UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e atividade biológica de dissacarídeos
acoplados a aminoácidos**

Peterson de Andrade

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

Peterson de Andrade

**Síntese e atividade biológica de dissacarídeos acoplados a
aminoácidos**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.**

**Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.**

Orientado: Peterson de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

de Andrade, Peterson

Síntese e atividade biológica de dissacarídeos acoplados a aminoácidos. Ribeirão Preto, 2008.

97 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Carvalho, Ivone.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *trans*-Sialidase. 3. Carboidratos
4. Dissacarídeos

Folha de Aprovação

Peterson de Andrade

Síntese e atividade biológica de dissacarídeos acoplados a aminoácidos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

**Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais Arlindo (*in memorian*) e Leonor,
às minhas irmãs Érika e Éllen e à minha querida esposa Livia.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Jesus Cristo que está comigo todos os dias para capacitar-me, ensinar-me, guiar-me, guardar-me etc.

Agradeço à minha família que sempre me ensinou a perseverar em meus objetivos.

Agradeço à professora doutora Ivone Carvalho a orientação durante todo esse tempo, as oportunidades que me deu, o conhecimento que me agregou e a confiança que depositou em mim ao desenvolver esse trabalho.

Agradeço aos técnicos, José Carlos Tomaz e Luís Otávio Zamoner, e técnicas, Cláudia Castania e Virgínia Betarello, todo apoio e disposição em ajudar ao longo desses dois anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica LÍlian, Adriane, Vanessa, Julierme, Pedrão, Daniel, Omelete, Pampers, Michele, Maristela, Samanta, Vinícius, Warley, Luciano, Denise a convivência extremamente agradável e muito divertida ao longo de vários anos, os momentos de alegria e de frustração que compartilhamos juntos e também a prontidão em ajudar uns aos outros.

Agradeço ao ministério da educação pela concessão da bolsa CAPES, sem a qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

**Uns confiam em carros outros em cavalos, mas nós faremos menção do nome do Senhor
nosso Deus. Uns encurvam-se e caem, mas nós nos levantamos e nos mantemos de pé.**

(Salmos 20: 7 - 8)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Alvos terapêuticos	7
1.3 Invasão da célula pelo parasita	9
1.4 Ácido siálico e <i>trans</i> -Sialidase	10
1.5 Mucinas.....	13
1.6 Importância biológica de carboidratos e glicoproteínas	14
1.7 Clonagem, expressão gênica e estrutura 3D de <i>trans</i> -Sialidase	16
1.8 Experiência Anterior.....	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Síntese do doador de galactose	40
4.2 Síntese dos aceptores de galactose	46
4.2.1 Aceptor com N ₃ em C-2	51
4.2.2 Aceptor com troc em C-2	55
4.3 Síntese dos blocos de construção.....	59
4.3.1 Síntese dos dissacarídeos	59
4.3.2 Síntese dos aminoácidos aceptores dos dissacarídeos	63
4.3.3 Acoplamento do dissacarídeo aos aminoácidos aceptores	64
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	84

RESUMO

de ANDRADE, P. **Síntese e atividade biológica de dissacarídeos acoplados a aminoácidos**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

trans-Sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariotes. *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e utiliza esta enzima para retirar este monossacarídeo de glicoconjugados do hospedeiro para sialilar moléculas aceptoras, como mucina-GPI (glicosilfosfatidilinositol), presentes na sua membrana plasmática. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α -2,3 com moléculas de galactose aceptoras na superfície do parasita. Considerando a heterogeneidade das moléculas de mucina de *T. cruzi*, é necessário que novas moléculas sejam sintetizadas a fim de que estas atuem como substratos glicopeptídicos, os quais podem levar ao melhor entendimento das interações entre enzima e substratos e permitir o planejamento racional de inibidores seletivos. Por isso, o trabalho foi dividido em três rotas sintéticas: (i) preparação do doador de galactose, (ii) preparação dos aceptores-doadores e (iii) acoplamento dos dissacarídeos com aminoácidos aceptores para obtenção dos blocos de construção. Apesar dos objetivos propostos inicialmente não terem sido totalmente alcançados, o trabalho desenvolvido durante esse período permitiu a síntese do doador de galactose (**3**) em três etapas, acceptor de galactose (**6**) em cinco etapas, dissacarídeo (**11**) na glicosilação de **6** com **3**, aminoácidos aceptores (**13** e **14**) e também dos blocos de construção (**17** e **18**) decorrente do acoplamento de **11** com os aminoácidos aceptores. Não obstante, é importante ressaltar que apesar da extensa rota planejada, porém necessária, a síntese dos blocos de construção é inédita. Portanto, pode-se concluir que o trabalho trouxe relevante contribuição no que diz respeito à química de carboidratos e à disponibilização de dados espectrométricos de compostos orgânicos para a literatura.

Palavras-chave: 1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *trans*-Sialidase. 3. Carboidratos. 4. Dissacarídeos.

ABSTRACT

de ANDRADE, P. **Synthesis and biological activity of disaccharides attached to amino acids**. 2008. 97 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Trypanosoma cruzi trans-sialidase (TcTS) belongs to the family of glycoproteins expressed on the surface of the parasite and constitutes one of the few examples of natural surface glycosyltransferases found in eucariotes. *T. cruzi* can not synthesize sialic acid itself and uses this enzyme to scavenge this monosaccharide from host glycoconjugates to sialylate acceptors molecules, such as GPI (glycosylphosphatidylinositol) mucins, that are present in parasite plasma membrane. This enzyme is specific to catalyze, preferentially, the transference of sialic acid to mucin glycoproteins, generating α -2,3-linkages with acceptor galactose molecules in the parasite surface. Considering the heterogeneity of *T. cruzi* mucin molecules, it's necessary to synthesize new compounds that can act as glycopeptide substrates, leading to a better understanding concerning the enzyme and substrates and allow the rational design of some selective inhibitors. Thus, this work was developed in three synthetic routes: (i) the synthesis of galactose donor, (ii) synthesis of donor-acceptors and (iii) coupling between disaccharides and acceptors amino acids in order to obtain building blocks. Despite of some objectives initially proposed had not been accomplished, the developed work during this period allow the synthesis of the galactose donor (**3**) in three steps, donor-acceptor (**6**) in five steps, disaccharide (**11**), acceptors amino acids (**13** and **14**) and also the building blocks (**17** and **18**). However, it's important highlight that the synthesis of the building blocks by this necessary, but extensive, synthetic route is unpublished. Therefore, it can be concluded that the present work brought rich contribution concerning the carbohydrate chemistry and the availability of spectrometric data of organic compounds to the literature.

Keywords: 1. *Trypanosoma cruzi*. 2. trans-Sialidase. 3. Carbohydrates. 4. Disaccharides.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac₂O: anidrido acético

AcOEt: acetato de etila

Arg: arginina

arom: aromático

Asp: ácido aspártico

BF₃.Et₂O: trifluorboroeterato

CCC: Cromatografia em Coluna Clássica

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCP: Cromatografia em Camada Preparativa

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

δ_H: deslocamento químico do hidrogênio

d: dubleto

DANA: 2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil-ácido neurâmico

DCM: diclorometano

dd: duplo dubleto

ddd: duplo duplo dubleto

DMF: dimetilformamida

DNA: ácido desoxirribonucléico

ESI: Ionização por Electrospray

Et₃N: trietilamina

Fmoc: 9-Fluorenilmetóxicarbonil

Gal: galactose

GlcNAc: *N*-acetilglicosamina

Glu: ácido glutâmico

GPI: glicosilfosfatidilinositol

Hz: Hertz

I₂: iodo

IV: infravermelho

J: constante de acoplamento

Leu: leucina

Lys: lisina

m: multiplete

M: massa

MASPs: proteínas de superfície associadas à mucina

MeOH: metanol

MHz: mega-Hertz

N₂: nitrogênio gasoso

Neu-5-Ac: ácido neurâmico 5-acético

NIS: *N*-iodosuccinimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAF: Fator de Agregação Plaquetária

PDB: Banco de Dados de Proteínas

Ph: fenil

PhCH(OMe)₂: benzaldeído dimetil acetal

PhSH: tiofenol

ppm: partes por milhão

Pro: prolina

Py: piridina

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: singleto

Ser: serina

t: tripleto

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TcTS: *trans*-sialidade de *Trypanosoma cruzi*

TfOH: ácido trifílico

Thr: treonina

TMSOTf: trimetilsilil triflato

TOF: tempo de voo

Troc: *N*-tricloroetóxicarbonil

Trp: triptofano

TS: *trans*-sialidase

Tyr: tirosina

UDP: Uridil Difosfato

Val: valina

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase sul-americana é uma enfermidade endêmica na América Latina (Figura 1) e classificada como a terceira maior doença parasitária nas regiões tropicais, após a malária e a esquistossomose¹.

Figura 1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas na América Latina

O agente causador da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) cuja transmissão em seres humanos e em outros mamíferos ocorre, principalmente, através das fezes do inseto “barbeiro” (Figura 2) infectado com algumas espécies de triatomídeos.

Figura 2 - Foto do inseto “barbeiro” (*Triatoma infestans*)

No entanto, tem se observado a transmissão por transfusão de sangue contaminado, por transplante de órgãos e através da placenta (congenita). Essa situação constitui um sério problema de saúde pública nas regiões urbanas². Atualmente, têm sido tomadas algumas medidas profiláticas tais como: erradicação do vetor (*Triatoma infestans*), melhoria nas condições de habitação, análises mais minuciosas pelos bancos de sangue, etc³.

Um estudo realizado na década 80 indicou que a prevalência de *T. cruzi* em 18 países endêmicos da América Latina era de 4,72 % da população (16 a 18 milhões), com aproximadamente 45.000 mortes por ano. A prevalência atual não é bem conhecida, mas afeta provavelmente 3 % da população latino-americana (10 a 14 milhões). Atualmente, a estimativa para incidência da infecção é de 1,5 milhões de pessoas por ano e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 23.000 pessoas morram por ano em decorrência da doença⁴.

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A fase aguda pode passar despercebida como também pode iniciar-se com febre, edemas localizados e generalizados, hepato-esplenomegalia, miocardite aguda e, raramente, pode levar à meningoencefalite fatal. Já a fase crônica é caracterizada por danos irreversíveis a diversos órgãos, como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico^{5,6}.

Cerca de 30 a 40 % dos pacientes que apresentam os sintomas da fase crônica desenvolvem lesões irreversíveis no coração e trato gastrointestinal, o que pode levar à morte súbita e/ou danos digestivos do paciente, principalmente megavisceral e desordens nervosas periféricas^{7,8}.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, onde o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e alguns mamíferos como por exemplo: gambás, tatus e macacos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos)⁹.

O parasita tem um ciclo de vida complexo tanto no inseto como no hospedeiro mamífero, podendo ser encontrado nas formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e tripomastigota metacíclica (Figura 3).

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 3 - (a) Tripomastigotas sanguíneos, (b) Amastigotas, (c) Epimastigotas, (d) Tripomastigotas metacíclicas

A forma tripomastigota metacíclica, proveniente do inseto vetor, flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade diversas células para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Após invasão, o parasita se diferencia na forma

amastigota, aflagelada, que se prolifera por fissão binária e, eventualmente, se rediferencia na forma tripomastigota, destruindo as células e alcançando novamente a corrente circulatória.

As formas tripomastigotas podem invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas pelo inseto. Neste último caso, são convertidas à forma epimastigota não infecciosa, completando o ciclo de vida entre o parasita e o vetor (Figura 4)^{10,11}.

Figura 4 - Ciclo de vida do *T. cruzi*, mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (formas amastigota e tripomastigota) e inseto vetor (formas epimastigota e tripomastigota metacíclica)

Desde a descoberta da doença, há mais de 90 anos, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem obter quimioterapia eficaz¹². O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico benznidazol (Rochagan[®]). O fármaco nifurtimox (Lampit[®]), também utilizado no tratamento por muito tempo, teve sua produção descontinuada recentemente (Figura 5)^{8,13}.

Figura 5 - Estrutura química do Nifurtimox e Benznidazol

Ambos os fármacos são usados na fase aguda da doença, mas suas eficácias variam de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência de variação de cepas do parasita. Esses medicamentos apresentam baixa eficácia e graves efeitos colaterais, sendo capazes de curar 60 % das infecções recentes, o que pode ser observado pelo desaparecimento de sintomas e diminuição da parasitemia¹⁴.

Na última década, foram realizados alguns estudos com intuito de analisar os efeitos do benznidazol na evolução da cardiopatia crônica em pacientes com nível crônico da doença. Algumas evidências sugerem que esse tratamento antiparasitário pode prevenir ou retardar a progressão da doença cardíaca, uma vez que poucos pacientes apresentaram progressão da cardiomiopatia e muitos pacientes tornaram-se sorologicamente não-reativos⁴.

Algumas terapias alternativas a esses dois fármacos também têm sido testadas. O alopurinol foi utilizado para tratar fase aguda e crônica de tripanossomíases americanas, em regimentos que variam consideravelmente em duração e dose, sendo a eficiência instável. Por outro lado, o itraconazol (derivado sintético do imidazol) tem mostrado promissora eficácia contra *T. cruzi* tanto *in vivo* quanto *in vitro*, resultando em cura total de ratos infectados cronicamente⁴.

Apt e colaboradores investigaram a extensão do efeito do tratamento com itraconazol ou alopurinol na infecção com *T. cruzi*. Eles concluíram que o itraconazol causou menos efeitos adversos que o alopurinol e também mostrou regressão de algumas anormalidades relacionadas à eletrocardiografia; apesar de ter sido menos efetivo na prevenção da cardiopatia. Dessa forma, eles sugerem o itraconazol como fármaco de escolha para tratar a fase crônica em adultos⁴.

Leon e colaboradores investigaram o resultado do efeito do tratamento com captopril na infecção com *T. cruzi* em ratos e concluíram que a administração de captopril reduziu de forma significativa necrose cardíaca bem como fibrose. Posteriormente, Braga e colaboradores, estudando os aspectos clínicos e terapêuticos da insuficiência cardíaca em decorrência da doença de Chagas, descobriram que a dose de alguns medicamentos utilizados para tratar insuficiência cardíaca era similar para pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica⁴.

A utilização de agente profilático também é uma solução desejável, devido à alta incidência de sangue contaminado em bancos de sangue (5 a 20 %), sendo este mecanismo considerado como o segundo mais importante meio de transmissão em áreas endêmicas².

A única substância usada como agente quimioprofilático é a violeta de genciana (cloreto de N-[4-bis-[[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]N-metilamônio) (Figura 6). Entretanto, seu uso é limitado devido aos efeitos colaterais e à coloração púrpura transferida à pele e às mucosas dos pacientes que recebem a transfusão de sangue, o que pode ser confundido com hipóxia naqueles que são submetidos a processos anestésicos¹⁵.

Figura 6 - Violeta de genciana: fármaco quimioprolático

O histórico apresentado demonstra a necessidade da descoberta e do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mais eficazes e seguros, que serão fundamentais para o tratamento da doença de Chagas, principalmente para aplicação nos últimos estágios da doença. Adicionalmente, deve ser priorizado novo tratamento da doença na fase aguda, em substituição aos fármacos atualmente disponíveis, frequentemente ineficazes e fracamente tolerados.

1.2 Alvos Terapêuticos

Os fatores atuais mais importantes na descoberta de novos fármacos envolvem o isolamento, identificação, e caracterização de novos compostos líderes bem como de suas propriedades moleculares e cinéticas. De fato, a validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades farmacológicas e toxicológicas de possíveis inibidores para o tratamento da doença de Chagas³.

A descoberta de novos alvos depende, em grande proporção, da interpretação de informações contidas no genoma do *T. cruzi*. O seqüenciamento e decifragem do genoma do parasita devem conduzir ao maior entendimento da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasita-hospedeiro e patologia da doença².

O seqüenciamento concluído recentemente mostra que mais de 50 % do genoma do *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener) é constituído por seqüências repetidas. Essas seqüências incluem genes para uma grande família de moléculas de superfície, incluindo *trans*-sialidases, proteases gp 63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs). Na superfície celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* são expressos vários grupos de proteínas, sendo que as moléculas de mucina e a enzima *trans*-sialidase (TS) fazem parte do grupo mais bem caracterizado; as 223 unidades protéicas detectadas no genoma da TS são produtos de 15 genes capazes de codificar para a enzima ativa¹⁶.

Vários critérios devem ser considerados na seleção de inibidores potenciais. O alvo a ser explorado deve ser encontrado unicamente no parasita e, portanto, ausente na célula do hospedeiro; deve ser também essencial para o desenvolvimento do parasita em um dos estágios de seu ciclo replicativo. O uso de enzimas e metabólitos como alvos terapêuticos permite uma melhor investigação em termos mecanísticos e estruturais, além de contribuir significativamente para o planejamento racional de fármacos¹⁷.

Os alvos identificados que vêm sendo explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, entre elas vale mencionar:

- Tripanotiona redutase, relacionada ao estresse oxidativo^{18,19};
- *trans*-Sialidase, envolvida na glicosilação de mucinas de âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) para adesão do parasita à célula do hospedeiro^{20,21};

- C₁₄Δ-esterol metiltransferase, essencial na biossíntese de ergosterol²²;
- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, presente na via glicolítica²³;
- Cisteína protease ou cruzipaina, relacionada a processo hidrolítico e penetração do parasita na célula do hospedeiro^{24,25};
- Dihidrofolato redutase, responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina^{26,27};
- DNA topoisomerase, relacionada a alterações da topologia do DNA²;
- Farnesilpirofosfato sintase, responsável pela síntese de variedade de esteróis e poliisoprenóides²;
- hipoxantina-fosforibosiltransferase, essencial na síntese de nucleotídeos purínicos²²;
- Prolil endopeptidase, envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos²⁸;
- Receptores do Fator de Agregação Plaquetária (PAF)²⁹.

1.3 Invasão da célula pelo parasita

O parasita intracelular *T. cruzi* desenvolve uma enzima regulatória de superfície, denominada *trans*-sialidase, envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita; etapa inicial no processo de infecção³⁰.

O ácido siálico, presente em glicoconjugados das células do hospedeiro, desempenha papel fundamental durante a invasão de células pelo parasita³⁰. *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e através desta enzima o parasita torna-se capaz de transferi-lo e incorporá-lo a moléculas de mucina, que estão ligadas à membrana parasitária³¹ (Figura 7).

Figura 7 - Transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasita (setas)

As glicoproteínas de mucina das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* possuem unidades terminais de α -galactose e β -galactose que funcionam como epítomos; sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti- α -galactose (anti- α -gal).

Dessa forma, a sialilação das moléculas de mucina pela ação da enzima *trans*-sialidase protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação de anticorpos líticos anti- α -gal e contribui, assim, pelo tropismo tecidual exibido pelo parasita³¹.

1.4 Ácido siálico e *trans*-Sialidase

Há vinte tipos de ácido siálico, com distintos grupos substituintes. O ácido neurâmico 5-acético (Neu-5-Ac) é o precursor biossintético de todos os derivados de ácido siálico (Figura 8). A maioria dos glicoconjugados de superfície apresenta cadeias oligossacarídicas terminais que conferem carga negativa.

Uma grande variedade de carboidratos pode ser observada nessas superfícies devido à adição de ácido siálico; estas moléculas estão reconhecidamente envolvidas no controle das interações celulares³².

Figura 8 - Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido siálico

A enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariontes. A enzima não pode utilizar ácido siálico livre, apenas transfere-o do hospedeiro para o parasita no sentido de controlar o nível de infecção³².

trans-Sialidase tem duas atividades: uma hidrolase e outra transferase. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α -2,3 com unidades de β -galactose aceptoras na superfície do parasita³³. Apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica.

A sialilação de mucinas de *T. cruzi* pela TcTS parece ocorrer apenas quando a ponte formada entre a cadeia peptídica e as unidades externas de β -galactose (aceptoras de ácido siálico) é constituída por unidade α -N-acetilglicosamina (α GlcNAc); característica do parasita³⁴.

A maneira pela qual a enzima TcTS transfere ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas de galactose, constituintes de glicoproteínas presentes na membrana plasmática do parasita, pode se representada na Figura 9³⁵.

Figura 9 - Modelo de reconhecimento de mucina e sialilação por *trans*-sialidase

Portanto, TcTS é uma sialiltransferase *in vivo* e *in vitro* na presença de substratos adequados de aceptores de açúcar, como β -galactose terminal de glicoconjugados. A reação de transferência catalisada por *trans*-sialidase (Esquema 1) é diferente daquela observada por sialiltransferases clássicas³⁶.

Esquema 1 - Reação de transferência de ácido siálico pela *trans*-sialidase

1.5 Mucinas

A superfície do parasita *T. cruzi* é coberta por uma espessa camada de glicoconjugados, a maior parte deles pertencentes à família das mucinas, que são altamente glicosilados e estão ancorados à membrana plasmática via GPI³⁷.

Os glicopeptídeos de mucina de *T. cruzi* identificados apresentam unidades multigalactosiladas **A**, **B** e **C** (Figura 10). Estas unidades de açúcar encontram-se ligadas, através da unidade GlcNAc, à cadeia peptídica com sequência rica em aminoácidos de Treonina (Thr), como Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Lys-Pro-Pro (Figura 11)³⁷.

Figura 10 - Estrutura das glicanas **A**, **B** e **C** encontradas em mucina de *T. cruzi*

Figura 11 - Glicopeptídeos como potenciais substratos de *trans*-sialidase de *T. cruzi*

1.6 Importância biológica de carboidratos e glicoproteínas

A abundância de carboidratos na natureza e suas diversas funções nos sistemas biológicos justificam a importância dos estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas. Os carboidratos são encontrados como monômeros ou oligômeros, ou ainda como componentes de biopolímeros e de outras substâncias encontradas naturalmente. Nas células, podem existir em variadas formas, como por exemplo: peptidoglicanas, proteoglicanas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, lipopolissacarídeos e glicolipídeos³⁸.

A maior parte dos carboidratos está ligada a cadeias laterais de resíduos de asparagina por meio de ligações *N*-glicosídicas ou a cadeias laterais de serina (Ser) ou treonina através de ligações *O*-glicosídicas. As ligações *O*-glicosídicas com os aminoácidos tirosina e hidroxilisina, bem como ligações *C*-glicosídicas com resíduos de triptofano, não são comumente encontradas³⁸.

Inúmeros processos celulares, tais como, reconhecimento e adesão celular, transporte intracelular e intercelular de produtos genéticos, controle de permeabilidade de membrana e reconhecimento molecular, estão diretamente relacionados à natureza de moléculas de carboidratos expressas em superfícies celulares. Determinantes de grupos antigênicos (ABH, etc.), antígenos associados a tumores (Le_x, Le_y, etc.) e sítios de ligação de patógenos são alguns dos relevantes glicoconjugados encontrados em células de mamíferos³⁹.

A glicosilação de proteínas, tornando-as *O*-ligadas a moléculas de açúcar, facilita a comunicação celular por direcionar a expressão de moléculas de carboidratos no citosol e na superfície celular; sendo essencial para a homeostase celular, balanço hormonal e resposta imune. Anormalidades no processo de glicosilação estão associadas a determinadas doenças, tais como, epítomos T e T_n relacionados à fibrose cística e câncer, e com a proteína-tau na doença de Alzheimer³⁹.

As glicoproteínas ocorrem naturalmente em várias formas (glicoformas), as quais possuem a mesma estrutura peptídica, mas diferem tanto na natureza quanto no sítio de glicosilação⁴⁰. As funções e a versatilidade das glicoproteínas são inúmeras, considerando a habilidade que possuem em transmitir importantes informações, além de outras potenciais aplicações. Como por exemplo, as glicoproteínas estão envolvidas em processos fisiológicos que variam desde a endocitose mediada por receptores até a interação e invasão de patógenos com conseqüente liberação de biomoduladores pelo organismo invadido⁴¹.

Dessa forma, o campo da glicobiologia tem crescido intensamente assim como o interesse pelo desenvolvimento de métodos para a síntese de glicoconjugados. Glicopeptídeos sintéticos (fragmentos de glicoproteínas) são necessários para o estudo de interações de ligação de glicoproteínas e estudo de adesão celular e especificidade de ligação a receptores³⁹.

Recentes progressos nessa área têm sido marcantes. Moléculas de carboidratos relativamente complexas têm sido ligadas covalentemente a aminoácidos para incorporação em seqüências de glicopeptídeos, como por exemplo, fragmentos de mucina, fragmentos de receptores de interleucina-8, haptenos de células T-helper, fragmentos de antígenos CD52 e seqüências de fibronectinas oncofetais³⁹.

O método mais eficaz desenvolvido até o momento para a preparação de glicopeptídeos envolve a combinação da síntese de peptídeos em *fase sólida* com o possível acoplamento de blocos de construção contendo resíduos de aminoácidos previamente ligados a unidades de açúcar por glicosilação enzimática^{42,43}.

A utilização de enzimas, tais como glicosiltransferases e glicosidases, conduz à formação de ligações glicosídicas de forma estereo e regioespecífica, sem haver necessidade do emprego de grupos protetores como na síntese química tradicional. Sendo assim, torna-se possível a obtenção de oligossacarídeos ou glicoconjugados de interesse biológico com alto rendimento^{42,43}.

1.7 Clonagem, expressão gênica e estrutura 3D de *trans*-sialidase

A clonagem do gene de *trans*-sialidase foi realizada por Schenkman e colaboradores⁴⁴. A enzima possui dois domínios distintos: um domínio catalítico-propulsor *N*-terminal (resíduos 1-371) estritamente associado, através de uma longa α hélice (resíduos 372-394), ao domínio *C*-terminal de lectina (resíduos 395-632)³⁵.

A estrutura de *trans*-sialidase de *T. cruzi* foi recentemente determinada a uma resolução de 1.6 Å e sua estrutura cristalográfica está disponível no PDB (Banco de dados de proteínas). A Figura 12 mostra as estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA (2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil-ácido neurâmico), análogo de ácido siálico, e o complexo cristalográfico, obtido do PDB (código 1 MS8), deste inibidor com a enzima TcTS⁴⁵.

Figura 12 - Estruturas do inibidor DANA seu complexo cristalográfico com TcTS

As principais funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da TcTS, fundamentais para o processo de transglicosilação, estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais aminoácidos do sítio catalítico da TcTS e suas funções

Principais aminoácidos presentes no sítio catalítico da TcTS	Funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da TcTS no processo de transglicosilação
<i>Arg 35, Arg 245 e Arg 314</i>	Ligam-se ao grupo carboxilato de ácido siálico.
<i>Glu 357</i>	Estabiliza o resíduo de <i>Arg 35</i> .
<i>Asp 59</i>	É essencial para a catálise: realiza ligação de hidrogênio com 4-OH de ácido siálico e 3-OH de galactose.
<i>Tyr 342 e Glu 230</i>	Localizados na região inferior do sítio catalítico, estabilizam o estado de transição da reação de transglicosilação.
<i>Val 95, Leu 176 e Trp120</i>	Presentes na cavidade hidrofóbica têm a função de acomodar o grupo <i>N</i> -acetil.
<i>Tyr 119 e Tyr 248</i>	Estes resíduos, juntamente com os resíduos <i>Trp 120</i> , <i>Val 203</i> e <i>Trp 312</i> , definem o ambiente hidrofóbico que contribui para a exclusão de água do centro reacional, favorecendo a <i>trans</i> -glicosilação. <i>Tyr 119</i> também realiza ligação de hidrogênio com o resíduo de glicerol do ligante.
<i>Pro 283</i>	Importante na transglicosilação em experimentos prévios de mutagênese.
<i>Asp 96</i>	Sua orientação no sítio catalítico afeta a posição precisa de ácido siálico. Interage com molécula de glicerol.

As principais interações existentes entre esses aminoácidos e o inibidor DANA estão representadas na Figura 13^{35,45}.

Figura 13 - Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB

1.8 Experiência Anterior

A preparação de substratos glicopeptídicos simples para o estudo da relação estrutura-função de *trans*-sialidase foi realizada por Vanessa Leiria Campo em seu trabalho de mestrado e doutorado, dando continuidade ao pós-doutorado da Professora Ivone Carvalho na Universidade de East Anglia (Inglaterra)³⁷.

Parte dos resultados alcançados está relacionada à preparação dos blocos de construção quirais Gal- β -treonina **1** e GlcNAc- β -treonina **2**, em solução, e à síntese dos glicopeptídeos GlcNAc(β)-heptapeptídeo **3**, GlcNAc(β)-heptapeptídeo-(β)Gal **4** e GlcNAc(α)-heptapeptídeo-(β)GlcNAc **5**; intermediários para a síntese de glicoconjugados de mucina de *T. cruzi* em fase sólida (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura de alguns compostos sintetizados pelo grupo

A descoberta de metodologias simplificadas para a preparação de carboidratos mais complexos levou o grupo a empregar enzimas da classe das glicosiltransferases e glicosidases.

Estas enzimas, sob condições controladas, são capazes de promover a formação de ligações glicosídicas de forma estéreo e regioespecífica, dando origem a oligossacarídeos ou glicoconjugados de interesse biológico, com alto rendimento^{46,47}.

Os resultados obtidos recentemente mostraram que a transferência de galactose (pelo doador Gal-UDP na presença da enzima galactosiltransferase β 1-4) para o composto **5** realmente ocorreu, porém com baixo rendimento e em apenas uma unidade monossacarídica.

É válido ressaltar que o processo também é caro, dispendioso e de difícil separação cromatográfica. Sendo assim, foi preciso encontrar outro caminho para obtenção de dissacarídeos ligados a aminoácidos (blocos de construção).

Adicionalmente, o modelo proposto para *trans*-sialidase conduz a algumas indagações, as quais não podem ser compreendidas apenas pelo emprego de substratos simples no estudo da relação estrutura - função da enzima.

Portanto, considerando a heterogeneidade das moléculas de mucina de *T. cruzi*, é necessário que novas moléculas sejam sintetizadas a fim de que estas atuem como substratos glicopeptídicos, os quais podem levar ao melhor entendimento da ação da enzima nos substratos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O principal objetivo do projeto é o desenvolvimento de estratégias de síntese de dissacarídeos contendo uma unidade de galactose ligada à *N*-acetilglicosamina (via ligação β 1 – 3), como observado na molécula de mucina de âncora de *T. cruzi*, para acoplamento dos aminoácidos L-treonina e L-serina nas posições α e β ; formando blocos de construção de interesse biológico (Figura 15).

Figura 15 - Estrutura dos dissacarídeos propostos

Esses dissacarídeos deverão ser submetidos a ensaios com a enzima *trans*-sialidase para investigação da natureza das interações moleculares críticas envolvidas no reconhecimento e processamento desses glicosídeos pela introdução de ácido siálico na posição 3 do resíduo de galactose (Figura 16). Essa investigação pode ser realizada na própria unidade (FCFRP) ou pelo grupo de pesquisa da Universidade de East Anglia (Inglaterra), com o qual colaboramos.

Figura 16 - Estrutura dos dissacarídeos propostos sialilados

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Aparelhagem Analítica:

- Ressonância Magnética Nuclear de ^1H : Bruker Advance DPX 400 MHz e DPX 500 MHz
- Espectrometria de Massas de alta resolução (ESI): Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF
- Espectrometria na região do Infravermelho: Nicolete Modelo Protege 460

Aparelhagem Laboratorial:

- Evaporador Rotatório: Büchi RE121
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10

Solventes, Reagentes e Outros Materiais

- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) e em Camada Preparativa (CCP) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK®.
- As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel tipo “Flash” (40-63 μm) da MERCK®.
- Alguns solventes e reagentes foram convenientemente purificados conforme métodos usuais, descritos na literatura (Perrin et al., 1980).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese do doador de galactose

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D-galactopiranosose⁴⁸

1

Uma suspensão de D-(+)-galactose (5,0 g; 27,8 mmol) em anidrido acético (Ac_2O) (25,0 mL) foi tratada com iodo (I_2) (0,25 g; 1,0 mmol) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente. Após 1 hora, todo açúcar havia se dissolvido formando uma solução castanha escura. O acompanhamento da reação por CCD [Hexano: Acetato de Etila (AcOEt) 1:1 (v:v)] mostrou a formação de apenas um produto. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano (DCM) e foi lavada com solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5 %. Em seguida, a fase aquosa foi lavada (2 vezes) com DCM. As fases orgânicas foram reunidas e neutralizadas com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). A secagem (sulfato de sódio - Na_2SO_4) e concentração (evaporador rotatório) da fase orgânica forneceram um óleo amarelo claro o qual foi cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O rendimento do composto **1** foi praticamente quantitativo (10,8 g; 27,7 mmol; 99 %). A proporção entre os isômeros α/β foi 5:1.

Dados do composto α : δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 400 MHz) 6,38 (1H, d, $J_{1,2}$ 1,7 Hz, H-1), 5,51 (1H, dd, $J_{3,4}$ 2,5 Hz; $J_{4,5}$ 1,3 Hz, H-4), 5,34 (2H, t, $J_{2,3}$ 1,7 Hz, H-2, H-3), 4,35 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 1,3 Hz; $J_{5,6b}$ 6,6 Hz; $J_{5,6a}$ 7,8 Hz, H-5), 4,10 (2H, dd, $J_{5,6b}$ 6,8 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,6 Hz, H-6a, H-6b), 2,17-2,01 (15H, 5s, 5 COCH_3).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosse^{49,50} **2**

O reagente acetato de hidrazina (H_2NNHAc) (2,6 g; 27,7 mmol) foi adicionado à solução de **1** (10,8 g; 27,7 mmol) em DMF (30,0 mL) e a reação foi deixada sob agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi diluído com AcOEt, lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água, seco com sulfato de magnésio (MgSO_4) e concentrado. A mistura obtida foi purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] e forneceu o composto **2** com rendimento de 70 % (6,8 g; 19,4 mmol) na proporção α/β de 3:1.

Dados do composto α : δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) 5,53 (1H, t, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,48 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,5 Hz; $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,42 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5; Hz $J_{2,3}$ 10,8 Hz, H-2), 5,17 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,5 Hz, H-3), 4,48 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 1,2 Hz; $J_{5,6b}$ 6,3 Hz; $J_{5,6a}$ 7,6 Hz, H-5), 4,11 (2H, dd, $J_{5,6b}$ 6,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,8 Hz, H-6a, H-6b), 3,12 (1H, dd, J 1,2 Hz; J 3,5 Hz, OH), 2,15-2,00 (12H, 4s, 4 COCH_3).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato⁵⁰ **3**

Uma solução de **2** (4,3 g; 12,3 mmol) em DCM (20,0 mL) destilado foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte (N_2). Tricloroacetoneitrila (CCl_3CN) (4,9 mL;

49,4 mmol) e 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,56 mL; 3,7 mmol) foram adicionados à solução, que foi agitada por 1 hora nas condições mencionadas acima. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **3** foi cristalizado em Éter etílico (Et₂O): Hexano sendo obtido apenas o isômero α com rendimento de 80 % (4,9 g; 9,9 mmol).

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 8,67 (1H, s, NH), 6,61 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,57 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,0 Hz; $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,43 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,0 Hz, H-3), 5,37 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,8 Hz, H-2), 4,44 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 1,0 Hz; $J_{5,6b}$ 6,5 Hz; $J_{5,6a}$ 12,3 Hz, H-5), 4,17 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6b), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 11,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6a), 2,17-2,02 (12H, 4s, 4 COCH₃).

3.2.2 Síntese dos aceptores de galactose

3.2.2.1 Aceptor com N₃ em C-2

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-D-glicopirranose⁵¹⁻⁵⁴

4

Uma solução do reagente triflato de azida (TfN₃) foi preparada através da dissolução de azida de sódio (NaN₃) (6,0 g) em água (15,0 mL). O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo e 25,0 mL de DCM foram adicionados. A seguir, 3,1 mL de anidrido triflico (Tf₂O) foram gotejados por 10 minutos. Após 2 horas e meia de reação a fase orgânica foi separada da aquosa em funil de separação. A fase aquosa ainda foi extraída com DCM (2 x

10,0 mL). As fases orgânicas foram combinadas e neutralizadas com solução saturada de Na_2CO_3 , para ser utilizada posteriormente.

O açúcar 2-amino-2-desóxi-D-glicose (cloridrato) (2,0 g; 9,3 mmol) foi dissolvido em água (30,0 mL) e tratado com carbonato de potássio (K_2CO_3) (2,3 g) e sulfato de cobre (CuSO_4) (14 mg). Em seguida, metanol (60,0 mL) e toda solução de TfN_3 preparada anteriormente foram adicionados e mais metanol foi adicionado (30,0 mL) até que o meio reacional ficasse homogêneo. Dessa forma, o sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD [AcOEt : MeOH 8:2 (v:v)].

Após esse período o meio reacional foi seco com ar comprimido (24 horas), dissolvido em piridina (Py) (50,0 mL), tratado com Ac_2O (30,0 mL) e agitado à temperatura ambiente por 24 horas. Ao fim dessa terceira etapa, a mistura foi seca com ar comprimido (24 horas), extraída com AcOEt , lavada com água e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **4** foi obtido com rendimento de 89 % (3,1 g; 8,3 mmol) na proporção α/β de 1:2.

Dados do composto β : δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) 5,57 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,6 Hz, H-1), 5,14-5,03 (2H, m, H-3, H-4), 4,30 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 4,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a), 4,07 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6b), 3,83 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 11,6 Hz; $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{5,6a}$ 4,5 Hz, H-5) 3,68 (1H, t, $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 2,20-2,03 (12H, 4s, 4 COCH_3).

3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila⁵⁵⁻⁵⁷

5

O composto **4** (3,1 g; 8,3 mmol) foi dissolvido em DCM (12,0 mL) destilado e mantido sob N_2 . Tiofenol (PhSH) (1,7 mL; 16,5 mmol) e trifluorboroeterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (4,2

mL; 33,1 mmol) foram adicionados ao sistema, que foi agitado por 48 horas nas condições mencionadas acima. Após esse tempo, a mistura reacional foi neutralizada com a adição de Et₃N, concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **5** foi obtido com 69 % de rendimento (2,4 g; 5,7 mmol;) na proporção α/β de 3:1.

Dados do composto α : δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 7,52-7,30 (5H, m, CH arom.), 5,65 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,5 Hz, H-1), 5,34 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,6 Hz; $J_{3,4}$ 9,3 Hz, H-3), 5,05 (1H, t, $J_{3,4}$ 10,3 Hz, H-4), 4,60 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 10,1 Hz; $J_{5,6b}$ 2,3 Hz; $J_{5,6a}$ 5,0 Hz, H-5), 4,30 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a), 4,09 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 4,03 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6b), 2,11-2,04 (9H, 3s, 3 COCH₃).

2-azido-4,6-O-benzilideno-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila^{55,58,59}

6

A uma solução do composto **5** (2,4 g; 5,7 mmol) em metanol (15,0 mL) foi adicionada quantidade catalítica de sódio metálico e o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. O meio reacional foi neutralizado com resina ácida (Dowex[®]), filtrado em funil de vidro sinterizado e concentrado. A mistura foi dissolvida em acetonitrila destilada (CH₃CN) (25,0 mL) para adição de benzaldeído dimetil acetal [PhCH(OMe)₂] (4,3 mL; 28,6 mmol) e ácido *p*-toluenossulfônico (*p*TSOH) (55 mg; 0,3 mmol). Após 18 horas de agitação à temperatura ambiente, Et₃N foi adicionada para interromper a reação e o sistema foi concentrado e purificado por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **6** foi obtido com 72 % de rendimento (1,6 g; 4,1 mmol). A proporção entre os isômeros α/β foi de 3:2.

Dados do composto α : δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 7,59-7,29 (10H, m, CH arom.), 5,58 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,8 Hz, H-1), 5,56 (1H, s, CH benzil), 4,39 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 10,4 Hz; $J_{5,6b}$ 4,9 Hz;

$J_{5,6a}$ 10,4 Hz, H-5), 4,24 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 4,9 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,4 Hz, H-6b), 4,08 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,5 Hz, H-3), 3,93 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,0 Hz, H-2), 3,76 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 10,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,4 Hz, H-6a), 3,59 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,5 Hz, H-4), 3,47 (1H, sl, OH).

3.2.2.2 Aceptor com troc em C-2

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desóxi-2-(2,2,2-tricloroetóxicarbonilamino)-D-glicopiranosídeo^{48,60}

7

A uma solução de cloridrato de 2-amino-2-desóxi-D-glicose (0,5 g; 2,3 mmol) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (0,5 g; 5,9 mmol) em água (7,4 mL), resfriada a 0°C, foi adicionado lentamente cloroformiato de 2,2,2-tricloroetila (trocCl) (0,5 mL; 3,4 mmol). A mistura foi agitada em banho de gelo por 2 horas e mantida à temperatura ambiente durante 19 horas. O precipitado branco formado foi separado por filtração e lavado com água e éter etílico. Após recristalização em etanol, o composto com troc (hidroxilas livres) foi obtido com rendimento de 53 % (440 mg; 1,2 mmol).

Uma suspensão de 2-desóxi-2-(2,2,2-tricloroetóxicarbonilamino)-D-glicopiranosídeo (1,2 g; 3,4 mmol) em Ac_2O (6,0 mL) foi tratada com I_2 (60 mg). A reação foi mantida sob agitação a 100 °C durante 1:30 h, sendo acompanhada por CCD [Hexano: AcOEt 1:1 (v:v)]. O final da reação foi evidenciado pela formação de uma solução castanha escura. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo DCM e foi lavada com solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5 %. Em seguida, a fase aquosa foi lavada (2 vezes) com DCM e as fases orgânicas foram neutralizadas com solução saturada Na_2CO_3 . A secagem (Na_2SO_4) e concentração

(evaporador rotatório) da fase orgânica forneceram um óleo amarelo claro, que foi cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O rendimento do composto **7** foi de 79 % (1,4 g; 2,7 mmol). A proporção entre os isômeros α/β foi de 2:3.

Dados do composto β : δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) 5,75 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,8 Hz, H-1), 5,22 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,2 Hz, H-3), 5,11 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,3 Hz, H-4), 5,14 (1H, d, J 9,1 Hz, NH), 4,73 (2H, s, CH_2 troc), 4,29-4,24 (2H, m, H-6a, H-6b), 3,93 (1H, q, J 9,5 Hz; H-2), 3,81 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 9,5 Hz; $J_{5,6b}$ 2,4 Hz; $J_{5,6a}$ 4,7 Hz, H-5), 2,10 (3H, s, $COCH_3$), 2,05 (9H, 1s, 3 $COCH_3$).

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desóxi-2-(2,2,2-tricloroetóxicarbonilamino)-1-tio- β -D-glicopiranosídeo de fenila^{55,56}

8

O composto **7** (1,4 g; 2,7 mmol) foi dissolvido em DCM (4,0 mL) destilado e mantido sob N_2 . PhSH (0,55 mL; 5,4 mmol) e $BF_3 \cdot Et_2O$ (1,4 mL; 10,7 mmol) foram adicionados ao sistema, que foi agitado por 6 horas nas condições mencionadas acima. Após esse tempo, a reação foi neutralizada com a adição de Et_3N , concentrada e a mistura reacional foi purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)]. O composto **8** foi obtido com rendimento de 37 % (0,57 g; 1,0 mmol); sendo verificada apenas a presença do isômero β .

Dados do composto β : δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) 7,53-7,30 (5H, m, CH arom.), 5,59 (1H, d, $J_{1,2}$ 9,1 Hz, H-1), 5,30 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 5,01 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-4), 4,87 (1H, d, J 10,3 Hz, NH), 4,80 e 4,72 (2H, AB, J_{AB} 12,1 Hz, CH_2 troc), 4,23 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a), 4,17 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6b), 3,78-3,71 (2H, m, H-2, H-5), 2,08-1,99 (9H, 3s, 3 $COCH_3$).

3.2.3 Síntese dos dissacarídeos

6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-4-hidróxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de fenila⁶¹

Os compostos **3** (0,17 g; 0,3 mmol) e **6** (0,1 g; 0,2 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por 3 horas a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente, foram dissolvidos em DCM (3,5 mL) destilado e mantidos sob N₂ para adição do promotor Trimetilsilil triflato (TMSOTf) (14 μ L; 77 μ mol). O sistema foi agitado por 1 hora a -30 °C e 18 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi neutralizada com a adição de Et₃N, concentrada, e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)]. O composto **10** foi obtido com rendimento de 18 % (30 mg; 0,04 mmol) e apenas o isômero α foi verificado.

δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 7,52-7,48 (2H, m, CH arom.), 7,33-7,29 (3H, m, CH arom.), 5,63 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,6 Hz, H-1), 5,40 (1H, d, $J_{3',4'}$ 2,9 Hz, H-4'), 5,28 (1H, dd, $J_{1',2'}$ 8,1 Hz; $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-2'), 5,05 (1H, dd, $J_{3',4'}$ 3,3 Hz; $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-3'), 4,65 (1H, d, $J_{1',2'}$ 8,1 Hz, H-1'), 4,40-4,34 (1H, m, H-4), 4,32 (2H, sl, OH, H-6b), 4,19-4,14 (1H, m, H-6b'), 4,13-4,08 (2H, m, H-6a, H-6a'), 4,07-4,03 (1H, m, H-5'), 3,85 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,6 Hz; $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 3,62-3,54 (2H, m, H-3, H-5), 2,16-1,98 (15H, 5s, 5 COCH₃). ESI-TOF calculado para C₂₈H₃₅N₃O₁₄S [M + Na⁺]: 692,1732; encontrado: 692,1868.

2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila^{61,62}

11

Os compostos **3** (0,9 g; 1,8 mmol) e **6** (0,7 g; 1,5 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por 3 horas a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente, foram dissolvidos em DCM (20,0 mL) destilado e mantidos sob N₂ a 0 °C para adição do promotor Trimetilsilil triflato (TMSOTf) (14 μ L; 77 μ mol). O sistema foi agitado por quarenta minutos nessas condições. Em seguida, a reação foi neutralizada com a adição de Et₃N, concentrada, e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)]. O composto **11** foi obtido com 93 % de rendimento (1,0 g; 1,4 mmol). A proporção entre os isômeros α/β foi de 5:1.

Dados do composto α : δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 7,58-7,55 (2H, m, CH arom.), 7,46-7,43 (2H, m, CH arom.), 7,38-7,34 (6H, m, CH arom.), 5,54 (1H, s, CH benzil), 5,30 (1H, d, $J_{3',4'}$ 3,8 Hz, H-4'), 5,24 (1H, dd, $J_{1',2'}$ 8,0 Hz; $J_{2',3'}$ 10,5 Hz, H-2'), 4,96 (1H, dd, $J_{3',4'}$ 3,4 Hz; $J_{2',3'}$ 10,5 Hz, H-3'), 4,77 (1H, d, $J_{1',2'}$ 8,0 Hz, H-1'), 4,50 (1H, d, J 10,2 Hz), 4,38 (1H, dd, J 5,1 Hz; J 10,5 Hz), 4,04 (1H, dd, J 7,6 Hz; J 11,0 Hz), 3,86-3,83 (1H, m, H-5'), 3,78 (1H, d, J 10,2 Hz), 3,73 (1H, t, J 9,2 Hz), 3,66-3,59 (2H, m, H-3, H-5), 3,46-3,41 (1H, m), 3,36 (1H, t, J 9,2 Hz), 2,11-1,91 (12H, 4s, 4 COCH₃). ESI-TOF calculado para C₃₃H₃₇N₃O₁₃S [M + Na⁺]: 738,1939; encontrado: 738,1949.

2-azido-2-desóxi-3-*O*-(β -D-galactopiranosil)-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de fenila⁵⁵

12

A uma solução do composto **10** (30 mg; 0,04 mmol) em metanol (2,0 mL) foi adicionada quantidade catalítica de sódio metálico e o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. O meio reacional foi neutralizado com resina ácida (Dowex[®]), filtrado em funil de vidro sinterizado, concentrado e purificado por cromatografia em camada preparativa (CCP) [DCM: MeOH 8:2 (v:v)]. O composto **12** foi obtido com rendimento de 62 % (13 mg; 0,03 mmol). ESI-TOF calculado para C₁₈H₂₅N₃O₉S [M + Na⁺]: 482,1203; encontrado: 482,1181.

4,6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila⁶³

16

O dissacarídeo **11** (0,56 g; 0,78 mmol) foi dissolvido em solução de ácido acético (AcOH 80 %) (10 mL) e aquecido a 80 °C até o consumo total do material de partida. Após esse período (2 horas) a mistura foi concentrada e coevaporada com tolueno para retirada da água. Logo em seguida, o produto (**15**) foi dissolvido em piridina (Py) (5,0 mL), tratado com Ac₂O (3,0 mL) e o sistema agitado à temperatura ambiente por 24 horas. Ao fim dessa segunda etapa, a mistura foi concentrada com evaporador rotatório acoplado à bomba de alto vácuo, extraída com AcOEt, lavada com água e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 1:1 (v:v)]. O composto **16** foi obtido com rendimento de 91 % (0,52 g; 0,73 mmol).

δ_{H} (CDCl₃, 500 MHz) 7,52-7,48 (2H, m, CH arom.), 7,33-7,29 (3H, m, CH arom.), 5,63 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,6 Hz, H-1), 5,40 (1H, d, $J_{3',4'}$ 2,9 Hz, H-4'), 5,28 (1H, dd, $J_{1',2'}$ 8,1 Hz; $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-2'), 5,05 (1H, dd, $J_{3',4'}$ 3,3 Hz; $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-3'), 4,65 (1H, d, $J_{1',2'}$ 8,1 Hz, H-1'), 4,52-4,47 (1H, m, H-4), 4,32 (1H, sl, H-6b), 4,19-4,14 (1H, m, H-6b'), 4,13-4,08 (2H, m,

H-6a, H-6a'), 4,07-4,03 (1H, m, H-5'), 3,85 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,6 Hz; $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 3,62-3,54 (2H, m, H-3, H-5), 2,18-1,96 (18H, 6s, 6 COCH₃). ESI-TOF calculado para C₃₀H₃₇N₃O₁₅S [M + Na⁺]: 734,1837; encontrado: 734,1707.

3.2.4 Síntese dos aminoácidos aceptores dos dissacarídeos

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico⁶⁴

13

Uma solução de ácido *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina carboxílico (3,5 g; 10,7 mmol) em etanol (10,0 mL) foi resfriada a 5 °C e lentamente neutralizada com solução aquosa de carbonato de cério (Cs₂CO₃) (1,7 g; 5,3 mmol). A mistura foi agitada por 20 minutos e concentrada em evaporador rotatório. A água foi removida por uma série de co-evaporações com tolueno até secagem. O sal de cério formado foi dissolvido em DMF (20,0 mL) e tratado com brometo de benzila (BnBr) (1,4 mL; 11,7 mmol). A reação foi acompanhada por CCD [Hexano: AcOEt 1:1 (v:v)].

Após 4 horas sob agitação, o subproduto brometo de cério (CsBr), precipitado, foi removido por filtração, e o filtrado resultante foi submetido à secagem em ar comprimido para remoção do solvente DMF. O produto **13** foi extraído com DCM, lavado com solução saturada de NaHCO₃, seco (MgSO₄) e concentrado. O composto **13** foi cristalizado a partir de AcOEt e Hexano e obtido como sólido branco com rendimento de 77 % (3,5 g; 8,3 mmol).

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,77 (2H, d, J 7,6 Hz, CH Fmoc arom., H-1, H-1'), 7,60 (2H, d, J 7,8 Hz, CH Fmoc arom., H-4, H-4'), 7,43-7,30 (9H, m, CH benzil e Fmoc arom., H-2, H-2',

H-3, H-3'), 5,72 (1H, d, J 7,6 Hz, NH), 5,23 (2H, s, O-CH₂-Ph), 4,52-4,46 (1H, m, CH Ser), 4,45-4,39 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4,22 (1H, t, J 6,8 Hz, CH Fmoc), 4,07-3,91 (2H, m, CH₂ Ser).

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina benzílico⁶⁴

14

Uma solução de ácido *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina carboxílico (3,5 g; 10,3 mmol) em etanol (10,0 mL) foi resfriada a 5 °C e lentamente neutralizada com solução aquosa de Cs₂CO₃ (1,7 g; 5,13 mmol). A mistura foi agitada por 20 minutos e concentrada em evaporador rotatório. A água foi removida por uma série de co-evaporações com tolueno até secagem. O sal de cério formado foi dissolvido em DMF (10,0 mL) e tratado com BnBr (1,5 mL; 12,3 mmol). A reação foi acompanhada por CCD [Hexano: AcOEt 1:1 (v:v)].

Após 4 horas sob agitação, o subproduto CsBr, precipitado, foi removido por filtração, e o filtrado resultante foi submetido à secagem em ar comprimido para remoção do solvente DMF. O produto **14** foi extraído com DCM, lavado com solução saturada de NaHCO₃, seco (MgSO₄) e concentrado. O composto **14** foi cristalizado a partir de AcOEt e Hexano e obtido como sólido branco com rendimento de 59 % (2,6 g; 6,1 mmol).

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,80 (2H, d, J 7,5 Hz, CH Fmoc arom., H-1, H-1'), 7,59 (2H, d, J 7,5 Hz, CH Fmoc arom., H-4, H-4'), 7,43-7,21 (9H, m, CH benzil e Fmoc arom., H-2, H-2', H-3, H-3'), 5,62 (1H, d, J 9,3 Hz, NH), 5,25 e 5,20 (2H, AB, J_{AB} 12,1 Hz, O-CH₂-Ph), 4,45-4,40 (2H, m, CH Thr), 4,38-4,34 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4,22 (1H, t, J 6,9 Hz, CH Fmoc), 1,65 (1H, sl, OH), 1,22 (3H, d, J 6,0 Hz, CH₃).

3.2.5 Acoplamento do dissacarídeo aos aminoácidos aceptores

Éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi-α-D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina⁶⁵

17

Uma solução do reagente iodôniotriflato (I^+OTf) foi preparada através da reação entre *N*-iodosuccinimida (NIS) (0,18 g; 0,84 mmol) e ácido trifílico (TfOH) (9 μ L; 105 μ mol) em DCM destilado (10,0 mL). O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo por 20 minutos, até ser totalmente transferido para o balão contendo o dissacarídeo e o aminoácido.

Os compostos **16** (0,3 g; 0,42 mmol) e **13** (0,15 g; 0,36 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por algumas horas a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente, foram dissolvidos em DCM (15,0 mL) destilado e mantidos a 0 °C sob N_2 para adição do reagente iodôniotriflato. O sistema foi agitado por 1 hora nessas condições até ser neutralizado com adição de Et_3N e concentrado. A purificação foi realizada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] e o produto **17** foi obtido com rendimento de 27 % (0,1 g; 98 μ mol).

δ_H ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,78 (2H, d, J 7,6 Hz, CH Fmoc arom.), 7,60 (2H, d, J 7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,44-7,29 (9H, m, CH benzil e Fmoc arom.), 5,86 (1H, d, J 7,9 Hz, NH), 5,35 (1H, d, $J_{3',4'}$ 2,4 Hz, H-4'), 5,24 (2H, s, O-CH₂-Ph), 5,12 (1H, d, $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-2'), 5,10 (1H, d, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 5,00 (1H, dd, J 3,4 Hz, J 10,4 Hz), 4,91 (1H, t, $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-3'), 4,81 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, H-1), 4,66-4,61 (1H, m, CH Ser), 4,58 (1H, d, $J_{1',2'}$ 7,9 Hz, H-

1'), 4,47-4,38 (2H, m, CH_2 Fmoc), 4,23 (1H, t, J 7,0 Hz, CH Fmoc), 4,12-4,06 (4H, m, CH_2 Ser, H-6a e H-6a'), 4,03 (1H, t, J 9,8 Hz), 3,97 (1H, t, J 9,8 Hz, H-5), 3,90-3,85 (1H, m, H-5'), 3,83 (1H, t, J 7,0 Hz, H-4), 3,20 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 2,14-1,98 (18H, 6s, 6 COCH_3). ESI-TOF calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{20}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 1041,3331; encontrado: 1041,3262.

Éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina⁶⁵

18

Uma solução do reagente iodôniotriflato (I^+OTf) foi preparada através da reação entre *N*-iodosuccinimida (NIS) (0,18 g; 0,84 mmol) e ácido trifílico (TfOH) (9 μL ; 105 μmol) em DCM destilado (10,0 mL). O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo por 20 minutos, até ser totalmente transferido para o balão contendo o dissacarídeo e o aminoácido.

Os compostos **16** (0,31 g; 0,43 mmol) e **14** (0,15 g; 0,35 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por algumas horas a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente, foram dissolvidos em DCM (15,0 mL) destilado e mantidos a 0 °C sob N_2 para adição do reagente iodôniotriflato. O sistema foi agitado por 1 hora nessas condições até ser neutralizado com adição de Et_3N e concentrado. A purificação foi realizada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] e o produto **18** foi obtido com rendimento próximo de 13 % (0,05 g; 48 μmol).

δ_{H} (CDCl_3 , 500 MHz) 7,78 (2H, d, J 7,6 Hz, CH Fmoc arom.), 7,60 (2H, d, J 7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,44-7,29 (9H, m, CH benzil e Fmoc arom.), 5,86 (1H, d, J 7,9 Hz, NH), 5,35 (1H, d, $J_{3',4'}$ 2,4 Hz, H-4'), 5,24 (2H, s, O- CH_2 -Ph), 5,12 (1H, d, $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-2'), 5,10 (1H, d, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 5,00 (1H, dd, J 3,4 Hz, J 10,4 Hz), 4,91 (1H, t, $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-3'), 4,81 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, H-1), 4,66-4,61 (1H, m, CH Ser), 4,58 (1H, d, $J_{1',2'}$ 7,9 Hz, H-1'), 4,47-4,38 (2H, m, CH_2 Fmoc), 4,23 (1H, t, J 7,0 Hz, CH Fmoc), 4,12-4,06 (4H, m, CH_2 Ser, H-6a e H-6a'), 4,03 (1H, t, J 9,8 Hz), 3,97 (1H, t, J 9,8 Hz, H-5), 3,90-3,85 (1H, m, H-5'), 3,83 (1H, t, J 7,0 Hz, H-4), 3,20 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 1,25 (1H, s, CH_3 treonina). ESI-TOF calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{20}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 1055,3488; encontrado: 1055,3435.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese de oligossacarídeos requer a diferenciação dos grupos hidroxílicos (com reatividade similar) e a obtenção de produtos com estereosseletividade desejada, uma vez que em cada glicosilação é gerado um novo centro estereogênico. Por essa razão, não existe um sistema automatizado rápido para a síntese de carboidratos, como ocorre para proteínas e ácidos nucleicos⁶⁶.

Adicionalmente, a síntese de carboidratos envolve o emprego de estratégias de proteção e desproteção das hidroxilas, de forma altamente seletivas, que conduzem a reações regiosseletivas e ao aumento do número de etapas da rota sintética⁵⁹.

Como o principal objetivo do projeto é desenvolver estratégias de síntese de dissacarídeos contendo uma unidade de galactose ligada à *N*-acetilglicosamina (via ligação β 1-3) para acoplamento dos aminoácidos L-serina e L-treonina (*N*-Fmoc protegidos) nas posições anoméricas α e β , serão necessárias várias etapas para a síntese total dos blocos de construção partindo-se de reagentes comerciais, tais como: D-galactose, D-glicosamina (2-amino-2-desóxi-D-glicose), L-serina e L-treonina (*N*-Fmoc protegidos).

Por isso, o trabalho foi dividido em três rotas sintéticas: (i) síntese do doador de galactose (**3**), (ii) síntese dos aceptores-doadores (**6** e **9**) (dependendo da reação) e (iii) acoplamento do dissacarídeo (**11**) aos aminoácidos aceptores (**13** e **14**) para síntese dos blocos de construção desprotegidos. Dessa forma, a estratégia sintética escolhida para o desenvolvimento do trabalho está representada no esquema 2.

Esquema 2 - Retrossíntese simplificada do bloco de construção

A retrossíntese simplificada mostra que para síntese do bloco de construção serão necessários dois compostos: o dissacarídeo (**11**) e um dos aminoácidos aceptores (**13** ou **14**). O dissacarídeo por sua vez, também será sintetizado a partir de outros dois compostos: o aceptor de galactose **6** ou **9** e o doador de galactose **3**.

Essa sequência sintética foi a estratégia mais observada na literatura estudada⁶⁷⁻⁷¹, ou seja, primeiro se prepara o dissacarídeo para depois se acoplar o aminoácido. Poucos trabalhos relatam o acoplamento do aminoácido ao monossacarídeo para depois ligar o doador glicosídico, formando o dissacarídeo.

4.1 Síntese do doador de galactose

Doadores glicosídicos são açúcares (monossacarídeos, di, tri, tetra, etc) que apresentam grupos abandonadores ligados ao carbono anomérico (C-1), permitindo o ataque de um nucleófilo devidamente funcionalizado (aminoácido, açúcar, etc). Dentre os doadores

glicosídicos mais comuns podem ser citados os halletos, acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos. Os halletos são os doadores mais empregados, seguidos pelos acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos^{72,73}.

Apesar dos halletos serem os mais empregados em reações de glicosilação, algumas desvantagens podem ser citadas: condições fortemente ácidas são necessárias para gerar os halletos, baixa estabilidade térmica e grande sensibilidade à hidrólise e a síntese de derivados glicosídicos a partir dos halletos são realizadas em presença de sais de metais pesados (ácidos de Lewis) como promotores (preferencialmente de mercúrio e prata). Além disso, esses sais de metais são caros e perigosos quanto ao manuseio (toxicidade do sal de mercúrio e perclorato de prata como potencial explosivo)⁷⁴.

Não obstante, nos últimos 5 anos o emprego do doador tricloroacetimidato cresceu cerca de cinco vezes e algumas vantagens podem ser citadas para justificar o interesse desse doador no trabalho: (i) alto rendimento em sua síntese (80 a 90 %), (ii) alto rendimento em reações de glicosilação e (iii) ativação por ácido de Lewis (como promotor) mesmo em baixas temperaturas, fazendo com que esse doador seja uma boa escolha quando o acceptor glicosídico for instável em condições ácidas ou mesmo à temperatura ambiente^{72,73}. Conseqüentemente o doador de galactose escolhido foi tricloroacetimidato.

A primeira parte do trabalho consistiu na preparação do monossacarídeo doador de galactose **3** em três etapas (Esquema 3).

Esquema 3 - Etapas da síntese do monossacarídeo doador de galactose **3**

A síntese foi iniciada com a per-*O*-acetilação do açúcar D-(+)-galactose em anidrido acético e iodo para obtenção de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D-galactopiranosose⁴⁸ (**1**).

Reações de acetilação são realizadas na presença de vários tipos de catalisadores, dentre os mais comuns temos piridina, acetato de sódio e iodo. Apesar de piridina ser o catalisador mais usado, este apresenta alta toxicidade, odor desagradável e é utilizado em grande quantidade (uma vez que também é o solvente da reação)⁴⁸.

Por outro lado, a reação pode ser realizada na presença de iodo, que é utilizado em quantidade catalítica, barato, fácil de manusear e capaz de polarizar os grupos carbonílicos de anidrido acético promovendo acetilação do açúcar; como mostra o mecanismo proposto no esquema 4⁴⁸.

Esquema 4 - Mecanismo proposto para per-*O*-acetilação de D-(+)-galactose

O procedimento levou à preparação do composto **1** com rendimento de 99 %, dentro do esperado. A estrutura foi confirmada por RMN ^1H , que indicou 5 singletos integrando para 15 hidrogênios na região 2 ppm, característico de CH_3 do grupo acetil.

Na sequência, **1** foi tratado com hidrazina monohidratada e ácido acético para remoção seletiva do grupo acetil da posição anomérica fornecendo o composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosose⁴⁹ (**2**). O rendimento dessa etapa foi considerado moderado (53 %) tendo em vista os resultados apresentados pela literatura (80 %)⁵⁰.

A fim de aumentar o rendimento dessa etapa, foi empregado acetato de hidrazina comercial⁵⁰, ao invés de gerá-lo como havia sido feito nas primeiras reações. O resultado foi satisfatório uma vez que o rendimento obtido foi elevado para 70 %.

Algumas evidências sugerem que o grupo amino livre do acetato de hidrazina atue como nucleófilo e ataque o carbono carbonílico do grupo acetil da posição anomérica para formar o composto **2** (Esquema 5) e gerar também diacetato de hidrazina.

A estrutura foi confirmada por RMN ^1H , que indicou 4 singletos integrando para 12 hidrogênios na região 2 ppm. Adicionalmente, o espectro na região do infravermelho (Anexo 1) apresentou uma banda em 3485 cm^{-1} , característica do grupo hidroxila presente no composto **2**.

Esquema 5 - Mecanismo proposto para desproteção da posição anomérica do produto **1**

A última etapa dessa rota envolveu ativação da posição anomérica com um bom grupo abandonador. A reação do grupo hidroxila da posição anomérica (catalisada por base) com nitrilas elétron-deficientes, como tricloroacetonnitrilas e trifluoroacetonnitrilas, é um método muito conveniente para introduzir acetimidato como grupo abandonador.

Dependendo da força da base utilizada na reação de tricloroacetimidização é possível obter tanto anômero α quanto o β do tricloroacetimidato. Portanto, a formação preferencial de um dos isômeros durante a reação de formação do doador glicosídico pode ser conseguida através da seleção da base mais adequada, bem como da temperatura^{72,75}.

É importante ressaltar que a configuração anomérica do doador funcionalizado com tricloroacetimidato é crucial para o controle estereoquímico durante a formação da ligação glicosídica, isto é, a síntese do doador **3** com o grupo abandonador em posição α permitirá que a ligação glicosídica com oceptor **6** ou **9** seja na posição β , fator importante para reconhecimento da enzima *trans*-sialidase e transferência de ácido siálico para galactose em futuros ensaios biológicos.

Sendo assim, o procedimento escolhido⁵⁰ levou à obtenção apenas do produto termodinamicamente mais estável 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (**3**) com rendimento de 80 %, apesar das primeiras reações terem apresentado rendimentos em torno de 50 %. Esse aumento de rendimento pode ser justificado

pela redução considerável do número de equivalentes de tricloroacetonitrila e de DBU, de acordo com novo protocolo empregado⁵⁰.

O espectro de RMN ^1H (Anexo 2) apresentou um singlete em 8,65 ppm que corresponde ao sinal do imidato (NH) e um dubleto em 6,61 ppm que corresponde ao H-1 ($J_{1,2}$ 3,5 Hz). Como não foi observado H-1 na posição axial a estrutura foi confirmada como 100 % α .

Em relação ao mecanismo dessa reação, acredita-se que DBU (base muito forte) retire o próton da hidroxila anomérica para formar o alcóxido, facilitando o ataque ao reagente tricloroacetonitrila, como indicado no esquema 6.

Esquema 6 - Mecanismo proposto para síntese do produto 3 a partir do produto 2

Todos os compostos dessa rota foram caracterizados por RMN ^1H . Os dados de ressonância também foram comparados com os da literatura. Igualmente, a proporção entre os isômeros α e β foi dada com base na integral relativa dos sinais dos hidrogênios ligados à posição anomérica e não foi necessário separá-los após cada uma das etapas.

4.2 Síntese dos aceptores de galactose

Os monossacarídeos 2-acetamino-2-desóxi-D-glicosídeos são componentes majoritários de muitos oligossacarídeos naturais com relevante atividade biológica. Também são importantes constituintes de vários glicoconjugados e freqüentemente encontram-se ligados a outras moléculas em posição β ⁷⁶.

Outrossim, são fragmentos importantes da classe de peptídeoglicanas e mucoproteínas, são determinantes de grupos sangüíneos, estão presentes em substratos naturais de *trans*-sialidase de *T. cruzi* e têm sido relacionados com modulação da função e atividade de proteínas no interior das células em processos de transcrição⁷⁷.

O desenvolvimento de eficientes métodos para síntese de oligossacarídeos que contenham 2-acetamino-2-desóxi-D-glicosídeos é atualmente um dos mais importantes objetivos em síntese de carboidratos⁷⁸. O maior obstáculo em sintetizar oligossacarídeos, bem como glicoconjugados contendo 2-amino-2-desóxi-D-glicosídeos, está na dificuldade de preparar açucres com grupo 2-amino, estruturalmente diversos, que apresentem alta estereosseletividade durante reações de glicosilação⁷⁹. Reações de glicosilação que envolvem a posição anomérica de 2-amino-D-glicosídeos podem gerar ligações glicosídicas tanto na posição α como β . Enquanto existem várias estratégias para síntese de 2-amino-D-glicosídeos “ β -linked,” a síntese de 2-amino-D-glicosídeos “ α -linked” limita-se quase que exclusivamente ao emprego de doador 2-azido-glicosídeo, e mais recentemente, de doador oxazolidinona⁸⁰.

O fator determinante para a estereosseletividade dessas reações é se o grupo ligado ao carbono 2 do anel participa ou não da estabilização do carbono anomérico com a saída do grupo abandonador. A influência desses grupos no controle da estereosseletividade α/β das reações de glicosilação pode ser representada pelo esquema 7.

Esquema 7 - Importância do grupo ligado a C-2 na estereosseletividade da glicosilação

A estratégia de modificação molecular adotada na preparação de compostos ligados preferencialmente em posição β envolve a introdução, em R, de um grupo sacador de elétrons (CCl₃ do grupo troc, por exemplo) suficientemente forte para diminuir a nucleofilicidade do oxigênio da carbonila. Se houver um grupo sacador em R deve ocorrer apenas estabilização do carbono anomérico (A) pela face α, favorecendo o ataque do nucleófilo pela face β (B). Caso não haja grupo sacador em R (CH₃), ocorre ataque no carbono anomérico (pela face α) para formação indesejada de **oxazolina**, composto estável que dificilmente é convertido no produto.

A síntese de compostos ligados majoritariamente em posição α envolve a modificação do grupo amino em azido (C) ou mesmo o distanciamento da carbonila em relação ao carbono anomérico (oxazolidinona). Em ambos os casos não há participação do grupo ligado ao C-2 na estabilização do carbono anomérico, portanto, o ataque nucleófilico ocorrerá preferencialmente pela face α (D e E). No caso da oxazolidinona a formação da ligação α é

praticamente 100 %⁸⁰, porém sua síntese é mais complexa do que o 2-azido-glicosídeo. Logo, o método adotado diz respeito ao grupo azido.

Em química orgânica, principalmente em química de carboidratos, o efeito anomérico pode ser entendido como um efeito estereoeletrônico que descreve a tendência de um substituinte, adjacente ao heteroátomo do anel tetrahidropirano, preferir orientação axial ao invés da equatorial (que é a menos impedida do ponto de vista estérico e por isso é a orientação esperada).

Algumas explicações foram propostas para o efeito anomérico desde sua observação em 1955 (J. T. Edward). A explicação mais simples refere-se ao fato de que a existência de dipolos alinhados envolvendo os heteroátomos cause repulsão entre eles, no caso do substituinte estar na posição equatorial. Em contra partida, os dipolos ficam opostos no caso do substituinte estar na posição axial (não existindo tão grande repulsão entre eles), representando um sistema energeticamente mais estável (Esquema 8)^{81,82}.

Esquema 8 - Representação dos dipolos alinhados e opostos influenciando as posições β e α

Uma explicação alternativa e bastante aceita é a de que exista estabilização eletrônica (hiperconjugação) entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio do anel pirano e o orbital sigma antiligante da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons estiver em posição sinperiplanar ao LUMO (Orbital molecular de mais baixa energia ocupado) da ligação axial (Esquema 9)^{81,82}. É importante ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente.

Esquema 9 - Influência dos elétrons do oxigênio no orbital antiligante da ligação axial

Conforme mencionado anteriormente, os tioglicosídeos estão entre os doadores mais comuns. Aproximadamente 50 % de todos os doadores usados em síntese de carboidratos no ano 2000 foram tioglicosídeos. Esse dado pode ser explicado por serem doadores bastante estáveis (comparado com haletos e tricloroacetimidatos) e por serem ativados em condições específicas^{72,73}.

Tioglicosídeos são muito usados também como estratégia sintética porque funcionam como grupo protetor ortogonal da posição anomérica, no caso de reações que participam como aceptores. Significa dizer que reagirão apenas em condições reacionais bem específicas, como por exemplo, na presença de reagentes tiofílicos⁷³. Sendo assim, as demais posições da molécula podem sofrer proteção ou desproteção sem interferência no carbono anomérico. Logo, houve grande interesse em trabalhar com essa classe de compostos.

Outros dois pontos importantes referem-se à funcionalização da posição anomérica, uma vez que o composto final dessa rota também deve ser doador glicosídico, e à proteção seletiva das hidroxilas ligadas a C-4 e C-6 para que apenas a hidroxila ligada a C-3 esteja livre para a ligação com o doador de galactose **3**.

De acordo com a literatura, um grande número de acetais aromáticos (benzaldeído dimetil acetal, 2-nitro benzaldeído dimetil acetal, benzofenona etc) tem sido usado como grupos protetores em síntese. Esses grupos podem ser facilmente introduzidos sob condições ácidas brandas e da mesma forma podem ser clivados para fornecer o correspondente diol. Além disso, sob condições oxidativas ou redutivas fornecem o composto monoprotetido⁸³.

Dessa forma, o trabalho foi desenvolvido no sentido de sintetizar, partindo de D-glicosamina, um composto que fosse aceptor (de galactose) e doador (de dissacarídeo, na reação com aminoácidos) simultaneamente; logo essa rota exigiu uma estratégia sintética mais elaborada, envolvendo maior número de etapas.

A seguir estão representadas as etapas dessa segunda rota do trabalho; que se refere à síntese de um aceptor-doador com grupo azido (Esquema 10) e outro aceptor-doador com grupo troc (Esquema 11) em C-2.

Esquema 10 - Etapas da síntese do aceptor com N_3 em C-2 (composto 6)

Esquema 11 - Etapas da síntese do aceptor com troc em C-2 (composto 9)

4.2.1 Aceptor com N₃ em C-2

Visando primeiramente à geração de aminoácidos α -glicosilados a rota se iniciou com “proteção” do grupo amino do material de partida com grupo azido, que é um grupo protetor não-participante bastante explorado, porém o mecanismo de diazotransferência é atualmente desconhecido. Fischer e Anselme propuseram a existência de um tetrazeno dianiônico estabilizado por dois íons de sódio. Extrapolando esse mecanismo proposto para um outro com íon bivalente (cobre) tem-se o mecanismo sugerido no esquema 12⁸⁴.

Esquema 12 - Mecanismo provável de conversão do grupo amino em azido

A reação se inicia com a geração do reagente triflato de azida (TfN_3) a partir de azida de sódio e anidrido trifílico. Com sua adição ao cloridrato de 2-amino-2-desóxi-D-glicose, previamente neutralizado com carbonato de potássio e ligado ao catalisador sulfato de cobre II (A), ocorre ataque do nitrogênio do açúcar a um dos nitrogênios do triflato formando um complexo (B). A subsequente desprotonação leva à formação do tetrazeno estabilizado pelo cobre (C). A sua quebra, via uma cicloadição bipolar reversa, deve formar o imino complexo de cobre-trifilil (D) e o produto com grupo azido (E)⁸⁴.

Na sequência, o composto (sem purificação e análise espectrométrica prévia) foi per-*O*-acetilado em presença de anidrido acético e piridina. Semelhantemente ao iodo a piridina atua como catalisador, porém sua capacidade nucleofílica permite seu ataque ao anidrido acético levando à formação de um intermediário mais suscetível ao ataque do açúcar para ligação do acetil. A piridina também auxilia na captura dos prótons liberados no meio reacional, impedindo que o grupo acetil do açúcar seja clivado. O mecanismo dessa reação pode ser visualizado no esquema 13.

Esquema 13 - Mecanismo proposto para per-*O*-acetilação em presença de piridina para síntese do produto **4**

Sendo assim, a primeira e segunda etapas dessa rota resultaram na síntese de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-D-glicopirranose (**4**)⁵¹⁻⁵⁴. Na primeira tentativa o rendimento final foi de 65 % (escala de teste), próximo do encontrado na literatura (72 %)⁴⁵. Num segundo momento, com aumento da escala, o rendimento foi de 9 %.

Analizando o método empregado, chegou-se à conclusão de que o ponto crucial era a adição do anidrido trifílico à solução de azida de sódio, para a geração do reagente triflato de azida. Portanto, o problema foi contornado adicionando lentamente o anidrido com funil de adição durante 10 minutos. Numa terceira tentativa o produto **4** foi obtido com 89 % de rendimento.

Frente às vantagens apresentadas pelos tioglicosídeos, o composto fenil 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**5**) foi sintetizado a partir de **4** em presença de tiofenol (PhSH) e trifluorboroeterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)⁵⁵⁻⁵⁷. No que diz respeito ao mecanismo, acredita-se que a saída do grupo *O*-acetil catalisada pelo ácido de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) promova a formação do íon oxocarbênio, que deve ser atacado pelo tiofenol (nucleófilo) na posição axial, preferencialmente. Por conseguinte, essa reação deve ocorrer via mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$ (Esquema 14).

Esquema 14 - Mecanismo proposto para reação do composto **4** com tiofenol e BF_3 eterato para síntese do produto **5**

O maior rendimento obtido foi de 69 % (depois de algumas tentativas); o que pode ser considerado adequado uma vez que o rendimento para esse tipo de reação está em torno de 80 %, de acordo com a literatura⁵⁶. O espectro de RMN ^1H apresentou um multiplete na região de 7 ppm que corresponde aos 5 hidrogênios do anel aromático, confirmando assim a estrutura.

A fim de fazer com que o composto **5** apresentasse também função deceptor glicosídico, permitindo que apenas a hidroxila ligada a C-3 permaneça livre, foi necessário promover total *O*-desacetilação com metanol e sódio metálico⁵⁵ (quantidade catalítica) para gerar o produto com as três hidroxilas livres (Esquema 15). Essa reação (catálise básica) foi

facilmente acompanhada por CCD; quando se observou o consumo total do material de partida (**5**) a reação foi interrompida e não foi necessária purificação para próxima etapa.

Posteriormente, o procedimento adotado para proteção seletiva das hidroxilas ligadas a C-4 e C-6 (benzaldeído dimetil acetal^{58,59}) levou à formação do produto desejado 2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**6**) com rendimento de 33 %. Esse resultado foi obtido apenas na primeira tentativa (escala de teste - 86 mg).

Nessa última etapa, não era esperado rendimento tão baixo, dado que é uma reação clássica e a literatura apresenta rendimentos em torno de 80 %. Analisando o mecanismo da reação (Esquema 15) pode-se perceber que o ácido *p*-toluenossulfônico promove catálise ácida tanto para formação do produto desejado como para sua clivagem (reação reversível). Nesse caso, o ácido deve ter sido adicionado em excesso, o que acarretaria clivagem do produto formado (**6**) em presença de resquícios de metanol e/ou água.

Esquema 15 - Mecanismo proposto para reação com benzaldeído dimetil acetal para síntese do produto **6**

Entretanto, o problema foi contornado refazendo-se o protocolo empregado, isto é, buscando-se na literatura a quantidade de ácido que realmente deveria ser adicionada (0,05 equivalentes), bem como a de benzaldeído dimetil acetal (5 equivalentes ao invés de 3) e o volume ideal de acetonitrila (10 mL por grama de açúcar). O rendimento obtido com o novo

protocolo foi de 72 %. A estrutura foi confirmada por RMN ^1H (Anexo 3), que apresentou um singlete correspondente ao *CH* benzílico em 5,56 ppm e 10 hidrogênios aromáticos na região de 7 ppm.

4.2.2 Aceptor com troc em C-2

Uma abordagem que também foi explorada no trabalho diz respeito ao emprego do grupo tricloroetóxicarbonil (troc) como protetor do grupo amino para síntese seletiva de aminoácidos β -glicosilados. Além de *N*-troc, os grupos protetores mais usados são *N*-phthalimida (Phth), *N*-ditiasuccinoil (Dts), *N*-alilóxicarbonil (Aloc), *N*-tetracloroftaloil (TCP), *N,N*-diacetil⁵⁶.

No entanto, o grupo *N*-troc apresenta algumas vantagens em relação aos demais citados acima: sua participação como grupo vizinho conduz preferencialmente à formação de β -glicosídeos; impede a formação do derivado oxazolina estável durante a reação de glicosilação, uma vez que é um forte sacador de elétrons e, portanto, incapaz de realizar um ataque nucleofílico ao átomo de carbono anomérico; pode ser removido facilmente em condições brandas para ser convertido diretamente no derivado *N*-acetil por tratamento com zinco em anidrido acético⁵⁶.

A primeira e segunda etapas da rota com grupo troc foram iniciadas com tratamento do material de partida comercial (cloridrato de 2-amino-2-desóxi-D-glicose) com cloroformiato de 2,2,2-tricloroetila (trocCl)⁶⁰ e anidrido acético, como mostrado no esquema 16.

Esquema 16 - Mecanismo proposto para proteção do grupo 2-amino do reagente comercial com trocCl para síntese do produto **7**

O tratamento do açúcar comercial com trocCl, previamente neutralizado com bicarbonato de sódio, possibilitou ataque do grupo amino à carbonila formando o composto *N*-protegido. A posterior per-*O*-acetilação desse composto levou ao produto desejado 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desóxi-2-(2,2,2-tricloroetóxicarbonilamino)-D-glicopiranosídeo (**7**).

O rendimento dessas duas etapas foi considerado bom (79 %) e a estrutura foi confirmada por RMN ^1H pela presença dos 2 hidrogênios (CH_2) do grupo troc em 4,73 ppm e dos 12 hidrogênios correspondentes ao grupo acetil na região de 2 ppm.

Na seqüência, usando o mesmo procedimento descrito para o derivado azido, foi possível sintetizar nessa terceira etapa o composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desóxi-2-(2,2,2-tricloroetóxicarbonilamino)-1-tio- β -D-glicopiranosídeo de fenila (**8**)^{55,56}. O mecanismo proposto para essa etapa deve ser entendido como aquele descrito para etapa com azido. No entanto, com a presença do grupo participante (troc) ligado ao carbono 2 o íon oxocarbênio deve ser estabilizado pela carbonila na face α , favorecendo o ataque do nucleófilo (tiofenol) pela face β (Esquema 17).

Esquema 17 - Mecanismo proposto para reação com tiofenol e BF_3 eterato para síntese do produto **8**

O melhor rendimento obtido nessa etapa foi de 86 %, porém com o aumento de escala o rendimento caiu para 37 %. A explicação para essa grande redução de rendimento pode estar na modificação do protocolo, uma vez que a quantidade de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ foi alterada (1,3 equivalente para 4 equivalentes). A mudança foi realizada em função do alto rendimento obtido na reação com o grupo azido, porém o mesmo resultado não foi observado no caso do grupo troc.

O espectro de RMN ^1H do composto **8** apresentou um multipletto na região de 7 ppm que corresponde aos 5 hidrogênios do anel aromático e um dubleto em 5,59 ppm que corresponde ao H-1 ($J_{1,2}$ 9,1 Hz). A ausência de H-1 na posição equatorial confirmou a estrutura como 100 % β .

A quarta e quinta etapa dessa rota estão relacionadas ao tratamento do composto **8** com metóxido de sódio, para total *O*-desacetilação⁵⁵, e subsequente proteção das hidroxilas das posições 4 e 6 com benzaldeído dimetil acetal^{58,59}.

No entanto, de acordo com o espectro de RMN ^1H da substância isolada da reação, não foram observados os sinais característicos do CH_2 do grupo troc na região de 4,7 ppm bem como o aparecimento de 2 singletos (com integral de três hidrogênios cada) nas regiões de 3,63 e 3,39 ppm.

A ausência desses dois hidrogênios pode ser interpretada pelo possível ataque nucleofílico do metóxido à carbonila do grupo troc, o que adicionaria um grupo metoxila na molécula (provavelmente o singlete em 3,39 ppm) e eliminaria parte do grupo protetor.

Essa hipótese foi confirmada repetindo a reação com metóxido de sódio para obtenção do produto **8.1** (Esquema 18), o qual foi analisado por espectrometria de massas de alta resolução (modo positivo) antes da reação de proteção com benzaldeído dimetil acetal (ESI-TOF calculado para $C_{14}H_{19}NO_6S$ [$M + Na^+$]: 352,0933; encontrado: 352,0781) (Anexo 4).

Esquema 18 - Clivagem do grupo troc com emprego de metóxido de sódio

O outro singlete em 3,63 ppm pode ser do grupo metoxila da reação de proteção com benzaldeído dimetil acetal [$PhCH(OMe)_2$], partindo do princípio que apenas uma das hidroxilas do produto **8.1** fosse protegida durante a reação, restando um grupo metoxila do reagente.

A busca na literatura⁵⁶ mostrou que uma maneira de contornar o problema de clivagem do grupo troc seria a mudança dos reagentes. Nesse caso, a *O*-desacetilação do composto **8** poderia ser realizada por catálise ácida (HCl e dioxano)⁵⁶. Apesar da literatura não trazer um protocolo definido, optou-se por realizar essa reação com metanol ao invés de dioxano.

Essa quarta etapa foi facilmente acompanhada por CCD. A reação foi neutralizada (interrompida) com resina básica (Dowex[®]) após 24 horas, quando não foi observado material de partida (**8**). De acordo com os dados do espectro de massas (ESI-TOF calculado para $C_{15}H_{18}Cl_3NO_6S$ [$M + Na^+$]: 470,0105; encontrado: 469,9695) (Anexo 5) pode-se dizer que a catálise ácida ocorreu sem clivar o grupo troc, formando o produto **8.2** (Esquema 19).

Esquema 19 - *O*-desacetilação do produto **8** para síntese do produto **8.2**

Sem qualquer purificação para próxima etapa, o composto **8.2** foi submetido às mesmas condições (do melhor protocolo) de síntese do composto **6**, ou seja, em presença de benzaldeído dimetil acetal e ácido *p*-toluenossulfônico, mas o resultado também não foi satisfatório.

Após purificação por CCP o produto foi analisado previamente por espectrometria de massas. O espectro não apresentou nenhum pico característico do íon quase-molecular, ou do aduto, correspondente à massa do composto esperado $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{NO}_6\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 556,0233. Num primeiro momento, pode-se dizer que o método de proteção do composto **8.1** deve ser revisto, no sentido de se obter um resultado satisfatório na última etapa dessa rota.

Uma outra forma de solucionar o problema seria a mudança na estratégia de síntese do bloco de construção, isto é, fazer a reação de glicosilação de **8** com um dos aminoácidos aceptores, clivar o grupo troc e convertê-lo no derivado *N*-acetil para proceder a *O*-desacetilação e subsequente proteção com benzaldeído dimetil acetal. No entanto, isso despenderia tempo ainda maior.

4.3 Síntese dos blocos de construção

4.3.1 Síntese dos dissacarídeos

A terceira, e última, rota do trabalho refere-se à preparação dos blocos de construção. Uma vez sintetizados o doador (**3**) e pelo menos um acceptor-doador (**6**), o próximo passo foi

buscar na literatura^{61,62} métodos que permitissem a síntese do dissacarídeo desejado (**11**) de forma satisfatória.

É importante destacar que o alto rendimento e estereosseletividade das reações de glicosilação dependem do doador glicosídico e dos reagentes promotores da reação, tais como: trimetilsilil triflato (TMSOTf)⁶¹, ácido triflico (TfOH)⁶², trifluorboroeterato (BF₃.Et₂O)⁶², triflato de prata (AgOTf)⁸⁵, dimetilmetiltiosulfoniltriflato (DMTST)⁷¹, brometo de mercúrio (HgBr₂)³⁷ e iodo⁶⁹.

De acordo com a literatura^{72,73}, os promotores (ácidos de Lewis) mais empregados em reações de glicosilação cujos doadores glicosídicos são tricloroacetimidatos são: trimetilsilil triflato e trifluorboroeterato em quantidades catalíticas. O solvente mais usado é diclorometano e a temperatura utilizada normalmente é abaixo de zero, mas pode variar de -78 °C à temperatura ambiente.

A primeira tentativa de acoplamento entre **3** e **6** levou à formação do composto 6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-4-hidróxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-1-tio-α-D-glicopiranosídeo de fenila (**10**) (Esquema 20). Sua estrutura foi elucidada por RMN ¹H; que indicou a presença do hidrogênio (H-1') da galactose (dubleto em 4,65 ppm) ligada na posição β (*J*_{1',2'} 8,1 Hz), apenas 5 hidrogênios na região do aromático e 5 singletos (15 hidrogênios) na região de 2 ppm. A estrutura foi confirmada por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para C₂₈H₃₅N₃O₁₄S [M + Na⁺]: 692,1732; encontrado: 692,1868) (Anexo 6).

Esquema 20 - Clivagem do grupo protetor benzilideno na tentativa de síntese do dissacarídeo desejado (**11**) a partir dos compostos **3** e **6**.

Mediante os dados do espectro de **10**, foi possível entender que houve clivagem do grupo protetor benzilideno com subsequente transesterificação. Apesar do resultado inesperado, existe citação de um resultado semelhante na literatura⁶¹, ou seja, formação de um dissacarídeo (diferente do proposto no presente trabalho) com 54 % de rendimento e transesterificação do próprio acceptor glicosídico.

Uma possível solução para a manter o grupo benzilideno inalterado foi reduzir a quantidade do promotor de 0,35 equivalente para 0,05 equivalente, que ainda foi diluído em DCM antes de ser adicionado. Outro parâmetro alterado foi a temperatura, aumentada de -30 °C para 0 °C.

Dessa forma, as alterações permitiram a síntese do composto 2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**11**) com rendimento de 93 %. A análise feita por RMN ¹H indicou a presença do hidrogênio (H-1') da galactose (dubleto em 4,77 ppm) ligada na posição β ($J_{1',2'}$ 8,0 Hz), 10 hidrogênios na região do aromático, 4 singletos (12 hidrogênios) referentes ao CH₃ do grupo acetil na região de 2 ppm e um singlete correspondente ao CH benzílico em 5,54 ppm.

A estrutura foi confirmada por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para C₃₃H₃₇N₃O₁₃S [M + Na⁺]: 738,1939; encontrado: 738,1949) (Anexo 7). Adicionalmente, a análise do composto **11** por espectrometria na região do infravermelho apresentou uma banda intensa em 2114 cm⁻¹ (Anexo 8), permitindo afirmar que o grupo azido permaneceu inalterado após várias reações.

No que diz respeito ao mecanismo dessa reação, acredita-se que o promotor TMSOTf (ácido de Lewis) facilite a saída do grupo abandonador do doador **3** no momento em que o nucleófilo (hidroxila do acceptor **6**) ataca sua posição anomérica, como indicado no esquema 21.

Esquema 21 - Mecanismo provável para reação de glicosilação entre **3** e **6** para síntese do dissacarídeo **11**

Segundo o mecanismo acima foi possível entender a razão do composto **10** ter sido obtido em tentativas anteriores. A explicação provável está na clivagem dos grupos benzilideno (acceptor) e acetil (doador) pela influência de ácido trifluorometanosulfônico (ácido trifílico), liberado durante a reação, e subsequente acetilação, visto que as hidroxilas 3 e 6 ficam livres. Lembrando também que as condições empregadas na primeira reação de glicosilação favoreceram o resultado obtido, isto é, o doador **3** foi adicionado em excesso (0,5 equivalente) e o promotor estava em quantidade superior à catalítica, situação que deve ter promovido grande liberação de ácido trifílico.

Num primeiro momento esse resultado pareceu insatisfatório, todavia a total *O*-desacetilação de **10** forneceu o produto 2-azido-2-desóxi-3-*O*-(β -D-galactopiranosil)-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de fenila (**12**) com rendimento de 62 % (Esquema 22). Sua estrutura foi confirmada apenas por espectrometria de massas até o momento (ESI-TOF calculado para $C_{18}H_{25}N_3O_9S$ [$M + Na^+$]: 482,1203; encontrado: 482,1181) (Anexo 9).

Esquema 22 - Total *O*-desacetilação de **10** para obtenção do composto **12**

Com esse resultado será possível realizar ensaios enzimáticos⁸⁶ com *trans*-Sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) dado que a enzima catalisa a transferência de ácido siálico a partir de substratos doadores como fetuína (glicoproteína sérica fetal) para aceptores contendo unidades de β -D-galactose. Por isso, o ensaio do composto **12** seria interessante para obtenção de alguns resultados preliminares, como por exemplo, o rendimento da reação de sialilação.

4.3.2 Síntese dos aminoácidos aceptores dos dissacarídeos

Os açúcares presentes em glicoproteínas, geralmente na forma de oligossacarídeo, estão ligados covalentemente às proteínas via ligação *O* ou *N*-glicosídica. Os aminoácidos de serina e treonina com grupo hidroxila livre podem participar de reações com açúcares fornecendo derivados *O*-glicosídicos⁸⁷.

Essas reações de glicosilação exigem o emprego de aminoácidos adequadamente protegidos em ambas posições reativas (grupo amino básico e ácido carboxílico). Aminoácidos protegidos na forma de carbamato, como *N*-Boc (*N*-terc-butóxicarbonílico) ou *N*-Fmoc (*N*-Fluorenilmetoxicarbonílico), podem ser adquiridos comercialmente e empregados diretamente na preparação dos blocos de construção glicosídicos. A proteção do grupo amino exclui a possibilidade de reações indesejadas, como formação de produtos *N*-glicosídicos.

O uso freqüente desses grupos protetores em síntese de peptídeos é devido à facilidade de preparação e remoção seletiva em condições suficientemente brandas, preservando assim a complexidade estrutural da molécula⁸⁸.

Os grupos protetores apresentam propriedades distintas e devem ser escolhidos de acordo com a estratégia sintética. Sendo assim, o grupo protetor de escolha para o presente trabalho foi Fmoc uma vez que possui alta estabilidade em meio ácido e quebra seletiva em meio básico, além de se mostrar mais conveniente na síntese em fase sólida.

Reações de glicosilação envolvendo aminoácidos com grupo carboxílico livre podem ser realizadas, porém há dificuldade quanto à solubilização dos reagentes e à purificação dos produtos glicosilados. Dessa forma, os derivados de serina e treonina (*N*-Fmoc protegidos) foram preparados⁶⁴ por benzilação clássica (Esquema 23) para serem empregados como aceptores dos dissacarídeos.

Com a adição de carbonato de cério foi possível neutralizar os íons H^+ e gerar também o carboxilato, que atua como nucleófilo atacando o brometo de benzila. Sendo assim, os aceptores **13** (Anexo 10) e **14** foram obtidos na forma de sólido com rendimento de 78 % e 60 % (respectivamente); o que pode ser considerado satisfatório.

Esquema 23 - Mecanismo provável de benzilação dos aminoácidos comerciais *N*-Fmoc protegidos

4.3.3 Acoplamento do dissacarídeo aos aminoácidos aceptores

Uma vez sintetizados o dissacarídeo **11** e os aminoácidos **13** e **14** foi possível dar início ao estudo dos métodos para o acoplamento desses compostos a fim de formar blocos de construção, que após uma sequência de reações de desproteção poderiam ser testados com a

enzima *trans*-sialidase para investigação da natureza das interações moleculares críticas envolvidas no reconhecimento e processamento desses glicosídeos.

Conforme citado anteriormente, compostos que contêm enxofre na posição anomérica (tioglicosídeos) também são empregados como doadores glicosídicos. Significa dizer que esses compostos devem reagir apenas em condições bem específicas, ou seja, na presença de reagentes tiofílicos.

Os primeiros reagentes (promotores) descritos na ativação dos tioglicosídeos foram: perclorato de iodônio dicolidina (IDCP)⁸⁹, tris (4-bromofenil) amino hexacloroantimoniato (BAHA)⁹⁰, *N*-iodosuccinimida / triflato de prata (NIS/AgOTf)⁹¹, e NIS/TfOH⁶⁵ ou NIS/TMSOTf⁶⁵. No entanto, outros reagentes também foram testados nos últimos anos, tais como: NIS/HClO₄⁹² e Difenilsulfóxido / anidrido trifílico (Ph₂SO/ Tf₂O)⁹³.

De uma maneira geral, os tioglicosídeos podem ser ativados a partir de espécies positivas (íon iodônio) que são geradas no meio reacional por esses promotores⁷². Considerando os reagentes NIS/TfOH, é possível entender como isso ocorre (Esquema 24).

Esquema 24 - Mecanismo provável de ativação de tioglicosídeos

Levando em consideração o esquema acima, a reação parece ocorrer no sentido de gerar um íon intermediário denominado iodôniotriflato (B), que é mais eletrofílico quando comparado

com NIS (A). Essa espécie bastante reativa ataca o tioglicosídeo (C) formando o íon oxocarbênio (D), que pode ser atacado por um nucleófilo para formar a ligação glicosídica⁶⁵.

Portanto, a etapa de acoplamento foi realizada seguindo essa estratégia de síntese. Apesar da reação de acoplamento do dissacarídeo **11** aos aminoácidos aceptores não estar descrita na literatura, as primeiras reações foram realizadas utilizando-se os reagentes mais empregados, isto é, NIS/TfOH em diclorometano anidro sob nitrogênio.

Os resultados iniciais não levaram à formação do bloco de construção desejado, mas sim à clivagem do grupo benzilideno formando o composto 2-azido-2-desóxi-4,6-hidróxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**15**) (Esquema 25), cuja estrutura foi analisada por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para $C_{26}H_{33}N_3O_{13}S$ $[M + Na^+]$: 650,1626; encontrado: 650,1596) (Anexo 11).

Esquema 25 - Resultado obtido nas primeiras reações de acoplamento do composto **11** com o aminoácido **13**

Uma possível alternativa para impedir essa clivagem foi reduzir a quantidade de ácido trifílico de 0,2 equivalente para 0,05 equivalente e diluí-lo em DCM para ser adicionado. Outro parâmetro também alterado foi a temperatura, que passou de 0 °C para -50 °C. Apesar dessas alterações, o acompanhamento das reações por CCD demonstrou consumo total do material de partida **11** e formação do composto **15** com uma hora de reação.

Com intuito de explorar o mesmo método de acoplamento, uma alternativa sintética encontrada para contornar esse problema foi a clivagem do grupo benzilideno (formação do composto **15**) e subsequente acetilação das hidroxilas 4 e 6 com piridina e anidrido acético

(Esquema 26)⁶³. O resultado desse acréscimo de duas etapas à rota foi satisfatório, uma vez que o composto 4,6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**16**) foi obtido com rendimento de 91 %.

A análise feita por RMN ¹H indicou a presença dos 18 hidrogênios (singletos) referentes ao CH₃ do grupo acetil entre 2,18 a 1,96 ppm. A estrutura foi confirmada também por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para C₃₀H₃₇N₃O₁₅S [M + Na⁺]: 734,1837; encontrado: 734,1707) (Anexo 12).

Esquema 26 - Reação de clivagem e acetilação do composto **11** para formação do produto **16**

Uma vez contornado o problema de clivagem do grupo benzilideno, novas reações foram realizadas a fim de sintetizar o bloco de construção. Analisando o método empregado, chegou-se à conclusão de que o ponto crítico da reação é a geração do íon iodônio (I⁺) a partir de NIS e ácido trifílico. Uma maneira de minimizar novos resultados negativos foi reagir esses dois promotores separadamente, para depois adicionar o produto final (iodôniotriflato) ao sistema contendo o dissacarídeo **16** e o aminoácido aceptor **13** (Esquema 27).

Esquema 27 - Reação de acoplamento para obtenção do bloco de construção **17**

A reação foi facilmente acompanhada por CCD, através da qual foram observados o consumo total do material de partida (**16**) e a formação de vários compostos. O procedimento levou

à formação do produto éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina (**17**) (Esquema 27) com rendimento de 27 %. O isômero β e os outros compostos não foram isolados.

A análise do produto **17** por RMN ^1H indicou a presença de alguns sinais característicos, como: 18 hidrogênios referentes ao CH_3 do grupo acetil na região de 2 ppm, 9 hidrogênios referentes aos grupos Fmoc e benzil na região de 7,5 ppm, 2 hidrogênios benzílicos na região de 5,2 ppm, NH em 5,8 ppm e H-1 ($J_{1,2}$ 3,4 Hz) e H-1' ($J_{1',2'}$ 7,9 Hz) em 4,81 e 4,58 ppm, respectivamente. A estrutura foi confirmada por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{20}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 1041,3331; encontrado: 1041,3262) (Anexo 13).

A reação de acoplamento também foi realizada com o aminoácido acceptor **14**, nas mesmas condições anteriores. O procedimento levou à formação do produto éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi- α -D-glicopirano-sil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treorina (**18**) (Esquema 28) com rendimento de 13 %. Apesar do consumo total do dissacarídeo **16** durante a reação (observação por CCD), 45 % do aminoácido **14** foi recuperado após CCC.

O espectro de RMN ^1H do produto **18** indicou a presença de 3 hidrogênios referentes ao grupo CH_3 em 1,25 ppm, além dos demais hidrogênios (mesmo deslocamento e constante) do composto **17**. A estrutura também foi confirmada por espectrometria de massas (ESI-TOF calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{20}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 1055,3488; encontrado: 1055,3435) (Anexo 14).

Esquema 28 - Reação de acoplamento para obtenção do bloco de construção **18**

Em virtude do pouco tempo disponível para conclusão do trabalho, foi possível realizar apenas uma reação com cada aminoácido. Isso significa dizer que os baixos rendimentos para essas duas reações de acoplamento poderiam ter sido contornados modificando-se alguns parâmetros, como por exemplo, redução da temperatura e variação na quantidade do promotor (NIS) e do aminoácido, para que os produtos desejados **17** e **18** fossem obtidos com maior rendimento.

Uma possível forma de solucionar o problema do baixo rendimento também seria mudar a estratégia de síntese do bloco de construção, isto é, ativando a posição anomérica do dissacarídeo **11** com outro grupo abandonador (haletó⁹⁴ ou tricloroacetimidato⁵⁷) para acoplar os aminoácidos (Esquema 29).

Esquema 29 - Outras estratégias para síntese dos blocos de construção a partir de **11**

Frente a essas duas situações de ativação, optou-se pela reação do dissacarídeo **11** com bromo para obtenção do composto **19**, por ser realizada em apenas uma etapa. Através do acompanhamento por CCD após 30 minutos de reação, foram observados o consumo total do material de partida **11** e a formação de possíveis produtos de degradação na origem, os quais não foram separados para análise. A redução da temperatura, de 0 °C para -70 °C, não alterou o resultado observado anteriormente.

Provavelmente, de todos os métodos empregados, a estratégia mais promissora para acoplar os aminoácidos ao dissacarídeo tenha sido a de clivagem do grupo benzilideno do dissacarídeo **11** e subsequente acetilação do composto **15** para formação do produto **16**. É importante lembrar que o método (tricloroacetimidato) para síntese do composto **21** não foi empregado nesse trabalho.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Como mencionado ao longo do trabalho, a estratégia sintética escolhida para o desenvolvimento do trabalho foi representada por três rotas sintéticas: preparação do doador de galactose, preparação dos aceptores-doadores e dos blocos de construção.

O trabalho desenvolvido durante esse período permitiu a síntese do doador de galactose (**3**) em três etapas, do acceptor de galactose (**6**) em cinco etapas, do dissacarídeo (**11**), dos aminoácidos aceptores (**13** e **14**) e também dos blocos de construção (**17** e **18**).

Todos esses compostos foram preparados com bons rendimentos, uma vez que determinados problemas de algumas etapas foram resolvidos. Apenas a síntese do acceptor-doador com o grupo troc em C-2 (**9**) não foi possível de ser finalizada.

Apesar do problema da catálise básica ter sido contornado com catálise ácida na reação de *O*-desacetilação do composto **8**, a etapa de proteção do composto **8.2** com benzaldeído dimetil acetal para síntese de **9** não foi satisfatória. No entanto, após a síntese dos blocos de construção, percebeu-se que não foi necessário desenvolver uma outra rota (acceptor-doador com o grupo troc em C-2) para obter blocos β , uma vez que a reação de acoplamento com N_3 em C-2 resultou em mistura dos isômeros.

A interpretação dos espectros de RMN 1H foi dificultada em alguns momentos pela sobreposição dos sinais de mistura entre os isômeros α/β e pela própria complexidade estrutural dos dissacarídeos e dos blocos de construção. Todavia, foi possível confirmar a estrutura dessas substâncias com outras técnicas, como por exemplo, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de massas.

Dentro do tempo disponível, não foi possível atingir todos os objetivos propostos inicialmente, ou seja, a síntese dos quatro blocos totalmente desprotegidos para ensaios com a enzima *trans*-Sialidase de *Trypanosoma cruzi*. Os problemas sintéticos podem ser apontados

como os principais responsáveis para o atraso no cronograma, sobretudo na tentativa de síntese do composto **9**, na síntese do dissacarídeo **11** e dos blocos de construção **17** e **18**.

É válido ressaltar que apesar da extensa rota planejada, porém necessária, a síntese dos blocos de construção **17** e **18** é inédita. Portanto, pode-se concluir que o trabalho trouxe relevante contribuição no que diz respeito: i) à síntese e elucidação estrutural de novos compostos, ii) ao estabelecimento de alguns métodos (protocolos) que permitiram bons rendimentos e iii) à definição de uma estratégia sintética coerente frente aos inúmeros métodos encontrados na literatura.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PORCEL, B. M.; ASLUND, L.; PETTERSON, U.; ANDERSSON, B. *Trypanosoma cruzi*: A putative vacuolar ATP synthase subunit and a CAAX Prenyl protease-encoding gene, as examples of gene identification in genome projects. **Experimental Parasitology**, v.95, p.176-186, 2000.
2. COURA, J. R.; De CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.
3. (WHO, 2002) data obtained from <http://www.who.ch>
4. TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.222-265, 2007.
5. DO CAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, p.1157-1164, 2001.
6. MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.401-404, 1999.
7. DO CAMPO, R.; SCHMUÑIS, C. A. Sterol biosynthesis inhibitors: Potential chemotherapeutics against Chagas disease. **Parasitology Today**, v.13, p.127-128, 1997.
8. URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.39-48, 2003.

9. NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9a. edição, Ed. Atheneu, Belo Horizonte, 1995, p.82.
10. BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p.347-382, 1973.
11. BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review Microbiology**, v.49, p.175-200, 1995.
12. MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.9, p.553-557, 2002.
13. MUELAS, S.; SUÁREZ, M.; PÉREZ, R.; RODRIGUEZ, H.; OCHOA, C.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-tiadizin-2-thione derivatives agaisnt *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.269-272, 2002.
14. DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of chagas disease (*American Trypanosomiasis*) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.103-121, 1999.
15. WENDEL, S.; GONZAGA, A. L. Chaga's Disease and Blood Transfusion: a new world problem? **Vox Sanguinis**, v.64, p.1-12, 1993.
16. EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, p.409-415, 2005.
17. FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chaga's Disease. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59, supl.II, p.179-187, 1999.
18. HILLEBRAND, H.; SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.6809-6815, 2003.

-
19. KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COOMBS, G. H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. **Parasitology Today**, v.15, p.404-409, 1999.
20. HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S. R.; FIELD, A. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase towards NeuAc- α -2,3-Gal- β -O-PNP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.141-144, 2001.
21. PREVIATO, J. O.; JONES, C.; XAVIER, M. T.; WAIT, R.; PARODI, A. J.; PREVIATO, L. M. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.7241-7250, 1995.
22. STTOPANI, A. O. M. Quimioterapia de La Enfermedad de Chagas. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59 (Supl II), p.147-165, 1999.
23. PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 angstrom resolution. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters)**, v.520, p.13-17, 2002.
24. HUANG, L.; ELLMAN, J. A. General solid-phase method to prepare novel cyclic ketone inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.2993-2996, 2002.
25. RAMOS, A. M.; DUSCHAK, V. G.; GEREZ DE BURGOS, N. M.; BARBOZA, M.; REMEDI, M. S.; VIDES, M. A.; CHIABRANDO, G. A. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human α -2-macroglobulin and pregnancy zone protein. **Experimental Parasitology**, v.100, p.121-130, 2002.
26. GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes. **Biochimical et Biophysical Acta**, v.1587, p.249-257, 2002.

27. ZUCCOTTO, F.; BRUM, R.; PACANOWSKA, D. G.; PEREZ, L. M. R.; GILBERT, I. H. The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.1463-1468, 1999.
28. VENDEVILLE, S.; BOUREL, L.; DAVIOUD-CHARVET, E.; GRELLIER, P.; DEPREZ, B.; SHERGHERAERT, C. Uromated parallel synthesis of a tetrahydroisoquinolin-based library: potential prolyl endopeptidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.437-442, 1999.
29. RODRIGUES, C. O.; DUTRA, P. M. L.; BARROS, F. S.; SOUTO-PADRÓN, T.; MEYER-FERNANDES, J. R.; LOPES, A. H. C. S. Platelet-Activating factor induction of secreted phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.266, p.36-42, 1999.
30. COREY, W. T.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* Uses a 45-kDa Mucin for Adhesion to Mammalian Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.290, p.29-34, 2002.
31. PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA de ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p.1299-1307, 2000.
32. LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; GUILLEN, I.; GONZALEZ CAPPAS, S. M.; FRASCH, A. C. C Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase activity in sera from human infections. **Journal of Infectious Diseases**, v.170, n.6, p.1570-1574, 1994.
33. RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; EICHINGER, D.; RODRIGUES, M.; SCHENKMAN, S. Temperature differences for *trans*-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Glycobiology**, v.7, p.1237, 1997.

34. AGRELOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 6(Gal β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.93-96, 2003.
35. BUSCHIAZZO A.; AMAYA M. F.; CREMONA M. L.; FRASCH A. C.; ALZARI P. M. The crystal structure and mode of action of *trans*-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Molecular Cell**, v.10, p.757-768, 2002.
36. PARODI, A. J.; POLLEVICK, G. D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. Identification of the Gene(S) Coding for the *Trans*-Sialidase of *Trypanosoma-Cruzi*. **EMBO Journal**, v.11, p.1705, 1992.
37. CARVALHO, I.; SCHEUERL, S. L.; KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Practical synthesis of the 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-beta-D-glucosides of Fmoc-serine and Fmoc-threonine and their benzyl esters. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1039-1043, 2003.
38. SZNAIDMAN, M. **Bioorganic Chemistry: Carbohydrates** (Ed.: S. M. Hecht), Oxford University Press, New York, p.1-56, 1999.
39. SCOTT, A. M.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-phase synthesis of O-linked glycopeptide analogues of enkephalin. **Journal of Organic Chemistry**, v.66, p.2327-2342, 2001.
40. RADEMACHER, T. W. Recent advances in glycoconjugate analysis and glycobiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.74-9, 1998.
41. DAVIS, B. G. Synthesis of Glycoproteins. **Chemical Reviews**, v.102, p.579-601, 2002.
42. TOLBORG, J. F.; PETERSEN, L.; JENSEN, K. J.; MAYER, C.; JAKEMAN, D. L.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. Solid-phase oligosaccharide and glycopeptide synthesis using glycosynthases. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, p.4143-4149, 2002.

43. MELDAL, M.; AUZANNEAU, F.-I.; HINDSGAUL, O.; PALCIC, M. M. A PEGA resin for use in the solid phase chemical/enzymatic synthesis of glycopeptides. **Journal of the Chemical Society: Chemical Communication**, p.1849-1850, 1994.
44. EGIMA C. M.; BRIONES M. R. S.; FREITAS L. H.G.; SCHENKMAN R. P. F.; UEMURA H.; SCHENKMAN S. Organization of *trans*-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.77, p.115-125, 1996.
45. AMAYA M. F.; BUSCHIAZZO A.; NGUYEN T.; ALZARI P. M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with *T. cruzi trans*-sialidase. **Journal of Molecular Biology**, v.325, p.773-784, 2003.
46. WONG, C. H.; HAYNIE, S. L.; WHITESIDES, G. M. Enzyme-Catalyzed Synthesis of N-Acetylactosamine with in Situ Regeneration of Uridine 5'-Diphosphate Glucose and Uridine 5'-Diphosphate Galactose. **Journal of Organic Chemistry**, v.47, p.5416-5418, 1982.
47. KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Synthesis of Complex Carbohydrates and Glycoconjugates: Enzyme-Based and Programmable One-Pot Strategies. **Chemical Reviews**, v.100, p.4465-4494, 2000.
48. KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v.53, n.34, p.11753-11766, 1997.
49. REN, T.; ZHANG, G.; LIU, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.1007-1010, 2001.
50. CHENG, H.; CAO, X.; XIAN, M.; FANG, L.; CAI, T. B.; JI, J. J.; TUNAC, J. B.; SUN, D.; WANG, P.G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate-Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.645-652, 2005.
51. ALPER, P. B.; HUNG, S. C.; WONG, C. H. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. **Tetrahedron Letters**, v.37, n.34, p.6029-6032, 1996.

52. RELE, S. M.; IYER, S. S.; BASKARAN, S.; CHAIKOF, E. L. Design and Synthesis of Dimeric Heparinoid Mimetics. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, n.26, p.9159-9170, 2004.
53. ORGUEIRA, H. A.; BARTOLOZZI, A.; SCHELL, P.; LITJENS, R. E. J. N.; PALMACCI, E. R.; SEEBERGER, P. H. Modular synthesis of heparin oligosaccharides **Chemistry – A European Journal**, v.9, n.1, p.140-169, 2003.
54. BOVIN, N. V.; ZURABYAN, S. E.; KHORLIN, A. Y. Addition of halogenoazides to glycals. **Carbohydrate Research**, v.98, p.25-35, 1981.
55. NITZ, M.; BUNDLE, D. R. Efficient synthesis of 3,6-dideoxy-beta-D-arabino-hexopyranosyl-terminated LacdiNac glycan chains of the *Trichinella spiralis* parasite. **Journal of Organic Chemistry**, v.65, p.3064-3073, 2000.
56. ELLERVIK, U.; MAGNUSSON, G. Glycosylation with N-Troc-protected glycosyl donors. **Carbohydrate Research**, v.280, p.251-260, 1996.
57. MARTÍN-LOMAS, M.; FLORES-MOSQUERA, M. F.; CHIARA J. L. Attempted Synthesis of Type-A Inositolphosphoglycan Mediators - Synthesis of a Pseudohexasaccharide Precursor. **European Journal of Organic Chemistry**, p.1547-1562, 2000.
58. YAN, L.; KAHNE, D. Generalizing Glycosylation: Synthesis of the Blood Group Antigens Le^a, Le^b, and Le^x Using a Standard Set of Reaction Conditions. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, p.9239-9248, 1996.
59. LINDBERG, J.; OHBERG, L.; GAREGG, P. J.; KONRADSSON, P. Efficient routes to glucosamine-myo-inositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. **Tetrahedron**, v.58, p.1387-1398, 2002.
60. MITCHELL, S. A.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-Phase Synthesis of O-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin. **Journal of Organic Chemistry**, v.66, p.2327-2342, 2001.

61. SOLIMAN S. E.; BASSILY R. W.; EL-SOKKARY R. I.; NASHED M. A. Acetylated methyl glucopyranuronate trichloroacetimidate as a glycosyl donor for efficient synthesis of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v.338, p.2337-2340, 2003.
62. LIU X.; STOCKER, B. L.; SEEBERGER, P. S. Total Synthesis of Phosphatidylinositol Mannosides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.3638 -3648, 2006.
63. LUNING, B.; NORBERG, T.; TEJBRANT, J. Synthesis of mono- and disaccharide amino-acid derivatives for use in solid phase peptide synthesis. **Glycoconjugate Journal**, v.6, n.1, p.5-19, 2005.
64. LE NGUYEN, D.; SEYER, R.; HEITZ, A.; CASTRO, B. Renin substrates. Part 1. Liquid-phase synthesis of the equine sequence with benzotriazolylxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p.1025-1031, 1985.
65. VEENEMAN, G.H.; VAN LEEUWEN S. H.; VAN BOOM, J.H. Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters. **Tetrahedron Letters**, v.31, n.9, p.1331-1334, 1990.
66. SEEBERGER, P. H.; HAASE, W. C. Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. **Chemical Reviews**, v.100, p.4349-4394, 2000.
67. SHAO, N. AND GUO, Z. Solution-phase synthesis with solid-state workup of an O-glycopeptide with a cluster of cancer-related T antigens. **Organic Letters**, v.7, n.16, p.3589-3592, 2005.
68. SAHA, U. K.; SCHMIDT, R. R. Efficient synthesis of O-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl)-serine and -threonine building blocks for glycopeptide formation. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.1, p.1855-1860, 1997.

69. VARGAS-BERENGUEL, A.; MELDAL, M.; PAULSEN, H.; BOCK, K. Convenient synthesis of *O*-(2-acitamido-2deoxy- β -D-glucopyranosyl)-serine and -threonine building blocks for solid-phase glycopeptide assembly. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.18, p.2615-2619, 1994.
70. KAPPES-ROTH, T.; WALDMANN, H. Chemoenzymatic synthesis of a biotin-labeled glycoposphononapeptide of the c-Myc oncoprotein. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.1, p.2579-2581, 2000.
71. SEITZ, O.; WONG, C-H. Chemoenzymatic Solution- and Solid-Phase Synthesis of *O*-Glycopeptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. A General Route to *O*-LacNAc, *O*-Sialyl-LacNAc, and *O*-Sialyl-Lewis-X Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.119, p.8766-8776, 1997.
72. JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic *O*-glycosylation. **Carbohydrate Research**, v.341, p.1266-1281, 2006.
73. WELL, R. M. V.; KARKKAINEN, T. S.; KARTHA, K. P. R.; FIELD, R. A Contrasting reactivity of thioglucoside and selenoglucoside donors towards promoters: implications for glycosylation stereocontrol. **Carbohydrate Research**, v.341, p.1391-1397, 2006.
74. SCHMIDT, R. R.; RUCKER, E. Stereoselective glycosidations of uronic acids **Tetrahedron Letters**, v.21, p.421-1424, 1980.
75. OSBORN, H. M. I. **Synthetic Methods of Carbohydrates**; 1º ed.; The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, UK, Academic Press, 2003.
76. DULLENKOPF, W.; CASTRO-PALOMINO, J. C.; MANZONI, L.; SCHMIDT, R. R. N-Trichloroethoxycarbonyl-glucosamine derivatives as glycosyl donors. **Carbohydrate Research**, v.296, p.135-147, 1996.
77. RADEMACHER, T. W. Recent advances in glycoconjugate analysis and glycobiology. **Current Opinion in Biotechnology** v.9, p.74-79, 1998.

78. BOULLANGER, P.; JOUINEAU, M.; BOUAMMALI, B.; LAFONT, D.; DESCOTES G. The use of N-alkoxycarbonyl derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucose as donors in glycosylation reactions. **Carbohydrate Research**, v.202, p.151-164, 1990.
79. BENAKLI, K.; ZHA, C.; KERNS, R. J. Chemoenzymatic Solution- and Solid-Phase Synthesis of O-Glycopeptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. A General Route to O-LacNAc, O-Sialyl-LacNAc, and O-Sialyl-Lewis-X Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.9461-9462, 2001.
80. BENAKLI, K.; ZHA C.; J. KERNS, R. J. Oxazolidinone Protected 2-Amino-2-deoxy-D-glucose Derivatives as Versatile Intermediates in Stereoselective Oligosaccharide Synthesis and the Formation of r-Linked Glycosides. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.9461-9462, 2001.
81. CAREY F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry - A: Structure and Mechanisms**. 4a. edição, Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
82. JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent Studies of the Anomeric Effect. **Tetrahedron**, v.48, p.5019-5087, 1992.
83. ELLERVIK, U. 9-Anthraldehyde acetals as protecting groups. **Tetrahedron Letters**, v.44, p.2279-2281, 2003.
84. NYFFELER, P. T.; LIANG, C.; KOELLER, K. M.; WONG, C. The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, p.10773 – 10778, 2002.
85. MEINJOHANN, E.; MELDAL, M.; BOCK, K. Efficient Synthesis of O-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-Ser/ Thr Building Blocks for SPPS of O-GlcNAc Glycopeptides. **Tetrahedron Letters**, v.36, p.9205-9208, 1995.
86. SPIRO, R. G. Studies on Fetuin, a Glycoprotein of Fetal Serum: Isolation, Chemical Composition, and Physicochemical Properties. **Journal of Biological Chemistry**, v.235, p.2860-2869, 1960.

87. HERZNER, H.; REIPEN, T.; SCHULTZ, M.; KUNZ, H. Synthesis of Glycopeptides Containing Carbohydrate and Peptide Recognition Motifs. **Chemical Reviews**, v.100, p.4495, 2000.
88. CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**, Oxford, UK, University Press, p.9-31, 2000.
89. VEENEMAN, G. H.; BOOM, J. H. An efficient thioglycoside-mediated formation of α glycosidic linkages promoted by iodonium dicollidine perchlorate. **Tetrahedron Letters**, v.31, n.2, p.275-278, 1990.
90. MARRA, A.; MALLET, J. M.; AMATORE, C.; SINAY, P. Glycosylation Using A One-Electron-Transfer Homogeneous Reagent - A Novel and Efficient Synthesis of Beta-Linked Disaccharides. **SYNLETT**, v.10, p.572-574, 1990.
91. KONRADSSON, P.; UKO E. UDODONG, U. E.; FRASER-REID, B. Iodonium promoted reactions of disarmed thioglycosides. **Tetrahedron Letters**, v.31, n.30, p.4313-4316, 1990.
92. MUKHOPADHYAY, B.; COLLET, B.; FIELD, R. A. Glycosylation reactions with 'disarmed' thioglycoside donors promoted by N-iodosuccinimide and HClO_4 -silica. **Tetrahedron Letters**, v.46, n.35, p.5923-5925, 2005.
93. CODÉE, J. D. C.; LITJENS, R. E. J. N.; DEN HEETEN, R.; OVERKLEEF, H. S.; VAN BOOM, J. H.; VAN DER MAREL, G. A. $\text{Ph}_2\text{SO}/\text{Tf}_2\text{O}$: a Powerful Promotor System in Chemoselective Glycosylations Using Thioglycosides. **Organic Letters**, v.5, n.9, p.1519 – 1522, 2003.
94. COLLET, B. Y. M. Synthesis of mucin glycan substrates for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Tese de Doutorado**, East Anglia: University of East Anglia, 2006.

Anexos

ANEXO 1 - Espectro na região do infravermelho do composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopirranose (2).

ANEXO 2 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (**3**).

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)
8,67	1	s	-
6,61	1	d	$J_{1,2} = 3,5$
5,57	1	dd	$J_{3,4} = 3,0; J_{4,5} = 1,2$
5,43	1	dd	$J_{2,3} = 10,8; J_{3,4} = 3,0$
5,37	1	dd	$J_{1,2} = 3,5; J_{2,3} = 10,8$
4,44	1	ddd	$J_{4,5} = 1,0; J_{5,6'} = 6,5; J_{5,6} = 12,3$
4,17	1	dd	$J_{5,6'} = 6,5; J_{6,6'} = 11,3$
4,09	1	dd	$J_{5,6} = 11,3; J_{6,6'} = 11,3$
2,17	3	s	-
2,04	3	s	-
2,03	3	s	-
2,02	3	s	-

ANEXO 3 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosil de fenila (**6**).

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)
7,59-7,29	10	m	-
5,58	1	d	$J_{1,2} = 5,8$
5,56	1	s	-
4,39	1	ddd	$J_{4,5} = 10,4; J_{5,6'} = 4,9; J_{5,6} = 10,4$
4,24	1	dd	$J_{5,6'} = 4,9; J_{6,6'} = 10,4$
4,08	1	t	$J_{3,4} = 9,5$
3,93	1	dd	$J_{1,2} = 5,5; J_{2,3} = 10,0$
3,76	1	dd	$J_{5,6} = 10,4; J_{6,6'} = 10,4$
3,59	1	t	$J_{3,4} = 9,5$
3,47	1	sl	-

ANEXO 4 - Espectro de massas do composto **8.1** (ESI-TOF calculado para $C_{14}H_{19}NO_6S$ [$M + Na^+$]: 352,0933; encontrado: 352,0781).

ANEXO 5 - Espectro de massas do composto **8.2** (ESI-TOF calculado para $C_{15}H_{18}Cl_3NO_6S$ $[M + Na^+]$: 470,0105; encontrado: 469,9695).

ANEXO 6 - Espectro de massas do composto 6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-4-hidróxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de fenila (**10**) (ESI-TOF calculado para $C_{28}H_{35}N_3O_{14}S$ $[M + Na^+]$: 692,1732; encontrado: 692,1868).

ANEXO 7 - Espectro de massas do composto 2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**11**) (ESI-TOF calculado para $C_{33}H_{37}N_3O_{13}S$ $[M + Na^+]$: 738,1939; encontrado: 738,1949).

ANEXO 8 - Espectro na região do infravermelho do composto 2-azido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (11).

ANEXO 9 - Espectro de massas do composto **12** (ESI-TOF calculado para $C_{18}H_{25}N_3O_9S$ [$M + Na^+$]: 482,1203; encontrado: 482,1181).

ANEXO 10 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico (**13**).

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)
7,77	2	d	$J = 7,6$
7,60	2	d	$J = 7,8$
7,43-7,30	9	m	-
5,72	1	d	$J = 7,6$
5,23	2	s	-
4,52-4,46	1	m	-
4,45-4,39	2	m	-
4,22	1	t	$J = 6,8$
4,07-3,91	2	m	-

ANEXO 11 - Espectro de massas do composto 2-azido-2-desóxi-4,6-hidróxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**15**) (ESI-TOF calculado para $C_{26}H_{33}N_3O_{13}S$ $[M + Na^+]$: 650,1626; encontrado: 650,1596).

ANEXO 12 - Espectro de massas do composto 4,6-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-1-tio-D-glicopiranosídeo de fenila (**16**) (ESI-TOF calculado para $C_{30}H_{37}N_3O_{15}S$ $[M + Na^+]$: 734,1837; encontrado: 734,1707).

ANEXO 13 - Espectro de massas do composto éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbo- nil)-L-serina (**17**) (ESI-TOF calculado para $C_{49}H_{54}N_4O_{20}$ $[M + Na^+]$: 1041,3331; encontrado: 1041,3262).

ANEXO 14 - Espectro de massas do composto éster benzílico de 4,6-*O*-acetil-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desóxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetóxicarbo-nil)-L-treorina (**18**) (ESI-TOF calculado para $C_{50}H_{56}N_4O_{20}$ $[M + Na^+]$: 1055,3488; encontrado: 1055,3435).