação do arranjo micelar por parte do homodímero (efeito descrito acima), impede o prosseguimento da dimerização, uma vez que a utilização de metade da concentração do monômero assegura que a concentração corte supracitada não seja alcançada.

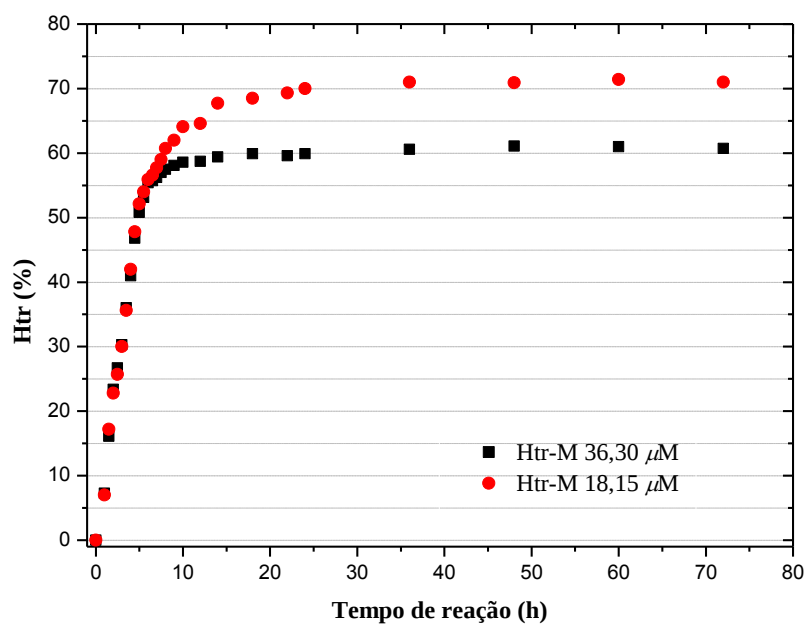


Figura 2.35: Percentual de conversão de Htr-M em Htr. Neste caso foi utilizada metade da concentração de síntese, *i. e.*, a 18,15 mmol·L⁻¹ (em preto). Em vermelho, a concentração de 36,3 mmol·L⁻¹ utilizada na síntese. Solução micelar de SDS 350 mmol·L⁻¹, tamponada com Tris·HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 8,5.

CAPITULO 3

SÍNTESE DE DERIVADOS GLICOTRIAZÓLICOS DAS FILOSEPTINAS 1, 2 E 3 E DA HILASEPTINA-1: EFEITOS DA GLICOSILAÇÃO NA INTERAÇÃO COM MEMBRANAS E NO POTENCIAL BIOLÓGICO

3.1 INTRODUÇÃO

Como resultado do crescente interesse mundial em peptídeos e proteínas, o conhecimento da relação entre estrutura e função dessas substâncias se tornou altamente difundido e atinge, a cada ano, um maior grau de maturidade. Contudo, sabe-se que a presença de carboidratos na estrutura de peptídeos e proteínas desempenha um papel fundamental em diversos processos envolvendo essas biomoléculas, seja no controle de propriedades estruturais e físico-químicas, seja em processos biológicos (Moradi *et al.*, 2016).

Atualmente, os glicopeptídeos de ocorrências naturais vancomicina, desmetilvancomicina, teicoplanina A2-2, avoparcina β , complestatina, ristocetina e actaplanina A são usados como antibióticos de escolha para o combate de muitos organismos patogênicos (Butler *et al.*, 2014). Paralelamente, os menos conhecidos e também naturais peptídeos glicosilados drosocina (Bulet *et al.*, 1993), pirrocoricina (Cociancich *et al.*, 1994), formaecinas (Mackintosh *et al.*, 1998) e dipterocinas (Bulet *et al.*, 1995), isolados de insetos, têm mostrado alta atividade antimicrobiana e, portanto, grande potencial para serem utilizados no combate à microrganismos patogênicos, quando comparados a suas formas não glicosiladas, enfatizando que a glicosilação pode ser muito importante para a atividade biológica.

Neste contexto, a ideia de incorporar um açúcar a peptídeos antimicrobianos pode levar a melhoras consideráveis em suas propriedades (Kosikowska e Lesner, 2016; Wenzel *et al.*, 2016) e, por isso, diferentes estratégias químicas têm sido desenvolvidas na tentativa de se estabelecerem ligações covalentes seletivas entre a unidade de carboidrato e a cadeia peptídica, permitindo os estudos estruturais e de interação, bem como as influências da glicosilação peptídica na sua função biológica (Dwek, 1998; Seitz, 2000; Sinclair e Elliott, 2005).

A glicosilação de proteínas e peptídeos costuma ser difícil de ser mimetizada por métodos químicos e tem sido intensamente aprimorada, tendo em vista a dificuldade de selecionar junções (“*links*”) glicosídicas, que possam ser estabelecidas numa cadeia peptídica

multifuncional (Nicotra *et al.*, 2007; Specker e Wittmann, 2007; Warren *et al.*, 2007). Assim, adaptações na SPFS podem ser consideradas, uma vez que essa metodologia emprega artifícios, que podem simplificar e tornar a preparação de alguma molécula glicosilada mais confiável. Isso possibilita que peptídeos, já minuciosamente estudados, possam ter suas formas glicosiladas obtidas e suas novas propriedades comparadas às das formas nativas. A SPFS tem, como algumas de suas vantagens, a rapidez e facilidade na condução da síntese, além da possibilidade de direcionar a reação para maiores rendimentos, com o uso de grande excesso de reagentes (Chan, W. C. e White, P. D., 2000; Galonic *et al.*, 2007)

Quando se pensa em uma metodologia a ser associada à SPFS, dentre as diversas possibilidades, a sua aplicação em combinação com a química “click” tem sido umas das propostas mais poderosas para se promover a ligação entre dois segmentos moleculares biologicamente ativos (Echemendía *et al.*, 2014; Tang e Becker, 2014; Ferreira *et al.*, 2015). Uma das propriedades mais interessantes da formação do 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído é o bioisosterismo entre esse regioisômero e a ligação amídica, o que os torna semelhantes na geometria e propriedades estruturais, estabilidade em relação a hidrólise, momento dipolar, oxidação e redução (Miller *et al.*, 2010). Esses resultados também puderam ser observados na primeira aplicação da reação CuAAC para formação de derivados peptídicos, utilizando-se a SPFS, quando Tornøe *et al.*, 2002, sintetizaram triazol-peptídeos e neoglicotriazol-peptídeos em um processo, que pode ser aplicado em reações com diferentes combinações entre azidas e alcinos, utilizando-se de variadas fontes de cobre (I) e de diferentes solventes, incluindo até mesmo o meio aquoso – Figura 3.36 (Tornøe, Christian W *et al.*, 2002; De Oliveira Freitas *et al.*, 2011).

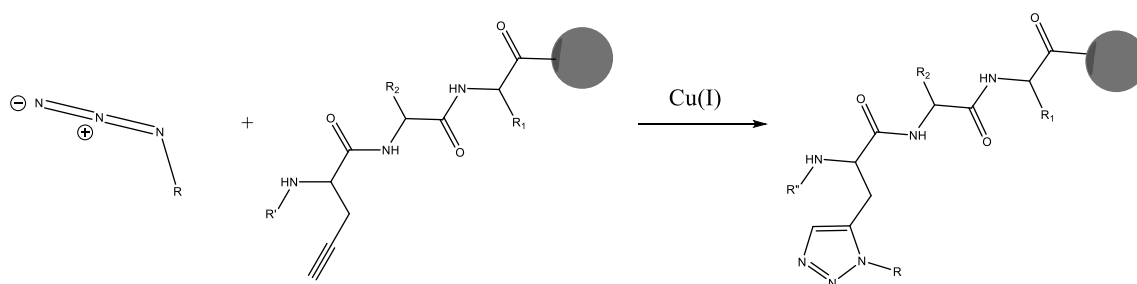


Figura 3.36: Representação esquemática da formação de triazol-peptídeos via CuAAC. Nessa reação, uma azida reage seletivamente com o alcino presente na cadeia peptídica, sob catálise do Cu(I), o que resulta na formação do derivado triazol-peptídeo correspondente.

Em 2001, K. B. Sharpless introduziu o termo “click” para descrever uma série de reações termodinamicamente estáveis, capazes de unir duas moléculas de forma simples e com altos

rendimentos (Kolb *et al.*, 2001). Em particular, as reações de cicloadições que envolvem uma azida e um grupo alcino preenchem muitos dos pré-requisitos da “química *click*”. Alcinos monossustituídos e azidas orgânicas estão disponíveis comercialmente, mas muitos outros derivados dessas substâncias podem ser facilmente sintetizados com ampla variedade de grupos funcionais. A partir do momento em que essas reações passaram a ser catalisadas por metais, como o cobre e o rutênio, a cicloadição azida-alcino passou a ser considerada como o protótipo ideal da reação “*click*”. Assim, embora a síntese de 1,2,3-triazóis já tenha sido estudada há vários anos (Kuijpers *et al.*, 2005), a descoberta relativamente recente realizada por Meldal e Sharpless quanto a mais famosa das reações “*click*”, a cicloadição [3+2] entre azidas e acetilenos catalisadas por Cu(I), CuAAC, contribuiu significativamente para a preparação eficiente de 1,2,3-triazóis 1,4-disubstituídos com considerável regioseletividade e, em geral, com elevados rendimentos (Tornøe, C. W. *et al.*, 2002). O catalisador dessa cicloadição é o Cu (I), podendo ser utilizados sais como o iodeto de cobre I (CuI), ou ainda sais de Cu(II) aliados ao uso de ascorbato de sódio, que atua como agente redutor, gerando o Cu(I) *in situ*. A adição de um leve excesso desse agente redutor previne a formação de alguns subprodutos a partir de homoacoplamentos oxidativos (Himo *et al.*, 2005).

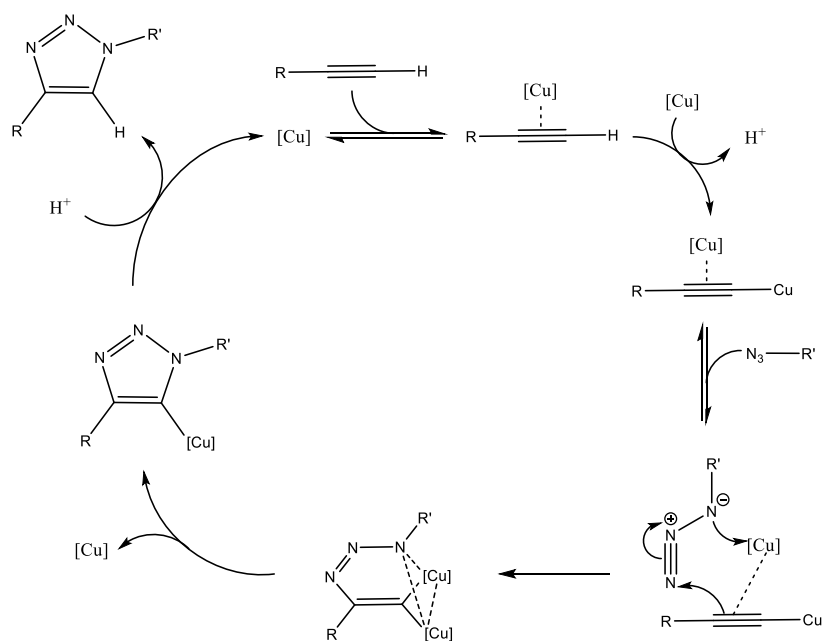


Figura 3.37: Mecanismo de reação da CuAAC. Esse mecanismo envolve a formação do intermediário acetileto de cobre, de um metalacido de cobre e um derivado triazolil de cobre, formando, por fim, o 1,2,3-triazol.

A Figura 3.37, representa o mecanismo da reação “*click*” de acordo com Worrell e Fokin *et al.*, 2013. O mecanismo proposto envolve a formação de um acetileto de cobre, que coordena

a azida para a formação de um metalaciclo de cobre de seis membros. Um segundo átomo de cobre interage e estabiliza esse metalaciclo. Depois de formado, esse metalaciclo tende a se contrair e rearranjar-se, culminando no derivado triazolil de cobre, que sofre uma protonólise, levando ao produto triazólico e fechando o ciclo catalítico (Worrell *et al.*, 2013).

No contexto da síntese de peptídeos, o emprego desse tipo de reação oferece pelo menos três importantes vantagens (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe, Christian W *et al.*, 2002; Kolb e Sharpless, 2003; Meldal e Tornøe, 2008; Kushwaha e Tiwari, 2013). A primeira está associada ao fato das unidades azida e alcino poderem ser incorporadas na sequência peptídica durante a síntese sem proteção, uma vez que ambos os grupos são estáveis e inertes às condições típicas das etapas de acoplamento e de clivagem envolvidas na Fmoc-SPFS, portanto, livres de produtos secundários. A segunda se relaciona ao ponto que azidas e alcinos reagem seletivamente um com o outro, de forma muito rápida e eficiente, quando na presença de catalisador. E a terceira é que, aparentemente, a CuAAC não é significativamente afetada por efeitos estéricos e eletrônicos. Mas mesmo assim, apesar de todas as facilidades, ainda são necessárias algumas modificações nas cadeias peptídicas, que sejam eficientes e seletivas, a fim de favorecerem a aplicação da reação "click" na SPFS. Esse conceito também tem sido largamente usado e, inclusive, com muito sucesso, na química de carboidratos (Aragão-Leoneti *et al.*, 2010).

Assim, em conexão com a busca por um processo de ligação rápida e eficiente entre açúcares e peptídeos, foi encontrado que resíduos de aminoácidos estrategicamente selecionados na cadeia peptídica podem ser substituídos por outros que apresentem modificações, de modo a favorecer a formação de uma ligação entre o açúcar e a cadeia peptídica (Wan *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2014). Neste contexto, este capítulo aborda a combinação entre a metodologia de SPFS e a reação CuAAC, para a preparação dos glicotriazol-peptídeos (GtP) derivados de representantes de duas famílias de PAMs: as filoseptinas, aqui representadas pelas filoseptina-1, -2 e -3 (PS-1, PS-2 e PS-3), e a família das hilaseptinas, aqui representada pela hilaseptina 1 (HSP1). A obtenção desses GtPs envolve a reação de um grupamento alcino estrategicamente inserido na cadeia polipeptídica dos referidos PAMs, com o grupamento azido inserido na estrutura de açúcares nas suas formas per-O-acetiladas.

A HSP1 é composta por catorze resíduos de aminoácidos e foi originalmente isolada da espécie de anuro *Hyla punctata*, que é comumente encontrado nas florestas úmidas do norte e nordeste do Brasil (Prates *et al.*, 2004). Embora o peptídeo nativo apresente uma carboxila na porção C-terminal, optou-se por sintetizar o peptídeo (HSP1-NH₂), bem como os respectivos derivados glicotriazólicos, com essa porção amidada, uma vez que essa modificação (natural ou não) tem promovido um aumento da atividade de diversos peptídeos antimicrobianos, segundo vários trabalhos relatados na literatura (Ali, Mohamed F *et al.*, 2001; Ali, M. F. *et al.*, 2001; Katayama, Hidekazu *et al.*, 2002; Katayama, H. *et al.*, 2002; Sforça *et al.*, 2004). A sequência primária desse PAM é mostrada, de acordo com o código de letras dos aminoácidos, na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Sequência primária da HSP1 na forma nativa (HSP1) e da sua forma amidada (HSP1-NH₂)

Peptídeo	Sequências primárias
HSP1	GILDA IKAIA KAAG
HSP1-NH ₂	GILDA IKAIA KAAG-NH ₂

*-NH₂: amidação C-terminal; pOAcGlc: D-Glicose per-O-acetilada; pOAcGlcNAc: N-acetilglicosamina per-O-acetilada; trz: anel triazólico.

A HSP1 não mostrou atividade hemolítica significativa e uma leve atividade contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Prates *et al.*, 2004). Por isso, a HSP1 foi um dos PAMs escolhidos nesse trabalho, pois representa um interessante protótipo para modificações químicas e se investigar o efeito da glicosilação na parte estrutural e também na interação e atividade biológica, sendo a inserção da unidade glicotriazólica realizada pela primeira vez nesse tipo de peptídeo (Junior, 2015).

Além da obtenção inédita da forma glicotriazólica da HSP1-NH₂, neste trabalho de tese, foram realizados vários experimentos, que visam investigar a parte estrutural e de interação, tendo sido utilizadas técnicas como a espectroscopia de dicroísmo circular (CD), de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e de fluorescência [que envolve o extravasamento de carboxifluoreceína (CF) a partir de vesículas fosfolipídicas], espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ), além de ensaios de atividade antimicrobiana.

As PS-1, PS-2 e PS-3 são peptídeos antimicrobianos naturalmente isolados da espécie de anuro *Phyllomedusa hypochondrialis*, sendo que as sequências nativas já apresentam a

porção C-terminal naturalmente amidada. Na Tabela 3.6 são apresentadas as respectivas sequências peptídicas.

Tabela 3.6: Sequência primária dos PAM's PS-1, -2 e -3 e dos seus respectivos glicotriazol-peptídeos obtidos

Peptídeo	Sequências primárias
PS-1	FLSLI PHAIN AVSAI AKHN-NH₂
PS-2	FLSLI PHAIN AVSTL VHHF-NH₂
PS-3	FLSLI PHAIN AVSAL ANHG-NH₂

*-NH₂: amidação C-terminal; pOAcGlc: D-Glicose *per-O*-acetilada; trz: anel triazólico.

Estudos estruturais e de interação desses PAMs com membranas biomiméticas têm sido realizados pelo grupo de pesquisa da UFMG (Resende *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2014) e, devido aos resultados obtidos, juntamente com a possibilidade de se potencializarem importantes propriedades, uma das propostas desta tese é a obtenção das formas glicosiladas desses PAMs, o que possibilitará a verificação da influência dessa modificação nas propriedades estruturais e das interações dessas moléculas quando em contato com a membrana.

Resultados de espectroscopia de CD e de RMN em solução indicaram que os três peptídeos nativos apresentam segmentos significativos de hélices anfipáticas, que se iniciam no 5º resíduo de aminoácido e se estendem até o 15º para a PS-3, até o 18º para a PS-1 e até a amidação C-terminal para a PS-2, ou seja, em termos de estabilidade estrutural, tem-se: PS-2 ≥ PS-1 > PS-3 (Resende *et al.*, 2008). Os sítios contendo os glicotriazóis foram criteriosamente selecionadas, com base nas estruturas tridimensionais e nas topologias dos peptídeos em bicamadas lipídicas determinadas por espectroscopia de RMN pelo nosso grupo de pesquisa. No caso da PS-3, será produzido o análogo glicosilado na porção C-terminal [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3. Como a PS-3 não apresenta conformação preferencial na porção C-terminal (Figura 3.38, p. 104), espera-se analisar o efeito da glicosilação em um possível ancoramento mais efetivo do peptídeo na membrana. Ao contrário das outras duas filoseptinas, a topologia da PS-1 apresenta um desvio da planaridade, devido à presença de um resíduo polar de Asn-19 ao longo da face hidrofóbica (Figura 3.38, p. 104), sendo que o derivado [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1 possibilita a investigação do efeito exercido pela glicosilação nessa posição tão crítica à topologia peptídica e, portanto, à interação peptídeo-membrana.

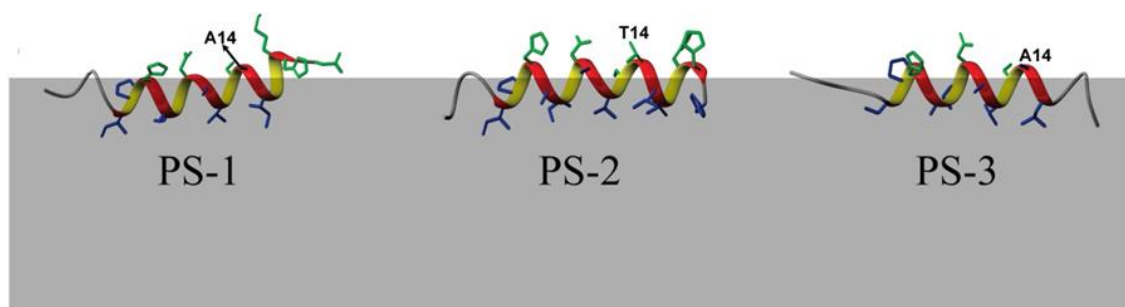


Figura 3.38: Topologias dos peptídeos filoseptina-1, -2, -3 reconstituídos em bicamadas lipídicas de POPC. Cadeias laterais de resíduos hidrofilicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A fração N-terminal aponta para a esquerda. As PS-2 e -3 apresentam alinhamentos perfeitamente paralelos à superfície da membrana, ao passo que a PS-1 apresenta certo desvio da planaridade, o que leva à remoção dos resíduos polares da porção C-terminal do interior da membrana. Os resíduos das posições 14 são destacados para acentuar os efeitos de balanço de anfipaticidade nas três sequências (ver texto). Figura extraída e adaptada de Resende *et al.*, 2014, com autorização da Elsevier (Anexo A6, p. 182).

Diferentemente da PS-1 e PS-3, que possuem resíduos hidrofóbicos de alanina na posição 14, a PS-2 possui um resíduo polar de treonina no respectivo sítio, sendo que essa diferença também confere à PS-2 uma maior anfipaticidade. Ressalta-se que essa diferença na sequência acarreta em diferenças topológicas associadas ao ângulo polar de rotação interna da hélice da PS-2, quando comparada às outras duas topologias peptídicas. Dessa forma, a glicosilação proposta [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 possibilitará avaliar o efeito da inserção dessa unidade glicosídica nessa posição importante para a interação do peptídeo nativo com a membrana. Vale ressaltar que a síntese desses peptídeos na sua forma glicosilada é inédita, fornecendo, assim, resultados bastante relevantes na área da síntese de peptídeos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Geral

Promover a síntese de glicotriazol-peptídeos, utilizando a combinação da Fmoc-SPFS e da CuAAC. Uma unidade de carboidrato será conectada às cadeias polipeptídica dos PAMs PS-1, PS-2, PS-3 e HSP1-NH₂, através de um *link* triazólico. Serão avaliadas as influências dessa unidade glicotriazólica na estruturação, na interação com meios miméticos e no potencial biológico desses peptídeos.

3.2.2 Específicos

- i. Síntese dos azido-açúcares per-*O*-acetilados modificados com uma azida N₃-Glc e N₃-GlcNAc.
- ii. obter, via estratégia Fmoc-SPFS, os peptídeos em suas formas nativas e nas formas contendo o derivado de aminoácido propargilglicina (Pra) inserido na cadeia peptídica.
- iii. aplicar a reação CuAAC para a obtenção dos glicotriazol-peptídeos.
- iv. realizar experimentos biofísicos para obtenção de dados estruturais e de interações com sistemas miméticos de membranas de todos os peptídeos e GtPs sintetizados. Para tal, serão utilizadas as seguintes técnicas:
 - a. espectroscopia de Dicroísmo Circular;
 - b. espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície;
 - c. espectroscopia de Fluorescência
 - d. espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta
 - e. Calorimetria de Titulação Isotérmica
- v. verificar o potencial biológico da HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ em experimentos de atividade antifúngica e antibacteriana;
- vi. Avaliar o papel de cada motivo estrutural adicionado à cadeia peptídica da HSP1-NH₂, no mecanismo de ação antifúngica.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Síntese dos Azido-Açúcares Per-*O*-acetilados

Foram sintetizados os açúcares modificados 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-deoxi- β -D-glicopiranosose (N₃-Glc per-*O*-acetilado) e o 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-dideoxi- β -D-glicopiranosose (N₃-GlcNAc per-*O*-acetilado). Todos os detalhes e dados analíticos dos intermediários e dos açúcares modificados podem ser encontrados na literatura (Franco *et al.*, 2015). As sínteses desses azido-açúcares foram feitas em colaboração com o Dr. Lucas Lopardi

Franco, sob coordenação do Professor Ricardo José Alves, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, UFMG.

3.3.2 Síntese dos Peptídeos, Triazol-Peptídeo e dos Glicotriazol-Peptídeos

Acoplamento e desproteção

A HSP1-NH₂ e a HSP1-NH₂ propargilada ([Pra¹]HSP1-NH₂) (aproximadamente 0,300 mmol) foram sintetizadas em colaboração com o MSc. Eduardo Coelho Junior, do Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB), da UFVJM, Diamantina, MG. As PS-1, 2 e 3 e suas formas propargiladas [Pra¹⁹]PS-1, [Pra¹⁴]PS-2 e [Pra¹⁹]PS-3 (aproximadamente 0,120 mmol) foram sintetizadas no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos – LASEP, do Departamento de Química da UFMG. Todos esses peptídeos foram obtidos com a porção C-terminal amidada e suas formas propargiladas foram obtidas pela substituição do resíduo de aminoácido selecionado por um resíduo de L-propargilglicina (Pra), via estratégia Fmoc-SPFS, conforme metodologia descrita no Capítulo 2, seção 2.3.1, p. 79.

Reação CuAAC

As reações CuAAC foram feitas na própria seringa onde se realiza a SPFS, conforme mostrado na Figura 3.39.

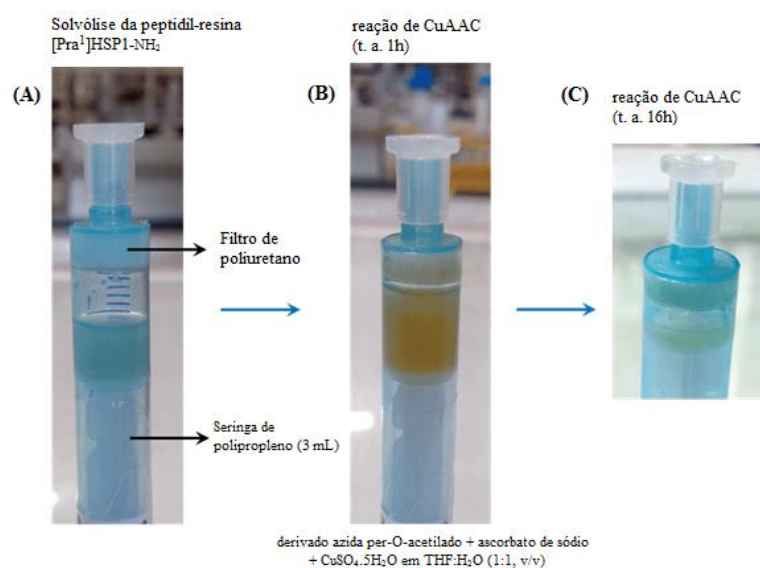
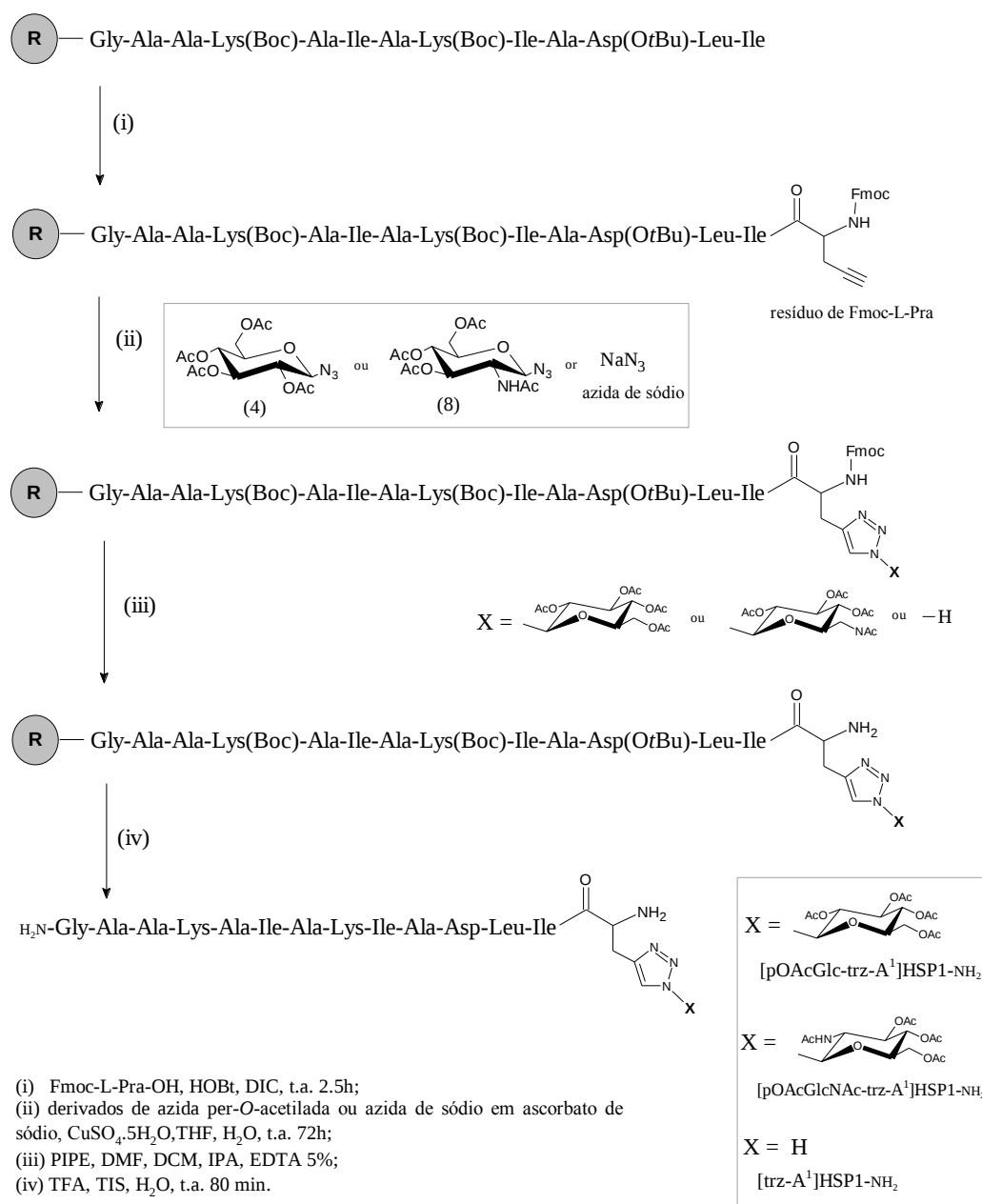


Figura 3.39: Processo realizado na síntese dos GtPs. (A) Peptidil-resina na presença de DCM:DMF (1:1, v/v) antes da reação de CuAAC, (B) solução reacional para a reação CuAAC e (C) depois da reação e ciclos de lavagem.

Os glicotriazol-peptídeos [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2, [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3 e o derivado triazólico [trz-G¹]HSP1-NH₂ foram obtidos pela CuAAC, utilizando o respectivo derivado azida per-*O*-acetilado da glicose (N₃-Glc) ou N-acetilglicosamina (N₃-GlcNAc), ou azida de sódio (Na N₃) na presença de sulfato de cobre (II) penta hidratado (CuSO₄·5H₂O) e ascorbato de sódio como agente redutor, como mostrado no Esquema 3.2 (o esquema ilustra o processo para todos os derivados peptídicos).



Esquema 3.2: Representação das etapas sintéticas para a obtenção dos glicotriazol-peptídeos e do triazol-peptídeo. Esse esquema utilizou como exemplo a cadeia peptídica da [Pra¹]HSP1-NH₂, no entanto, os outros derivados foram glicosilados em posições distintas.

A seguintes soluções foram adicionadas na própria seringa contendo, individualmente, todas as peptidilresinas com os derivados propargilados ($[Pra^1]XXX$ -peptidil-resina) e com as cadeias laterais protegidas: (a) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,5 equiv.) em 0,5 mL de água, (b) ascorbato de sódio (0,6 equiv.) em 0,5 mL de água, e (c) a solução dos respectivos derivados azida per-O-acetilados (1,8 ou 2,4 equiv.) ou de azida de sódio (1,8 equiv.) em aproximadamente 1,0 mL de THF (tetraidrofurano) – Figura 3.39B, p. 106. A mistura reacional foi, então, agitada em agitador do tipo Vórtex (450 rpm) a temperatura ambiente por 48h. Depois disso, os glicotriazóis-peptidilresina e o triazol-peptidilresina foram filtrados e lavados com uma solução aquosa contendo 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 25% NH_4OH (3 x 3 mL) em água destilada (3 x 3 mL), que foi seguido por três lavagens alternadas com DMF e álcool isopropílico (IPA, 3 x 3 mL cada) e finalmente três lavagens com DCM (3 x 3 mL, Figura 3.39C, p. 106).

Para a clivagem dos peptídeos, triazol-peptídeo ou dos glicotriazol-peptídeos da resina, empregou-se metodologia muito similar à já descrita no Capítulo 2 (seção 2.3.1, p. 80), sendo apenas a solução de clivagem modificada para TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5, v/v), uma vez que não há necessidade do uso de EDT, devido à ausência de resíduos de cisteína (Chan, W. e White, P. D., 2000). Todos os produtos foram caracterizados e purificados por CLAE-FR (Varian ProStar[®] 640 ou 210, com detector na região do ultravioleta modelo ProStar[®] 335, Walnut Creek, EUA) em coluna semi-preparativa KINETEX[®] C18 fase-reversa 5 μ (250 x 10 mm, 100Å, Califórnia, EUA) ou VYDAC[®] 218TP C18 fase-reversa (250 x 10 mm, Grace Corporate, Columbia, Maryland, EUA) equilibrada com 0,1% de solução aquosa de TFA e eluída com um gradiente linear de 0,08% TFA em ACN. Um fluxo de 2,0 mL·min⁻¹ ou 2,5 mL·min⁻¹ foi usado e os peptídeos, triazol-peptídeo ou os glicotriazol-peptídeos detectados a 214 nm.

Os produtos purificados foram caracterizados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, usando um espectrômetro Bruker Daltonics[®] Ultraflex *Extreme* III ou Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), pertencentes, respectivamente, ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e à EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Alíquotas das frações obtidas da purificação cromatográfica foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF nos modos MS para todas as substâncias sintetizadas neste trabalho e MS/MS para as filoseptinas. Os instrumentos são equipados com Laser Smartbeam[™] operados em modo positivo e controlados pelo *software Flex Control 3.0*

(Bruker Daltonics, Bilerica, EUA). As alíquotas foram misturadas em uma solução supersaturada de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) – matriz/peptídeo 5:2 (v/v) - diretamente em placas MTP AnchorChipTM 400/384 ou 800/384 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e secadas à temperatura ambiente. Para a determinação da massa monoisotópica na faixa de 500 a 5000 Da foi utilizado o modo refletido com calibração externa, empregando-se o padrão de calibração de peptídeos indicado pelo fabricante (*Peptide Calibration Standard*, Bruker Daltonics, Bilerica, EUA). Para visualização dos resultados foi utilizado o software Flex Analysis 3.0. O modo MS/MS, visando a fragmentação dos íons precursores (espectrometria de massas sequencial), foi realizado por meio da aceleração dos precursores de 3.6 kV. A fragmentação dos íons ocorreu na célula de *LIFT* com aceleração de 19 kV. Os espectros foram visualizados e processados no software *Flex Analysis* 3.0 e a estrutura primária dos peptídeos e dos GtPs foram interpretadas manualmente por sequenciamento *de novo* dos espectros obtidos nas análises de MS/MS no *software* PepSeq (Garrett e Grisham, 1995).

3.3.3 Preparação das Vesículas Fosfolipídicas

Para a preparação das vesículas, foram utilizados os fosfolipídios POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol), ambos da Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, EUA). Para os experimentos com a HSP1-NH₂ e derivados, foram preparadas vesículas contendo também o ergosterol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) na razão molar de 3:1:1 (POPC:POPG:ergosterol). No caso das PS-1, -2, -3 e derivados, apenas vesículas POPC:POPG em uma razão molar de 3:1 foram preparadas.

Para as preparações, os respectivos fosfolipídios foram diluídos em clorofórmio, que foi logo removido por evaporação rotativa a pressão reduzida, resultando em um filme fino, o qual foi hidratado com uma solução tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹ com 20 mmol·L⁻¹ de NaCl (pH 8,0) ou tampão fosfato 10 mmol·L⁻¹ com 20 mmol·L⁻¹ de NaCl (pH 5,9). Para a obtenção das LUVs, submeteu-se a suspensão para extrusão (cerca de 11x) através de uma membrana de policarbonato de 100 nm em um mini-extrusor (Avanti[®], Polar Lipids Inc., AL, EUA).

Para os ensaios de extravasamento, a inserção da 5(6)-carboxifluoreceína (CF, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) em 1 mmol·L⁻¹ de LUVs foi realizada pela hidratação do fino filme com uma solução tampão contendo 10 mmol·L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,0) e 5 mmol·L⁻¹ de CF. A CF livre foi removida passando-se 1 mL das LUVs extrusadas através de uma coluna Sephadex-G25 (1.2 x 10 cm), com solução eluente tampão 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0) contendo 200

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$. As LUVs foram coletadas no volume morto (V_0) e o total do conteúdo de fosfolípidios das LUVs eluídas foi determinado por um método colorimétrico como o descrito na literatura (Stewart, 1980).

3.3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os experimentos de CD foram realizados em solução aquosa de tampão Tris-HCl $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0, contendo NaCl a $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou de tampão fosfato aquoso $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5,9, contendo NaCl a $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Foram também realizados experimentos na presença de LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1, razão molar) para a HSP1-NH₂ e POPC:POPG (3:1, razão molar) para as PS-1, PS-2, PS-3 e seus respectivos glicoderivados ($25,0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para concentrações de fosfolípidios que foram de 0 a $5,0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os espectros de CD com as preferências da estrutura secundária das cadeias peptídicas foram obtidos a 20°C para a HSP1-NH₂ ou 25°C para as PS-1, PS-2, PS-3 e seus respectivos glicoderivados no espectropolarímetro Jasco-715 (Jasco, Tóquio, Japão), acoplado a uma unidade de controle de temperatura Jasco PFD-425S Peltier, usando uma cubeta de quartzo retangular de caminho ótico 1,0 mm (Uvonic *Instruments*, Plainview, NY, EUA), pertencente ao Laboratório de espectroscopia do Departamento de Química da UFMG. Todos os espectros foram obtidos com oito varreduras de 260 a 190 nm (ou 195 nm), utilizando os seguintes parâmetros: 0,5 de largura de banda, 0,2 nm de resolução de leitura de elipticidade e $100\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ de velocidade de varredura, com 4 s de tempo de resposta. Experimentos similares com a solução dos respectivos brancos foram também realizados para permitir a subtração do espectro. Os espectros foram analisados utilizando o software CDPro (Sreerama, N. e Woody, R. W., 2000; Sreerama e Woody, 2004).

3.3.5 Medidas de Extravasamento de Marcador Químico Incorporado em Vesículas Fosfolipídicas

Medidas de liberação de CF foram realizadas para LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1, razão molar) na presença da HSP1-NH₂ ou de seus derivados triazol-peptídico ou glicotriazol-peptídicos. Alíquotas de LUVs ($150\text{ }\mu\text{L}$) foram adicionadas a micro-poços de poliestireno (dimensões 128 x 86 x 14,5 mm) para a medida da emissão de fluorescência em meio contendo $100\text{ }\mu\text{L}$ do peptídeo e dos seus derivados no mesmo tampão usado na etapa de eluição em coluna Sephadex-G25 para a preparação de vesículas em encapsuladas com CF (veja

seção 3.3.3, p 109). O aumento da fluorescência como uma função do tempo a 25 °C foi continuamente obtida em uma plataforma de detecção Spectra Max[®] Paradigm (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, EUA), usando $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$. A fluorescência total de CF (máximo de extravasamento) foi determinado por um experimento similar, usando 100 μL de 5% (m/v) de Triton-X 100. O percentual de CF extravasada foi determinado como previamente descrito na literatura (Alvarez *et al.*, 2003; Verly *et al.*, 2008).

3.3.6 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta (ζ)

Os experimentos de DLS e o potencial zeta (ζ) foram realizados a 25 °C em analisador de partícula Malvern Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Reino Unido). As medidas do diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e do ζ das LUVs puras e ligadas aos peptídeos ou derivados foram feitas usando uma célula quadrada de polietileno. As soluções foram submetidas ao espalhamento com uma luz monocromática (laser de 10 mW He-Ne, 632,4 nm de comprimento de onda) e a intensidade de espalhamento foi medida a um ângulo de 90°. O D_h e o ζ foram determinados pela média de cinco medidas independentes, cada uma obtida como a principal de 30 contagens. Soluções de LUVs de (a) 1,0 mmol·L⁻¹ de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1, razão molar) em solução aquosa de tampão Tris-HCl (10 mmol·L⁻¹, pH 8,0, com 200 mmol·L⁻¹ de NaCl) foram tituladas com soluções estoques de 1,0 mmol·L⁻¹ de peptídeo ou glicotriazol-peptídeo preparado no mesmo tampão. A titulação foi conduzida pela adição de 5 ou 10 μL da solução titulante até alcançar o índice de polidispersividade (PDI) de 0,3.

3.3.7 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície

As medidas de SPR foram realizadas em comprimentos de onda de 670 e 850 nm, simultaneamente, em um instrumento SPR Navi[™] 200 (BioNavis Ltd., Ylöjärvi, Finlândia), pertencente ao Departamento de Química da UFVJM, Diamantina, MG. Os experimentos foram realizados a 25 °C e o fluxo para a imobilização das LUVs e para as interações dos peptídeos foi de 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Os experimentos foram realizados, empregando-se o sensor chip SPR SiO₂ (SPR102-SiO₂), que foi lavado *in situ* num canal de fluxo com injeções sequenciais a cada 5 minutos, com 5% de solução Hellmanex[®] III (Sigma, St Louis, MO, EUA), 2-propanol e água Milli-Q[®], imediatamente antes de cada experimento. Para cada medida de SPR, o sensor chip foi primeiro submetido a uma corrida com tampão (Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,0, com

20 mmol·L⁻¹ de NaCl) e então a uma solução 1,0 mmol·L⁻¹ POPC:POPG:ergosterol (3:1:1, razão molar) durante aproximadamente 10-15 min, até alcançar a estabilidade da linha de base. Os experimentos consistiram de injeções de 250 µL de soluções de HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ em diferentes concentrações (7,5 – 120 µmol·L⁻¹, no fluxo de tampão) nos dois canais de fluxo por 10 minutos para a estabilização. Os parâmetros (*d*) de espessura e a constante de associação (*K_a*) das interações peptídeo-membrana foram obtidos pelo uso do software TraceDrawer v.1.6 (Ridgeview Instruments AB, Vänge, Suécia).

Para a quantificação do conteúdo fosfolipídico das soluções de LUVs, as amostras de SPR foram coletadas durante 5 min, imediatamente depois de cada injeção de fosfolípido. Essas amostras foram adicionadas a 1,2 mL de solução aquosa de ferrotiocianato de amônio e 1,5 mL de clorofórmio. O sistema bifásico foi vigorosamente agitado por 1,0 min. A fase inferior de clorofórmio foi coletada com pipeta de vidro e transferida para outro tubo. Sulfato de sódio anidro foi usado para remover a água residual antes da medida. A quantificação de fosfolípidios foi realizada em um espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-Vis (Walnut Creek, CA, EUA).

3.3.8 Calorimetria de Titulação Isotérmica

As análises ITC foram realizadas a 25° C em microcalorímetro VP-ITC da Malvern® (Malvern, Reino Unido), pertencente ao Departamento de Química da UFVJM, Diamantina, MG. A calibração do equipamento foi realizada com água Milli-Q® tipo 1 e em software Microcal Origin® 7.0, presente no próprio equipamento. As soluções utilizadas foram previamente desgaseificadas em acessório Microcal Thermovac® da marca Malvern (Malvern, Reino Unido).

Cada experimento consistiu de 20 injeções sucessivas de 10,0 µL de titulante (20 mmol·L⁻¹ POPC:POPG 3:1) na cela de reação preenchida com 1,4 mL de solução de peptídeo ou de seus derivados (50,0 µmol·L⁻¹), em intervalos de 300 s. Para eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula calorimétrica, foi descartada a primeira injeção de 1,0 µL. Experimentos para a obtenção dos calores de diluição foram realizados por injeções das LUVs no tampão fosfato 10 mmol·L⁻¹ com 20,0 mmol·L⁻¹ de NaCl, pH 5,9, que foi utilizado em todas as amostras desse experimento.

Os dados e as isothermas obtidas para cada análise foram tratados e analisados no software do próprio equipamento Microcal Origin[®] 7.0 para ITC, descontando os experimentos de diluição.

3.3.9 Ensaios Antimicrobianos

Ensaios antibacterianos

As atividades antibacterianas da HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ foram investigadas frente a quatro cepas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA), a saber: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (29313), *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 e *Escherichia coli* ATCC 25992. Os microrganismos foram cultivados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Farmácia da UFVJM em Diamantina, MG, tendo sido esses experimentos conduzidos em colaboração com as Professoras Helen Matos e Kelly Kato. Os microrganismos em cultura estacionária a 35 °C foram transferidos para meio líquido Mueller-Hinton, de acordo com o guia da *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Wright *et al.*, 1984). A mais alta concentração de peptídeo usada foi de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em um inóculo inicial de $5,0 \times 10^5$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$ (unidade formadoras de colônia $\cdot\text{mL}^{-1}$). Os peptídeos foram dissolvidos em até oito vezes no caldo Mueller-Hinton por diluição seriada, até a concentração de 3,175 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O volume final foi de 100 μL por poço, 50 μL de peptídeo e 50 μL de inóculo. O experimento foi realizado em cultura estacionária a 35 °C e as leituras espectrofotométricas foram realizadas depois de 12 h de incubação. A concentração inibitória mínima (MIC, do inglês, *minimal inhibitory concentration*) foi determinada, baseando-se em três medidas independentes, usando o parâmetro de densidade ótica ($A_{595\text{ nm}}$) obtido em uma plataforma de detecção SpectraMax[®] Paradigm (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EUA). O MIC do antibiótico convencional cloranfenicol foi também determinado contra as três cepas de bactérias. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Ensaios Antifúngicos

As atividades antifúngicas da HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ foram investigadas contra três cepas de fungos da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA), a saber: *Candida tropicalis* (ATCC[®]28707), *Candida parapsilosis* (ATCC[®]22019) e *Candida krusei* (ATCC[®]34135). Os

microrganismos foram cultivados no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Farmácia da UFVJM, Diamantina, MG, tendo sido esses experimentos conduzidos em colaboração com as Professoras Helen Matos e Kelly Kato. A cultura de células foi crescida a 35°C em caldo *Sabouraud* dextrose (Sigma-Aldrich) sob leve agitação e com pH ajustado para 7,0, usando RPMI 1640 tamponado com ácido 4-morfolinopropanosulfônico (3-morfolina-4-ilpropano-1-sulfonato, MOPS).

O MIC foi obtido a partir do ensaio de micro diluição, de acordo com a NCCLS 2002, contra as três cepas de *Candida spp.* As colônias de inóculo foram suspendidas em 5,0 mL de solução salina estéril ($0,145 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e a concentração foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland de leitura (densidade ótica) a 530 nm em um espectrofotômetro utilizando uma plataforma de detecção SpectraMax[®] Paradigm (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EUA). A suspensão de trabalho foi diluída de 1:50, seguida por uma diluição de 1:20 em meio RPMI-1640, resultando em uma margem de concentração de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. A suspensão de levedura foi plaqueada em 96 poços estéreis (50 μL /poço) pela adição de soluções já testadas (50 μL de solução de droga antifúngica preparada de 2x a concentração final), que foram incubadas a 35°C por 48 h, para obter a densidade ótica a 595 nm. A anfotericina B ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a 5-fluorocitosina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram usadas como controles e seus MICs foram também determinados. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

3.3.10 Biossíntese de Ergosterol

Os esteróis intracelulares totais foram extraídos como descrito por Lamrood e colaboradores (Lamrood, 2009), mas com uma leve modificação na colônia de *C. krusei* incubada *overnight* em cultura em placa de ágar *Sabouraud* dextrose (Difco, Detroit, MI), contendo 64 μg ou 128 μg de HSP1-NH₂ (49 e $98 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), [trz-A¹]HSP1-NH₂ (46 e $92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ (37 e $74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ (37 e $74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) para cada mL. As células foram separadas por centrifugação e tratadas por saponificação em 50% de etanol, contendo 15% de KOH por 2 h sob refluxo. Depois da adição de dois volumes de água, os lipídeos não saponificáveis (NSL, do inglês, *non saponifiable lipids*) foram extraídos três vezes com éter de petróleo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), na faixa de 40 a 60 °C. A camada orgânica extraída foi lavada com água, secada *overnight* em sulfato de sódio anidro, filtrada e levada ao evaporador rotatório. A porção de NLS foi dissolvida em cicloexano e estocada a -20 °C na ausência de luz. Primeiramente, uma alíquota

de 20 μL de esterol extraída foi diluída em etanol puro e a absorbância foi escaneada entre 240 nm e 300 nm, em um espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-Vis (Walnut Creek, EUA). Para as análises quantitativas, o método de quantificação de esteróis (SQM, do inglês, *sterol quantitation method*) foi aplicado, como descrito por Arthington-Skaggs e colaboradores (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999), que indica o conteúdo de ergosterol e do 24(28)dehidroergosterol (DHE – um intermediário esterol da etapa final), de acordo com as equações:

$$\% \text{ ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE} = [(A_{281.5}/290) \times F]/\text{peso pellet}, \quad (3.1)$$

$$\% 24(28)\text{DHE} = [(A_{230}/518) \times F]/\text{peso pellet}, \quad (3.2)$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE}] - \% 24(28)\text{DHE}, \quad (3.3)$$

onde F é o fator de diluição em etanol.

3.4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nesta seção, primeiramente serão apresentados e discutidos os resultados dos GtPs derivados do peptídeo antimicrobiano HSP1-NH₂ e, em seguida, os resultados referentes aos GtPs derivados das PS-1, -2 e -3.

3.4.1 Síntese dos Azido-açúcares per-*O*-acetilados

Os açúcares modificados 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-deoxi- β -D-glicopiranosose (N₃-Glc per-*O*-acetilado) e 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-dideoxi- β -D-glicopiranosose (N₃-GlcNAc per-*O*-acetilado) foram sintetizados e identificados por espectroscopias no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e de RMN, como mostrado na referência Franco *et al.*, 2015.

3.4.2 Glicotriazol-peptídeos Derivados da HSP1-NH₂: Síntese, Estudos Biofísicos e Avaliação do Potencial Biológico

3.4.2.1 Síntese do Peptídeo e seus Derivados

Os peptídeos na sua forma carbóxi-amidada HSP1-NH₂ e seu derivado propargilado [Pra¹]HSP1-NH₂ foram sintetizados pela estratégia Fmoc-SPFS e suas identidades foram confirmadas por espectrometria de massa, como mostrado na Figura 3.40, p. 116.

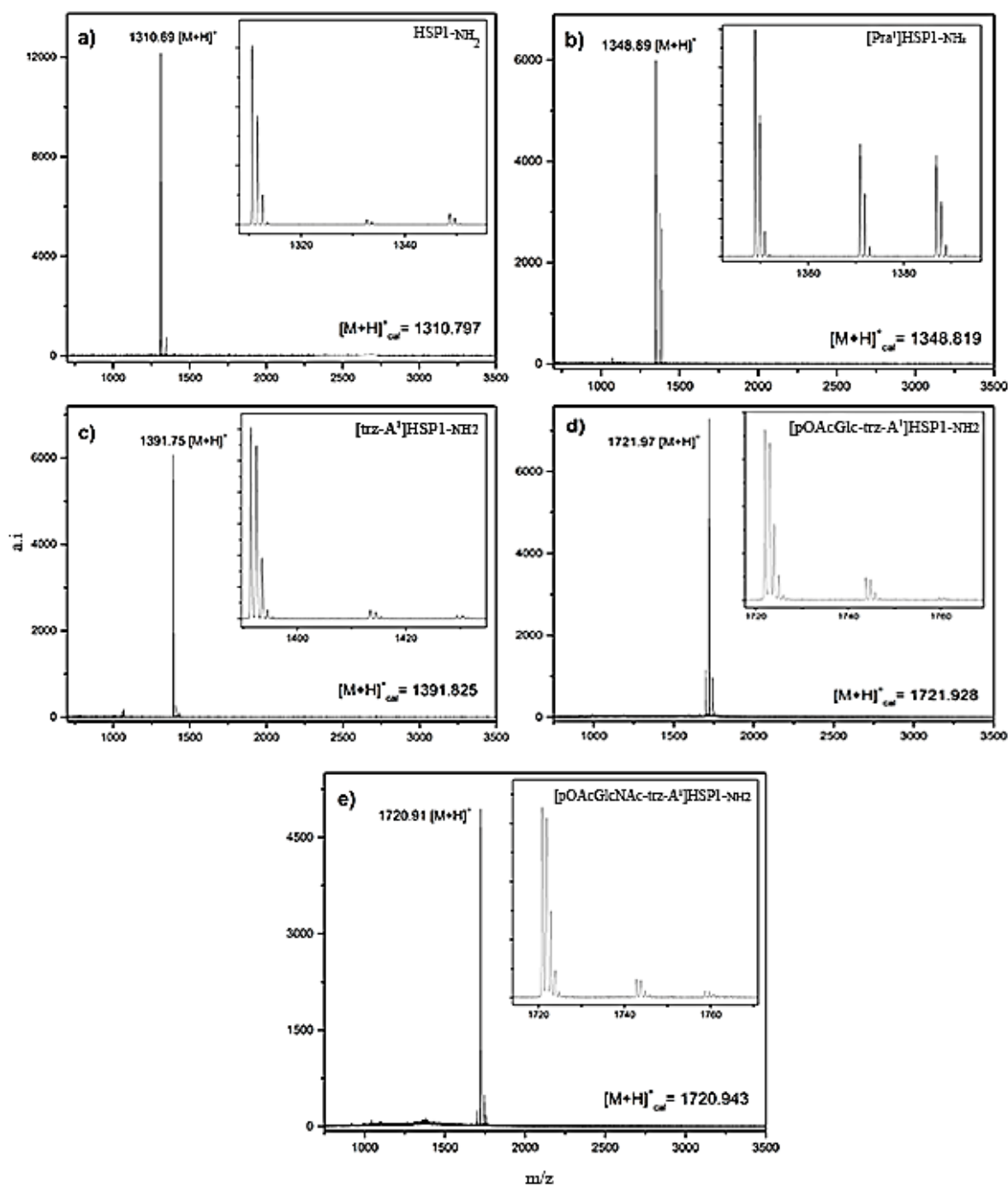


Figura 3.40: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada dos produtos sintéticos HSP1-NH₂ e de seus derivados. Os $[M+H]^+$ foram obtidos com valores próximos dos valores teóricos calculados para todas as moléculas. (a) HSP1-NH₂, (b) [Pra¹]HSP1-NH₂, (c) derivado triazol [trz-A¹]HSP1-NH₂, produtos glicosilados (d) [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e (e) [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂. $[M+H]^+_{cal}$ correspondem à m/z teórica.

Os derivados [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ foram sucessivamente obtidos pela reação CuAAC, usando CuSO₄·5H₂O/ascorbato de sódio. A cadeia peptídica foi sintetizada em uma seringa adaptada

com um filtro de poliuretano, como mostrado na Figura 3.39, p. 106. Antes da adição dos reagentes para realização da reação CuAAC, a peptidil-resina mostrou uma cor levemente amarelada (Figura 3.39A, p. 106). No entanto, sob a adição da solução reagente, os grânulos da peptidil-resina imediatamente adquiriram uma cor marrom escura (Figura 3.39B, p. 106), que estava provavelmente relacionada à agregação/acumulação dos azido-sacarídeos protegidos na superfície da peptidil-resina. Na realidade, a evolução da reação de glicosilação apresentava uma evidência visual, que se trata do desaparecimento dessa coloração marrom escura, tendo, depois de 16 h de reação, a peptidil-resina adquirido sua coloração inicial levemente amarelada (Figura 3.39C, p. 106). Todos os produtos derivados do triazol foram purificados por CLAE-FR semi-preparativa e suas purezas (> 98%) foram verificadas por CLAE-FR e por espectrometria de massa (Figura 3.40C, D e E, p. 116). O rendimento da reação foi de aproximadamente 80% para o preparo das HSP1-NH₂ e [Pra¹]HSP1-NH₂ e de aproximadamente 75% para os [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂.

3.4.2.2 Ensaios Antibacterianos e Antifúngicos

As atividades do peptídeo HSP1-NH₂ e dos seus derivados [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ foram verificadas por ensaios contra cepas de bactérias *Gram*-positivas (*S. aureus* e *S. agalactiae*) e *Gram*-negativas (*P. aureginosa* e *E. coli*) e comparadas com o antibiótico convencional cloranfenicol (controle positivo). Todos os peptídeos mostraram atividade antibacteriana, exceto contra a cepa de *S. agalactiae*. Os MICs determinados para os peptídeos são 1,5 a 2,0 vezes maiores do que o controle positivo para as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, no entanto, um MIC similar ao do cloranfenicol foi obtido nos ensaios contra *P. aureginosa*. Curiosamente, o ensaio antibacteriano indicou que a glicosilação promove um leve aumento na atividade antibacteriana, embora nenhuma diferença importante foi observada entre a HSP1-NH₂ e a [trz-A¹]HSP1-NH₂ (Tabela 3.7, p. 118).

Por outro lado, os glicotriazol-peptídeos e o [trz-A¹]HSP1-NH₂ mostraram consistentemente uma alta atividade antifúngica, quando comparados à HSP1-NH₂ individualmente. Enquanto que, virtualmente, o peptídeo HSP1-NH₂ não tem atividade contra as cepas de *Candida spp*, o derivado triazólico mostrou uma atividade antifúngica mais significativa (Tabela 3.7, p. 118), indicando que a adição do anel triazólico à cadeia peptídica já

é suficiente para o promover o aumento da atividade antifúngica do peptídeo. Claramente, os glicotriazol-peptídeos mostraram mais eficácia, quando comparados ao [trz-A¹]HSP1-NH₂ e foram observadas atividades comparáveis com àquelas do controle positivo. Em resumo, esses resultados indicam que tanto o triazol quanto o carboidrato parecem promover um aumento significativo na atividade antifúngica do HSP1-NH₂.

Tabela 3.7: Concentração inibitória mínima (MIC) determinada para HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ na presença de bactéria e *Candida spp* (ATCC)

MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a					
Cepa de Bacteria	HSP1-NH ₂	[trz-A ¹]HSP1-NH ₂	[pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	[pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	188	185	170	155	93
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ND	ND	ND	ND	93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94	92	80	76	93
<i>Escherichia coli</i>	188	185	170	155	93
MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a /MFC ^b					
<i>Candida spp</i>	HSP1-NH ₂	[trz-A ¹]HSP1-NH ₂	[pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	[pOAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	5-fluorocitosina
<i>Candida tropicalis</i>	149,90	80,50	46,27	44,01	27,13
<i>Candida parapsilosis</i>	138,10	75,70	29,88	33,60	26,75
<i>Candida krusei</i>	136,90	65,60	22,30	11,96	85,53

ND – Não determinado. * valores de MIC por mol de cadeia monomérica.

^a concentração inibitória mínima. ^b concentração fungicida mínima.

Enquanto a porção triazólica não melhora a atividade antibacteriana do peptídeo (Tabela 3.7), ela de fato melhora suas propriedades antifúngicas. A atividade depois da adição da porção triazólica foi cerca de duas vezes mais alta quando comparada ao valor observado da HSP1-NH₂ sozinha contra as três cepas de fungo testadas (Tabela 3.7). A adição de uma porção carboidrato ao triazol-peptídeo aumenta ainda mais sua atividade antifúngica e, portanto, um valor significativamente menor de MIC é observado para os dois glicotriazóis-peptídeo contra as três cepas, indicando que as duas unidades juntas claramente parecem melhorar a ação antifúngica do peptídeo. A propósito, no ensaio contra *Candida krusei*, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [trz-A¹]HSP1-NH₂ mostraram atividades cerca de sete, seis e duas vezes maiores do que HSP1-NH₂, respectivamente.

A fim de avaliar o efeito da unidade glicotriazólica no aumento do potencial antimicrobiano, escolheu-se a HSP1, em um primeiro momento, por ser um peptídeo que apresenta baixa atividade antimicrobiana, quando comparado a outros PAMs, como a DD k e a

LyeTx I (Batista *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2010). Conforme observado na Tabela 3.7, p. 118, a inserção dessa unidade na sequência primária levou ao aumento significativo do potencial antifúngico da HSP1, de forma que a metodologia aqui apresentada pode ser empregada na modificação de outros PAMs bem mais ativos que a HSP1.

3.4.2.3 Experimentos Biofísicos

A membrana plasmática de fungos tem algumas características específicas entre os organismos eucarióticos, tais como quantidade de glicosíngolipídios na ordem de 20-30% e uma variação significativa na composição de ácidos graxos do glicerofosfolipídios. Palma-Guerrero *et al.* (2010), mostraram que os fungos com grandes quantidades de ácido linoléico e com grande índice de insaturação são mais susceptíveis à molécula de quitosana do que espécies sem esses ácidos graxos insaturados (Palma-Guerrero *et al.*, 2010). Portanto, a variação da fluidez da membrana fúngica é muito importante para a compreensão da atividade antifúngica do peptídeo e dos carboidratos.

A Figura 3.41 mostra a estrutura geral da membrana de fungos. O ergosterol está localizado na interface da membrana fosfolipídica, promovendo fluidez estrutural e modulação; portanto, participando do controle de alguns eventos fisiológicos (Zhang e Rao, 2010).

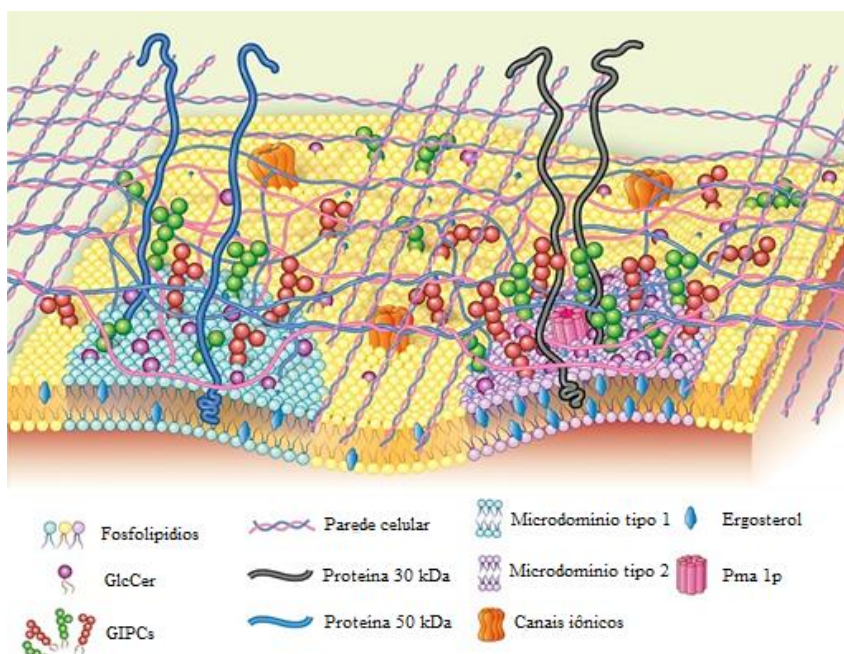


Figura 3.41: Esquema ilustrando a constituição da parede celular dos fungos. Figura extraída de Guimarães *et al.*, 2014. A reprodução dessa figura é permitida, desde que para fins acadêmicos, conforme preconiza a *Creative Commons Attribution License* (CC BY 4.0).

Conforme constatado a partir de ensaios biológicos, a adição das unidades glicotriazólicas na porção peptídica da HSP1-NH₂ aumentou significativamente seu potencial antifúngico. Dessa forma, decidiu-se utilizar neste trabalho vesículas contendo ergosterol como modelo mimético (simplificado) de membranas, o qual foi empregado em diferentes ensaios biofísicos. A seguir são descritos os estudos estruturais, realizados por CD, e de interação, realizados por SPR, extravasamento de CF, DLS e potencial ζ . Todos os ensaios em meios miméticos foram realizados na presença de LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1).

Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os perfis dos espectros de CD apresentados na Figura 3.42, p. 121, com mínimos próximos a 208 e 222 nm, indicam que a HSP1-NH₂ e que seus derivados adotam conformação α -helicoidal na presença de vesículas de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1). Portanto, a unidade glicotriazólica não causa diferenças tão significativas no perfil de estrutura secundária da HSP1-NH₂, embora seja caracterizada helicidade ligeiramente maior para os compostos não glicosilados. Foi determinada, a partir das desconvoluções dos espectros utilizando-se o *software* CDPro (seção 3.3.4, p. 110), a helicidade H de 69% para a HSP1-NH₂, sendo um perfil espectral e helicidade muito similares observados para a derivado triazólico [trz-A¹]HSP1-NH₂ (H = 65%). Conteúdos de hélices ligeiramente menores são observados sob a glicosilação e valores de H = 56% e H = 59% são obtidos para [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂, respectivamente.

O espectro de CD da HSP1-NH₂ e de seus derivados em meio aquoso (dados não apresentados), mostraram perfis compatíveis com as conformações randômicas, portanto a interação peptídeo-membrana possui um papel crucial na estabilidade da conformação em hélice α de todas as espécies. Efeito similar foi previamente observado para o peptídeo nativo HSP1 em soluções de TFE:H₂O e na presença de micelas de SDS (Prates *et al.*, 2004), não tendo sido, entretanto, relatados previamente na literatura, estudos por CD em ambientes de bicamada lipídica, até o ponto em que sabemos.

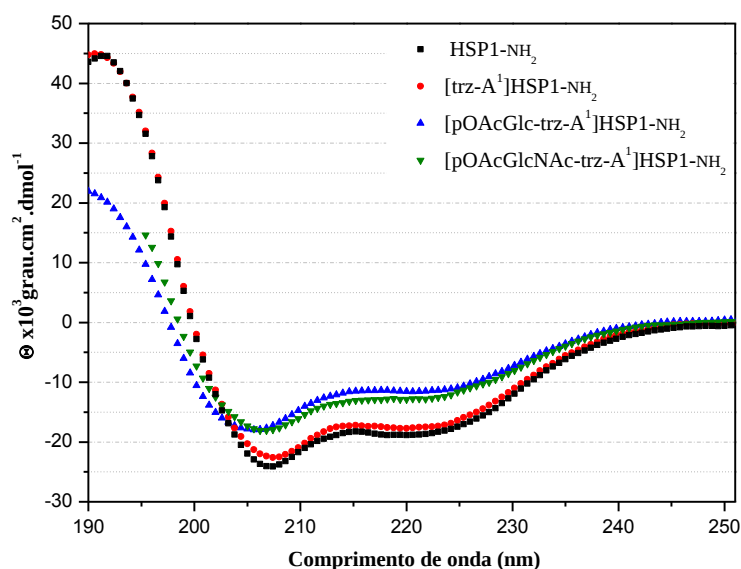


Figura 3.42: Espectros de CD da HSP1-NH₂ e de seus derivados na presença de 500 μ M de LUVs POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) em soluções aquosas de tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,0. Em preto, o espectro para 57 μ mol·L⁻¹ de HSP1-NH₂ (■), em vermelho, para 55 μ mol·L⁻¹ de [trz-A¹]HSP1-NH₂ (●), em azul para 60 μ mol·L⁻¹ de [pOAcGlc-trz-G¹]HSP1-NH₂ (▲) e verde escuro para 55 μ mol·L⁻¹ de [pOAcGlcNAc-trz-G¹]HSP1-NH₂ (▼).

Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície

Para se investigar as interações com membranas da HSP1-NH₂ e de seus derivados, foi utilizado nesse trabalho a SPR, a fim de medir as afinidades desses compostos por LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1), que foram imobilizadas em um sensor chip de SiO₂, na presença de um fluxo de solução tampão Tris-HCl. Os sensogramas da ligação entre HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ com as bicamadas lipídicas, mostradas na Figura 3.43, p. 122, confirmam as interações peptídeo-membranas. As interações são caracterizadas pelo aumento das intensidades dos sinais de unidade de ressonância (RU) em função da concentração peptídica e esses resultados indicam que a quantidade de peptídeo ligado a moléculas de lipídios é proporcional ao aumento da concentração peptídica.

Os sensogramas da ligação da HSP1-NH₂ e [trz-A¹]HSP1-NH₂ a bicamadas lipídicas carregadas negativamente são muito similares entre si. No entanto, níveis de resposta significativamente mais baixos são observados quando comparados à ligação das glicofórmulas, que, por sua vez, apresentam um nível de resposta similar entre si. As medidas de SPR claramente indicam uma alta afinidade dos glicotriazóis-peptídeo às bicamadas aniônicas

contendo ergosterol, quando comparadas à da HSP1-NH₂. Os valores de K_a obtidos são cerca de três vezes maiores para os glicotriazóis-peptídeo do que para as formas não glicosiladas (Tabela 3.8, p. 123), confirmando interações mais forte entre a membrana e as glicofornas, quando comparadas à HSP1-NH₂ e à [trz-A¹]HSP1-NH₂ (Mozsolits *et al.*, 2001; Papo e Shai, 2003b; a).

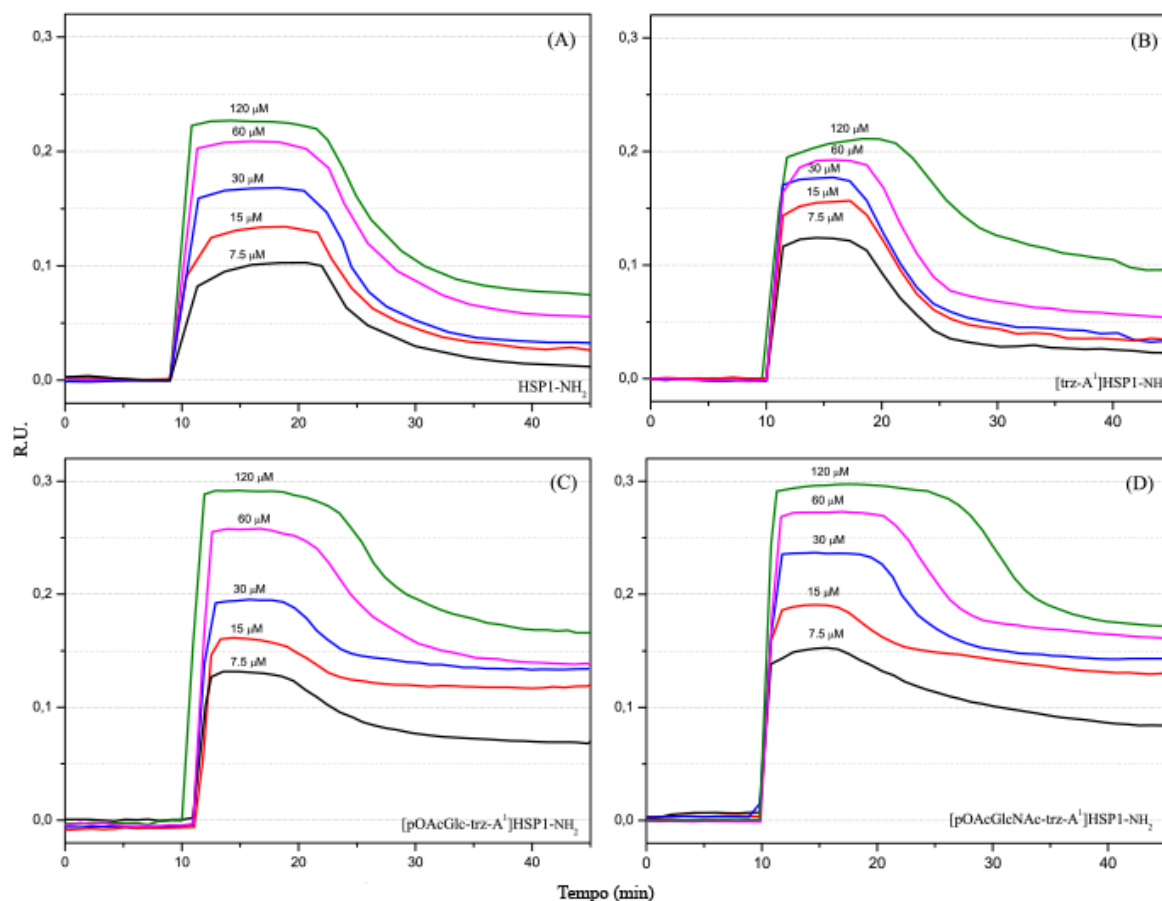


Figura 3.43: Sensogramas indicando as interações entre HSP1-NH₂ e seus derivados com as LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) imobilizadas na superfície de um sensor chip de SiO₂. Todos os peptídeos foram injetados a concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 120 μ M em solução aquosa de tampão Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 8,0, contendo 20 mmol·L⁻¹ de NaCl. (A) HSP1-NH₂, (B) [trz-A¹]HSP1-NH₂, (C) [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e (D) [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂.

As menores afinidades da HSP1-NH₂ e da [trz-A¹]HSP1-NH₂ quando comparadas às das formas glicosiladas indicam a contribuição das unidades glicotriazólicas no processo de ligação. Essas interações mais fortes devem estar contribuindo para os resultados antifúngicos, descritos na Tabela 3.7, p. 118.

Tabela 3.8: Resultados das curvas ajustadas para os dados obtidos para HSP1-NH₂ e seus derivados utilizando um modelo de ligação de dois estados (*two-state binding model*)

Peptídeo	K_a (M ⁻¹)	Erro
HSP1-NH ₂	12.560	105,8
[trz-G ¹]HSP1-NH ₂	14.560	96,7
[pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	39.800	10,3
[pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	45.030	87,4

Medidas de extravasamento de CF incorporada em vesículas fosfolipídicas

O extravasamento de CF incorporada a LUVs sem a adição de peptídeo é insignificante durante o tempo experimental. A adição de HSP1-NH₂ ou de seus derivados às LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1, razão molar) resulta em extravasamento de CF, como apresentado na Figura 3.44.

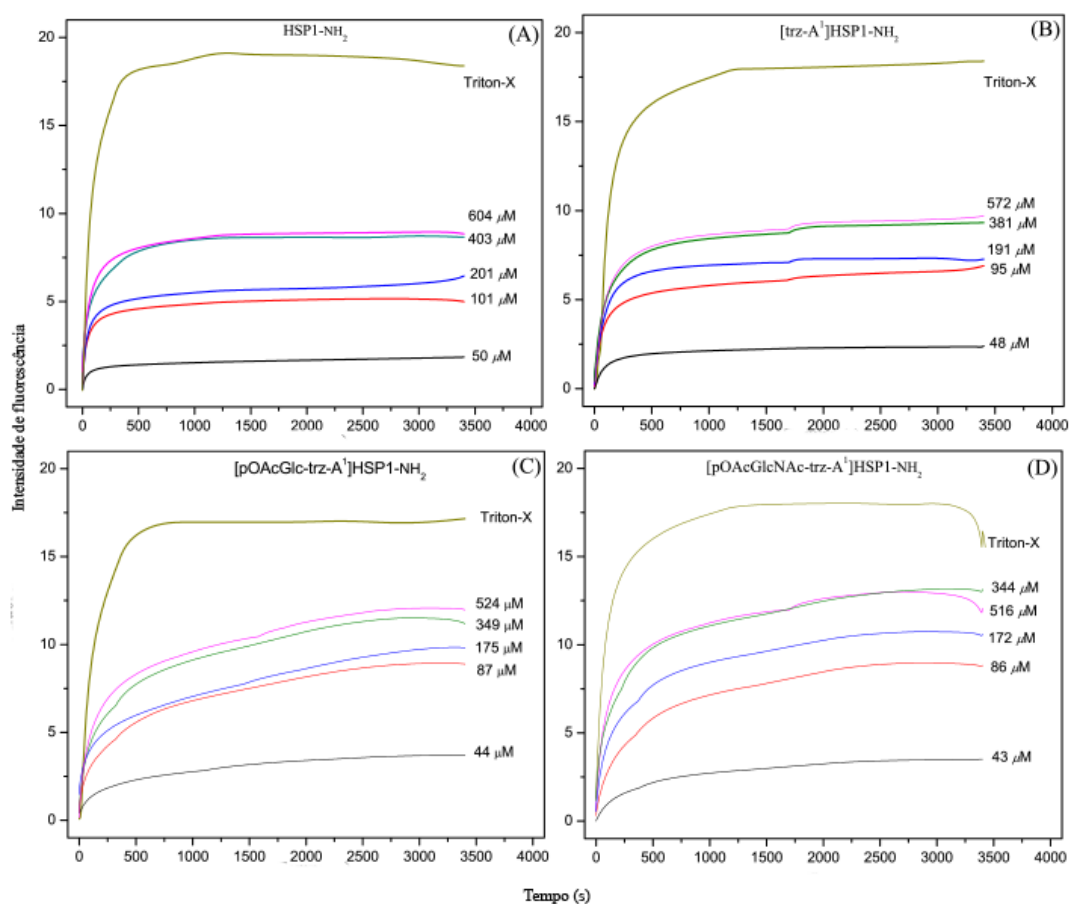


Figura 3.44: Cinética de liberação de CF das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) na presença de (A) HSP1-NH₂, (B) [trz-A¹]HSP1-NH₂, (C) [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e (D) [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂. A fluorescência foi emitida pela liberação de CF em função do tempo a 25°C. A fluorescência total emitida foi determinada pela adição de 25 μ L de Triton X-100 10% (m/v).

Em todos os casos, a fluorescência aumenta com o aumento da concentração de peptídeo até um patamar limite ser alcançado. A porcentagem de CF liberada (CF %) e a constante de velocidade de extravasamento (k_{obs}) da liberação *versus* a razão P/L (Peptídeo/Lipídeo) são apresentadas na Figura 3.45. O incremento na razão P/L leva a um aumento na CF % (Figura 3.45A) e da cinética de liberação de CF (k_{obs}) (Figura 3.45B). Particularmente, no mesmo intervalo de tempo, a liberação CF% das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) é bastante pequena para HSP1-NH₂ e [trz-A¹]HSP1-NH₂, quando comparadas às glicofornas. Por outro lado, essas últimas mostram uma cinética de liberação de CF mais lenta, quando comparadas à HSP1-NH₂ e a seu derivado triazólico.

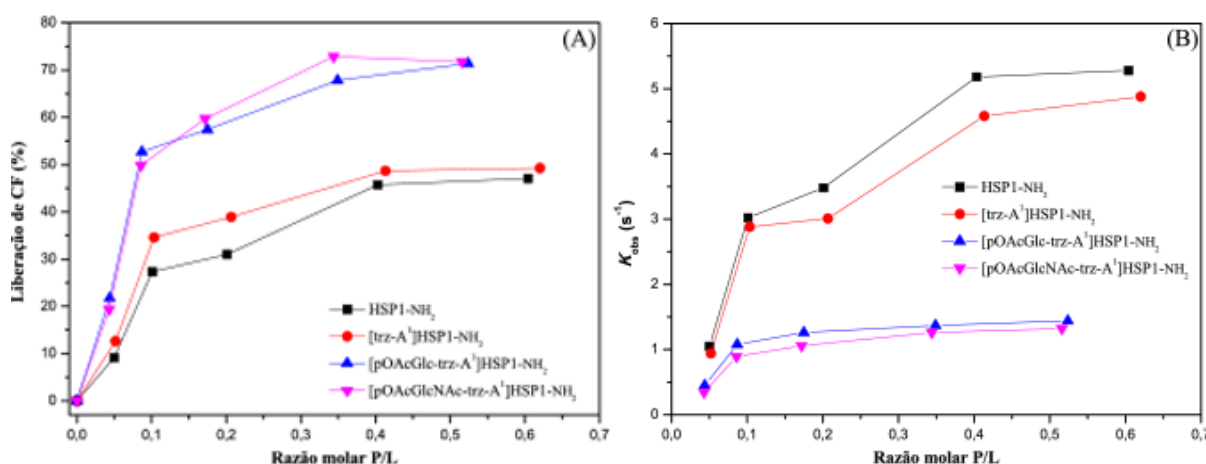


Figura 3.45: (A) Porcentagem de liberação de CF e (B) constante de velocidade observada, k_{obs} , da liberação de CF em função da razão molar P/L. [HSP1-NH₂]/L (preto), [trz-A¹]HSP1-NH₂/L (vermelho), [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (azul) e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (magenta) a 2500 s. [HSP1-NH₂]/L (preto), [trz-A¹]HSP1-NH₂/L (vermelho), [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (azul) e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (magenta). Medidas foram feitas a 2500 s e as amostras foram adicionadas a microplacas contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) e 200 mM NaCl.

3.4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta (ζ)

A Figura 3.46A (p. 125) mostra as mudanças nos diâmetros hidrodinâmicos (D_h) das vesículas de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) sob adição de HSP1-NH₂ ou de seus derivados. A adição de alíquotas de todos os compostos leva ao aumento do D_h das vesículas fosfolipídicas até um limite ser alcançado. Individualmente, uma interação mais forte dos dois glicotriazol-peptídeos ocorre nas vesículas carregadas negativamente em tampão Tris-HCl, pH 8,0, enquanto que a variação do D_h das mesmas LUVs causada pela presença de HSP1-NH₂ e do seu derivado triazólico [trz-A¹]HSP1-NH₂ é consideravelmente pequena, o que indica uma

incorporação mais pronunciada dos glicotriazol-peptídeos na bicamada lipídica, em comparação com as formas não glicosiladas.

O máximo de D_h adquirido pelas LUVs em presença dos glicotriazol-peptídeos é obtido na razão molar P/L de 0,2, enquanto o máximo obtido na presença das formas não glicosiladas é próximo de 0,3 (Figura 3.46A). Isso sugere uma propriedade de ruptura de membrana mais forte para os glicotriazol-peptídeos em comparação com as formas não glicosiladas, o que está de acordo com a maior porcentagem de extravasamento de CF de LUVs induzida pelas glicoformas (Figura 3.45, p. 124).

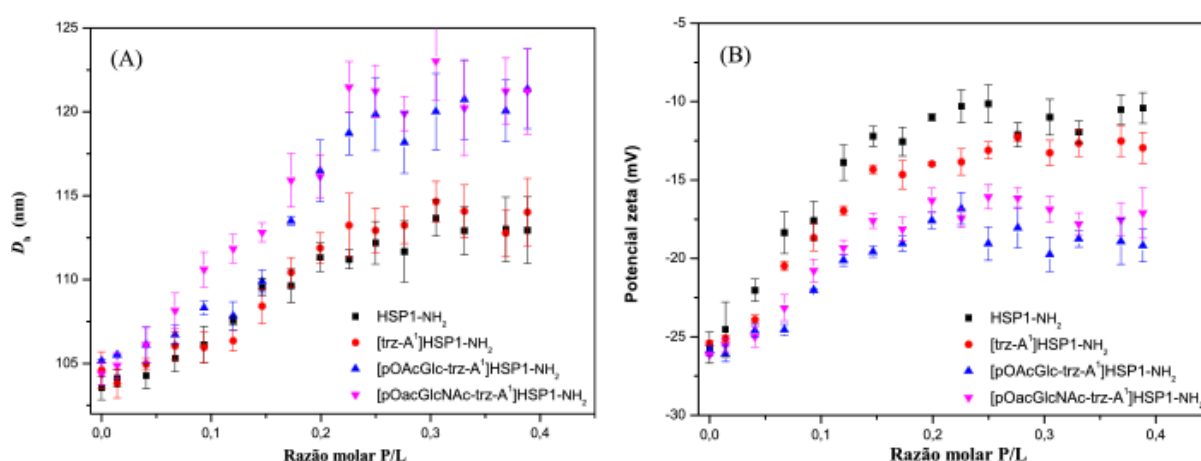


Figura 3.46: Efeito da adição de HSP1-NH₂ e de seus derivados no diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1). (A) Mudanças no diâmetro hidrodinâmico (D_h) em função da razão P/L e (B) no potencial zeta em função da razão peptídeo/fosfolípido. Razão molar [HSP1-NH₂]/L (preto), [trz-A¹]HSP1-NH₂/L (vermelho), [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (azul) e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂/L (magenta).

A mobilidade eletroforética das LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) em presença de HSP1-NH₂ e de suas formas derivadas foi investigada para se avaliar as forças eletrostáticas envolvidas nas interações peptídeo-membrana. A Figura 3.46B apresenta os experimentos de ζ em que as suspensões de LUVs foram tituladas com soluções de HSP1-NH₂ ou com seus derivados em tampão Tris-HCl, pH 8,0. Para as LUVs de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) em ausência de peptídeo, os valores iniciais de ζ são próximos de -26 mV. A interação dos peptídeos carregados positivamente com as bicamadas carregadas negativamente muda a carga superficial da membrana, que leva ao aumento dos valores do ζ , quando a concentração de peptídeo aumenta. O aumento do ζ é mais significativo na presença de HSP1-NH₂ e [trz-A¹]HSP1-NH₂ quando comparado aos glicotriazol-peptídeos. Esses resultados sugerem uma

interação eletrostática mais forte da HSP1-NH₂ e da [trz-A¹]HSP1-NH₂ com a bicamada lipídica negativa, quando comparadas às duas glicoformas. Como consequência, as interações peptídeo-membrana não podem ser explicadas somente pelas forças eletrostáticas, uma vez que isso poderia também ser motivado pela inserção da porção *N*-terminal glicosilada do [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ ou [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ na bicamada, os glicotriazol-peptídeos levam a um maior aumento do *D_h* da vesícula, quando comparados à HSP1-NH₂ e ao seu derivado triazólico.

Embora as interações eletrostáticas entre o peptídeo catiônico e a carga negativa das moléculas de POPG sejam relevantes para a ligação peptídeo-membrana (Beschiaschvili e Seelig, 1990; Freire *et al.*, 2011; Manzini *et al.*, 2014), como mostra o aumento no potencial ζ da bicamada (Figura 3.46B, p. 125), a presença do açúcar per-*O*-acetilado na porção *N*-terminal da cadeia peptídica parece ser importante para garantir interações mais fortes das glicoformas com a membrana. Isso é suportado pelos valores de *K_a* maiores e pela variação menos pronunciada do potencial ζ da membrana sob adição dos glicotriazol-peptídeos em comparação com a adição de alíquotas da HSP1-NH₂ ou [trz-A¹]HSP1-NH₂. Enquanto que para a HSP1-NH₂ e a [trz-A¹]HSP1-NH₂ uma interação superficial maior predomina para neutralizar parcialmente a superfície externa carregada negativamente das LUVs aniônicas, para os glicotriazol-peptídeos, parte dessas interações eletrostáticas são substituídas por interações que poderiam ser relacionadas à inserção das unidades monossacarídicas, levando a uma propriedade de ruptura da membrana mais forte. Isso é importante para apontar que os valores de potencial zeta alcançam um *plateau* na faixa de -15 a -10 mV para os derivados não glicosilados, estando na margem de -20 a -16 mV para a [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e a [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂, o que pode indicar um deslocamento de contra-íons. A cadeia oleoil de ácido graxo presente na membrana também deve contribuir para a inserção dos glicotriazol-peptídeos, especialmente considerando a hidrofobicidade dessas glicoformas per-*O*-acetiladas, quando comparadas às cadeias de carboidratos não acetiladas. Interações das cadeias de açúcar da molécula de quitosana são largamente afetadas pelo grau de instauração e fluidez da membrana, sendo que dados de sonda fluorescente na membrana fosfolipídica mostram que realmente esse carboidrato na sua forma não modificada insere-se na bicamada (Palma-Guerrero *et al.*, 2010).

3.4.2.5 Biossíntese de Ergosterol

Em células de fungos, a primeira etapa microsomal na biossíntese do ergosterol consiste na desmetilação do lanosterol, que é catalisada pela lanosterol 14 α -demetilase, uma enzima da classe CYP51 (Ji *et al.*, 2000; Tatsumi *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm mostrado que os derivados triazólicos agem como agentes antifúngicos pela interferência na biossíntese do ergosterol (Lorand e Kocsis, 2007; Zhang e Rao, 2010; Kathiravan *et al.*, 2012; Sgherri *et al.*, 2014). Dessa forma, procurando por fármacos contendo o grupo 1,2,3-triazol, alguns derivados do 9-(prop-2-inil)-9H-carbazol têm sido acoplados a alguns β -azido-álcoois a partir da reação “click” e suas atividades antifúngicas têm sido comparadas à do fluconazol, que possui em sua estrutura um anel triazólico e é um dos mais importantes fármacos no tratamento de infecções fúngicas (Rad *et al.*, 2016). Nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho são de relevância para fornecer protótipos antifúngicos, pela combinação da atividade antimicrobiana dos PAMs com aquela dos 1,2,3-triazóis e dos carboidratos, os quais podem ser obtidos por métodos práticos e relativamente simples.

Assim, o presente trabalho buscou avaliar a inibição da biossíntese do ergosterol em células de *C. krusei* depois de 48 h de incubação, na presença do HSP1-NH₂ ou de seus derivados, sendo os resultados sumariados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Inibição da biossíntese de ergosterol em células de *C. krusei* cultivadas na presença de HSP1-NH₂, [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂, após 48 h de incubação

Amostras testadas	Percentual ^a de redução do conteúdo de ergosterol de células cultivadas com peptídeo e seus derivados à conc. (μ g/mL) de	
	64	128
HSP1-NH ₂	6	10
[trz-A ¹]HSP1-NH ₂	35	85
[pOAcGlc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	62	82
[pOAcGlcNAc-trz-A ¹]HSP1-NH ₂	79	88

^a Percentual de redução no conteúdo principal de ergosterol celular comparado com o crescimento de células sem peptídeo ou seus derivados.

O conteúdo total de ergosterol foi determinado para cada isolado de células de *C. krusei* cultivadas na presença de 64 ou 128 μ g.mL⁻¹ dos compostos peptídicos. Nenhuma mudança

significativa foi observada na quantidade de ergosterol produzida por *C. krusei* na presença de HSP1-NH₂ nas duas concentrações. Em contraste, uma diminuição dose-dependente na produção de ergosterol foi revelada, quando os isolados foram cultivados na presença de [trz-A¹]HSP1-NH₂, [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1-NH₂ (Tabela 3.9, p. 127). Além disso, a sensibilidade na biossíntese de ergosterol observada no MIC da micro diluição do caldo em 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é aproximadamente duas vezes mais alta para os glicotriazol-peptídeos em comparação com [trz-A¹]HSP1-NH₂. Como mostrado na Tabela 3.9, p. 127, a principal diminuição no conteúdo total de ergosterol para isolados susceptíveis foi de 35% para células cultivadas em 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 85% em 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, na presença [trz-A¹]HSP1-NH₂. As reduções nos conteúdos totais de ergosterol para a [pOAcGlc-trz-A¹]HSP1-NH₂ e a [pOAcGlcNAc-trz-A¹]HSP1 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram de 62 e 79%, respectivamente. Esses valores estão na faixa de 82% a 88% depois da exposição dos isolados a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ desses glicotriazol-peptídeos, respectivamente.

Curiosamente, na maior concentração testada (128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) os glicotriazol-peptídeos e o [trz-A¹]HSP1-NH₂ foram cerca de oito vezes mais ativos do que a HSP1-NH₂ na inibição da biossíntese do ergosterol (Tabela 3.9, p. 127), embora na menor concentrações testadas (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), as atividades dos glicotriazol-peptídeos são cerca de duas vezes maiores que a do [trz-A¹]HSP1-NH₂, que, por sua vez, é cerca de seis vezes mais efetivo na inibição da produção de ergosterol em comparação com a HSP1-NH₂. Isso sugere que, a menores concentrações de peptídeo, a unidade monossacarídica age juntamente com o anel triazólico para promover a inibição da biossíntese (um máximo de 79% de inibição é observado para o derivado de *N*-acetilglicosamina). No entanto, a altas concentrações de peptídeo, a inibição efetiva exercida pela unidade triazólica alcança um *plateau* entre 80-90% de inibição, que não é significativamente alterado pela presença da unidade monossacarídica.

Outras investigações são necessárias para avaliar se os derivados triazólicos podem atravessar a membrana plasmática e se ligar à lanosterol 14 α -demetilase microsomal. Além disso, é importante verificar se essas moléculas são aptas a promover indiretamente a oxidação do ergosterol presente na membrana do fungo. Algumas abordagens biofísicas indicaram que a unidade de carboidrato aumenta a capacidade lítica do peptídeo e essa propriedade está relacionada a interações entre a bicamada lipídica e o monossacarídeo, que resultam em uma propriedade de ruptura mais forte da membrana. Apesar disso, a presença do anel triazólico é importante para aumentar a atividade antifúngica do peptídeo, desde que ela promova a inibição

da biossíntese de ergosterol, um processo que é dependente da concentração do triazol-peptídeo e que pode ser assistido pela porção carboidrato a uma menor concentração peptídica. Esses dois efeitos combinados são decisivos para melhorar as propriedades antifúngicas da HSP1-NH₂.

3.4.3 Glicotriazol-peptídeos Derivados das PS-1, -2 e -3: Síntese, Avaliação da Influência da Glicosilação nas Estruturas e nas Interações com Modelos Miméticos de Membrana

3.4.3.1 Síntese dos Peptídeos e de seus Derivados

Os peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3, nas suas formas nativas, foram obtidos pela estratégia Fmoc-SPFS e suas identidades foram confirmadas por EM, como mostrado na Figura 3.47A, C e E, p. 130. Os derivados [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 e [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3 foram obtidos pela utilização conjunta da Fmoc-SPFS e da reação CuAAC, usando CuSO₄·5H₂O/NaAsc. A cadeia peptídica contendo o resíduo de Pra foi primeiramente sintetizada em uma seringa adaptada com um filtro de poliuretano, como exemplificado na Figura 3.39, p. 106.

Curiosamente, no caso da glicosilação desses peptídeos, antes da adição dos reagentes para realização da reação de CuAAC, a peptidilresina mostrou uma cor levemente amarelada, como aquela observada para a reação com a HSP1-NH₂ propargilada (Figura 3.39A, p. 106). No entanto, sob a adição da solução reagente, os grânulos da peptidil-resina imediatamente adquiriram uma cor esverdeada mais intensa, diferente da marrom escura mostrada para a HSP1-NH₂ propargilada na Figura 3.39B, p. 106. Depois de aproximadamente 48h de reação, uma coloração mais próxima do marrom escuro foi revelada, mas não a coloração inicial levemente amarelada (Figura 3.39C, p. 106).

Todos os peptídeos e seus derivados glicotriazólicos foram purificados por CLAE-FR semi-preparativa e suas purezas (> 98%) foram verificadas por CLAE-FR e por EM (Figura 3.47B, D e F, p. 130). Os rendimentos das reações foram de aproximadamente 85% para o preparo da PS-1, 91% para a PS-2 e 80 % para a PS-3. Já, para os GtPs, foram de 60% para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, 65% para a [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 e 55% para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3, aproximadamente.

Os sequenciamentos de todos esses peptídeos foram realizados, para se confirmar as respectivas sequências primárias. Os espectros de massas dos perfis de fragmentação com os respectivos assinalamentos são apresentados no Apêndice B1, p. 172.

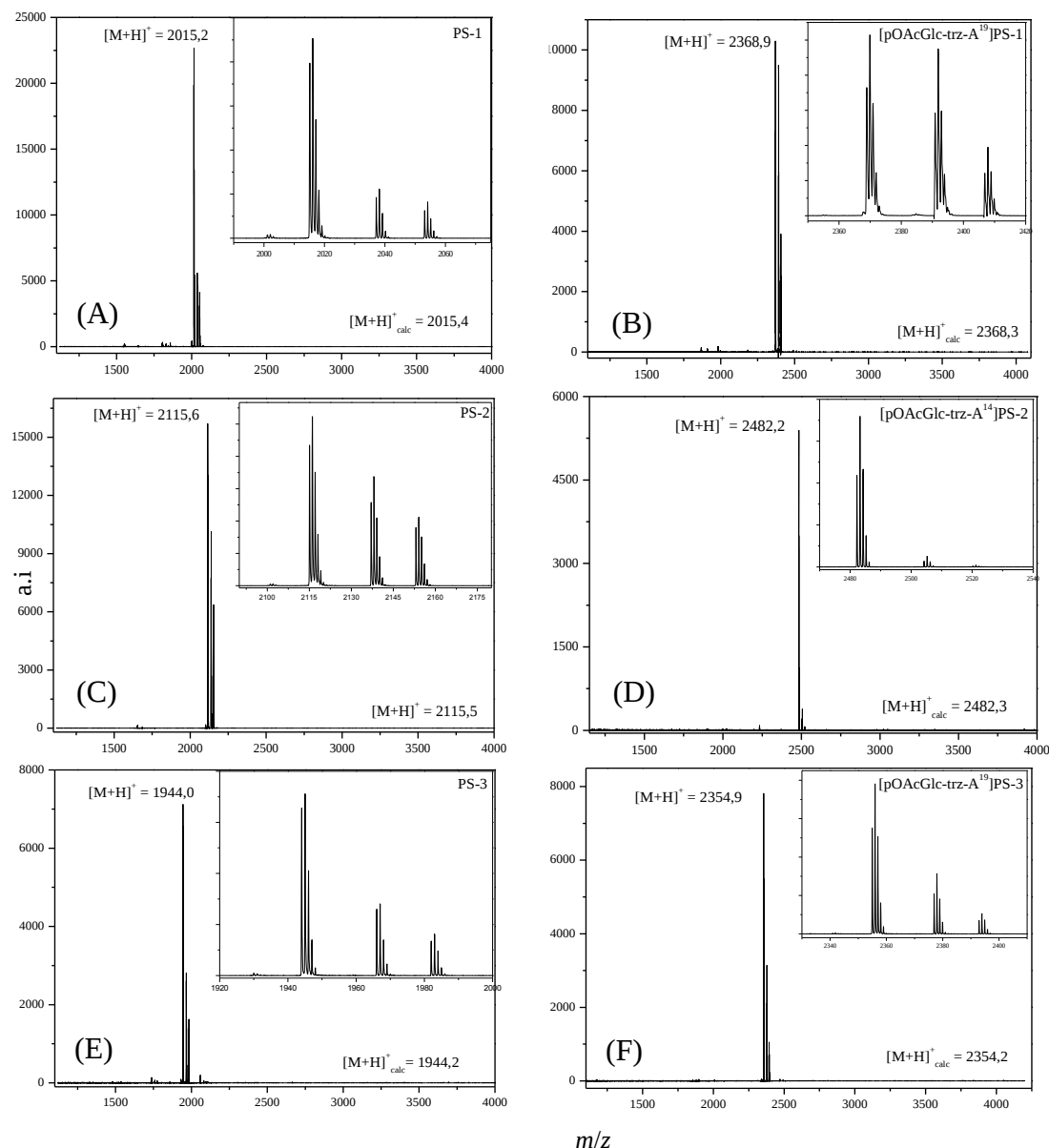


Figura 3.47: Espectro de massas mostrando o íon molecular correspondente à amostra purificada dos peptídeos sintéticos (A) PS-1, (C) -2, (E) -3 e dos respectivos glicotriazol-peptídeos (B) [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, (D) [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 e (F) [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3 por espectrometria de massa. $[M+H]^+$ correspondem às razões m/z experimentais e $[M+H]^+_{calc}$ às razões m/z teóricas.

Para o sequenciamento *de novo*, foram identificados fragmentos dos peptídeos e GtPs nos espectros MS/MS correspondentes, devido às quebras de ligações da cadeia principal, que resultam em uma série de íons característicos para cada tipo de ligação, sendo *-a*, *-b* e *-c* para

fragmentos provenientes da porção *N*-terminal e $-x$, $-y$ e $-z$, provenientes da porção C-terminal (Figura 3.48). No entanto, geralmente o assinalamento é feito pelos fragmentos de íons provenientes das ligações peptídicas, os quais resultam nos íons das séries $-b$ e $-y$. Dessa forma, os espectros contendo os íons das duas séries foram assinalados e permitiram o reconhecimento completo das sequências primárias de todos os peptídeos e de seus derivados GTPs (Apêndice B1, p. 172).

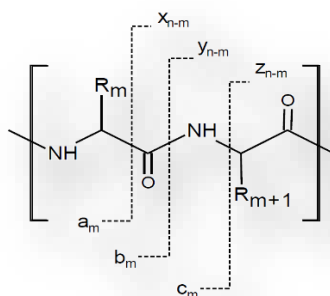


Figura 3.48: Estrutura química geral das quebras mais prováveis de um peptídeo durante a fragmentação.

As letras correspondem à nomenclatura usual dos fragmentos formados. “*n*” é o número total de resíduos do peptídeo e “*m*” é o número de resíduos correspondentes à série de íons $-a$, $-b$ e $-c$. Da esquerda para direita, porção *N*-terminal para C-terminal.

Para o sequenciamento dos peptídeos nas suas formas nativas, não houve dificuldade no assinalamento dos resíduos de aminoácidos, com exceção da Phe1 e da Leu2 da porção *N*-terminal (série $-b$), que são resíduos de aminoácidos comuns na sequência homóloga de todos os peptídeos e que foram assinalados como fragmentos dipeptídicos, inclusive para os espectros dos GTPs. Um exemplo do dipeptídeo assinalado é mostrado na Figura 3.49, representado pela linha azul e tem o íon com razão m/z de 261,1 Da (série de íons $-b$).

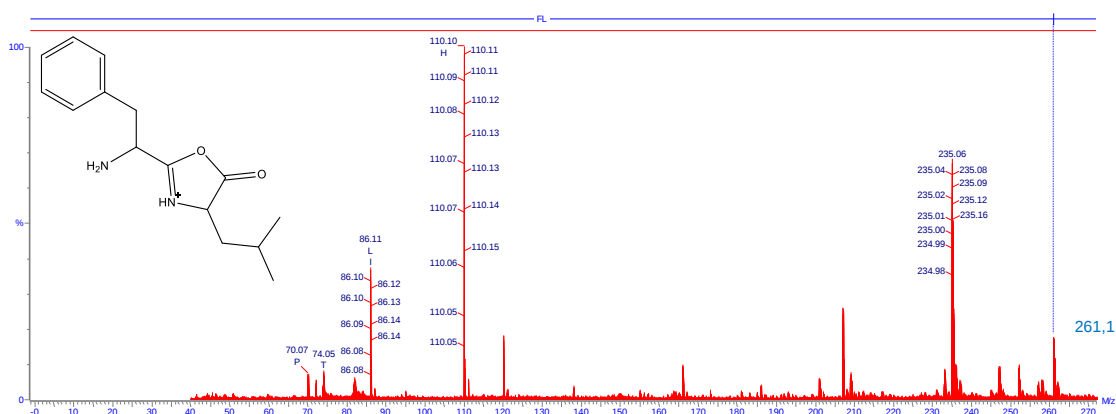


Figura 3.49: Região ampliada do espectro MS/MS, mostrando o fragmento dipeptídico de Phe-Leu-assinalado e da porção *N*-terminal da PS-2 (série $-b$, “-FL-” linha superior em azul). A razão m/z desse fragmento é de 261,1 e sua estrutura está representada no canto superior direito do espectro.

Já para os GtPs, existe uma peculiaridade ao se analisar esses espectros, devido à presença de uma unidade monossacarídica ligada a um resíduo de aminoácido por um grupo 1,2,3-triazólico, o que muda o mecanismo de fragmentação da sequência peptídica (Figura 3.50).

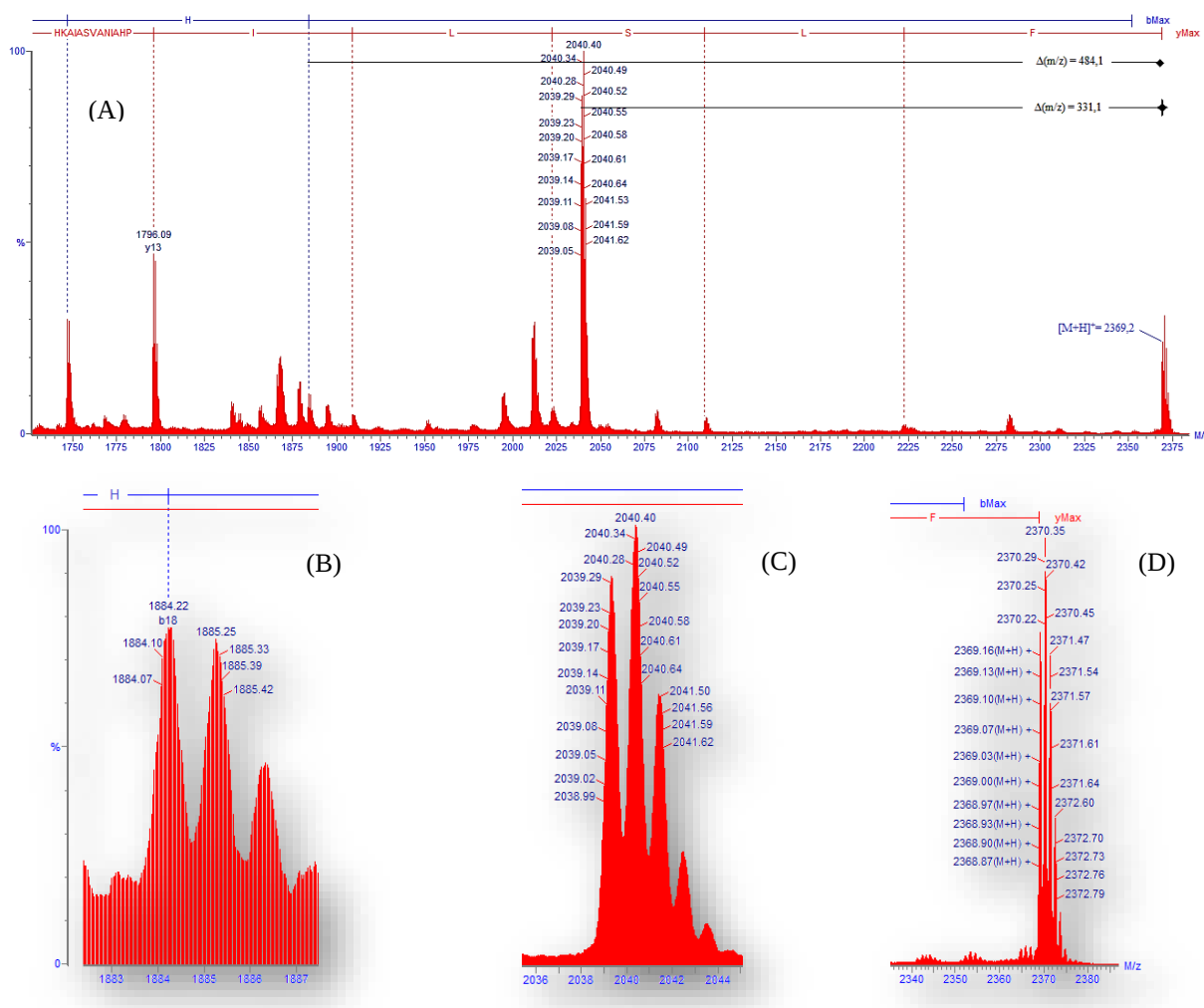


Figura 3.50: (A) Região ampliada do espectro da [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1 mostrando a diferença do íon molecular $[M+H]^+$ subtraído do íon de razão m/z 2039,2 e do íon de razão m/z = 1884,2, correspondente ao fragmento do triazol-peptídeo e do peptídeo até o resíduo de His18 (linha preta). (B) mostram a ampliação da região dos íons referentes ao fragmento $-b_{18}$, onde a unidade glicotriazol-aminoácido está ligada à cadeia peptídica, (C) região ampliada do íon referente ao fragmento do glicotriazol-peptídeo e (D) referente ao íon molecular.

O íon de razão m/z equivalente à perda do açúcar está evidente em todos os espectros MS/MS para os GtPs (ver espectros no Apêndice B1, p. 172). O açúcar é identificado, quando se subtrai o íon molecular $[M+H]^+$ dos respectivos GtPs por um íon de intensidade considerável (fragmento intenso da série $-b$, em azul no espectro) com uma razão m/z menor nos espectros.

Por exemplo, para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, o [M+H]⁺ tem valor igual a 2369,2 e o fragmento com sinal mais intenso no espectro é o íon com *m/z* de 2039,2 (Figura 3.50A, p. 132). Subtraindo [M+H]⁺ desse íon, o resultado é massa correspondente à unidade monossacarídica, que é de 331,1 Da. A razão *m/z* igual a 2039,2 corresponde, portanto, à unidade triazol-peptídeo, da qual o açúcar foi desconectado (Figura 3.50C, p. 132). O interessante é que, se observado o intervalo de razão *m/z* no espectro entre o resíduo de His assinalado na série -*b* (-*b*₁₈, Figura 3.50B, p. 132) e o íon molecular da [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, a diferença de razão *m/z* é equivalente ao fragmento do glicotriazol-aminoácido da sequência peptídica (pOAcGlc-trz-G), *i. e.*, 484,2 Da, que corresponde a essa unidade menos um hidrogênio, devido à ligação peptídica com o aminoácido adjacente.

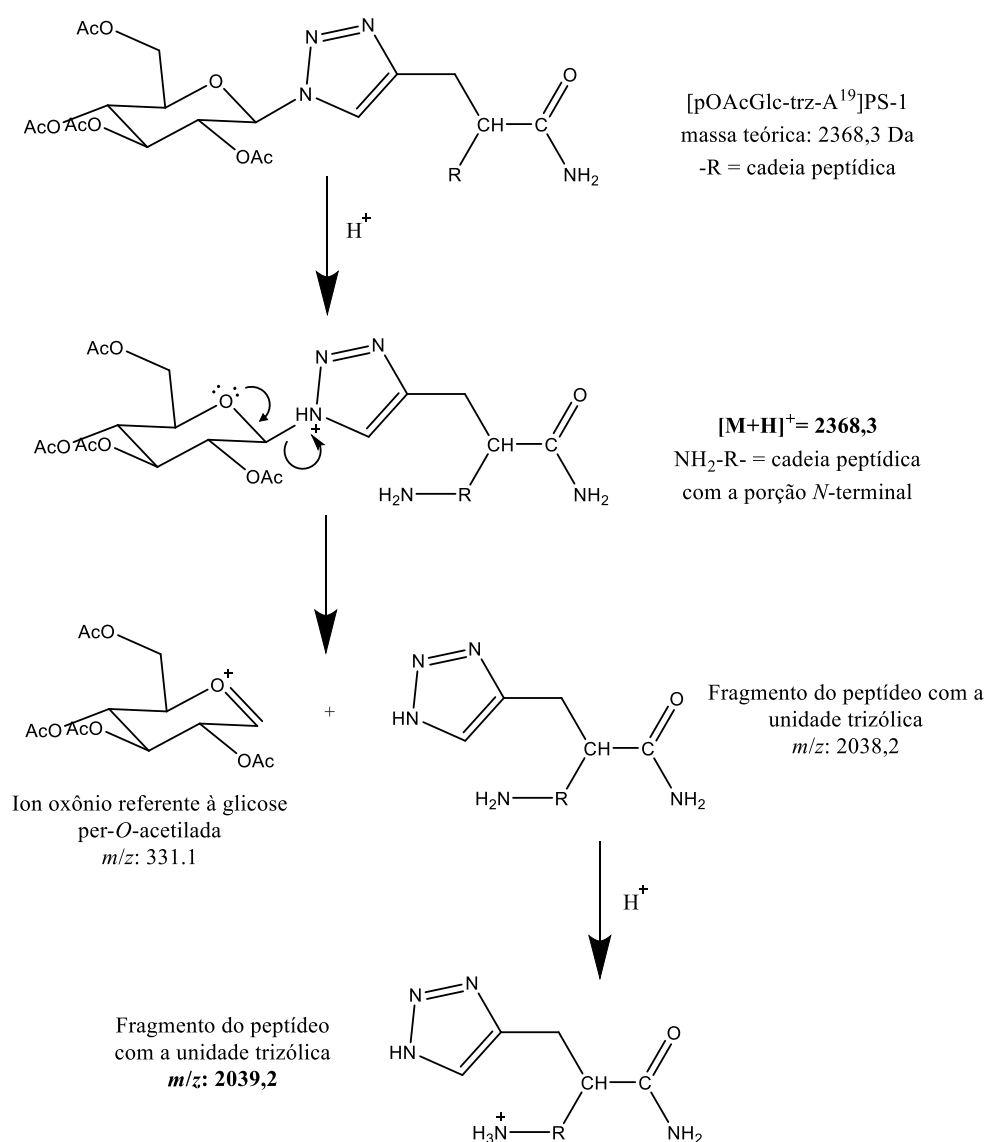


Figura 3.51: Mecanismo de fragmentação proposto para o segmento glicotriazólico no sequenciamento dos GtPs por MS/MS.

Essa análise levou à proposta de um possível mecanismo de fragmentação da unidade monossacarídica do triazol-peptídeo, que é ilustrado na Figura 3.51, p. 133. Devido às condições de fragmentação, o nitrogênio ligado ao açúcar per-*O*-acetilado é protonado, o que favorece a quebra heterolítica da sua ligação com o carbono anomérico do açúcar, mecanismo que é assistido pelo oxigênio adjacente a esse carbono. Formam-se, então, duas espécies: o íon referente à glicose per-*O*-acetilada ($m/z = 331,1$ Da) e o referente ao triazol-peptídeo com a massa do 1,2,3-triazol mais a massa da cadeia peptídica correspondente.

3.4.3.2 Estudos Biofísicos

Ao longo dos últimos anos, as estruturas tridimensionais de alta resolução e as topologias de interação das PS-1, -2 e -3 com modelos de membranas foram extensivamente investigadas pelo grupo de pesquisa da UFMG, utilizando-se as espectroscopias de CD e de RMN em solução e de sólidos (Resende *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2014).

Esses peptídeos possuem caráter catiônico e são constituídos por dezenove resíduos de aminoácidos, sendo observado 74% de homologia nas sequências primárias (Tabela 3.6, p. 103). Cerca de 60 a 80% dos resíduos de aminoácidos desses peptídeos são hidrofóbicos, os quais estão separados por resíduos hidrofílicos. Nas três sequências são encontrados resíduos de aminoácidos, que podem suportar carga positiva via protonação em valores de pH abaixo ou próximos à neutralidade. Nesse ponto, o peptídeo PS-1 contém duas histidinas (His) nas posições 7 e 18 e uma lisina (Lys) na posição 17, o peptídeo PS-2 apresenta três unidades de His nas mesmas posições, enquanto que o peptídeo PS-3 apresenta apenas duas unidades de His nas posições 7 e 18.

Consideráveis diferenças de atividades biológicas têm sido observadas devido a pequenas variações nas sequências primárias de compostos-modelo, mesmo em casos onde a composição de aminoácidos dos peptídeos se mantém constante (Wieprecht *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 2006). No que tange esse ponto, as filoseptinas aparecem como um exemplo interessante, uma vez que sequências primárias idênticas são encontradas para os três peptídeos entre os resíduos 1 e 13, bem como no resíduo 18. Por outro lado, as variações nas sequências primárias entre os resíduos das posições 14-17 e 19 propiciam a investigação de diferentes interações peptídeo-membrana associadas às diferenças estruturais entre essas moléculas. Sabe-se que um balanço entre carga e caráter hidrofóbico tem um papel muito importante na afinidade e na interação de um peptídeo com a membrana microbiana, que é um alvo bem comum de ataque

desse tipo de composto antimicrobiano (Lohner e Prenner, 1999; Vogt e Bechinger, 1999; White e Wimley, 1999). A alteração mais pronunciada é a variação da carga efetiva do resíduo 17 em pH fisiológico. Enquanto em pH 7,0 a PS-1 apresenta uma carga positiva no resíduo de Lys-17 e a PS-2 pode estar protonada no resíduo de His-17, a PS-3 possui carga nula no resíduo de Asn-17. Não obstante, as demais diferenças na composição de aminoácidos alteram também a hidrofobicidade dos três peptídeos.

Portanto, devido ao baixo padrão de carga desses peptídeos em pH mais alto, como ocorre com estudos realizados em tampão Tris-HCl, ao longo de vários experimentos realizados neste trabalho, decidiu-se executar as análises de ITC e de CD em tampão fosfato pH 5,9, o que possibilita a protonação dos resíduos de aminoácidos de His e, conseqüentemente, tende a aumentar a interação com as LUVs aniônicas de POPC:POPG (3:1) utilizadas no desenvolvimento dos experimentos.

Os estudos de ITC foram realizados para descrever a interação dos peptídeos e de seus derivados GtPs com as LUVs de POPC:POPG (3:1, v/v), avaliando a influência da glicosilação nos parâmetros termodinâmicos obtidos. A cada titulação, as frações das LUVs interagem com as biomoléculas acondicionadas na célula de reação. Essas interações, inicialmente, fornecem curvas de fluxo de calor representadas por sinais ou picos ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) em função do tempo (s). Esses sinais são integrados para obtenção do calor envolvido em cada injeção (δh em $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) e plotados em função da razão molar L/P, representando assim uma isoterma de interação peptídeo-membrana com a variação de calor envolvida no processo. O conjunto desses pontos pode ser ajustado por vários modelos presentes no próprio *software* da Microcal Origin® 7.0, pertencente ao equipamento, a partir do qual calcula-se os parâmetros termodinâmicos da interação.

A Figura 3.52, p. 136, mostra os resultados da ITC obtidos para todos os peptídeos e suas glicoformas. Observando-se os perfis das isotermas obtidas, as variações do calor durante a titulação de solução de LUVs POPC:POPG (3:1) com cada solução de peptídeo ou GtP indicam interações entre as espécies. A baixas razões molares L/P (*i.e.*, < 10 para PS-1 e PS-3 e < 5 para a PS-2), é gerado um fluxo de calor (h_i) positivo característico de processo endotérmico. A partir de uma razão L/P próxima a 8, o h_i para a PS-1, PS-3 e suas respectivas glicoformas [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1 e [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3, é invertido e passa a ser exotérmico durante as injeções subsequentes (*i.e.*, a razões L/P > 10). Para a PS-2 e seu

glicoderivado [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2, o comportamento da isoterma é parecido, porém a inflexão da curva ocorre em uma razão L/P de aproximadamente 3,5.

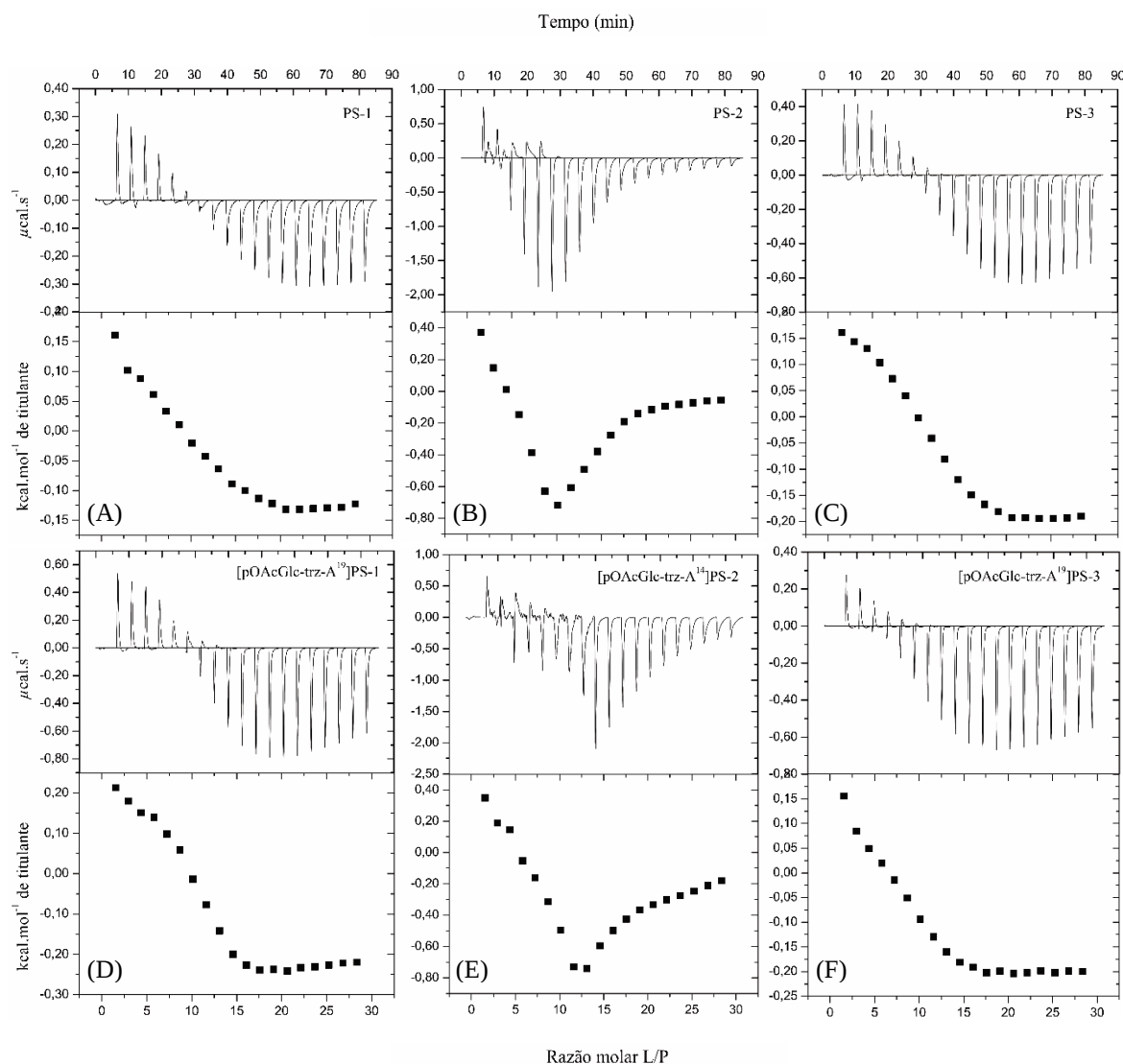


Figura 3.52: Calorimetria de Titulação Isotérmica da (A) PS-1, (B) PS-2, (C) PS-3 e de seus respectivos GtPs (D) [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, (E) [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 e (F) [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3 com as LUVs, a 25 °C. 50 μM dos peptídeos foram titulados com 10 mM de LUVs de POPC:POPG (3:1, mol:mol), ambas soluções preparadas no mesmo tampão (fosfato 10 mM, pH 5.9, contendo 20 mM NaCl). A figura mostra dois tipos de gráficos: acima a curva de titulação com os sinais do fluxo de calor em $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ e abaixo a integração desses sinais em função da razão molar L/P.

Os comportamentos dessas isotermas, nos quais o fluxo de calor se iguala a zero ($\delta h = 0$) em uma determinada razão molar, são resultados de uma compensação de processos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem simultaneamente durante as interações peptídeo-membrana. Isto ocorre, pois em um experimento de ITC são medidos calores globais de interação, porém o processo de interação peptídeo-membrana ocorre em diferentes etapas.

Primeiramente há a aproximação e interação do peptídeo com a bicamada, devido a atração eletrostática, seguida da mudança conformacional e, finalmente a interação do peptídeo estruturado com a bicamada fosfolipídica (Seelig, 1997; 2004; Voievoda *et al.*, 2015). Esses perfis obtidos para todos os peptídeos e derivados GtPs não permitiram um ajuste adequado utilizando os modelos que acompanham o *software* do equipamento, impedindo a obtenção dos parâmetros termodinâmicos e, conseqüentemente, a realização de uma análise mais acurada da interação peptídeo-membrana.

Neste sentido, seguindo metodologia proposta por Voievoda e colaboradores, foram realizados experimentos de CD em diferentes razões molares lipídeo-peptídeo, mantendo-se sempre a temperatura constante, para obtenção de isotermas a partir de dados de helicidade molar, que possibilitassem a determinação do calor envolvido na formação da estrutura secundária dos peptídeos ao interagirem com as LUVs. Para isto, foram empregadas diferentes concentrações de LUVs de POPC:POPG (3:1, razão molar) fixando-se as concentrações de peptídeos e dos seus respectivos glicoderivados (Voievoda *et al.*, 2015). Os espectros de CD foram corrigidos pela subtração dos espectros dos respectivos brancos (das LUVs na sua forma pura) e são apresentados na Figura 3.53, p. 138.

A análise inicial dos espectros de CD mostra que, na ausência de vesículas fosfolipídicas, os espectros obtidos para as filoseptinas e seus derivados glicotriazólicos apresentam perfis consistentes com os de peptídeos não estruturados, sendo observado um mínimo próximo a 198 nm. A adição de vesículas fosfolipídicas a concentrações crescentes leva, inicialmente, ao deslocamento desse mínimo, até que se observa uma modificação dos perfis espectrais, com a caracterização dos mínimos próximos a 208 e 222 nm, que se tornam mais intensos a maiores razões L/P, ao longo da titulação. Esse tipo de comportamento é muito comum aos PAMs, que não apresentam, em grande parte, estruturas preferenciais em meio aquoso, mas adotam as conformações ativas quando em contato com membranas fosfolipídicas.

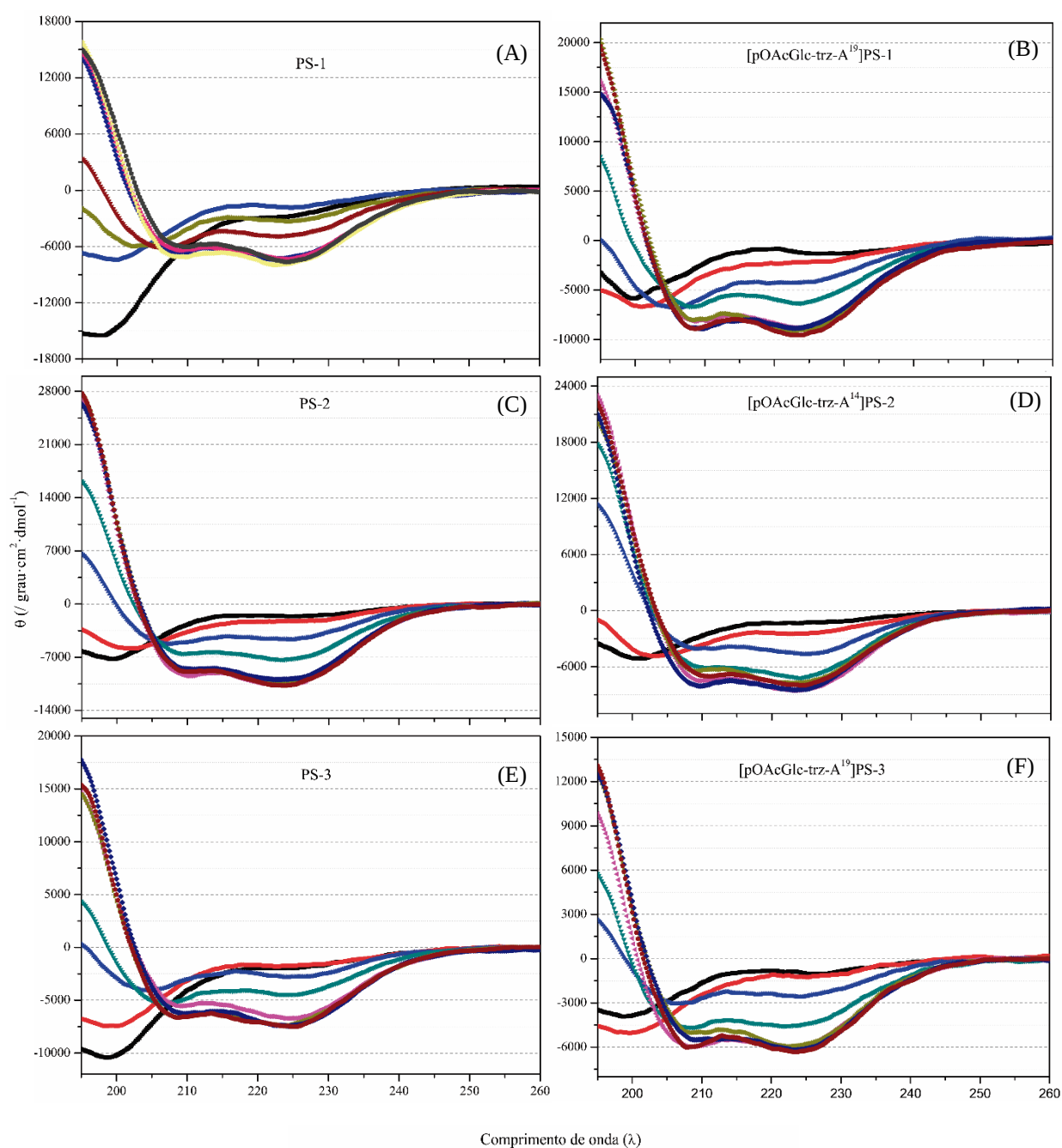


Figura 3.53: Espectros de CD obtidos para os peptídeos PS-1, -2 e -3 (A, C e E, respectivamente) e seus respectivos derivados glicotriazol-peptídicos – 25 μ M (B, D e F). Os peptídeos foram titulados com LUVs de POPC:POPG (3:1) em tampão fosfato (10 mM, pH 5,9, com 20 mM de NaCl) nas razões molares L/P de (■) 0:1, (●) 1:1, (▲) 5:1, (▼) 10:1, (◆) 25:1, (◆) 50:1, (◆) 75:1 e (◆) 100:1.

Quando comparados os mínimos (208 e 222 nm) observados nos espectros da PS-2 e da PS-3 (Figura 3.53C e E) com os de seus respectivos glicoderivados (Figura 3.53D e F), percebem-se diminuições nas respectivas intensidades. No entanto, quando se comparam os espectros da PS-1 com os de seu glicoderivado [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, ocorre um

comportamento inverso, havendo uma diminuição nas intensidades dos respectivos mínimos nos espectros da glicofoma (Figura 3.53A, p. 138). Esses comportamentos são melhor visualizados na Figura 3.54, que apresenta os teores de helicidade em função da razão L/P, tendo sido esses valores obtidos a partir da desconvolução dos espectros de CD em elipticidade molar e representados na forma de fração molar para cada biomolécula. Os dados obtidos apresentaram excelentes concordâncias em termos dos conteúdos conformacionais.

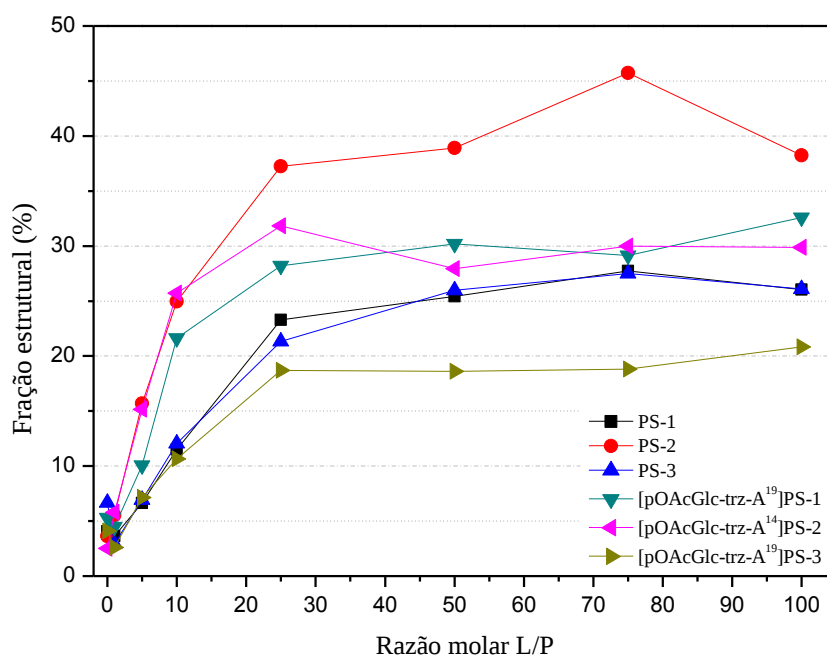


Figura 3.54: Fração helicoidal (%) em função da razão molar L/P, obtida por desconvolução dos espectros de CD.

Nesse gráfico, fica evidenciado que o conteúdo α -helicoidal aumenta para a PS-1 após a inserção da unidade glicotriazólica, passando de 26,4 para 32,6%, enquanto que para a PS-2 e PS-3 há uma diminuição, passando de 38,3 para 29,9 em relação à [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 e de 26,1 para 20,8% em relação à [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3, respectivamente. Com esses resultados, é possível inferir que a inserção do carboidrato per-*O*-acetilado na porção C-terminal, crítica para a topologia de interação da PS-1 (ver Figura 3.38 e discussões, p. 103 e 104), favorece uma maior estabilidade conformacional para a hélice peptídica.

Apesar dos dados de CD para os peptídeos PS-1, -2 e -3 e para os seus derivados glicotriazólicos apresentarem conformações α -helicoidais na presença de vesículas aniônicas, os valores de elipticidades molares obtidos para os mínimos característicos desse tipo de conformação são bem menores, em comparação com os de outros peptídeos antimicrobianos

isolados de anuros, como as ocelatinas -LB1, -LB2 e -F1 e a DD K (Verly *et al.*, 2009; Gusmão *et al.*, 2017). Curiosamente, a espectroscopia de RMN em solução e de sólidos indica que as filoseptinas apresentam conformações α -helicoidais em maior parte de suas extensões e esses resultados sugerem, então, que elas, bem como seus glicoderivados, se particionam entre a forma α -helicoidal ligada à membrana e a forma não estruturada em solução aquosa, quando na presença de meio miméticos de membrana, como as vesículas fosfolipídicas. Essa partição parece estar de acordo com os resultados de ITC obtidos para as três filoseptinas e para suas respectivas glicofomas, no sentido de que as primeiras injeções estão associadas a variações de fluxo de calor exotérmicas, ao passo que fluxos endotérmicos são observados em injeções subsequentes, o que pode estar associado à saturação da interação peptídeo-membrana. Recentemente, foi elucidada pelo grupo de pesquisa na UFMG a estrutura tridimensional da [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2, utilizando-se a espectroscopia de RMN (Wust, 2017). Esse GtP apresentou um grau de helicidade, tanto na presença de micelas de DPC-*d*₃₈ quanto em solução de TFE-*d*₂:H₂O, que é compatível com a estrutura obtida por RMN para o peptídeo nativo, *i.e.*, um segmento helicoidal se estendendo do quinto resíduo de aminoácido até a amidação C-terminal. Esses resultados, aliados aos dados de CD, sugerem que os GtP, quando na presença de vesículas fosfolipídicas, também se particionam entre a forma helicoidal ligada à membrana e à forma não estruturada (não ligada) em meio aquoso.

Como dito anteriormente, a termodinâmica envolvida na interação de peptídeos carregados positivamente com a bicamada lipídica, consiste basicamente em três etapas iniciais: (i) atração eletrostática, (ii) adsorção na superfície da bicamada e (iii) mudança conformacional (Seelig, 2004). O ΔH^0 envolvido nessas etapas mede o conteúdo energético da formação e da “quebra” de ligações polares e, geralmente, quanto mais negativo, mais a interação é favorecida. Os peptídeos carregados positivamente tendem a passar por essas três etapas e, muitos deles, podem também penetrar, de forma hidrofóbica, no interior da bicamada lipídica. O ΔH^0 nessa parte da interação, normalmente é endotérmico, o que implica que a reação apresenta uma dependência maior do fator entrópico do sistema ($-T\Delta S^0$), tais como interações hidrofóbicas e entropia de solvatação.

Dessa forma, puderam-se obter os parâmetros termodinâmicos da formação de hélice nos processos iniciais envolvidos na interação das PS-1, -2 e -3, e das suas respectivas formas glicosiladas. Uma das formas de prever a entalpia envolvida na formação da hélice (ΔH_{helix}^0) foi realizada por Seelig e colaboradores, quando mostraram, para o peptídeo antimicrobiano

magainina 2 e para um fragmento peptídico da enzima rhodanese mitocondrial de rato, que a formação de hélice α induzida pela aproximação à membrana é um processo exotérmico com h_{helix} que varia de -0,6 a 0,8 kcal·mol⁻¹ (Wieprecht *et al.*, 1999; 2000). No caso das filoseptinas, a extensão de formação de hélice α já é conhecida (Resende *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2014) e, portanto, a entalpia correspondente aproximada de formação de hélice ($\Delta H_{helix_1}^0$) pode ser calculada por:

$$\Delta H_{helix_1}^0 = n_{aa} \Delta \Theta_{helix} h_{helix} , \quad (3.4)$$

onde n_{aa} é o número de resíduos de aminoácidos que mudam de conformação na formação da hélice α ; $\Delta \Theta_{helix_1}$, a variação do conteúdo de hélice com o aumento da razão L/P e h_{helix} a entalpia envolvida por resíduo de aminoácido na conformação α -helicoidal. O n_{aa} obtidos para os peptídeos PS-1, -2 e -3, também foram considerados para os seus derivados GtPs, uma vez que, conforme mencionado acima, a estrutura de RMN da [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 mostrou um segmento de hélice com a mesma extensão que o do peptídeo nativo (Wust, 2017). Os $\Delta H_{helix_1}^0$ calculados para todas essas moléculas estão organizados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Parâmetros termodinâmicos obtidos pela espectroscopia de CD

Peptídeo	n_{aa}	$\Delta \Theta_{helix}$	$\Delta H_{helix_1}^0$ ^a (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta H_{helix_2}^0$ ^b (kcal·mol ⁻¹)	K_I ^b	N ^b
PS-1	15	22,0	-2,31	-2,15 ± 0,1	13800 ± 900	4.34 ± 0,021
[pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-1		27,3	-2,87	-2,67 ± 0,1	14900 ± 850	3.88 ± 0,024
PS-2	15	34,6	-3,63	-3,38 ± 0,1	21080 ± 686	10.12 ± 0.098
[pOAcGlc-trz-A ¹⁴]PS-2		27,4	-2,88	-2,98 ± 0,1	18400 ± 849	9.70 ± 0.023
PS-3	11	19,4	-1,50	-1,79 ± 0,1	10500 ± 101	2.71 ± 0.046
[pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-3		16,8	-1,29	-1,99 ± 0,1	11650 ± 105	3.21 ± 0.045

^a Calculado usando a Equação 3.4. ^b Parâmetros obtidos pela isoterma de ligação de Langmuir.

Além do cálculo da entalpia teórica envolvida no processo de estruturação dos peptídeos, com os dados quantificados de CD, isotermas de ligação podem ser deduzidas, considerando a variação da elipticidade molar em 222 nm em função da razão L/P. Para isso, foi aplicado um dos modelos de isoterma de ligação de Langmuir, o qual considera que a superfície da bicamada lipídica esteja coberta com uma certa quantidade de peptídeos ligada a N lipídeos (LangmuirEXT2, *software* Microcal Origin[®] 7.0). As isotermas obtidas para cada molécula estão representadas na Figura 3.55, p. 142, e os parâmetros calculados, com os ajustes,

organizados na Tabela 3.10, p. 142, onde K_1 é a constante de afinidade de Langmuir, N , o número de lipídeos ligados por peptídeo, e $\Delta H_{helix_2}^0$ a entalpia de formação de hélice.

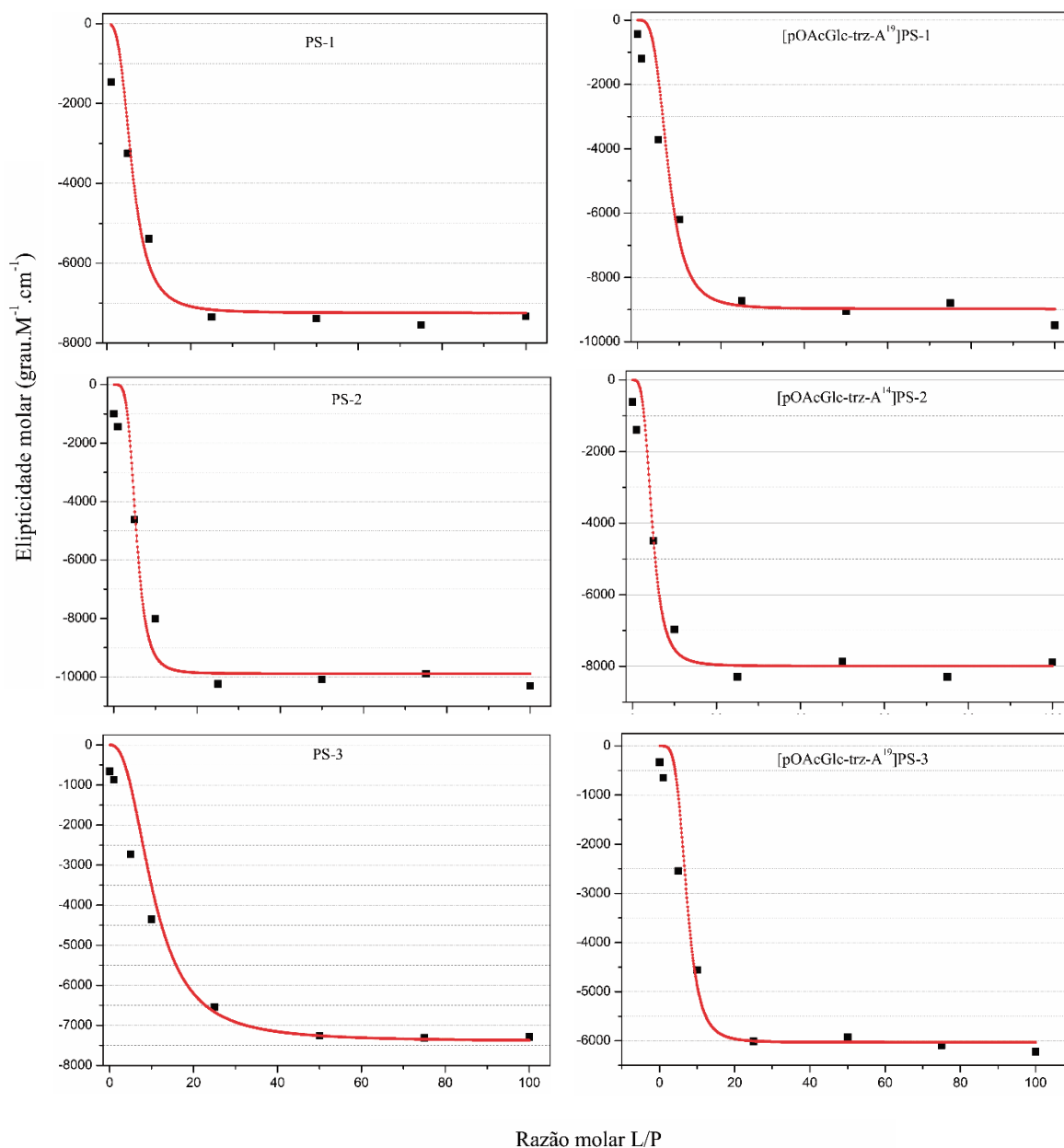


Figura 3.55: Isotermas de ligação obtidas para as PS-1, PS-2, PS-3 e seus respectivos GtPs. A elipticidade molar em 222 nm foi plotada em função da razão molar P/L (■). A linha vermelha corresponde às isotermas obtidas e ajustadas pelo modelo de isoterma de ligação de Langmuir (LangmuirEXT2, *software* Microcal Origin® 7.0).

De posse da entalpia de formação da hélice ($\Delta H_{helix_2}^0$) aliadas à afinidade K_1 e com o parâmetro N , foi possível simular uma nova isoterma, porém empregando-se a razão molar L/P utilizada nos experimentos de ITC (Figura 3.56, isoterma em preto, p. 143). Essa isoterma simulada, para cada peptídeo, denominada de isoterma de adsorção de Langmuir, foi então

subtraída pelos dados das isotermas da ITC da Figura 3.52, p. 136 (Figura 3.56, isoterma em vermelho), fornecendo assim uma terceira isoterma (Figura 3.56, isoterma em azul).

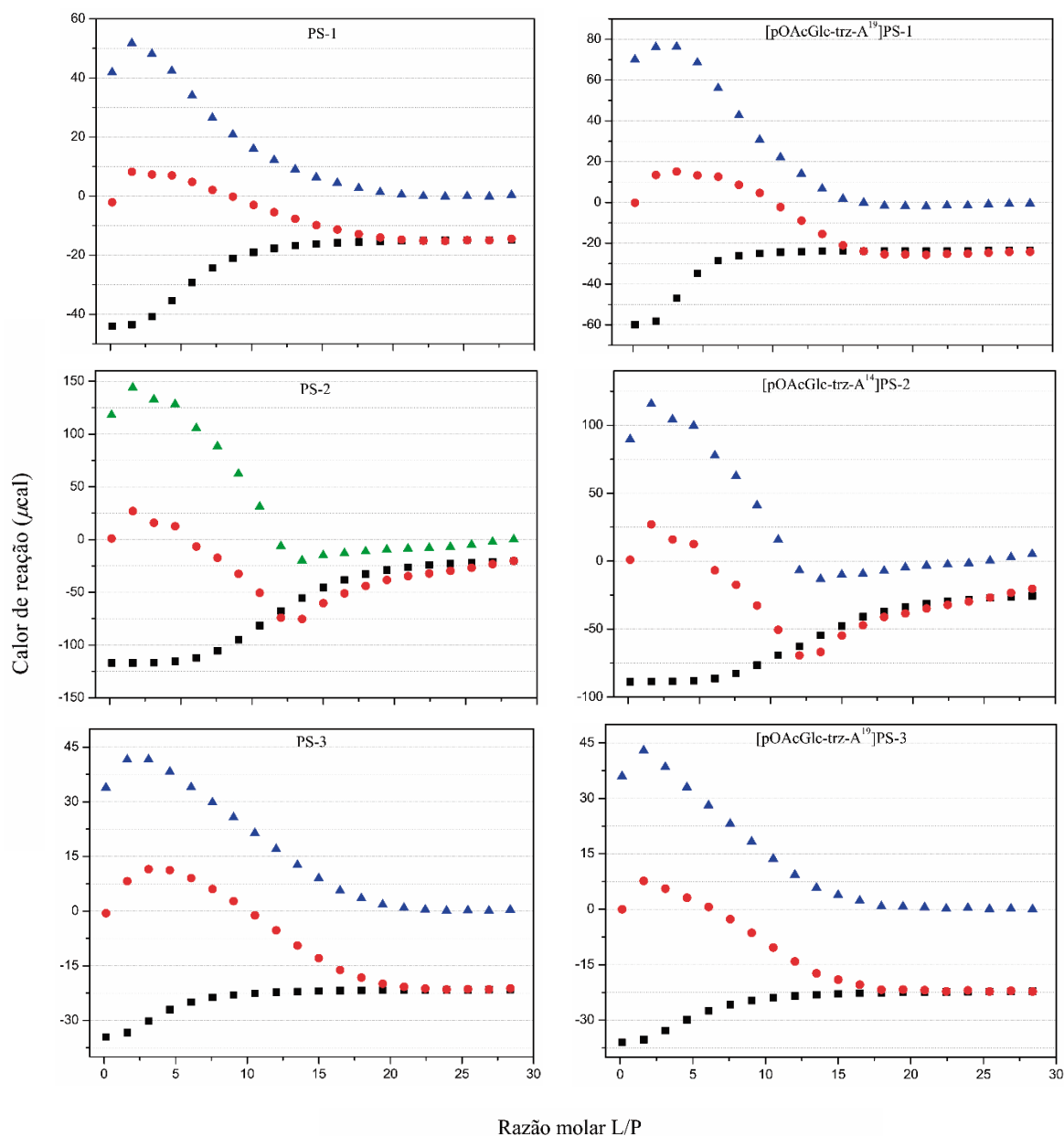


Figura 3.56: Análises das isotermas de ITC, utilizando o modelo de isoterma de ligação de Langmuir. Em preto (■), a isoterma de Langmuir simulada utilizando parâmetros obtidos por CD com as razões molares L/P experimentais do ITC. Em vermelho (●), isoterma obtida experimentalmente pela ITC. Em azul (▲), isoterma resultante da subtração da isoterma de Langmuir em preto pela isoterma obtida nos experimentos de ITC, em vermelho.

A isoterma resultante de cada peptídeo foi plotada e realizou-se o ajuste pela isoterma de Wiseman, que possibilitou a obtenção dos parâmetros termodinâmicos referentes apenas à

interação dos peptídeos e glicotriazol-peptídeos ligados à membrana (Figura 3.57 e Tabela 3.11, p. 145).

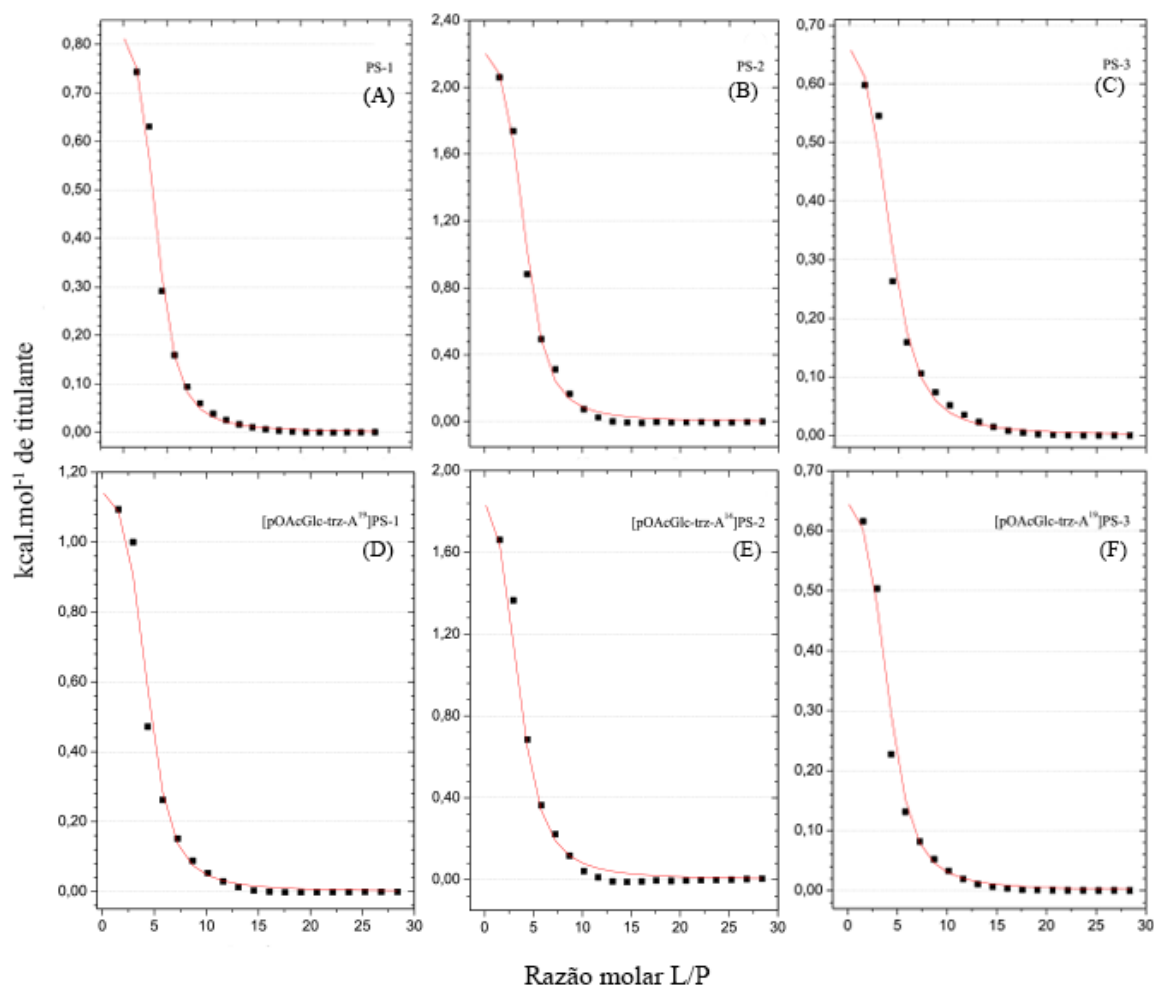


Figura 3.57: Dados obtidos pela diferença da isoterma de Langmuir e a isoterma obtida nos experimentos de ITC. A linha em vermelho representa a isoterma obtida pelo modelo de interação de Wiseman.

Observando a descrição e os resultados apresentados na Figura 3.52, p. 136, as primeiras injeções estão associadas a variações de fluxo de calor exotérmicas, ao passo que fluxos endotérmicos são observados em injeções subsequentes. Com a subtração realizada, a isoterma resultante apresentou somente uma variação de fluxo endotérmica, sugerindo que os parâmetros obtidos do ajuste estejam associados somente aos peptídeos que estão ligados à membrana, *i.e.*, após X razão L/P tem-se apenas calores de diluição (Tabela 3.11, p. 145).

Tabela 3.11: Parâmetros termodinâmicos corrigidos obtidos pela ITC

Peptídeo	<i>N</i>	<i>K_{app}</i> (M ⁻¹)	ΔH° (cal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹)	ΔG° (cal.mol ⁻¹)	(- <i>T</i> ΔS°)
PS-1	3,31±0,07	41.900±3990	933,1±70,2	24,3	-6.282,98	-7245,1
[pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-1	3,86±0,10	54.800±4150	1.251,0±54,1	25,9	-6.441,43	-7722,1
PS-2	3,65±0,07	51.400±2300	2.442,0±105,0	29,7	-6.403,62	-8855,1
[pOAcGlc-trz-A ¹⁴]PS-2	2,99±0,10	31.200±4180	2.237,0±122,0	28,1	-6.108,91	-8378,0
PS-3	3,72±0,10	32.000±2110	771,3±66,3	23,2	-6.123,86	-6917,1
[pOAcGlc-trz-A ¹⁹]PS-3	3,60±0,09	40.600±1020	735,3±43,9	23,6	-6.264,38	-7036,3

Como demonstrado anteriormente por resultados de espectroscopias de CD e de RMN em solução, obtidos por nosso grupo ao longo dos anos, os três peptídeos apresentam segmentos definidos de hélices anfipáticas e, em termos de estabilidade estrutural, tem-se $PS-2 \geq PS-1 > PS-3$ - Figura 3.38, p. 104 (Resende *et al.*, 2008). Essas estabilidades estruturais foram explicadas com base em diferentes interações hidrofóbicas, de neutralização de dipolo e de *capping* de hélice, tendo-se confirmado que, pequenas modificações nas sequências de aminoácidos das cadeias peptídicas, levaram a significativas diferenças nas estruturações, em especial nas proximidades das porções C-terminal, pois estas modificações nas sequências peptídicas se dão a partir do 14º resíduo de aminoácido, quando comparadas as cadeias dos três peptídeos.

Conforme mencionado anteriormente (Figura 3.38 e discussões relacionadas nas p. 103 e 104) estudos de RMN de sólidos indicaram que a PS-2 e a PS-3 apresentam topologias perfeitamente paralelas à superfície da membrana, ao passo que a PS-1 apresenta um desvio da planaridade, devido à presença do resíduo polar de Asn19 na face apolar da hélice. Não obstante, a presença de um resíduo de treonina na posição 14 parece conferir à PS-2 uma maior anfipaticidade em relação às outras duas filoseptinas. Por isso, conforme discutido na seção 3.1, p. 103 e 104, as glicosilações foram realizadas em posições criteriosamente selecionadas, a fim de se tentar aumentar a afinidade das filoseptinas por membranas. Comparando-se a PS-1 e seu derivado [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, a contribuição entálpica (ΔH^0) aumenta de forma considerável, o que indica uma diminuição das interações eletrostáticas. Ao mesmo tempo, é observada uma diminuição do termo entrópico $-T\Delta S^0$ para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, o que sugere uma intensificação das interações hidrofóbicas. Esses dois fatores sugerem a inserção

da unidade glicotriazólica na interface das vesículas, que estaria associada a: (i) interações hidrofóbicas mais pronunciadas e, conseqüentemente, diminuição do termo entrópico $-T\Delta S^0$; (ii) aumento do valor de ΔH^0 , uma vez que o resíduo hidrofílico de Asn19 do peptídeo nativo, que antes se encontrava na interface da bicamada, em interações com as cabeças polares de fósforo e as moléculas de água, não faz parte da sequência do GtP. O ΔG^0 mais negativo, calculado para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1, indica que a ligação passa a ocorrer de forma mais espontânea. O valor de K_{app} confirma o aumento considerável de afinidade após a glicosilação, passando de 41900 para a PS-1 para 54800 M⁻¹ para o seu derivado GtP. Portanto, a substituição por uma unidade glicotriazólica do resíduo hidrofílico de Asn19, que é uma descontinuidade na face apolar da hélice da PS-1, provocou uma melhora incontestável nos parâmetros termodinâmicos de interação da PS-1. Conforme discutido anteriormente, o resíduo de Asn19 confere um desvio da planaridade para a topologia de interação do peptídeo nativo com membranas. Os resultados aqui obtidos indicam que o resíduo glicotriazólico deve se inserir no interior da membrana, o que certamente altera a topologia de interação para o respectivo GtP. Em investigações futuras dessas moléculas, pode ser de grande valia sintetizar a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1 com marcações isotópicas seletivas de ¹⁵N e de ²H, a fim de se analisar por espectroscopia de RMN de sólidos sua topologia de interação em maiores detalhes. É importante destacar também que a internalização do resíduo pOAcGlc-trz-A foi observada para o GtP derivado da HSP1-NH₂ (seção 3.4.2.3, p. 121 a 126), o que corrobora os resultados aqui obtidos para a [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-1.

A interação da PS-2 com a bicamada lipídica foi diminuída com a inserção da unidade glicotriazólica. A diminuição do ΔH^0 , após essa modificação estrutural, indica que há um aumento das interações eletrostáticas, fato que se deve a uma menor inserção dos resíduos carregados na bicamada. Nesse caso, há uma diminuição do ΔS^0 e o ΔG^0 se torna menos negativo, o que indica uma reação menos espontânea e uma menor dependência em relação ao termo entrópico ($-T\Delta S^0$ menos negativo). Essa diminuição de interação após a glicosilação se confirma quando se observam os valores de K_{app} , que caem consideravelmente de 51.400 para a PS-2 para 31.200 M⁻¹ para [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2. Assim, fica comprovado que a substituição da Thr-14 por uma unidade glicotriazólica per-O-acetilada, perturba sua anfipaticidade. Curiosamente, a presença de um resíduo hidrofílico nessa posição confere uma maior anfipaticidade para a PS-2 em relação às outras duas filoseptinas. A inserção de um resíduo glicotriazólico nessa posição parece, então, acarretar em interações mais fracas do GtP com os fosfolipídios da membrana, conforme mostrado pelos valores de N , passando de 3,65

para 2,99 lipídios que interage por peptídeo. Em investigações futuras dessas moléculas, será certamente interessante remover os grupos acetato da unidade glicosídica por reação de desproteção, uma vez que a presença de um grande número de grupos hidroxila livres nessa posição chave, pode vir a aumentar de forma significativa a afinidade do respectivo GtP por membranas.

Quanto à glicosilação da PS-3, percebeu-se um ligeiro favorecimento da interação do respectivo GtP tanto por fatores entrópicos, quanto entálpicos, sendo que o ΔG^0 indica que foi aumentada a espontaneidade da interação. Os valores de K_{app} confirmam o aumento da interação do [pOAcGlc-trz-A¹⁹]PS-3 em relação à PS-3, que passam de 32.000 desta última para 40.600 M⁻¹ (Tabela 3.11, p. 145). O objetivo da inserção da unidade GtP era justamente trabalhar com a porção C-terminal da PS-3, que mostra menor estabilidade estrutural, quando comparada às outras filoseptinas. Os resultados obtidos indicaram, no fim das contas, parâmetros de interação mais favoráveis, conforme esperado.

Apesar da PS-2 não apresentar uma melhora na interação, é importante destacar que o maior favorecimento da interação das PS-1 e PS-3 nas suas formas glicosiladas, também vai de acordo aos resultados de SPR obtidos para as interações da HSP1-NH₂ e de seus derivados com as bicamadas de POPC:POPG:ergosterol (3:1:1) (Tabela 3.8, p. 123), no sentido de que, a glicosilação na região N-terminal aumentou a afinidade das glicoformas em comparação com a respectiva cadeia polipeptídica base e com o seu derivado triazólico. Ainda é importante destacar que foi comprovada a partição das filoseptinas investigadas entre a forma ligada e a forma em solução, sendo que estudos prévios mostram que as formas ligadas apresentam conformações bem definidas, além do que, os três peptídeos nativos apresentam significativo potencial antifúngico e antibacteriano (Resende *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2014). Em outros trabalhos será importante se avaliarem os potenciais biológicos dos derivados glicosilados, a fim de se verificar o efeito das glicosilações nas propriedades antimicrobianas desses peptídeos.

CONCLUSÃO

Apesar dos consideráveis avanços na química de peptídeos, as metodologias de síntese dependem de uma série de questões, que influenciam diretamente na eficiência reacional e na qualidade dos produtos obtidos. Nesse sentido, o presente trabalho de tese teve como objeto a síntese de peptídeos, explorando duas importantes modificações pós-translacionais: a formação de ligação de dissulfeto e a glicosilação de peptídeos – além de investigar a influência da inserção das unidades glicotriazólicas em cadeias peptídicas.

O primeiro tópico abordado nesta tese trata da síntese e da cinética reacional para obtenção do homodímero homotarsinina (Htr), a partir de reações de dimerização de sua cadeia monomérica (Htr-M). Dentre as investigações realizadas neste trabalho, é descrito o estudo de cinética de dimerização de peptídeos através da formação de ligação dissulfeto em meios empregando co-solvente orgânico e sistemas micelares, visando estabelecer a influência destes meios nessa cinética. Assim, os estudos de cinética foram realizados em solução tampão aquosa, em solução de TFE:H₂O e na presença de micelas de SDS. Os dados obtidos foram ajustados a um modelo matemático, que foi capaz de fundamentar teoricamente o processo de dimerização nesses meios. Evidências de estados agregados e um perfil sigmoidal da curva obtida a partir do monitoramento da dimerização, levaram à utilização de um modelo baseado em um processo com dois estágios principais: o período de maturação e o estado de aceleração da reação. O ajuste das curvas a partir da equação de Avrami tiveram boa concordância com os dados experimentais. Os parâmetros cinéticos calculados evidenciaram que o processo de dimerização em meio aquoso depende da formação de vários agregados no período de indução, os quais parecem ser importantes na estruturação em hélice α das cadeias monoméricas de Htr-M. Na solução de TFE:H₂O, existem cadeias monoméricas previamente estruturadas e livres, sem estarem agregadas, e os parâmetros obtidos indicam que a dimerização não depende significativamente da agregação, o que também é observado na presença de micelas de SDS, onde a formação de hélice é facilmente alcançada e a agregação tem uma influência marginal no processo de dimerização. Portanto, a dimerização em micelas de SDS é significativamente mais rápida que em meio aquoso e em TFE:H₂O (40:60, v/v), mas o maior rendimento foi obtido em TFE:H₂O (40:60, v/v), seguido pelo obtido em meio aquoso e em SDS.

Uma melhor compreensão do processo de dimerização, bem como das características propiciadas pelos diferentes meios reacionais abre as portas para uma série de possibilidades

práticas, considerando-se que essa classe de peptídeos tem despertado enorme interesse da comunidade científica, o que é constatado pelo número de publicações em periódicos científicos de considerável fator de impacto [vide Introdução do Capítulo 2 e referências (Raimondo *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2009; Verly *et al.*, 2017)]. Assim, neste trabalho foram produzidos resultados relevantes, que apontaram para cinéticas de reações mais eficientes em sistemas micelares e vantagens com relação ao uso de co-solventes. Espera-se que essas descrições mais acuradas da cinética e do mecanismo de dimerização possam ser utilizadas em inúmeros outros trabalhos, que proponham a investigação de peptídeos diméricos, sejam essas relacionadas a aspectos estruturais, de interação, de atividade biológica, dentre outras. Portanto, conclui-se que a utilização desses meios pode propiciar cinéticas e/ou rendimentos bem mais satisfatórios do que as reações convencionais, que são normalmente conduzidas em meio aquoso tamponado.

O segundo tema abordado neste trabalho objetivou a síntese de derivados glicotriazólicos (GtPs) de peptídeos antimicrobianos, bem como retratou de forma inédita (até o ponto que sabemos) as investigações do potencial biológico e das interações dessas moléculas com meios miméticos de membranas. Na busca por alternativas que pudessem ser aplicadas de forma simples e eficiente na junção de um carboidrato à cadeia peptídica, este trabalho aliou a eficiência da química “*click*” à praticidade da síntese de peptídeos em fase sólida. Dessa forma, foi descrita a obtenção de glicotriazol-peptídeos derivados dos peptídeos antimicrobianos HSP1-NH₂, PS-1, PS-2 e PS-3. A estratégia usada para a obtenção dos GtPs mostrou ter boa aplicabilidade às necessidades da presente proposta. Mesmo com algumas dificuldades, que variam de acordo com cada caso, a CuAAC pôde ser utilizada como complemento dos protocolos da SPFS, pois os peptídeos aqui glicosilados foram obtidos com bons rendimentos e com excelente grau de pureza. Do ponto de vista sintético, o ganho de atividade obtido a partir desse procedimento é extremamente relevante, uma vez que duas unidades ativas puderam ser ligadas a partir de um “*link*” triazólico estável e de reconhecido potencial antifúngico, a partir de uma única etapa de reação relativamente simples. Destaca-se aqui a possibilidade de melhorias significativas das propriedades biológicas de sequências peptídicas de diferentes tamanhos.

No caso da HSP1-NH₂, foram produzidos derivados GtPs com propriedades antifúngicas bem superiores, como comprovado pelos ensaios biológicos. Com o objetivo de se investigar o efeito das unidades não peptídicas na promoção da atividade, experimentos biofísicos indicaram que a unidade de carboidrato leva a interações mais favoráveis com

membranas, ao passo que tanto a unidade sacarídica quanto a triazólica atuam na inibição da biossíntese do ergosterol, embora a unidade triazólica individualmente já presente, a maiores concentrações, efeito inibitório significativo.

A glicosilação das filoseptinas foi comprovada pelo sequenciamento *de novo*, que, claramente, mostrou o perfil geral de fragmentação dos peptídeos contendo a unidade glicotriazólica. Também foram realizados estudos biofísicos para esses peptídeos, que apontaram, após a inserção das unidades glicotriazólicas na cadeia peptídica, um aumento da interação das PS-1 e -3, porém uma diminuição da interação da PS-2. O aumento mais interessante foi o do [pOAcGlcTrz-A¹⁹]PS-1, pois, segundo os dados de topologia obtidos por RMN em estudos anteriores, a PS-1 apresentava parte da cadeia peptídica desviada para fora da membrana, região, justamente, onde foi inserida uma unidade glicotriazólica. Os dados de CD também reforçam essa melhora indicando um aumento no seu conteúdo α -helicoidal, o que está relacionado com sua maior interação com a bicamada e a uma maior fração ligada do GtP, em relação ao peptídeo nativo. No caso da PS-2, fica comprovado que a substituição da Thr-14 por uma unidade glicotriazólica per-*O*-acetilada, perturba sua anfipaticidade, o que diminui a sua interação. E, por fim, para a PS-3, também houve um aumento na interação com a glicosilação, mesmo com a diminuição do conteúdo α -helicoidal, o que, de fato, reforça que a inserção dessa unidade tende a aumentar a interação com a bicamada.

Portanto, este trabalho permitiu não só a obtenção sintética de GtPs, como também revelou o potencial dessa unidade glicotriazólica na melhoria das atividades dos PAMs e de suas interações com membranas. A estratégia apresentada aqui pode ser facilmente ampliada para outros PAMs ativos, como foi feita, por exemplo, na incorporação de derivados antifúngicos obtidos a partir da quitosana (Gabriel *et al.*, 2015; Elieh-Ali-Komi e Hamblin, 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, A. B. M. *et al.* A backbone amide protecting group for overcoming difficult sequences and suppressing aspartimide formation. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 360-367, 2016. ISSN 1099-1387. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/psc.2877> >.

ABEDINI, A.; RALEIGH, D. P. Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. **Organic letters**, v. 7, n. 4, p. 693-696, 2005. ISSN 1523-7060.

AL-WARHI, T. I.; AL-HAZIMI, H. M.; EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 97-116, 2012. ISSN 1319-6103.

ALI, M. F. *et al.* Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 81-89, 2001. ISSN 0167-4838.

ALVAREZ, C. *et al.* Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces--modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. **Chem Phys Lipids**, v. 122, n. 1-2, p. 97-105, Jan 2003. ISSN 0009-3084 (Print)

0009-3084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598041> >.

AMBLARD, M. *et al.* Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006. ISSN 1073-6085.

ANDERSON, V. L.; WEBB, W. W. A desolvation model for trifluoroethanol-induced aggregation of enhanced green fluorescent protein. **Biophysical journal**, v. 102, n. 4, p. 897-906, 2012. ISSN 0006-3495.

ANDREEV, O. A. *et al.* Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 19, p. 7893-7898, May 8, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/104/19/7893.abstract> >.

ANDREWS, D.; KITCHIN, J.; SEALE, P. Solid-phase synthesis of a range of O-phosphorylated peptides by post-assembly phosphorylation and oxidation. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 38, n. 5, p. 469-475, 1991. ISSN 1399-3011.

ARAGÃO-LEONETI, V. *et al.* Application of copper (I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC)'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, v. 66, n. 49, p. 9475-9492, 2010. ISSN 0040-4020.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. *et al.* Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 10, p. 3332-7, Oct 1999. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488201> >.

AVRAMI, M. Kinetics of phase change. I General theory. **Journal of Chemical Physics**, v. 7, n. 12, p. 1103-1112, 1939. ISSN 0021-9606.

_____. Kinetics of phase change. II transformation-time relations for random distribution of nuclei. **Journal of Chemical Physics**, v. 8, n. 2, p. 212-224, 1940. ISSN 0021-9606.

_____. Granulation, phase change, and microstructure kinetics of phase change. III. **Journal of chemical physics**, v. 9, n. 2, p. 177-184, 1941. ISSN 0021-9606.

BACSA, B. *et al.* Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: a critical comparison of microwave and conventional heating technologies. **The Journal of organic chemistry**, v. 73, n. 19, p. 7532-7542, 2008. ISSN 0022-3263.

BAKSHI, K. *et al.* Circular dichroism of peptides. **Therapeutic Peptides: Methods and Protocols**, p. 247-253, 2014. ISSN 1627036725.

BARBOSA, B. P. D. A. **Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos Homotarsinina e LyeTx I mnAK Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolipídicas**. 2016. 72 Dissertation (Mestrado). Química, Universidade Federal de Minas Gerais

BARNHAM, K. J. *et al.* Helical structure and self-association in a 13 residue neuropeptide Y Y2 receptor agonist: relationship to biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1435, n. 1, p. 127-137, 1999. ISSN 0167-4838.

BATISTA, C. *et al.* Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta* 1. **Peptides**, v. 20, n. 6, p. 679-686, 1999. ISSN 0196-9781.

BATISTA, C. V. *et al.* A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS letters**, v. 494, n. 1-2, p. 85-89, 2001. ISSN 1873-3468.

BATISTA, C. V. F. *et al.* A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS letters**, v. 494, n. 1, p. 85-89, 2001. ISSN 0014-5793.

BECHINGER, B.; GORR, S.-U. Antimicrobial Peptides Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, p. 0022034516679973, 2016. ISSN 0022-0345.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006. ISSN 0005-2736.

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, p. 115-125, 2011. ISSN 0301-4622.

BEDNARSKA, N. G.; WREN, B. W.; WILLCOCKS, S. J. The importance of the glycosylation of antimicrobial peptides: natural and synthetic approaches. **Drug discovery today**, 2017. ISSN 1359-6446.

BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 1, p. 4-27, 2016. ISSN 1099-1387.

BENINCASA, M. *et al.* Methods for Elucidating the Mechanism of Action of Proline-Rich and Other Non-lytic Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols**, p. 283-295, 2017. ISSN 1493967355.

BESCHIASCHVILI, G.; SEELIG, J. Peptide binding to lipid bilayers. Binding isotherms and zeta.-potential of a cyclic somatostatin analog. **Biochemistry**, v. 29, n. 49, p. 10995-11000, 1990. ISSN 0006-2960.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual review of biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 395-414, 1990. ISSN 0066-4154.

BOMMARIUS, B. *et al.* Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 1957-1965, 2010. ISSN 0196-9781.

BOONS, G.-J.; HALE, K. J. **Organic synthesis with carbohydrates**. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 0470760052.

BRAY, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 7, p. 587-593, 2003. ISSN 1474-1776.

BREITLING, R. *et al.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein expression and purification**, v. 25, n. 2, p. 209-218, 2002. ISSN 1046-5928.

BROECKER, J.; VARGAS, C.; KELLER, S. Revisiting the optimal cvalue for isothermal titration calorimetry. **Analytical biochemistry**, v. 418, n. 2, p. 307-309, 2011. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269711004970> >.

BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 1, p. 87-92, 2005. ISSN 0734-9750.

BULET, P. *et al.* A novel inducible antibacterial peptide of Drosophila carries an O-glycosylated substitution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14893-14897, 1993. ISSN 0021-9258.

BULET, P. *et al.* Insect immunity. The inducible antibacterial peptide dipterin carries two O-glycans necessary for biological activity. **Biochemistry**, v. 34, n. 22, p. 7394-7400, 1995. ISSN 0006-2960.

BUTLER, M. S. *et al.* Glycopeptide antibiotics: back to the future. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 9, p. 631-644, 2014. ISSN 0021-8820.

CALCE, E. *et al.* Air oxidation method employed for the disulfide bond formation of natural and synthetic peptides. **Amino acids**, v. 47, n. 8, p. 1507-1515, 2015. ISSN 0939-4451.

CARDONA, V. *et al.* Application of Dmb-dipeptides in the Fmoc SPPS of difficult and aspartimide-prone sequences. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 14, n. 4, p. 285-292, 2008. ISSN 1573-3149.

CARNICELLI, V. *et al.* Interaction between antimicrobial peptides (AMPs) and their primary target, the biomembranes. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education**, v. 2, p. 1123-1134, 2013.

CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 19, p. 5748-5749, 1970. ISSN 0002-7863.

CARPINO, L. A. *et al.* Synthesis of 'difficult' peptide sequences: application of a depsipeptide technique to the Jung-Redemann 10- and 26-mers and the amyloid peptide A β (1-42). **Tetrahedron letters**, v. 45, n. 40, p. 7519-7523, 2004. ISSN 0040-4039.

CASTELLANA, E. T.; CREMER, P. S. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. **Surface Science Reports**, v. 61, n. 10, p. 429-444, 11/15/ 2006. ISSN 0167-5729. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167572906000616> >.

CAVAGNERO, S.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Improved low pH bicelle system for orienting macromolecules over a wide temperature range. **Journal of biomolecular NMR**, v. 13, n. 4, p. 387-391, 1999. ISSN 0925-2738.

CHAN, W.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach Series)**. Oxford University Press, USA, 2000.

CHAN, Y.-H. M.; BOXER, S. G. Model membrane systems and their applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 581-587, 12// 2007. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593107001457> >.

CHAUDHARY, N.; SINGH, S.; NAGARAJ, R. Aggregation properties of a short peptide that mediates amyloid fibril formation in model proteins unrelated to disease. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 4, p. 679-689, 2011. ISSN 0250-5991.

CHU, B. Dynamic light scattering. **Soft Matter Characterization**, p. 335-372, 2008. ISSN 140204464X.

CIEŚLA, J.; FRĄCZYK, T.; RODE, W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 2, p. 137-148, 2011. ISSN 0001-527X.

COCIANCICH, S. *et al.* Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. **Biochemical journal**, v. 300, n. 2, p. 567-575, 1994. ISSN 0264-6021.

COIN, I. *et al.* Depsipeptide Methodology for Solid-Phase Peptide Synthesis: Circumventing Side Reactions and Development of an Automated Technique via Depsidipeptide Units†. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n. 16, p. 6171-6177, 2006. ISSN 0022-3263.

COLLINS, J. M. *et al.* High-efficiency solid phase peptide synthesis (HE-SPPS). **Organic letters**, v. 16, n. 3, p. 940-943, 2014. ISSN 1523-7060.

COPE, F. Detection of phase transitions and cooperative interactions by Avrami analysis of sigmoid biological time curves for muscle, nerve, growth, firefly, and infrared phosphorescence of green leaves, melanin, and cytochrome C. **Physiological Chemistry and Physics**, v. 9, n. 4-5, p. 443-459, 1976. ISSN 0031-9325.

CRUCHO, C. I. *et al.* Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate research**, v. 402, p. 124-132, 2015. ISSN 0008-6215.

DA COSTA, J. P. *et al.* Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2023-2040, 2015. ISSN 0175-7598.

DALLA SERRA, M. *et al.* Structural Features of Distinctin Affecting Peptide Biological and Biochemical Properties†. **Biochemistry**, v. 47, n. 30, p. 7888-7899, 2008. ISSN 0006-2960.

DALZIEL, M. *et al.* Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 1235681, 2014. ISSN 0036-8075.

DATTA, A.; KUNDU, P.; BHUNIA, A. Designing potent antimicrobial peptides by disulphide linked dimerization and N-terminal lipidation to increase antimicrobial activity and membrane perturbation: Structural insights into lipopolysaccharide binding. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 335-345, 1/1/2016. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979715302071> >.

DE OLIVEIRA FREITAS, L. B. *et al.* A Reação “Click” na Síntese De 1, 2, 3-Triazóis: Aspectos Químicos e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

DELEU, M. *et al.* Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: a review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 12, p. 3171-3190, 2014. ISSN 0005-2736.

DEMPSEY, C. E.; UENO, S.; AVISON, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 402-409, 2003. ISSN 0006-2960.

DIJKSHOORN, L. *et al.* The synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF (1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4919-4921, 2004. ISSN 0066-4804.

DOVIDCHENKO, N. V.; FINKELSTEIN, A. V.; GALZITSKAYA, O. V. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. I. Modeling the

amyloid protofibril formation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 5, p. 1189-1197, 2014. ISSN 1520-6106.

DRUCKER, D. J.; DRITSELIS, A.; KIRKPATRICK, P. Liraglutide. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 4, p. 267-268, 2010. ISSN 1474-1776.

DUPLÂTRE, G.; FERREIRA MARQUES, M.; DA GRAÇA MIGUEL, M. Size of sodium dodecyl sulfate micelles in aqueous solutions as studied by positron annihilation lifetime spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 41, p. 16608-16612, 1996. ISSN 0022-3654.

DUREK, T.; BECKER, C. F. Protein semi-synthesis: new proteins for functional and structural studies. **Biomolecular engineering**, v. 22, n. 5, p. 153-172, 2005. ISSN 1389-0344.

DWEK, R. A. Biological importance of glycosylation. In: (Ed.). **Molecular Recognition and Inclusion**: Springer, 1998. p.1-6. ISBN 9401062269.

EASTON, D. M. *et al.* Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 582-590, 2009. ISSN 0167-7799.

EBANKS, K. C. **Kinetics of Peptide Aggregation**. Virginia Polytechnic Institute and State University, 2011.

ECHEMENDÍA, R. *et al.* The Cu I-catalyzed alkyne–azide cycloaddition as direct conjugation/cyclization method of peptides to steroids. **Tetrahedron**, v. 70, n. 20, p. 3297-3305, 2014. ISSN 0040-4020.

EG SOUZA, S. *et al.* Novel copoly (styrene-divinylbenzene)-resins with different phenylmethylamine groups for use in peptide synthesis method. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 5, p. 392-401, 2015. ISSN 0929-8665.

EL-FAHAM, A. *et al.* COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. **Chemistry–A European Journal**, v. 15, n. 37, p. 9404-9416, 2009. ISSN 1521-3765.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. **International journal of advanced research**, v. 4, n. 3, p. 411, 2016.

EVARISTO, G. *et al.* The chains of the heterodimeric amphibian skin antimicrobial peptide, distinctin, are encoded by separate messenger RNAs. **Journal of proteomics**, 2012. ISSN 1874-3919.

EVERETT, D. H. **Basic principles of colloid science**. Royal Society of Chemistry, 1988. ISBN 1847550207.

FERNANDEZ, M. V.; FREED, E. O. “Expand and Click”: A New Method for Labeling HIV-1 Envelope Glycoproteins. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 5, p. 548-550, 2017. ISSN 2451-9456.

FERREIRA, S. Z. *et al.* Synthesis of a New Peptide–Coumarin Conjugate: A Potential Agent against Cryptococcosis. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 6, n. 3, p. 271-275, 2015. ISSN 1948-5875.

FIELDS, G. B. **Methods in enzymology. Vol. 289, Solid-phase peptide synthesis**. Academic Press, 1997.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International journal of peptide and protein research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990. ISSN 1399-3011.

FINKELSTEIN, J. Glycochemistry & glycobiology. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 999-999, 2007. ISSN 0028-0836.

FINNEY, E. E.; FINKE, R. G. Is there a minimal chemical mechanism underlying classical Avrami-Erofe'ev treatments of phase-transformation kinetic data? **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 19, p. 4692-4705, 2009. ISSN 0897-4756.

FISCHER, E.; OTTO, E. Synthesis of the derivatives of some dipeptides. **Ber. Deutsch. Chem. Ges.**, v. 36, p. 2106-2116, 1903.

FISCHER, P. M. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 1, p. 9-35, 2003. ISSN 1099-1387.

FRANCO, L. L. *et al.* Synthesis of D-glucose-and N-acetylglucosamine-based N-glycosylsulfonamides. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1044-1052, 2015. ISSN 0100-4042.

FREIRE, J. M. *et al.* Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 4, p. 481-487, 2011. ISSN 0175-7571.

GABRIEL, G. J. *et al.* Interactions between antimicrobial polynorbornenes and phospholipid vesicles monitored by light scattering and microcalorimetry. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12489-12495, 2008. ISSN 0743-7463.

GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. D. O. Synthesis, characterization, and antifungal activities of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5725-5731, 2015. ISSN 0021-8561.

GALONIC, D. P. *et al.* Glycochemistry & glycobiology. **Nature**, v. 446, p. 26, 2007.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Molecular aspects of cell biology**. Saunders College Publ., 1995. ISBN 003011604X.

GAST, K. *et al.* Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. **European Biophysics Journal**, v. 30, n. 4, p. 273-283, 2001. ISSN 0175-7571.

GE, Y. *et al.* In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 782-788, 1999. ISSN 0066-4804.

GÓNGORA-BENÍTEZ, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. **Chemical reviews**, v. 114, n. 2, p. 901-926, 2013. ISSN 0009-2665.

GOODMAN, M. *et al.* **Synthesis of peptides and peptidomimetics**. Thieme, 2003. ISBN 1588901823.

GOODWIN, D.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 26, p. 4451-4461, // 2012. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2012/00000019/00000026/art00006>

<https://doi.org/10.2174/092986712803251548> >.

GREGORIADIS, G. *et al.* Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. **International journal of pharmaceutics**, v. 300, n. 1, p. 125-130, 2005. ISSN 0378-5173.

GUALTIERI, A. *et al.* Kinetics of formation of zeolite Na-A [LTA] from natural kaolinites. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 24, n. 3, p. 191-199, 1997. ISSN 0342-1791.

GUIMARÃES, C. F. R. C. **Peptídeo Antimicrobiano Homotarsinina: Estudos Reacionais de Dimerização e Ensaio de Citotoxicidade**. 2013. 111 Dissertation (Master). Departamento de Química, UFVJM, Diamantina, MG.

GUSMÃO, K. A. *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. ISSN 1678-9199.

GUZMÁN, F.; BARBERIS, S.; ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 279-314, 2007. ISSN 0717-3458.

HAASE, C.; SEITZ, O. Chemical Synthesis of Glycopeptides. In: (Ed.). **Glycopeptides and Glycoproteins**: Springer, 2006. p.1-36.

HALL, K.; MOZSOLITS, H.; AGUILAR, M.-I. Surface plasmon resonance analysis of antimicrobial peptide–membrane interactions: affinity & mechanism of action. **Letters in Peptide Science**, v. 10, n. 5-6, p. 475-485, 2003. ISSN 0929-5666.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial Peptides: An Introduction. **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols**, p. 3-22, 2017. ISSN 1493967355.

HEERKLOTZ, H. The microcalorimetry of lipid membranes. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, n. 15, p. R441, 2004. ISSN 0953-8984.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1508, n. 1–2, p. 69-85, 11/23/ 2000. ISSN 0005-2736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304415700000095> >.

HEINLEIN, C. *et al.* Fragment condensation of C-terminal pseudoproline peptides without racemization on the solid phase. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 28, p. 6406-6410, 2011. ISSN 1521-3773.

HERZNER, H. *et al.* Synthesis of glycopeptides containing carbohydrate and peptide recognition motifs. **Chemical reviews**, v. 100, n. 12, p. 4495-4538, 2000. ISSN 0009-2665.

HEWAGE, G. B. **Advancements in polymer resins for solid-phase peptide synthesis**. 2016. Massachusetts Institute of Technology

HIMO, F. *et al.* Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210-216, 2005. ISSN 0002-7863.

HOJO, H. Recent progress in the chemical synthesis of proteins. **Current opinion in structural biology**, v. 26, p. 16-23, 2014. ISSN 0959-440X.

HOWL, J. **Peptide synthesis and applications**. Springer Science & Business Media, 2005. ISBN 1592598773.

[HTTP://GLOSARIOS.SERVIDOR-ALICANTE.COM/](http://glosarios.servidor-alicante.com/). Glossário de Química. 2017. Disponível em: < <http://glosarios.servidor-alicante.com/quimica/dicroismo-circular> >. Acesso em: 23-05-2017.

HUANG, Y.-C. *et al.* Accelerated Fmoc solid-phase synthesis of peptides with aggregation-disrupting backbones. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1500-1506, 2015.

INSTRUMENTS, M. Zetasizer nano series user manual. **Worcestershire: Malvern Instruments Ltd**, 2004.

IRZHAK, T.; MEZHIKOVSKII, S.; IRZHAK, V. The physical meaning of the Avrami equation in oligomer curing reactions. **Polymer Science Series B**, v. 50, n. 7-8, p. 201-203, 2008. ISSN 1560-0904.

ISIDRO LLOBET, A.; ÁLVAREZ DOMINGO, M.; ALBERICIO PALOMERA, F. Amino acid-protecting groups. **Chemical Reviews**, 2009, vol. 109, num. 6, p. 2455-2504, 2009. ISSN 0009-2665.

JAD, Y. E. *et al.* Peptide synthesis beyond DMF: THF and ACN as excellent and friendlier alternatives. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2393-2398, 2015.

JAD, Y. E. *et al.* Oxyma-T, expanding the arsenal of coupling reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 31, p. 3523-3525, 8/3/ 2016. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403916307882> >.

JAD, Y. E. *et al.* Oxyma-B, an excellent racemization suppressor for peptide synthesis. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, n. 42, p. 8379-8385, 2014.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006. ISSN 0893-8512.

Jl, H. *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 13, p. 2493-2505, 2000. ISSN 0022-2623.

JOHNSON JR, W. C. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 17, n. 1, p. 145-166, 1988. ISSN 0084-6589.

JUNGHANS, A. *et al.* Protein– Lipid Interactions at the Air– Water Interface. **Langmuir**, v. 26, n. 14, p. 12049-12053, 2010. ISSN 0743-7463.

JUNIOR, E. F. C. **SÍNTESE QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM MEIOS BIOMIMÉTICOS DE GLICOPEPTÍDEO-TRIAZÓIS DERIVADOS DE HSP-1**. 2015. 87 Dissertação (Mestrado). Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG.

KAMIMORI, H. *et al.* Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. **Analytical biochemistry**, v. 337, n. 1, p. 149-153, 2005. ISSN 0003-2697.

KANESHIRO, C. M.; MICHAEL, K. A Convergent Synthesis of N-Glycopeptides. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 7, p. 1077-1081, 2006. ISSN 1521-3773.

KASZUBA, M. *et al.* Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 823-829, 2008. ISSN 1388-0764.

KATAYAMA, H. *et al.* Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. **Peptides**, v. 23, n. 9, p. 1537-1546, 2002. ISSN 0196-9781.

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12217413> >.

KATHIRAVAN, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012. ISSN 0968-0896.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current protein and peptide science**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000. ISSN 1389-2037.

KEMP, D. Racemization in peptide synthesis. **The peptides, analysis, synthesis, biology**, v. 2, p. 315-383, 2014.

KENNER, G.; MCDERMOTT, J.; SHEPPARD, R. The safety catch principle in solid phase peptide synthesis. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 12, p. 636-637, 1971.

KENT, S. B. Chemical synthesis of peptides and proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 957-989, 1988. ISSN 0066-4154.

KENT, S. B. H. Total chemical synthesis of proteins. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 338-351, 2009. ISSN 0306-0012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B700141J> >.

KHAN, R. A. Synthesis of Met-enkephalin by solution-phase peptide synthesis methodology utilizing para-toluene sulfonic acid as N-terminal masking of l-methionine amino acid. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 88, n. 6, p. 884-888, 2016. ISSN 1747-0285.

KIMMERLIN, T.; SEEBACH, D. '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*. **The Journal of peptide research**, v. 65, n. 2, p. 229-260, 2005. ISSN 1399-3011.

KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International journal of peptide and protein research**, v. 36, n. 3, p. 255-266, 1990. ISSN 1399-3011.

KNOBLOCH, J. *et al.* Membrane-drug interactions studied using model membrane systems. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 6, p. 714-718, 2015. ISSN 1319-562X.

KOLB, H. C.; FINN, M.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001. ISSN 1521-3773.

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. ISSN 1359-6446.

KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 26, n. 6, p. 689-702, 2016. ISSN 1354-3776.

KUIJPERS, B. H. M. *et al.* Copper (I)-mediated synthesis of trisubstituted 1, 2, 3-triazoles. **Synlett**, v. 16, n. 20, p. 3059-3062, 2005. ISSN 0936-5214.

KUNZ, H. Synthesis of glycopeptides, partial structures of biological recognition components [New Synthetic Methods (67)]. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 26, n. 4, p. 294-308, 1987. ISSN 1521-3773.

KUPRIN, S. *et al.* Nonideality of water-hexafluoropropanol mixtures as studied by X-ray small angle scattering. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 217, n. 3, p. 1151-1156, 1995. ISSN 0006-291X.

KUSHWAHA, D.; TIWARI, V. K. Click chemistry inspired synthesis of glycoporphyrin dendrimers. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, n. 16, p. 8184-8190, 2013. ISSN 0022-3263.

LAMROOD, P. Y. Spectrophotometric Semi-Micro Determination of Ergosterol in Selected Medicinal Indian Phellinus Quél.(Aphyllphoromycetidae) Species. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 11, n. 3, 2009. ISSN 1521-9437.

LARSEN, B. D.; HOLM, A. Incomplete Fmoc deprotection in solid-phase synthesis of peptides. **International journal of peptide and protein research**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 1994. ISSN 1399-3011.

LAUTRETTE, G. *et al.* Nitrogen Arylation for Macrocyclization of Unprotected Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 27, p. 8340-8343, 2016/07/13 2016. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b03757>>.

LAUX-BIEHLMANN, A. *et al.* Endogenous morphine and its metabolites in mammals: history, synthesis, localization and perspectives. **Neuroscience**, v. 233, p. 95-117, 2013. ISSN 0306-4522.

LEADBETTER, M. R. *et al.* Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties. **The Journal of antibiotics**, v. 57, n. 5, p. 326-336, 2004. ISSN 0021-8820.

LEE, J. Y. *et al.* Different modes of antibiotic action of homodimeric and monomeric battenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide. **BMB Rep**, v. 42, n. 9, p. 586-592, 2009.

LEES, J. *et al.* CDtool—an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 285-289, 2004. ISSN 0003-2697.

LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. **Protein expression and purification**, v. 80, n. 2, p. 260-267, 2011. ISSN 1046-5928.

LI, Y. *et al.* Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012. ISSN 0196-9781.

LICO, C. *et al.* The use of plants for the production of therapeutic human peptides. **Plant cell reports**, v. 31, n. 3, p. 439-451, 2012. ISSN 0721-7714.

LIM, D. *et al.* Protecting-Group-Free One-Pot Synthesis of Glycoconjugates Directly from Reducing Sugars. **Angewandte Chemie**, v. 126, n. 44, p. 12101-12105, 2014. ISSN 1521-3757.

LIMA, A. P. E., L.K.; FERRÃO, M., COSTEIRA, J.M.; OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, D.M.S; SILVA, K.M. . SAPOTECA: biblioteca de sons e vídeos de anuros amazônicos., Manaus, Amazonas, Brasil, 2012. Disponível em: < <https://ppbio.inpa.gov.br/sapoteca/paginainicial> >. Acesso em: 27/05/2017.

LIU, B. *et al.* Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy. **Peptides**, v. 88, p. 115-125, 2// 2017. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978116302625> >.

LOHNER, K. Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 5, p. 508-519, 2017. ISSN 1568-0266.

LOHNER, K.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 141-156, 1999. ISSN 0005-2736.

LORAND, T.; KOCSIS, B. Recent advances in antifungal agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7, n. 9, p. 900-911, 2007. ISSN 1389-5575.

LORENZÓN, E. *et al.* Effects of Dimerization on the Structure and Biological Activity of Antimicrobial Peptide Ctx-Ha. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012. ISSN 0066-4804.

LORENZÓN, E. *et al.* Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. **Amino acids**, p. 1-8, 2013. ISSN 0939-4451.

LUNA, O. F. *et al.* Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1542, 2016.

MACKINTOSH, J. A. *et al.* Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6139-6143, 1998. ISSN 0021-9258.

MACPHEE, C. E. *et al.* Trifluoroethanol induces the self-association of specific amphipathic peptides. **FEBS letters**, v. 416, n. 3, p. 265-268, 1997. ISSN 0014-5793.

MAEGAWA, T. *et al.* Novel deprotection method of Fmoc group under neutral hydrogenation conditions. **Amino acids**, v. 36, n. 3, p. 493-499, 2009. ISSN 0939-4451.

MALANOVIC, N. *et al.* Phospholipid-driven differences determine the action of the synthetic antimicrobial peptide OP-145 on Gram-positive bacterial and mammalian membrane model systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2437-2447, 2015. ISSN 0005-2736.

MANZINI, M. C. *et al.* Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 7, p. 1985-99, Jul 2014. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743023> >.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 838-849, 2005. ISSN 1471-0072.

MASON, A. J. *et al.* The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. **The FASEB journal**, v. 20, n. 2, p. 320-322, 2006. ISSN 0892-6638.

MEISL, G. *et al.* Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A β 40 and A β 42 peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p. 9384-9389, 2014. ISSN 0027-8424.

MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chemical reviews**, v. 108, n. 8, p. 2952-3015, 2008. ISSN 0009-2665.

MENDOZA-ESPINOSA, P. *et al.* Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 365, n. 1, p. 8-15, 2008. ISSN 0006-291X.

MENSA, B. *et al.* Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5136-5145, 2014. ISSN 0066-4804.

MERGLER, M.; DICK, F. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 10, p. 650-657, 2005. ISSN 1099-1387.

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, 1963. ISSN 0002-7863.

MILLER, J. S. *et al.* Toward Fully Synthetic N-Linked Glycoproteins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 4, p. 431-434, 2003. ISSN 1521-3773.

MILLER, N.; WILLIAMS, G. M.; BRIMBLE, M. A. Synthesis of Neoglycopeptides via Click Chemistry. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 16, n. 3, p. 125-132, 2010. ISSN 1573-3149.

MONERA, O. *et al.* Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19218-19227, 1993. ISSN 0021-9258.

MORADI, S. V. *et al.* Glycosylation, an effective synthetic strategy to improve the bioavailability of therapeutic peptides. **Chemical Science**, v. 7, n. 4, p. 2492-2500, 2016.

MOZSOLITS, H. *et al.* Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1512, n. 1, p. 64-76, May 2 2001. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334625> >.

MULLEN, D. G. *et al.* Synthesis and characterization of the 47-residue heterodimeric antimicrobial peptide distinctin, featuring directed disulfide bridge formation. **Peptide Science**, v. 98, n. 5, p. 479-484, 2012. ISSN 1097-0282.

MUNISHKINA, L. A. *et al.* Conformational behavior and aggregation of α -synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. **Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 2720-2730, 2003. ISSN 0006-2960.

MYGIND, P. H. *et al.* Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975-980, 2005. ISSN 0028-0836.

NICOTRA, F. *et al.* Chemoselective neoglycosylation. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 61, p. 353-398, 2007. ISSN 0065-2318.

NORTHFIELD, S. E. *et al.* Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. **European journal of medicinal chemistry**, v. 77, p. 248-257, 2014. ISSN 0223-5234.

OFFER, J.; QUIBELL, M.; JOHNSON, T. On-resin solid-phase synthesis of asparagine N-linked glycopeptides: use of N-(2-acetoxy-4-methoxybenzyl)(AcHmb) aspartyl amide-bond protection to prevent unwanted aspartimide formation. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 2, p. 175-182, 1996. ISSN 1364-5463.

OLSON, F. *et al.* Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979/10/19 1979. ISSN 0005-2736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273679900853> >.

OTHON, C. M. *et al.* Solvation in protein (un) folding of melittin tetramer–monomer transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 12593-12598, 2009. ISSN 0027-8424.

PACKMAN, L. C. N-2-Hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb) backbone protection strategy prevents double aspartimide formation in a ‘difficult’ peptide sequence. **Tetrahedron letters**, v. 36, n. 41, p. 7523-7526, 1995. ISSN 0040-4039.

PALASEK, S. A.; COX, Z. J.; COLLINS, J. M. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 13, n. 3, p. 143-148, 2007. ISSN 1099-1387.

PALMA-GUERRERO, J. *et al.* Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Mol Microbiol**, v. 75, n. 4, p. 1021-32, Feb 2010. ISSN 1365-2958 (Electronic)

0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20487294> >.

PALOMO, J. M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. **RSC Advances**, v. 4, n. 62, p. 32658-32672, 2014.

PANTELEEV, P. V. *et al.* Dimerization of the antimicrobial peptide arenicin plays a key role in the cytotoxicity but not in the antibacterial activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 1320-1326, 1/22/ 2017. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X16320794> >.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003a.

_____. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 458-66, Jan 21 2003b. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525173> >.

PARADÍS-BAS, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The road to the synthesis of “difficult peptides”. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 3, p. 631-654, 2016.

PARRA, A. *et al.* Semi-synthesis of acylated triterpenes from olive-oil industry wastes for the development of anticancer and anti-HIV agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 74, p. 278-301, 2014. ISSN 0223-5234.

PARRA, A. *et al.* Solution-and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1139-1145, 2009. ISSN 0968-0896.

PATCHING, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 43-55, 2014. ISSN 0005-2736.

PEARSON, D. A. *et al.* Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 21, p. 2739-2742, 1989. ISSN 0040-4039.

PEDROSO, E. *et al.* Diketopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and Fmoc-amino acids. **Tetrahedron letters**, v. 27, n. 6, p. 743-746, 1986. ISSN 0040-4039.

PORCELLI, F. *et al.* Structures of the dimeric and monomeric variants of magainin antimicrobial peptides (MSI-78 and MSI-594) in micelles and bilayers, determined by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 5793-5799, 2006. ISSN 0006-2960.

POSTMA, T. M.; ALBERICIO, F. Disulfide formation strategies in peptide synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2014, n. 17, p. 3519-3530, 2014. ISSN 1099-0690.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003. ISSN 0196-9781.

PRATES, M. V. **Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa Tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica**. 1999. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

PRATES, M. V. *et al.* The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018-13026, 2004. ISSN 0021-9258.

PURRUCKER, O. *et al.* Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon–silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 47, n. 5, p. 791-798, 2001. ISSN 0013-4686.

RAD, M. N. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,2,3-triazolyl [Formula: see text]-hydroxy alkyl/carbazole hybrid molecules. **Mol Divers**, v. 20, n. 3, p. 705-18, Aug 2016. ISSN 1573-501X (Electronic)

1381-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27278443> >.

RAHNAMAEIAN, M.; VILCINSKAS, A. Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8847-8855, 2015. ISSN 0175-7598.

RAIMONDO, D. *et al.* A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 18, p. 6309-6314, 2005. ISSN 0027-8424.

RAJAGOPALAN, R.; HIEMENZ, P. C. Principles of colloid and surface chemistry. **Marcel Dekker, New-York, 3e édition, ISBN 0**, v. 8247, n. 9397, p. 8, 1997.

RALHAN, K.; KRISHNAKUMAR, V. G.; GUPTA, S. Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis. **RSC Advances**, v. 5, n. 126, p. 104417-104425, 2015.

RESENDE, J. M. *et al.* Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16639-16644, 2009. ISSN 0027-8424.

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, Oct 2008. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260284100001 >.

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, Aug 2014. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000340578100014 >.

RICHTER, R. P.; BÉRAT, R.; BRISSON, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. **Langmuir**, v. 22, n. 8, p. 3497-3505, 2006/04/01 2006. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/la052687c> >.

ROBERT, P. **Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy**: Plenum Press, New York 1985.

RONGA, L. *et al.* Supported oligomethionine sulfoxide and Ellman's reagent for cysteine bridges formation. **Amino acids**, v. 44, n. 2, p. 733-742, 2013. ISSN 0939-4451.

ROSTOVTSEV, V. V. *et al.* A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie**, v. 114, n. 14, p. 2708-2711, 2002. ISSN 1521-3757.

ROTHBART, S. B. *et al.* Peptide microarrays to interrogate the "histone code". **Methods in enzymology**, v. 512, p. 107, 2012.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles†. **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 15765-15774, 2000. ISSN 0006-2960.

RUPP, B. Circular Dichroism Spectroscopy. San Marcos, CA, Estados unidos, 2009. Disponível em: < <http://www.ruppweb.org/cd/cdtutorial.htm#Summary> >. Acesso em: 26/05/2017.

SAKAKIBARA, S. Chemical synthesis of proteins in solution. **Peptide Science**, v. 51, n. 4, p. 279-296, 1999. ISSN 1097-0282.

SAMPSON, W. R.; PATSIOURAS, H.; EDE, N. J. The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: a comparative study. **Journal of Peptide Science**, v. 5, n. 9, p. 403-409, 1999. ISSN 1099-1387.

SANI, M.-A.; SEPAROVIC, F. How membrane-active peptides get into lipid membranes. **Accounts of chemical research**, v. 49, n. 6, p. 1130-1138, 2016. ISSN 0001-4842.

SANTOS, D. *et al.* LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino acids**, v. 39, n. 1, p. 135-144, 2010. ISSN 0939-4451.

SCHMIDTCHEN, A.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. **Advances in colloid and interface science**, v. 205, p. 265-274, 2014. ISSN 0001-8686.

SCHNÖLZER, M. *et al.* In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 13, n. 1-2, p. 31-44, 2007. ISSN 1573-3149.

SCOCCHI, M. *et al.* Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 76-88, 2016. ISSN 1568-0266.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1666, n. 1, p. 105-117, 2004. ISSN 0005-2736.

SEELIG, J. Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1331, n. 1, p. 103-116, 1997. ISSN 0304-4157.

_____. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1666, n. 1, p. 40-50, 2004. ISSN 0005-2736.

SEITZ, O. Glycopeptide synthesis and the effects of glycosylation on protein structure and activity. **ChemBioChem**, v. 1, n. 4, p. 214-246, 2000. ISSN 1439-7633. Disponível em: <
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1439-7633\(20001117\)1:4<214::AID-CBIC214>3.0.CO;2-B/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+7th+March+from+10%3A00-13%3A00+GMT+%2805%3A00-08%3A00+EST%29+for+essential+maintenance.++Apologies+for+the+inconvenience.](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1439-7633(20001117)1:4<214::AID-CBIC214>3.0.CO;2-B/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+7th+March+from+10%3A00-13%3A00+GMT+%2805%3A00-08%3A00+EST%29+for+essential+maintenance.++Apologies+for+the+inconvenience.)>.

SELIVANOVA, O. M. *et al.* How to Determine the Size of Folding Nuclei of Protofibrils from the Concentration Dependence of the Rate and Lag-Time of Aggregation. II. Experimental Application for Insulin and LysPro Insulin: Aggregation Morphology, Kinetics, and Sizes of Nuclei. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 5, p. 1198-1206, 2014. ISSN 1520-6106.

SENGUPTA, D. *et al.* Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2308-2317, 2008. ISSN 0005-2736.

SEWALD, N.; JAKUBKE, H.-D. **Peptides: chemistry and biology**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 3527802657.

SFORÇA, M. L. *et al.* How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5608-5617, 2004. ISSN 0006-2960.

SGHERRI, C. *et al.* Effects of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: A spin probe epr study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 465-473, 2014. ISSN 0005-2736.

SIMON, M. D. *et al.* Rapid Flow-Based Peptide Synthesis. **ChemBioChem**, v. 15, n. 5, p. 713-720, 2014. ISSN 1439-7633.

SIMON, S. A.; MCINTOSH, T. J. **Peptide-lipid interactions**. Academic Press, 2002. ISBN 0080925855.

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

SPECKER, D.; WITTMANN, V. Synthesis and application of glycopeptide and glycoprotein mimetics. **Glycopeptides and Glycoproteins**, p. 65-107, 2007.

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

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. ISSN 0003-2697.

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

STATHOPOULOS, P. *et al.* Side reactions in the SPPS of Cys-containing peptides. **Amino acids**, v. 44, n. 5, p. 1357-1363, 2013. ISSN 0939-4451.

STEINSTRÄESSER, L. *et al.* Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 322-333, 2011. ISSN 0171-2985.

STEWART, J. C. M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Anal. Biochem.**, v. 104, n. 1, p. 10-14, 1980.

SUDHEENDRA, U. *et al.* Membrane disruptive antimicrobial activities of human β -defensin-3 analogs. **European journal of medicinal chemistry**, v. 91, p. 91-99, 2015. ISSN 0223-5234.

TAM, J. P. *et al.* Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 17, p. 6657-6662, 1991. ISSN 0002-7863.

TANAKA, H.; KOGA, N.; GALWEY, A. K. Thermal dehydration of crystalline hydrates. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 3, p. 251, 1995. ISSN 0021-9584.

TANG, W.; BECKER, M. L. "Click" reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 20, p. 7013-7039, 2014.

TATSUMI, Y. *et al.* Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 5, p. 2405-9, May 2013. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23459486> >.

TENCZA, S. B. *et al.* Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 33-41, 1999. ISSN 0305-7453.

THAMRI, A. *et al.* Peptide modification results in the formation of a dimer with a 60-fold enhanced antimicrobial activity. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173783, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173783> >.

TONEY, J. Iseganan (IntraBiotics pharmaceuticals). **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 3, n. 2, p. 225-228, 2002. ISSN 1472-4472.

TORNØE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase:[1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002. ISSN 0022-3263.

TSUDA, Y.; OKADA, Y. Solution-Phase Peptide Synthesis. **Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Volume 3**, p. 201-251, 2012. ISSN 3527631801.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003. ISSN 0002-7863.

URBAN, J. *et al.* Lability of N-alkylated peptides towards TFA cleavage. **International journal of peptide and protein research**, v. 47, n. 3, p. 182-189, 1996. ISSN 1399-3011.

UTENG, M. *et al.* Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11417-11426, 2003. ISSN 0006-2960.

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

VERLY, R. M. *et al.* Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented 15 N and 31 P solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical journal**, v. 96, n. 6, p. 2194-2203, 2009. ISSN 0006-3495.

VERLY, R. M. *et al.* Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. **Scientific reports**, v. 7, 2017.

VERLY, R. M. *et al.* Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 15-24, Jan 2008. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083275> >.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **BioDrugs**, v. 22, n. 5, p. 315-329, 2008. ISSN 1173-8804.

VIGNEAUD, V. D. *et al.* The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 19, p. 4879-4880, 1953. ISSN 0002-7863.

VLIEGHE, P. *et al.* Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug discovery today**, v. 15, n. 1, p. 40-56, 2010. ISSN 1359-6446.

VOGT, T. C.; BECHINGER, B. The Interactions of Histidine-containing Amphipathic Helical Peptide Antibiotics with Lipid Bilayers THE EFFECTS OF CHARGES AND pH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29115-29121, 1999. ISSN 0021-9258.

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, 2015. ISSN 1520-6106.

VOJKOVSKY, T. Detection of secondary amines on solid phase. **Peptide research**, v. 8, n. 4, p. 236-237, 1994. ISSN 1040-5704.

WAGHU, F. H. *et al.* CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1154-D1158, 2014. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1157> >.

WALTHO, J. P. *et al.* Peptide models of protein folding initiation sites. 1. Secondary structure formation by peptides corresponding to the G-and H-helices of myoglobin. **Biochemistry**, v. 32, n. 25, p. 6337-6347, 1993. ISSN 0006-2960.

WAN, Q. *et al.* A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n. 21, p. 8244-8249, 2006. ISSN 0022-3263.

WANG, G. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**. CAB International, 2011. ISBN 1845936574.

WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Computational Peptidology**, p. 43-66, 2015. ISSN 149392284X.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl 1, p. D933-D937, 2009. ISSN 0305-1048.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1087-D1093, 2016. ISSN 0305-1048.

WANG, K.; SCHMIED, W. H.; CHIN, J. W. Reprogramming the genetic code: from triplet to quadruplet codes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 10, p. 2288-2297, 2012. ISSN 1521-3773.

WARREN, J.; GENG, X.; DANISHEFSKY, S. Glycopeptides and Glycoproteins: Synthesis, Structure, and Application. 2007.

WENZEL, M. *et al.* Influence of lipidation on the mode of action of a small RW-rich antimicrobial peptide. **Biochim Biophys Acta**, v. 1858, n. 5, p. 1004-11, May 2016. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26603779> >.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. Membrane protein folding and stability: physical principles. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 28, n. 1, p. 319-365, 1999. ISSN 1056-8700.

WIEPRECHT, T. *et al.* Thermodynamics of the α -helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 3, p. 785-794, 1999. ISSN 0022-2836.

_____. Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects. **Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 442-452, 2000. ISSN 0006-2960.

WIEPRECHT, T. *et al.* Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS letters**, v. 417, n. 1, p. 135-140, 1997. ISSN 0014-5793.

WISEMAN, T. *et al.* Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, 1989. ISSN 0003-2697.

WÖHR, T. *et al.* Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 39, p. 9218-9227, 1996. ISSN 0002-7863.

WORRELL, B.; MALIK, J.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 457-460, 2013. ISSN 0036-8075.

WRIGHT, C. D.; BOWIE, J. U.; NELSON, R. D. Influence of yeast mannan on release of myeloperoxidase by human neutrophils: determination of structural features of mannan required for formation of myeloperoxidase-mannan-neutrophil complexes. **Infection and immunity**, v. 43, n. 2, p. 467, 1984. ISSN 0019-9567.

WUST, M. A. **studos estruturais por RMN do glicopiranosil-triazol-peptídeo [pOAcGlc-trz-A¹⁴]PS-2 em meios miméticos de membrana**. 2017. Dissertação (Mestre). Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química.

XU, X.; LAI, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. **Chemical reviews**, v. 115, n. 4, p. 1760-1846, 2015. ISSN 0009-2665.

YAMAGUCHI, T. *et al.* A disulfide-linked amyloid- β peptide dimer forms a protofibril-like oligomer through a distinct pathway from amyloid fibril formation. **Biochemistry**, v. 49, n. 33, p. 7100-7107, 2010. ISSN 0006-2960.

YANG, L. *et al.* Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001. ISSN 0006-3495.

YANG, Y. **Side Reactions in Peptide Synthesis**. Academic Press, 2015. ISBN 0128011815.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002. ISSN 0028-0836.

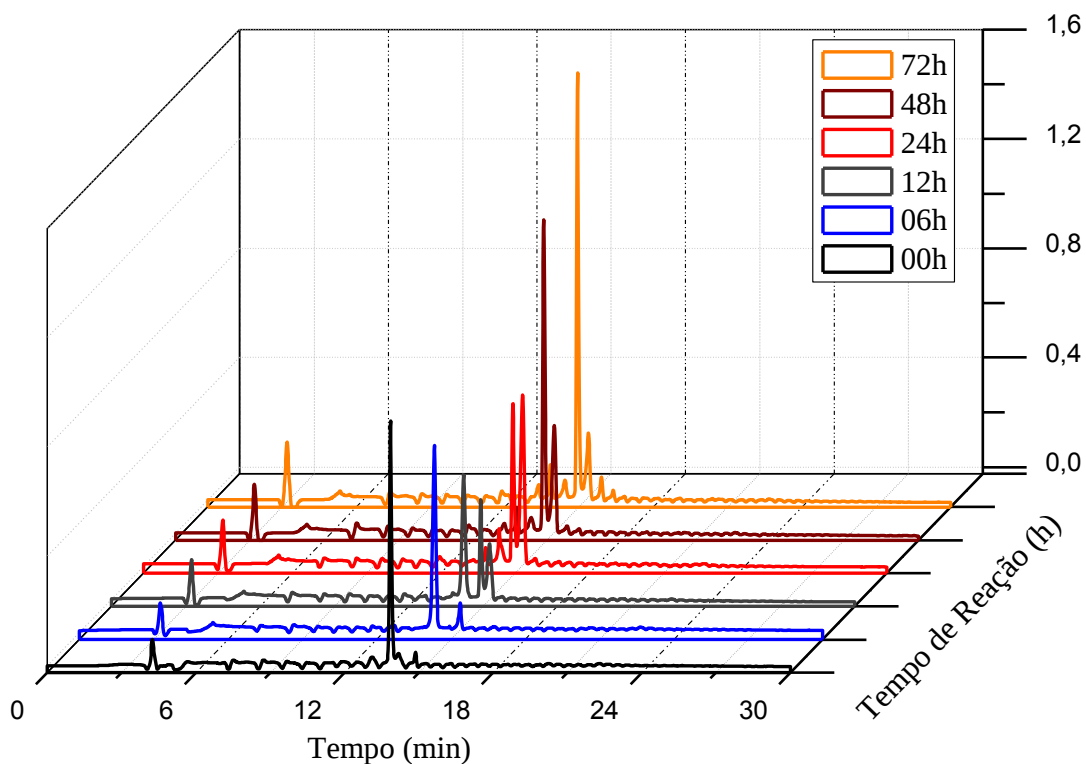
ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides: Do They Have a Future as Therapeutics? In: (Ed.). **Antimicrobial Peptides**: Springer, 2016. p.147-154.

ZHANG, Y.; RAO, R. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 551-554, 2010. ISSN 2150-5594.

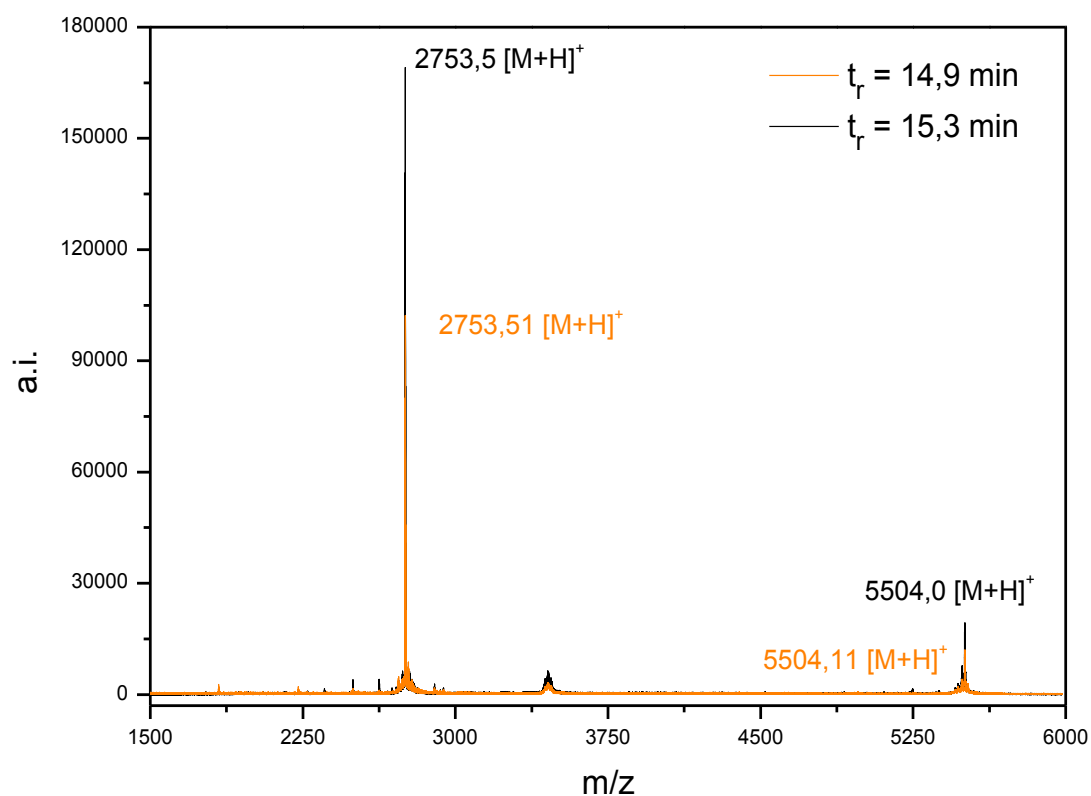
ZHU, W. L.; SHIN, S. Y. Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal action. **Journal of Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 345-352, 2009. ISSN 1099-1387.

ANEXOS E APÊNDICES

APÊNDICE A1 - Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H₂O (40:60, v/v), a partir de solução mais concentrada (36,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de Htr-M. Alíquotas injetadas (20 μL) em coluna C18 Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm), equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O gradiente foi o mesmo empregado na purificação de Htr-M. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 215 nm. (Preto) 0h de reação, (azul) 6h de reação, (cinza escuro) 12h de reação, (vermelho) 24h de reação, (vinho) 48h de reação, (alaranjado) 72h de reação. Figura extraída de Guimarães, C. F., 2013 (Guimarães, 2013).



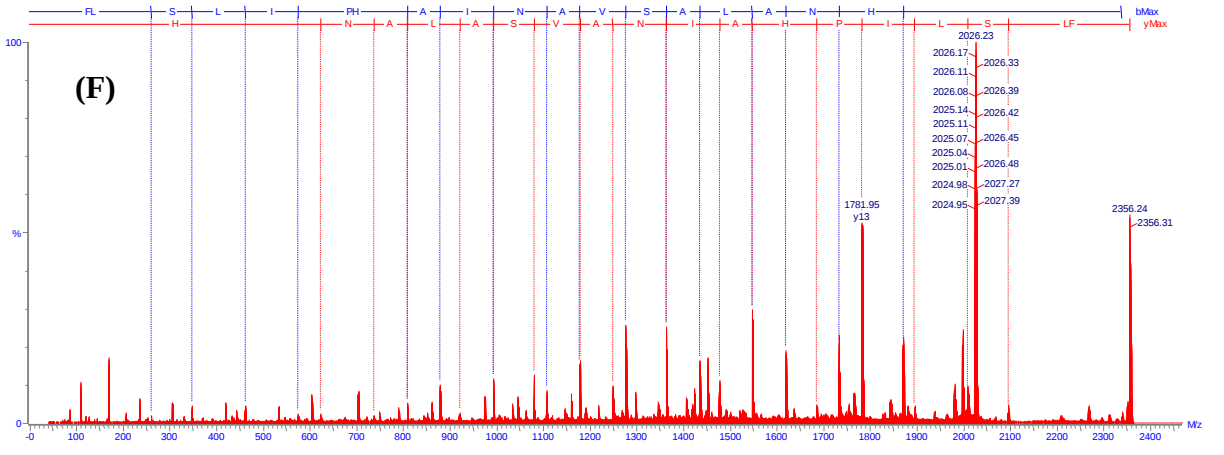
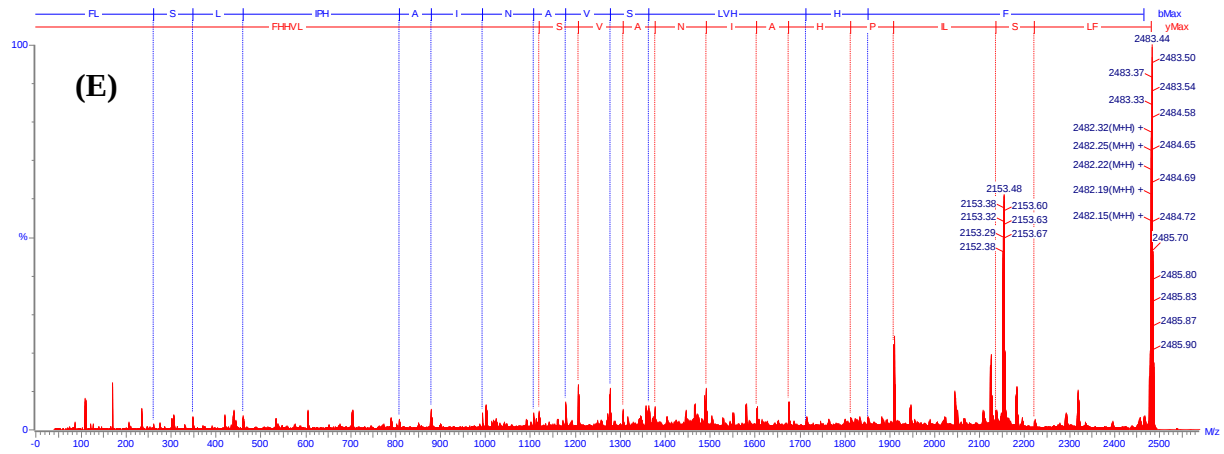
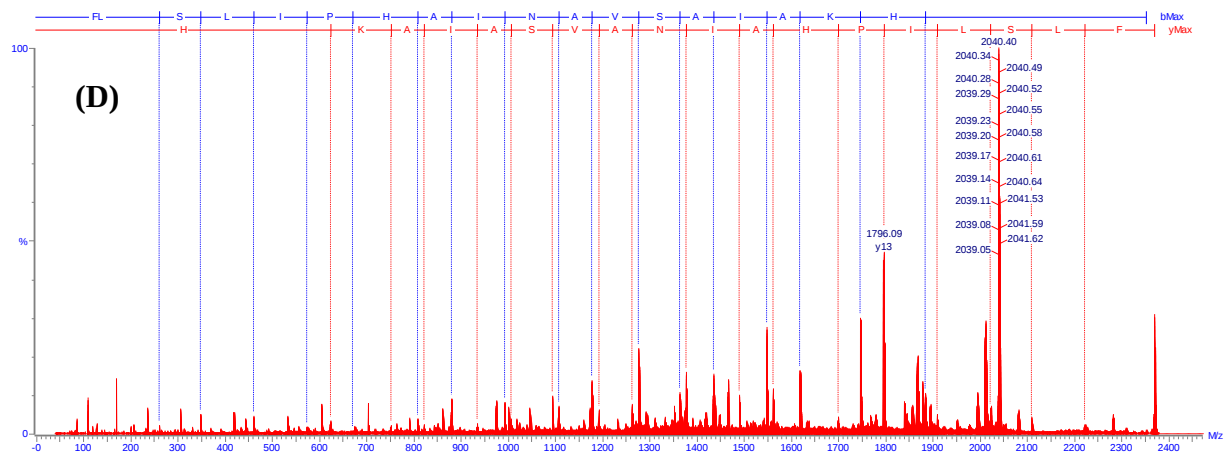
APÊNDICE A2 - Espectro de massas (MALDI-ToF) para os picos coletados relativos aos tempos de retenção de 14,9 e 15,3 min. Os dois espectros foram sobrepostos para ressaltar a semelhança entre eles. Em laranja, o espectro equivalente à fração do pico em tempo de retenção de 14,9 min e em preto o espectro equivalente à fração do pico em de tempo de retenção de 15,3 min. Figura extraída de Guimarães, C. F., 2013 (Guimarães, 2013).



(A) Mass spectrum of the full-length PTPN22 protein (FL). The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 2000, and the y-axis represents relative intensity (%). The protein sequence is shown at the top: FL (blue) and yMax (red). Key peaks are labeled with their m/z values and fragmentation types: 1207.93 (y12), 1441.67 (y14), 1441.72, 1441.75, 1441.82, 1441.85, 1441.88, 1441.90, 1441.93, 1442.00, 1442.03, 1443.00, 1443.06, 1443.08, 1443.11, 1443.13, 1443.16, 1443.18, 1444.03, 2016.24 (bMax).

(B) Mass spectrum of the C-terminal truncated PTPN22 protein (FL-CT). The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 2200, and the y-axis represents relative intensity (%). The protein sequence is shown at the top: FL-CT (blue) and yMax (red). Key peaks are labeled with their m/z values and fragmentation types: 1123.70 (y10), 1123.76 (y10), 1307.88 (y12), 1541.67 (y14), 1541.77, 1541.80, 1541.83, 1541.85, 1541.88, 1541.98, 1542.01, 1542.99, 1543.02, 1543.05, 1543.07, 1543.10, 1543.13, 2115.04 (bMax), 2116.13, 2116.31, 2117.34, 2117.41, 2117.44.

(C) Mass spectrum of the N-terminal truncated PTPN22 protein (FL-NT). The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 2000, and the y-axis represents relative intensity (%). The protein sequence is shown at the top: FL-NT (blue) and yMax (red). Key peaks are labeled with their m/z values and fragmentation types: 952.66 (y10), 1136.80 (y12), 1276.88 (b12), 1276.90, 1370.59, 1370.62, 1370.64, 1370.67, 1370.69, 1370.72, 1370.74, 1370.77, 1370.79, 1370.87 (y14), 1370.89, 1370.94, 1371.92, 1371.95, 1371.97, 1372.00, 1372.02, 1372.05, 1372.87.



APÊNDICE C1 – Trabalhos apresentados em eventos

1. **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Junior, E. F. C.; Bemquerer, M. P.; Resende, J. M.; Verly, R. M. Influence of triazole and saccharide rings on antifungal activity of glycopeptide-triazoles derived from antimicrobial peptide HSP-NH₂. In: **V Latin American Protein Society Meeting**. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.
2. Tolomeu, H.V.; Verly, R. M.; Matos, C. O.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Resende, J. M.; Bemquerer, M. P. Study of Structure and peptide-membrane Interaction for antimicrobial peptide CnAMP-1 and analogs. In: **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**, 2015, Foz do Iguaçu, PR.
3. Junior, E. F. C.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Bemquerer, M. P.; Resende, J. M.; Verly, R. M. Synthesis and Characterization of Glycopeptido-triazole Derivative from Antimicrobial Peptide HSP-1. In: **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**, 2015, Foz do Iguaçu, PR.
4. **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Resende, J. M.; Verly, R. M. Novas Perspectivas para Formação de Ligação de Dissulfeto em Peptídeos Homodiméricos. **Apresentação Oral de Trabalho, XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais**; Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, 2014, Poços de Caldas, MG.
5. Gomes, I. P.; Torres, L. M. F. C.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Verly, R. M.; Resende, J. M.; Gusmão, K. A. G. Síntese, Caracterização e Análise Conformacional por Dicroísmo Circular do Peptídeo Antimicrobiano HSP1. In: **XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2014, Poços de Caldas, MG.
6. Amaral, R. A.; Ortlieb, L. O.; Rodrigues, V. H. S.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Verly, R. M. estudo conformacional por RMN bidimensional do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I. In: **II Semana da Integração: Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2013, Diamantina.
7. Ortlieb, L. O.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Ferreira, D. E. C.; Resende, J. M.; Verly, R. M. Estudo do mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano LyeTx-1 em membranas

fosfolipídicas. In: **XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2013, São João del-Rei, MG.

8. Guimarães, Carlos F. R. C.; Amaro, R. C.; Verly, R. M. Estudos dos efeitos conformacionais na reação de dimerização para obtenção do peptídeo antimicrobiano homotarsinina. In: **XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2013, São João del-Rei, MG.

9. Guimarães, Carlos F.; Verly, R. M.; Resende, J. M.; Pilo-Veloso, D. Estudos dos efeitos na cinética de dimerização do peptídeo antimicrobiano homotarsinina. In: **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013, Águas de Lindóia, SP.

10. Guimarães, Carlos F. R. C.; Verly, R. M.; Resende, J. M. Síntese química e avaliação da atividade antimicrobiana e Citotoxicidade do peptídeo dimérico homotarsinina. In: **XXVII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2013, São João del-Rei, MG.

APÊNDICE C2 – Artigos produzidos durante o doutorado

Publicados

1) Lima, Amanda B.; Torres, Livia M. F. C.; **Guimarães, Carlos F. R. C.**; Verly, Rodrigo M.; Silva, Leonardo M. Da; Carvalho Júnior, Álvaro D.; Santos, Wallans T. P. Dos.

Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Samples by Differential Pulse Voltammetry Using a Boron-Doped Diamond Electrode.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. XIX, p. 1 – 6, 2014. [doi:10.5935/0103-5053.20140005]

2) Verly, Rodrigo M.; Resende, Jarbas M.; Junior, Eduardo F. C.; De Magalhães, Mariana T. Q.; **Guimarães, Carlos F. C. R.**; Munhoz, Victor H. O.; Bemquerer, Marcelo Porto; Almeida, Fábio C. L.; Santoro, Marcelo M.; Piló-Veloso, Dorila; Bechinger, Burkhard.

Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin.

Nature Scientific Reports, v. 7, p. 40854, 2017. [DOI: 10.1038/srep40854]

3) Eduardo F. C. Junior, **Carlos F. R. C. Guimarães**, Lucas L. Franco, Ricardo J. Alves, Kelly C. Kato, Helen R. Martins, José D. de Souza Filho, Marcelo Porto Bemquerer, Victor H. O. Munhoz, Jarbas M. Resende, Rodrigo M. Verly.

Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity

Amino Acids, v. -, p. -, 2017. [DOI: 10.1007/s00726-017-2441-2]

ANEXO A1: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.2



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)




**AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY**

Title: Peptide Antimicrobial Agents

Author: Håvard Jenssen, Pamela Hamill, Robert E. W. Hancock et al.

Publication: Clinical Microbiology Reviews

Publisher: American Society for Microbiology

Date: Jul 1, 2006

Copyright © 2006, American Society for Microbiology

Logged in as:
 Carlos Filipe Guimarães
 Universidade Federal d Minas
 Gerais

Account #:
 3001158252

[LOGOUT](#)

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

ANEXO A2: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.3

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 27, 2017

This Agreement between Universidade Federal d Minas Gerais -- Carlos Filipe Guimarães ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4120441270813
License date	Jun 01, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes
Licensed Content Title	Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review
Licensed Content Author	Magali Deleu, Jean-Marc Crowet, Mehmet N. Nasir, Laurence Lins
Licensed Content Date	Dec 1, 2014
Licensed Content Volume	1838
Licensed Content Issue	12
Licensed Content Pages	20
Start Page	3171
End Page	3190
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	186
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Universidade Federal d Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil Attn: Universidade Federal de Minas Gerais
Total	0.00 USD

ANEXO A3: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.4**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 27, 2017

This Agreement between Universidade Federal de Minas Gerais -- Carlos Filipe Guimarães ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4120810870854
License date	Jun 02, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biophysical Chemistry
Licensed Content Title	The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments
Licensed Content Author	Burkhard Bechinger, Jarbas M. Resende, Christopher Aisenbrey
Licensed Content Date	Jan 1, 2011
Licensed Content Volume	153
Licensed Content Issue	2-3
Licensed Content Pages	11
Start Page	115
End Page	125
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	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	186
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Universidade Federal de Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil Attn: Universidade Federal de Minas Gerais
Total	0.00 USD

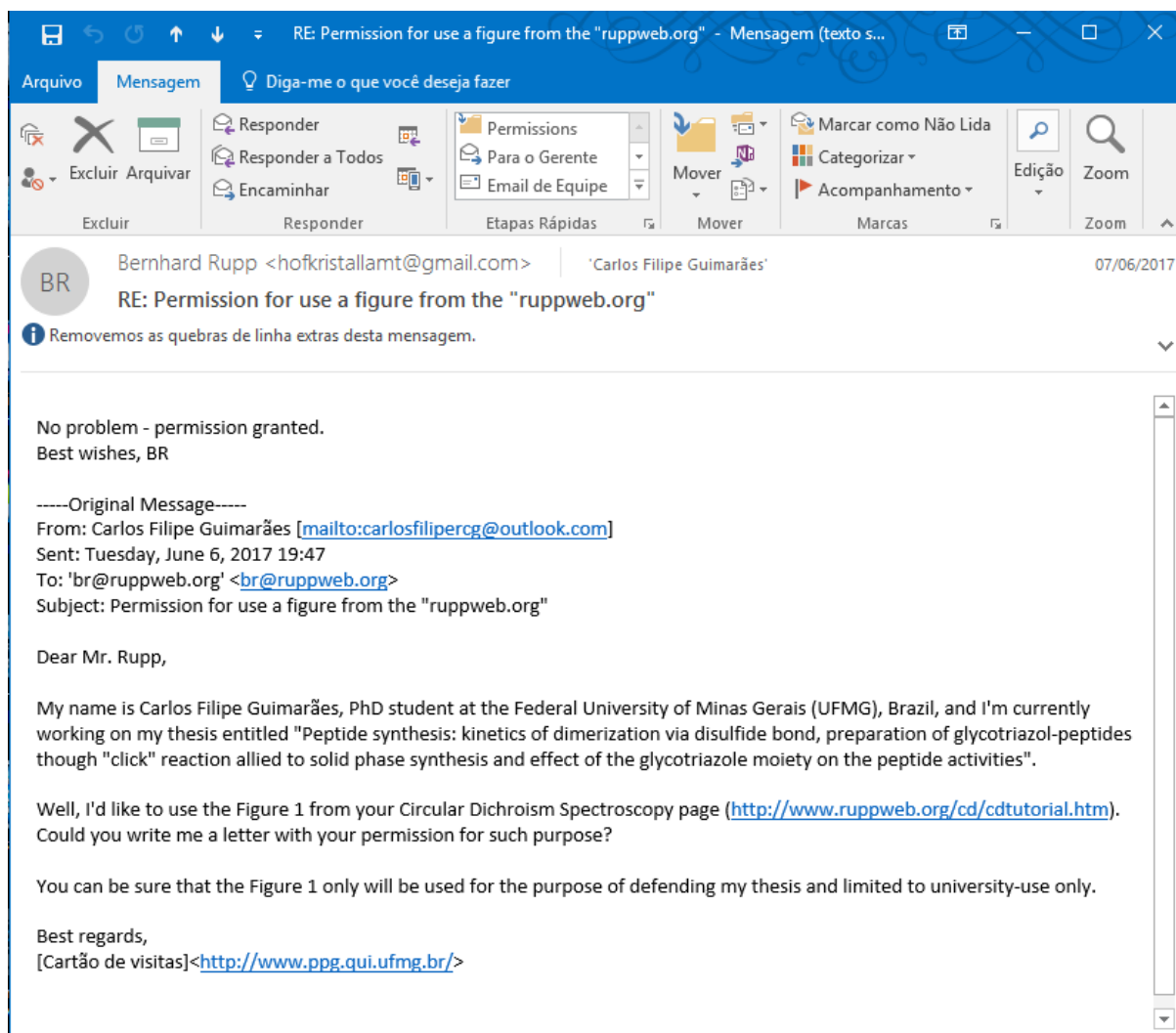
ANEXO A4: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.5**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 27, 2017

This Agreement between Universidade Federal d Minas Gerais -- Carlos Filipe Guimarães ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4120811021607
License date	Jun 02, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes
Licensed Content Title	Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery
Licensed Content Author	Simon G. Patching
Licensed Content Date	Jan 1, 2014
Licensed Content Volume	1838
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	13
Start Page	43
End Page	55
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	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	186
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Universidade Federal d Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil Attn: Universidade Federal d Minas Gerais
Total	0.00 USD

ANEXO A5: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 1.9



ANEXO A6: Autorização para uso de Direitos Autorais Figura 3.38

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 27, 2017

This Agreement between Universidade Federal de Minas Gerais -- Carlos Filipe Guimarães ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4120870431441
License date	Jun 02, 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	Aug 19, 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
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 5.G
Title of your thesis/dissertation	Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	186
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Universidade Federal d Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil Attn: Universidade Federal de Minas Gerais
Total	0.00 USD

ANEXO A7: Autorização para uso de Direitos Autorais do Capítulo 2, para o conteúdo referente à HSP1-NH₂ e seus derivados.

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 27, 2017

This Agreement between Universidade Federal d Minas Gerais -- Carlos Filipe Guimarães ("You") and Springer ("Springer") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer and Copyright Clearance Center.

License Number	4127780222970
License date	Jun 14, 2017
Licensed Content Publisher	Springer
Licensed Content Publication	Amino Acids
Licensed Content Title	Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity
Licensed Content Author	Eduardo F. C. Junior
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Full text
Number of copies	3
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Title of your thesis / dissertation	Peptide synthesis: kinetics of dimerization via disulfide bond, preparation, and biophysics studies of glycotriazole-peptides.
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size(pages)	186
Requestor Location	Universidade Federal d Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 Brazil Attn: Universidade Federal d Minas Gerais
Billing Type	Invoice
Billing Address	Universidade Federal d Minas Gerais Av. Pres. Antônio Carlos 6627 Pampulha Belo Horizonte, Brazil 31270-901 Attn: Universidade Federal de Minas Gerais
Total	0.00 USD