

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de *trans-sialidase* de *Trypanosoma cruzi***

Getúlio Gomes Junqueira

Ribeirão Preto  
2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi***

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientado(a):** Getúlio Gomes Junqueira

**Orientador(a):** Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 01/07/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2013

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.

**[Junqueira, Getúlio Gomes](#)**

Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de *trans-sialidase* de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2013.  
145 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: [Carvalho, Ivone.](#)

1. Doença de Chagas
2. *Trypanosoma cruzi*
3. *trans-sialidase*
4. galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas
5. Click chemistry

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Getúlio Gomes Junqueira

Título do trabalho: Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Produtos Naturais  
e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

*Aos meus pais João e Antonia , a minha madrinha  
Ângela, a minha irmã Lorena e ao meu amor Milena , pelos  
incentivos, dedicação e apoio incondicionais.*

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus pelas oportunidades que tem me proporcionado e por estar sempre ao meu lado

Agradeço à minha família por todo amor e apoio durante toda minha formação acadêmica

Agradeço à Milena por todo amor e dedicação durantes esses anos

Agradeço à professora doutora Ivone Carvalho pela sua orientação e confiança que depositou em mim ao desenvolver este trabalho. Também agradeço pelas oportunidades que me ofereceu e o conhecimento que me agregou.

Agradeço aos técnicos Luís Otávio Zamoner, Marcelo Rodrigues de Carvalho, Vinícius Palaretti, Clóvis Júnior e à técnica Cláudia Castania pela dedicação ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica Milena, Lílian, Vanessa, Valquíria, Carol, Susimaire, Daniel, Pedro, Vinícius, Oswaldo, Flávio, Ricardo, Evandro, Jonathan, Paulo, Talita e Ana os momentos de alegria e de frustração que compartilhamos ao longo dos últimos anos.

Agradeço ao CNPq o financiamento, sem o qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

JUNQUEIRA, G. G. Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. 2013. 145f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

A doença de Chagas é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e esquistossomose, e seu agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. O parasita expressa uma enzima de superfície denominada *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), responsável pela transferência do ácidos siálicos de células do hospedeiro para moléculas de β-galactose terminais presentes em glicoproteínas de sua superfície. As moléculas de glicoproteína sialiladas estão envolvidas na adesão e subsequente penetração do parasita em células hospedeiras. O papel fundamental da TcTS no reconhecimento e na invasão de células hospedeiras, bem como sua ausência em seres humanos, torna esta enzima um alvo potencial a ser estudado. A TcTS é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α-2,3 com unidades de β-galactose aceitoras na superfície do parasita. Considerando a importância da unidade de galactose e da função carboxila do ácido siálico para interações no sítio ativo de TcTS, priorizamos na síntese de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas com diferentes substituintes, visto que o grupo sulfonamida é bioisóstero do ácido carboxílico, na busca de potenciais inibidores de TcTS. Os derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **45-51** foram preparados via estratégia de *click chemistry*, por reação de ciclo-adição azido-alcino catalisada por Cu(I) (CuAAC), a partir do intermediário de galactose contendo função amino terminal **30** e os derivados aril azidas **38-44**. Após etapa de desacetilação, os produtos obtidos **52-58** foram testados em TcTS por ensaio fluorimétrico *in vitro* para avaliação de sua atividade inibitória. Os resultados obtidos são interessantes e bastante promissores, principalmente com os obtidos com o produto **58** (contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfapiridina), que apresentou atividade inibitória promissora (81%) na concentração de 1,0 mM, abrindo perspectivas para a síntese de um maior número de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas com diferentes substituintes em R, para o estabelecimento de estudos de relação estrutura-atividade. Adicionalmente, os compostos **53-55** foram testados em ensaios *in vitro* para avaliação de sua atividade tripanocida e citotóxica, e apresentaram atividade tripanocida máxima de 50%, normalmente nas concentrações de 500 a 250 µM, com destaque para o derivado **55**, contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfamerazina, que apresentou atividade moderada, mas superior ao benznidazol nas concentrações mais baixas ( $15,0 - 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Por outro lado, de acordo com os resultados do ensaio de citotoxicidade, a atividade citotóxica foi observada apenas nas concentrações mais elevadas, similar ao benznidazol.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; *trans*-Sialidase; Click chemistry; galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas

JUNQUEIRA, G. G. **Synthesis and evaluation of galactosyl-triazol benzenesulfonamides derivatives as potential inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans-sialidase***. 2013. 145f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

Chagas disease is considered the third most common tropical parasitic disease worldwide, after malaria and schistosomiasis, and its causer is the flagellate protozoan, *Trypanosoma cruzi*. The parasite expresses a surface enzyme known as *Trypanosoma cruzi trans-sialidase* (TcTS), responsible for the transference of sialic acid from host cell to  $\beta$ -galactose terminal molecules present in surface glycoproteins. Sialylated glycoproteins molecules are involved in adhesion and further penetration of parasite in host cell. Due to TcTS primordial role in recognizing and invasion of host cells, as well as its absence in humans, this enzyme becomes a potential target to be investigated. TcTS is specific on catalyzing, specially, transference of sialic acid to mucin molecule giving  $\alpha$ -2,3 bond with  $\beta$ -galactose moiety in parasite surface. Considering the importance of the galactose moiety and the function of carboxylic in sialic acid for interactions in TcTS enzyme, we prioritized the synthesis of galactosyl-triazol-benzenesulfonamides derivatives with different substituents since sulfonamide group is bioisoster of carboxylic acid, in attempt to produce potential inhibitors of TcTS. The galactosyl-triazol-benzenesulfonamides derivatives **45-51** were prepared via *click chemistry* reaction (Copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC)) from galactose intermediate with terminal amino group **30** and aril azides derivatives **38-44**. After removing acetyl group, the inhibiting activity of products **52-58** were evaluated in TcTS fluorimetric *in vitro* assay. We found very promising results, specially with **58** (containing galactosyl-triazolic group bonded to sulfapyridine), which showed 81% of inhibitory activity in 1,0mM solution, bringing expectations for synthesis of greater number of galactosyl-triazol-benzenesulfonamides derivatives with different substituents in R, to establish studies of structure relationship activity. Additionally, trypanocidal and cytotoxic activity of compounds **53-55** were tested and showed maximum activity of 50%, commonly in concentrations of 500 to 250  $\mu$ M, specially compound **55**, containing galactosyl-triazolic group bonded to sulfamerazine, with showed moderate activity, but higher than benznidazol in lower concentrations ( $15,0 - 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). On the other hand, according to cytotoxicity results, activity were observed only in higher concentrations, as for benznidazol.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; *trans-sialidase*; *click chemistry*; galactosyl-triazol-benzenesulfonamides

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.....	4
<b>Figura 3:</b> Violeta de genciana.....	5
<b>Figura 4:</b> Medicamentos utilizados em associação no tratamento da Doença de Chagas.....	6
<b>Figura 5:</b> Potenciais agentes com atividade tripanocida.....	7
<b>Figura 6:</b> Inibidores da síntese de ergosterol.....	9
<b>Figura 7:</b> Naftoquinonas com atividade tripanocida.....	9
<b>Figura 8:</b> Derivados sulfonamidas com atividade tripanocida.....	10
<b>Figura 9:</b> Estrutura química dos derivados sulfonamidas <b>6</b> e <b>7</b> com atividade inibidora de TcTS.....	11
<b>Figura 10:</b> Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido <i>N</i> -acetil-neuramínico.....	14
<b>Figura 11:</b> Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $\text{Thr}_8\text{LysPro}_2$ .....	14
<b>Figura 12:</b> Modelo estrutural de moléculas de mucina de <i>T. cruzi</i> aceitoras de ácido siálico.....	15
<b>Figura 13:</b> Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS – DANA (Código PDB: 1MS8).....	17
<b>Figura 14:</b> Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB.....	18
<b>Figura 15:</b> Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico.....	21
<b>Figura 16:</b> Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico não relacionados com carboidratos.....	22
<b>Figura 17:</b> Derivados miméticos de substratos aceptores de ácido siálico.....	23

<b>Figura 18:</b> Estruturas de derivados miméticos do estado de transição de TcTS.....	24
<b>Figura 19:</b> Estruturas de derivados benzotiazol miméticos do transição de TcTS.....	24
<b>Figura 20:</b> Estrutura dos compostos propostos como potenciais inibidores da enzima <i>trans</i> -sialidase de <i>T. cruzi</i> .....	25
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do precursor (31) e de seu derivado azido 38 em CD <sub>3</sub> OD.....	35
<b>Figura 22:</b> Espectros de RMN $^1\text{H}$ dos precursores <b>32-34</b> e seus derivados azidos <b>39-41</b> em CD <sub>3</sub> OD.....	38
<b>Figura 23:</b> Compostos testados nos ensaios biológicos.....	46
<b>Figura 24:</b> Estrutura dos compostos utilizados como controle positivo.....	47
<b>Figura 25:</b> Resultados do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM com os compostos <b>52-55</b> .....	48
<b>Figura 26:</b> Resultados do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM com os compostos <b>56-58</b> .....	49
<b>Figura 27:</b> Resultados do ensaio de inibição de TcTS nas concentrações de 1,0 - 0,25 m mmol.L <sup>-1</sup> com o produto <b>58</b> .....	50
<b>Figura 28:</b> Atividade tripanocida dos compostos <b>53-55</b> em relação ao fármaco de referência benznidazol (Bz).....	51
<b>Figura 29:</b> Atividade citotóxica dos compostos <b>53-55</b> e benznidazol (Bz), avaliados em ensaios de cultura de células de baço de camundongos.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais aminoácidos do sítio catalítico de TcTS e suas funções.....	19
<b>Tabela 2:</b> Condições reacionais de síntese dos derivados aril azidas <b>39-41</b> ..	36
<b>Tabela 3:</b> Condição reacional, estrutura e rendimento dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas <b>45-51</b> .....	41
<b>Tabela 4:</b> Comparação entre os deslocamentos químicos dos intermediários com hidroxila acetilada e seus respectivos derivados com hidroxila livre.....	45

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Reação de transferência e hidrólise de ácido siálico catalisada pela <i>trans</i> -sialidase de <i>T. cruzi</i> .....	16
<b>Esquema 2:</b> Mecanismo da reação de transglicosilação catalisada por TcTS....	20
<b>Esquema 3:</b> Rota sintética proposta para preparação dos potenciais inibidores de TcTS.....	26
<b>Esquema 4:</b> Etapas da síntese do monossacarídeo doador de galactose <b>29</b> ....	27
<b>Esquema 5:</b> Mecanismo proposto para per-O-acetilação de D-(+)-galactose.....	28
<b>Esquema 6:</b> Mecanismo proposto para obtenção do composto <b>28</b> .....	29
<b>Esquema 7:</b> Mecanismo proposto para obtenção do composto <b>29</b> .....	30
<b>Esquema 8:</b> Síntese do derivado de galactose contendo o grupo alcino terminal.....	31
<b>Esquema 9:</b> Mecanismo proposto para obtenção do composto <b>30</b> .....	31
<b>Esquema 10:</b> Síntese do derivado aril azida <b>38</b> .....	31
<b>Esquema 11:</b> Formação do íon diazônio como etapa intermediária na síntese de derivados aril azidas.....	32
<b>Esquema 12:</b> Formação de aril azidas a partir de compostos de diazônio.....	34
<b>Esquema 13:</b> Esquema geral de síntese dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas.....	39
<b>Esquema 14:</b> Produtos da reação de Huisgen sem o uso de catalisador.....	42
<b>Esquema 15:</b> Mecanismo reacional proposto para a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar formando 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos.....	43
<b>Esquema 16:</b> Esquema geral de O-desacetilação.....	44
<b>Esquema 17:</b> Reação de TcTS acompanhada em fluorímetro, com MuNANA como substrato doador e lactose como substrato aceitor.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Å: Angstrom  
Ac<sub>2</sub>O: Anidrido acético  
AcOEt: Acetato de Etila  
Arg: Arginina  
Asp: Ácido Aspártico  
CCC: Cromatografia em Coluna Clássica  
CCD: Cromatografia em Camada Delgada  
CFAE: Cromatografia Flash de Alta Eficiência  
CuAAC: copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition  
d: Dubleto  
DANA: ácido 2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil neuramínico  
DBU:Diazobiciclo-undecano  
DCM: Diclorometano  
dd: Duplo Dubleto  
ddd: Duplo Duplo Dubleto  
DMF: *N,N*-Dimetilformamida  
dt: Duplo Tripleto  
Et<sub>3</sub>SiH: Trietilsilano  
GalNAc: *N*-acetil-galactosamina  
GlcNAc: *N*-acetil-glicosamina  
Glu: Ácido Glutâmico  
Gly: Glicina  
GPI: Glicosilfosfatidilinositol  
IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória de 50%  
J: constante acoplamento  
Kd: Constante de Dissociação  
Ki: Constante de Inibição  
Leu: Leucina  
Ly: Lisina  
m: Multiplet  
MASPs: Proteínas de Superfície Associadas à Mucina  
MHz: mega-Hertz  
MIF: Campo de Interação Molecular  
MIP: Metoxiisopropil  
MuNANA: Ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-*N*-acetilneuramínico

Neu-5-Ac: Ácido *N*-acetilneuramínico  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PDB: Banco de Dados de Proteína  
ppm: Partes por Milhão  
Pro: Prolina  
Py: Piridina  
RMN  $^{13}\text{C}$ : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
RMN  $^1\text{H}$ : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
s: Simpleto  
Ser: Serina  
t: Tripleto  
TcTS: *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*  
THF: Tetraidrofurano  
Thr: Treonina  
Trp: Triptofano  
TS: *trans*-sialidase  
Tyr: Tirosina  
Val: Valina  
v/v: Volume/Volume  
 $\delta$ : Deslocamento químico

## SUMÁRIO

Resumo .....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas .....	v
Lista de esquemas .....	vi
Lista de abreviaturas e siglas .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Doença de Chagas .....	2
1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas e do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.1.2 Tratamento da doença de Chagas .....	4
1.1.3 Novas abordagens terapêuticas .....	5
1.1.4 Alvos terapêuticos .....	11
1.2 <i>Trans</i> sialidase.....	13
1.2.1 Ácido siálico e mucinas.....	13
1.2.2 Atividade enzimática.....	15
1.2.3 Estrutura 3D de <i>trans</i> -Sialidase e mecanismo de ação.....	16
1.2.4 Inibidores de <i>trans</i> -Sialidase de <i>T. Cruzi</i> .....	20
1.2.4.1 Inibidores miméticos de substrato doador.....	21
1.2.4.2 Inibidores miméticos de substratos aceptores.....	23
1.2.4.3 Inibidores miméticos do estado de transição	24
2. OBJETIVO .....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.1 Síntese.....	26
3.1.1 Estratégia sintética.....	26
3.1.2 Síntese regiosseletiva para obtenção do intermediário doador de galactose.....	27
3.1.3 Síntese de derivado de galactose contendo a função alcino terminal	30
3.1.4 Síntese de derivados aril azidas.....	31
3.1.4.1 Diazotação.....	32
3.1.4.2 Aril azidas a partir de compostos de Diazônio.....	33
3.1.5 Reação de ciclo-adição 1,3 dipolar catalisada por cobre (CuAAC), "Click Chemistry", para obtenção dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas.....	39
3.1.6. Desacetilação dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas .....	44
3.2 Ensaios biológicos.....	46
3.2.1 Ensaio de inibição.....	46
3.2.2 Ensaio de atividade tripanocida e citotóxica.....	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	53

<b>4.1 Materiais.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Métodos.....</b>	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, representando uma ameaça para a saúde humana e para o desenvolvimento econômico nestes países. São freqüentemente chamadas de doenças negligenciadas (DN), uma vez que afetam populações pobres e marginalizadas e para as quais não existe tratamento satisfatório (DIAS et al, 2009; VIK, 2009). Apesar dos maiores investimentos em pesquisa realizados principalmente por órgãos governamentais, a aprovação de novos fármacos para tratamento destas doenças ocorridos na última década é basicamente a mesma quando comparado a duas décadas e meia atrás, como relatado pelo DNDI (“Drugs for Neglected Diseases Initiative”) e MSF (“Médecins Sans Frontières”), Por exemplo, entre 2000 e 2011, das 850 novas terapias aprovadas pelas principais agências reguladoras, como FDA, apenas 37 foram destinadas para o tratamento de DN e somente 4 representavam novas entidades químicas. Por outro lado, entre 1975 e 1999, 1393 novos fármacos foram aprovados e apenas 16 foram destinados a DN, sendo 11 relacionados a novas entidades químicas. Adicionalmente, a maioria das novas alternativas terapêuticas refere-se à associação de fármacos já conhecidos e novos regimes terapêuticos (WILLYARD, 2013). Alguns problemas importantes na Pesquisa e Desenvolvimento de produtos P&D destinados a DN tem sido apontados pela World Health Organization (WHO), Programe for Tropical Disease Research (TDR) and BIO Ventures for Global Health, como dificuldades de tradução da pesquisa básica em desenvolvimento de fármacos e implementação de políticas públicas (NWAKA et al. 2009). A necessidade de novas alternativas terapêuticas que contornem problemas de resistência é evidente, mas os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de produtos são insuficientes, por isso estimativa-se que cerca de 3 bilhões de indivíduos sofrem de uma ou mais infecções parasitárias (DIAS et al., 2009; KRAUS, 2009). A criação de consórcios de pesquisa envolvendo a Academia com a sua capacidade de pesquisa, a Indústria Farmacêutica, pesquisadores contratados, Agências Filantróticas, Associações Públicas e Privadas ligadas à descoberta e desenvolvimento de fármacos coordenados pelo DNDI, tem sido extremamente promissora para a identificação e otimização de protótipos de fármacos uma vez que envolve o “screening” the bibliotecas de compostos, Química Medicinal, Farmacologia e Farmacodinâmica,

desenvolvimento de formulações, manufatura dos produtos e condução de triagens clínicas. O principal foco destas pesquisas na ordem dos Cinetoplastídeo, o qual inclui a família dos Tripanosomatídeos, tem sido direcionado à identificação de compostos ativos contra o parasita e não necessariamente contra determinado alvo macromolecular. A principal razão baseia-se no fato de que a maioria destes alvos não é validada e existe grande discrepância nos resultados obtidos entre os ensaios enzimáticos, por exemplo, e diretamente contra os parasitas. (CHATELAIN and LOSET, 2011).

## 1.1 Doença de Chagas

### 1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas e do parasita *Trypanosoma cruzi*

Descoberta em abril de 1909 por Carlos Chagas (1878-1934), a nova doença foi caracterizada como uma expressiva endemia rural que atingia vários países latino-americanos (AMATO NETO; PASTERNAK, 2009; FIOCRUZ, 2009). Mesmo após 100 anos desde sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um grande desafio à saúde pública mundial (RASSI et al., 2009).

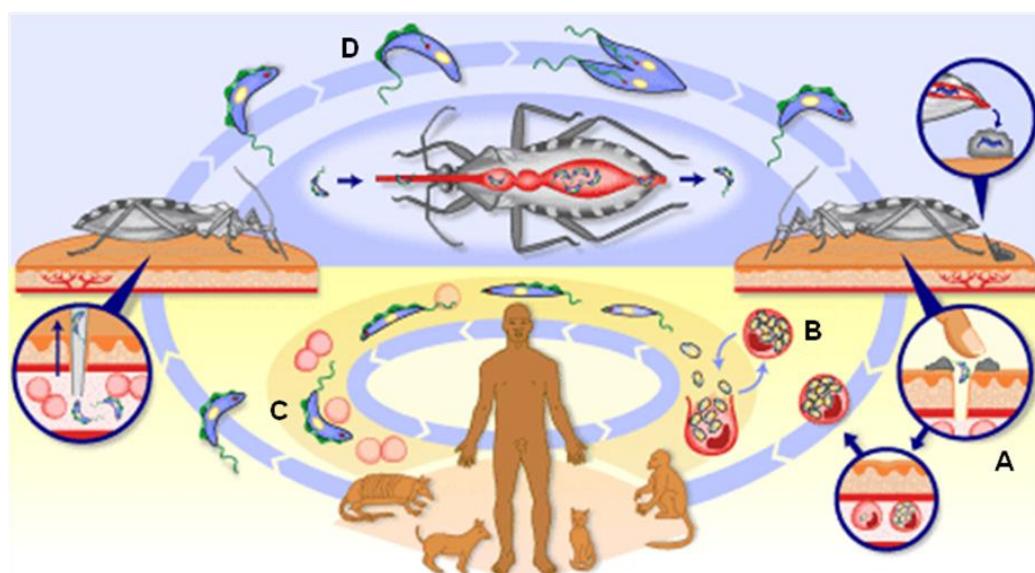
A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e esquistossomose (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011), e atualmente, estima-se que atinja aproximadamente 10 milhões de pessoas em todo o mundo, levando a óbito mais de 10 mil por ano (WHO, 2010; CLAYTON, 2010). O modo mais comum de transmissão ocorre quando as fezes do inseto vetor *Triatoma infestans* contaminadas com *T. cruzi* entram em contato com qualquer ruptura na pele (incluindo a mordida), mucosas dos olhos e boca. Outros modos de transmissão incluem transfusão de sangue infectado, transmissão oral com alimentos contaminados, transmissão vertical e transplante de órgãos (WHO, 2010; CLAYTON, 2010). Graças a medidas de controle sanitário, a transmissão via *Triatoma infestans* foi interrompida no Brasil em 2006 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

No entanto, devido ao recente fluxo de imigrantes provenientes de países endêmicos, a doença tem se tornado problema de saúde na América do Norte e em

muitas partes da Europa, Ásia e Oceania, onde foi identificado número crescente de indivíduos infectados (RASSI et al., 2009).

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica com sinais e sintomas distintos. A fase aguda, período inicial da infecção, pode passar despercebida como também pode se iniciar com quadro febril prolongado, edemas localizados e generalizados e nos casos mais graves insuficiencia cardiaca aguda e hepatoesplenomegalia. Já a fase crônica é caracterizada pela destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos como: coração, e esôfago (MONCAYO, 1999; DO CAMPO, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (Figura 1), no qual o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, sendo encontrado as formas amastigota e tripomastigota, e por uma fase de multiplicação extracelular no inseto vetor (triatomíneos), sendo encontrado as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. (NEVES et al., 1995).



<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php>

**Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi***

A forma tripomastigota metacíclica (**A**), proveniente do inseto vetor, flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade diversas células para escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro. Após invasão, o parasita se diferencia na forma amastigota (**B**), aflagelada, que se prolifera por fissão binária e, eventualmente, se rediferencia na forma tripomastigota (**C**), destruindo as células e alcançando novamente a corrente circulatória. As formas tripomastigotas podem

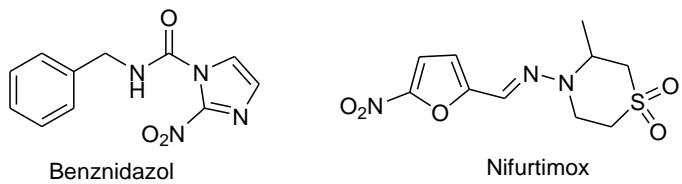
invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas por um vetor. Neste último caso, são convertidas na forma epimastigota (**D**) não infecciosa e posteriormente na forma tripomastigota metacíclica, completando o ciclo de vida (NEVES et al., 1995).

### 1.1.2 Tratamento da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença, início do século XX, inúmeras tentativas de tratamento foram realizadas, mas sem obter um quimioterápico eficiente (MUELAS-SERRANO et al., 2002).

A quimioterapia específica para a doença de Chagas com os derivados nitro-heterocíclicos benznidazol (Rochagan®) e nifurtimox (Lampit®) foi introduzida no início dos anos 70 (Figura 2). Este último teve sua produção descontinuada devido aos graves efeitos colaterais (MUELAS et al., 2002; URBINA et al., 2003).

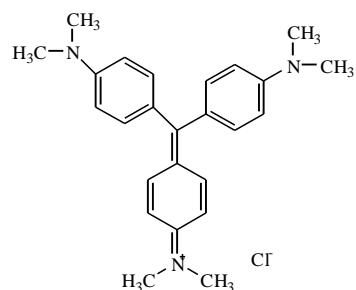
Ambos os fármacos apresentam eficácia significativa durante a fase aguda da doença, eficácia que não é mantida durante a fase crônica da doença (URBINA, 2009; CLAYTON, 2010). A razão para essa diferença de resultados entre as fases aguda e crônica ainda não estão claras, mas podem estar relacionadas com as propriedades farmacocinéticas dos intermediários destes compostos nitro-heterocíclicos, que apresentam meia-vida curta e baixa penetração nos tecidos, os quais limitam sua ação na fase crônica, quando os parasitas encontram-se dentro dos tecidos (URBINA, 2009).



**Figura 2 - Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.**

Atualmente não existe tratamento eficiente para a fase crônica da doença, fase responsável pelos danos irreversíveis causados nos diversos órgãos (DIAS; SCHOFIELD, 1999). Outros inconvenientes para o tratamento com esses dois fármacos são a inexistência de formulações pediátricas e a duração do tratamento, 60 dias com benznidazol e até 90 dias com o nifurtimox (CLAYTON, 2010).

A utilização de agente profilático também se torna uma alternativa viável, 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 endêmicas (COURA; De CASTRO, 2002). A violeta de genciana (cloreto de N-[4-bis-[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]N-metilamônio)(Figura 3) é o único agente quimioprofilático utilizado, mas 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 anestésicos (WENDEL; GONZAGA, 1993).



**Figura 3 -** Violeta de genciana

Todos esses fatos demonstram a extrema necessidade de novas abordagens para o tratamento quimioterápico específico da doença de Chagas. Neste sentido, algumas terapias alternativas aos fármacos nifurtimox e benznidazol têm sido testadas.

### 1.1.3 Novas abordagens terapêuticas

Algumas terapias alternativas aos fármacos nifurtimox e benznidazol estão sendo utilizadas.

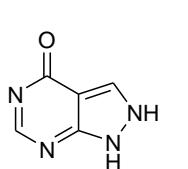
Gallerano e colaboradores demonstraram que o allopurinol (figura 4) foi tão eficaz quanto o benznidazol na eliminação da parasitemia na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, além de reduzir significativamente a frequencia de reações adversas (GALLERANO et. al., 1990)

Embora o uso da combinação de medicamentos ser comprovadamente eficaz em outras infecções, sua utilização no tratamento da Doença de Chagas não é muito comum.

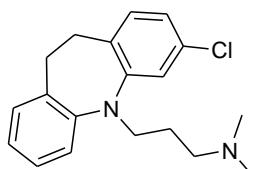
Recentemente um estudo piloto foi realizado para avaliar os efeitos do tratamento da fase crônica da doença de Chagas com os antiparasitários alopurinol e benznidazol (figura 4). Este estudo demonstrou que a combinação dos fármacos induziu significativas modificações na resposta imunológica, indicado por uma redução da carga parasitária. Sendo assim, uma estratégia possível para melhorar a eficácia do tratamentos é a combinação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, como já é utizado em outras doenças crônicas, incluindo tuberculose, HIV e malária (PEREZ-MAZLIAH et. Al., 2013).

Outro estudo divulgado recentemente descreveu a associação do benznidazol (BZN) com a clomipramina (CLO) (figura 4), fármaco utilizado no tratamento da depressão. Neste estudo, o BZN apresentou eficácia superior a clomipramina na fase aguda da doença, no entanto, foram observados focos de necrose no fígado dos animais tratados com BZN. Entretanto, a associação BZN + CLO apresentou resultados comparáveis aos resultados obtidos apenas com BZN, mas sem ser observados focos de necrose no fígado. Adicionalmente a este resultado, a associação BZN + CLO apresentou menos efeitos colaterais do que o tratamento apenas com BZN. O efeito protetor da CLO nos tecidos estudados não foram explicados, sendo necessário investigações experimentais específicas. Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a CLO é um interessante candidato para o tratamento da doença de Chagas na sua fase crônica, uma vez que diminui o dano cardíaco e melhora a sobrevivência dos indivíduos infectados (STRAUSS et. al., 2013).

Estes resultados sugerem a necessidade de se continuar testando novos protocolos com diferentes combinações na busca de um tratamento mais eficiente e seguro.



Alopurinol

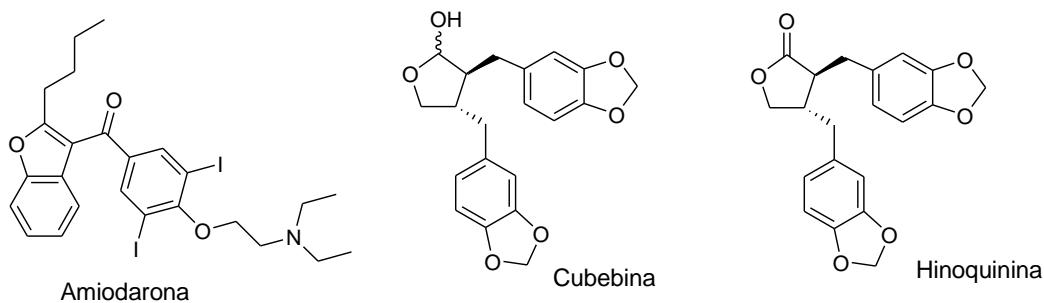


Clomipramina

**Figura 4.** Medicamentos utilizados em associação no tratamento da Doença de Chagas

O medicamento amiodarona (AMD) (Figura 5), um conhecido agente antiarrítmico utilizado para o tratamento sintomático de pacientes chagásicos crônicos, também está sendo estudado frente à sua atividade tripanocida. Estudos recentes confirmaram que a AMD tem significativa atividade contra a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi*, sem afetar a viabilidade da célula hospedeira. Esta atividade resulta de um duplo mecanismo de ação, com a interrupção da homeostase do Ca<sup>2+</sup> e bloqueio da biossíntese do lanosterol (PHERCYLES VEIGA-SANTOS et. al., 2012)

Esperandim e colaboradores utilizaram as lignanas cubebina (produto natural) e hinoquinina (obtida por semi-síntese) (Figura 5) para avaliar a atividade terapêutica *in vivo* durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Os resultados obtidos demonstram que estas lignanas podem ser consideradas candidatos promissores para o desenvolvimento de potenciais fármacos para o tratamento da doença de Chagas (ESPERANDIM et. al., 2013). Outros estudos também mostraram uma significativa atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* da cubebina e hinoquinina, bem como sua ação anti-inflamatória (DA SILVA et al., 2005).



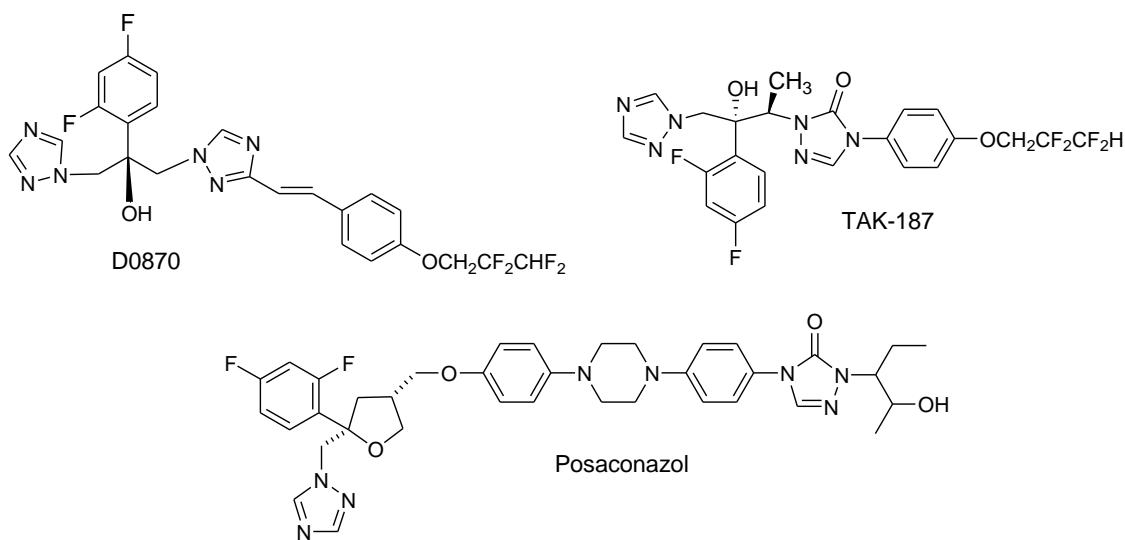
**Figura 5.** Potenciais agentes com atividade tripanocida

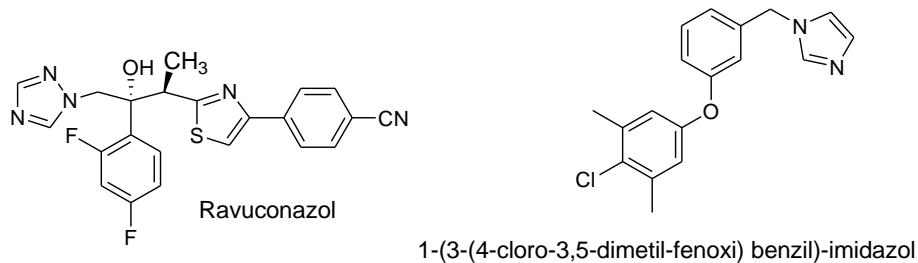
Em seus estudos, Molina et al. destaca a sensibilidade do *T. cruzi* aos inibidores da síntese de ergosterol (SBI's). Compostos como os derivados triazólicos têm a capacidade de serem reconhecidos pela enzima CYP51 (14- $\alpha$ -esterol demetilase), causando a sua inibição e, consequentemente, bloqueando a síntese do ergosterol (MOLINA et al., 2000).

Derivados triazólicos como o D0870 (Zeneca Farmacêutica), TAK-187 (Takeda Chemical Company) e posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute) (figura 6) foram descritos como os primeiros compostos a mostrar atividade curativa nas duas fases da doença de Chagas, sem efeitos

colaterais tóxicos para os hospedeiros. Além disso, também foram capazes de eliminar as cepas resistentes ao benznidazol e nifurtimox (URBINA, 2009; CLAYTON, 2010; GRAEBIN et al., 2009). Outro triazol, o rauconazol (Bristol-Myers Squibb) (figura 6), também apresentou atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, apesar de sua atividade *in vivo* ter sido limitada, provavelmente devido a suas propriedades farmacocinéticas, como meia-vida curta (URBINA, 2009). Alguns desses compostos já estão em fase clínica de testes, tais como TAK-187 (fase I completa) e posaconazol (fase II iniciada) (Clayton, 2010).

Andriani e colaborado sintetizaram uma série de derivados contendo anel imidazólico que foram utilizados em ensaio frente células de mamífero infectadas com a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Os derivados apresentaram EC<sub>50</sub> de 0,08 – 1,63 µM, benznidazol com EC<sub>50</sub> = 1,9 µM, demonstrando a importância do anel imidazol na busca de abordagens terapêuticas mais eficientes. Neste mesmo trabalho, o derivado com menor EC<sub>50</sub>, o 1-(3-(4-cloro-3,5-dimetil-fenoxy) benzil)-imidazol (figura 6), foi testado quanto a sua afinidade pela enzima CYP51 (14- $\alpha$ -esterol demetilase). Com valor de K<sub>d</sub> = 0,067, este derivado apresentou potência próxima a potência do posaconazol (K<sub>d</sub> = 0,06), atualmente o candidato mais promissor para tratamento da fase crônica da Doença de Chagas (ANDRIANI et. al., 2013).

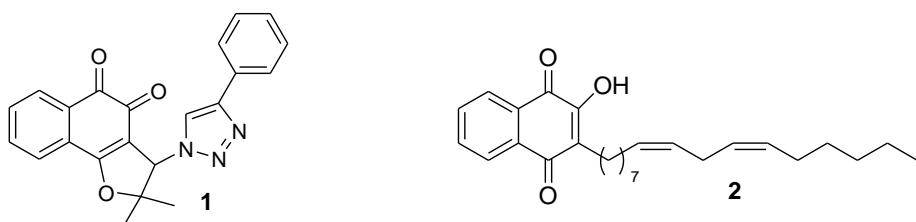




**Figura 6.** Inibidores da síntese de ergosterol

Junior et al. (2008) em seus trabalhos com quinonas, demonstrou que naftoquinonas triazólicas obtidas através de reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3-dipolar catalisadas por cobre (CuAAC) apresentaram significativa atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, destaque para o derivado **1** (figura 7) com IC<sub>50</sub> de 17,3 µM, sendo mais potente que a quinona sem o núcleo triazólico. Estes resultados demonstram que o núcleo triazólico atua aumentando a atividade tripanocida do composto, sendo alternativa viável em estudos na busca de quimioterápicos mais eficazes para o tratamento das infecções causadas por tripanosomatídeos.

Em outro trabalho com naftoquinonas, Da Silva e colaboradores sintetizaram uma série de naftoquinonas substituídas que foram submetidas a ensaio de atividade tripanocida contra forma tripomastigota de *T. cruzi*. Desta série, 3 derivados apresentaram atividade relevante, destaque para o composto **2** (figura 7) com IC<sub>50</sub> de 7,8 µM ( DA SILVA et. al., 2013).

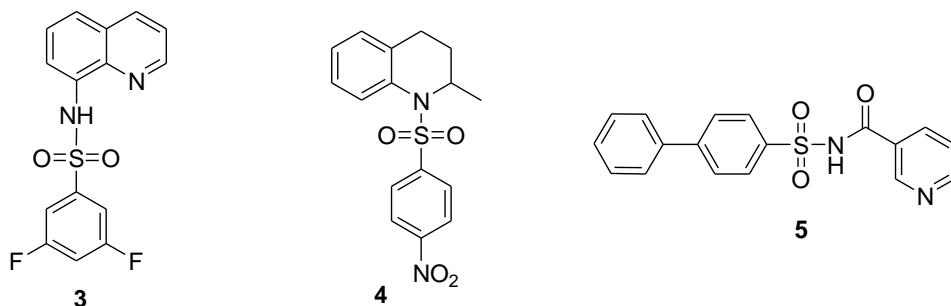


**Figura 7.** Naftoquinonas com atividade tripanocida

Derivados sulfonamidas têm sido descritos como potenciais agentes tripanocida. Da SILVA et. al. (2007) sintetizou o derivado *N*-quinolin-8-il- arilsulfonamida (**3**) (figura 8), através da técnica de hibridação molecular de um grupo sulfonamida e um anel de quinolina, que exibiu atividade tripanocida sobre *T. cruzi*. Em outro trabalho, Pagliero e colaboradores (2010) relataram os derivados

benzenossulfonil -2-metil- 1,2,3,4-tetra-hidroquinolina como potenciais inibidores de *T. cruzi*, relevância para o derivado 1 - (4-nitro-benzenossulfonil)-2-metil-1,2,3,4-tetra-hidroquinolina (**4**) (figura 8), com IC<sub>50</sub> de 11,44 µM.

Bocanegra-Garcia e colaboradores sintetizaram uma série de 11 derivados sulfonamidas. Todos os derivados apresentaram atividade lítica, similar ou superior quando comparados aos fármacos de referência nifurtimox e benznidazol, com destaque para o derivado N-(bifenil-4-il-sulfonil)-nicotinamida (**5**) (figura 8) com LC<sub>50</sub> = 50,61 µg/ml, benznidazol e nifurtimox com LC<sub>50</sub> > 250 µg/ml, para cepa NINOA (Bocanegra-Garcia et. al., 2012).

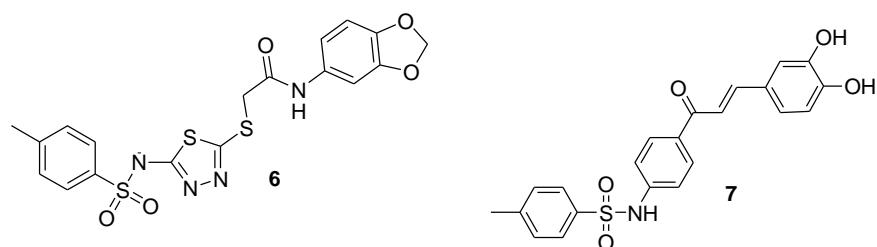


**Figura 8.** Derivados sulfonamidas com atividade tripanocida

Derivados de sulfonamidas também têm sido descritos como potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS), cuja importância é descrita no item 1.2. NERES et al. (2009) utilizou a estratégia de aplicação de filtros em screening virtual, um trabalho de docking molecular utilizando o programa GOLD, para identificar moléculas capazes de formar interações com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo de TcTS. Essas interações envolveram especificamente ligação de hidrogênio com os resíduos de Arg 314, Arg 245, Arg 53, Asp 96, Asp 59 e interações hidrofóbicas com resíduos de Tyr 312 e Tyr 119. Estes filtros foram escolhidos com base em interações que são comumente observadas nas estruturas de complexos TcTS, obtidos por cristalografia de raio X. A fase final do processo de seleção envolveu 1819 moléculas, que tiveram sua estrutura bidimensional e encaixe no sítio ativo de TcTS analisados, o que resultou na seleção de 23 moléculas com estruturas diversas, mas que tinham pelo menos um grupo carregado negativamente (sulfonamida ou carboxilato). Das 23 moléculas, 21 foram testadas com sucesso e quatro apresentaram inibição superior a 80% da atividade de TcTS.

Dentre essas, merece destaque o derivado sulfonamida **6** (figura 9), cujo valor de IC<sub>50</sub> obtido foi de 280µM.

Em outro estudo, KIM et al. (2009) sintetizou sulfonamidas derivadas de chalconas por meio da reação de condensação de Claisen-Shmidt. Todos os compostos sintetizados foram testados em TcTS, e os derivados 3,4-diidroxilados foram os mais potentes, com destaque para o composto **7** (Figura 9) com IC<sub>50</sub> de 0,9µM.



**Figura 9.** Estrutura química dos derivados sulfonamidas **6** e **7** com atividade inibidora de TcTS.

A atividade observada para os derivados **6** e **7** pode ser devido ao fato do grupo sulfonamida ser bioisóstero do ácido carboxílico, o qual está presente na estrutura química do ácido siálico. Dessa forma, o grupo sulfonamido seria capaz de mimetizar o ácido carboxílico do ácido siálico e interagir no sítio doador da enzima *trans*-sialidase, promovendo sua inibição.

Dessa forma, a descoberta de novos fármacos antichagásicos, mais seguros e eficazes, é de fundamental importância e depende de investigações de novos alvos moleculares. Neste sentido, diversos alvos terapêuticos entre os quais a enzima *trans*-sialidase vêm sendo utilizados em pesquisas para o desenvolvimento de novos compostos contra o *T. cruzi* (RIVERA et al., 2009)

#### 1.1.4 Alvos terapêuticos

A descoberta de novos alvos depende, em grande parte, da interpretação de informações contidas no genoma do parasita. Assim, o seu sequenciamento pode conduzir a um maior entendimento da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, como também interação parasita-hospedeiro e patologia das doenças (COURA; De CASTRO, 2002).

O seqüenciamento completo do genoma do *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener), mais da metade sendo constituído por seqüências repetidas, revelou 22 mil

genes que codificam proteínas. Estas seqüências incluem genes para uma superfamília de moléculas de superfície, incluindo *trans*-sialidases, proteases gp 63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs) (CLAYTON, 2010). 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 melhor caracterizado; as 223 unidades protéicas detectadas no genoma da TS são compostas de 15 genes capazes de codificar a enzima ativa (EL-SAYED, 2005).

Vários critérios devem ser considerados na seleção de potenciais inibidores. O alvo a ser explorado deve ser encontrado unicamente no parasita e, portanto, ausente na célula do hospedeiro; deve ser essencial para o desenvolvimento do parasita em algum dos estágios de seu ciclo replicativo. O uso de enzimas e metabólitos como alvos terapêuticos permite melhor investigação em termos mecanísticos e estruturais, além de contribuir significativamente para o planejamento racional de fármacos (FAIRLAMB, 1999).

Os alvos identificados que têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, entre elas destacam-se :

- **Tripanotonia redutase** (KRAUTH-SIEGEL; COOMBS, 1999), relacionada ao estresse oxidativo.
- ***trans*-Sialidase** (PREVIATO et al., 1995; HARRISON et al., 2001), envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- **C<sub>14</sub>D<sup>24,25</sup>-esterol metiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na biossíntese de ergosterol.
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase** (PAVÃO et al., 2002), presente na via glicolítica.
- **Cisteína proteases (Cruzipaína)** (RAMOS et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase** (ZUCCOTTO et al., 1999), responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina.

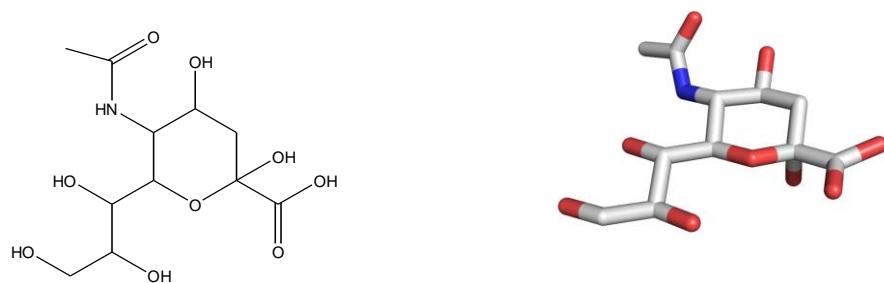
- **Prolil endopeptidase** (VENDEVILLE et al., 1999), envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- **DNA topoisomerase I e II** (MUELAS-SERRANO et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), enzimas essenciais que catalisam alterações topológicas na molécula de DNA. Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo do DNA, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação.
- **Farnesilpirofosfato sintase** (MUELAS-SERRANO et al., 2002), envolvida na biossíntese de uma variedade de esteróides e poliisoprenóides a partir de farnesilpirofosfato.

## 1.2 Trans-Sialidase

O parasita intracelular *T. cruzi* desenvolve uma enzima regulatória de superfície, denominada *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita; etapa inicial no processo de infecção (PREVIATO et al., 1995). A TcTS tem como seu principal substrato o ácido siálico, o qual está presente em glicoconjugados das células do hospedeiro e desempenha papel fundamental durante a invasão celular pelo parasita. *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 ligadas à sua membrana através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (COREY et al., 2002; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

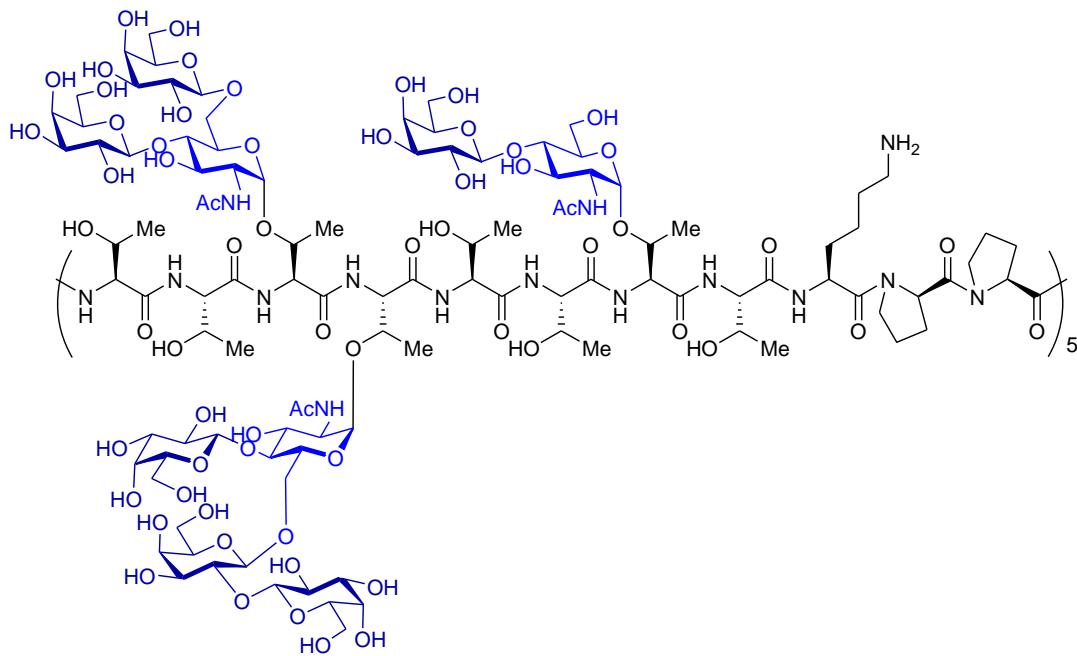
### 1.2.1 Ácido siálico e mucinas

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destaque para os ácidos siálicos, uma superfamília de carboidratos complexos de nove carbonos que ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos (ANGATA et al., 2002). O ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu-5-Ac) é o precursor biossintético de todos os derivados de ácido siálico (Figura 10) (DENINNO, 1991).

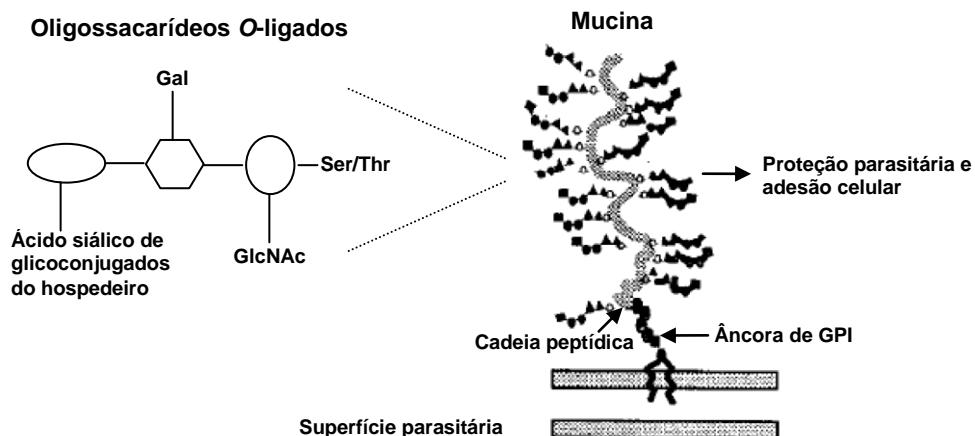


**Figura 10** - Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido *N*-acetil-neuramínico.

As glicoproteínas de mucina são moléculas multigalactosiladas, cujas unidades de galactose encontram-se ligadas, através de unidades de  $\alpha$ -*N*-acetil-glicosamina ( $\alpha$ GlcNAc), à cadeia peptídica com sequência rica em aminoácidos de Thr e Pro ( $\text{Thr}_8\text{LysPro}_2$ ) (Figuras 11 e 12) (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). As moléculas de mucina sialiladas, invisíveis à ação de proteases presentes na membrana plasmática de *T. cruzi*, estão envolvidas no processo de aderência e subsequente penetração do parasita nas células do hospedeiro (AGRELLOS et al., 2003; PREVIATO et al., 1995).



**Figura 11** - Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva  $\text{Thr}_8\text{LysPro}_2$ .



**Figura 12 -** Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi* acceptoras de ácido siálico.

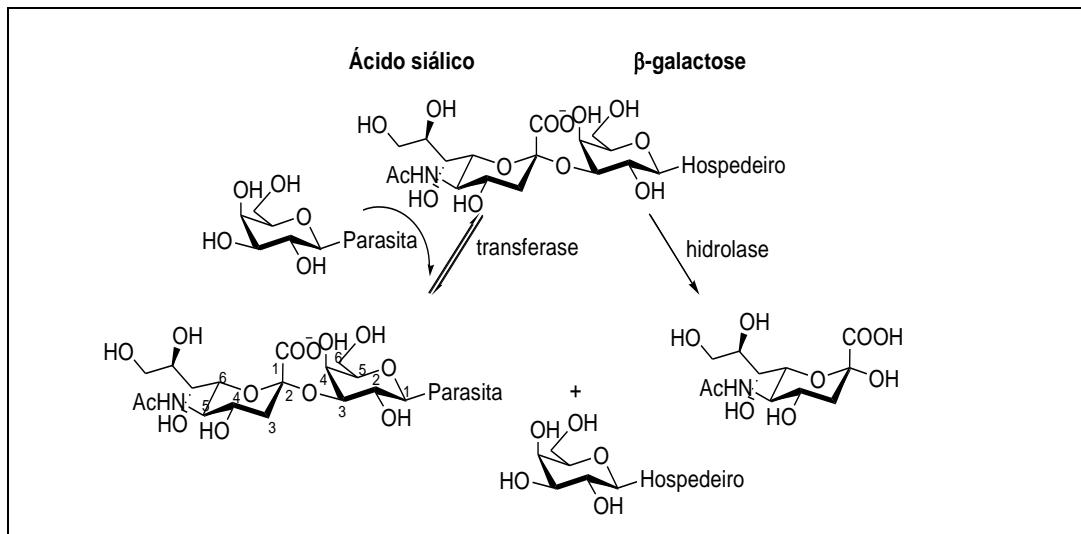
As moléculas de mucina de *T. cruzi* assemelham-se às de mamíferos, no entanto as unidades oligossacarídicas nos mamíferos estão ligadas à cadeia peptídica por unidades de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), e não  $\alpha$ -*N*-acetil-glicosamina ( $\alpha$ GlcNAc) (DI NOIA et al., 1996).

### 1.2.2 Atividade enzimática

A *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita. Esta enzima não utiliza ácido siálico livre, apenas transfere-o do hospedeiro para o parasita no sentido de controlar o nível de infecção (FRASCH et al., 1998).

A TcTS tem duas atividades: uma transferase e outra hidrolase. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações  $\alpha$ -2,3 com unidades de  $\beta$ -galactose acceptoras, na superfície do parasita (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000). Assim, TcTS é uma sialiltransferase *in vivo* e *in vitro* na presença de substratos adequados, como  $\beta$ -galactose terminal de glicoconjugados (Esquema 1) (PARODI et al., 1992).

Apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, a *trans*-sialidase também possui ação hidrolítica em ocasiões específicas de ausência de substratos acceptores (Esquema 1) (BUSCHIAZZO et al., 2002).



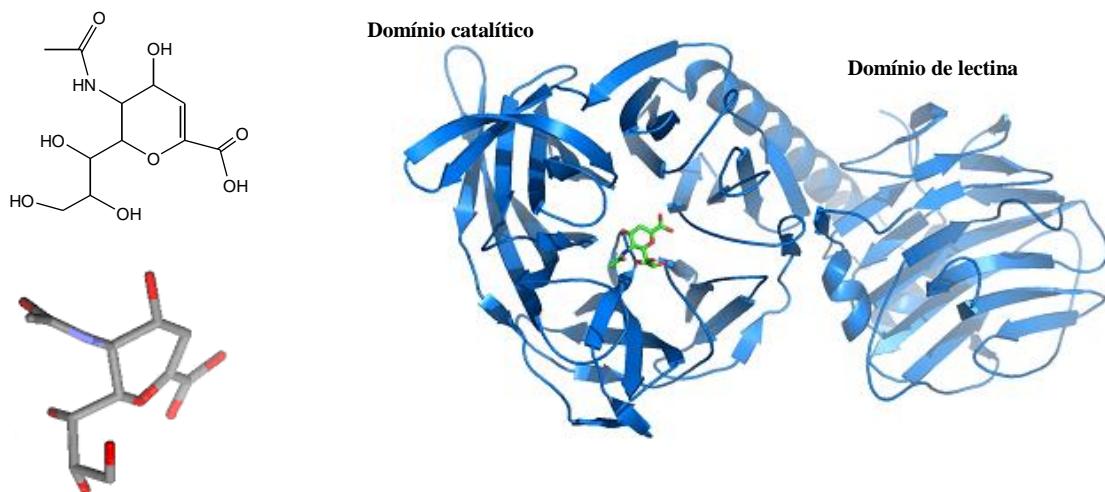
**Esquema 1** - Reação de transferência e hidrólise de ácido siálico catalisada pela *trans*-sialidase de *T. cruzi*.

### 1.2.3 Estrutura 3D de *trans*-Sialidase e mecanismo de ação

A enzima TcTS possui dois domínios distintos: um domínio catalítico-propulsor *N*-terminal (resíduos 1-371) estreitamente associado, através de uma longa α hélice (resíduos 372-394), ao domínio C-terminal de lectina (resíduos 395-632) (BUSCHIAZZO et al., 2002).

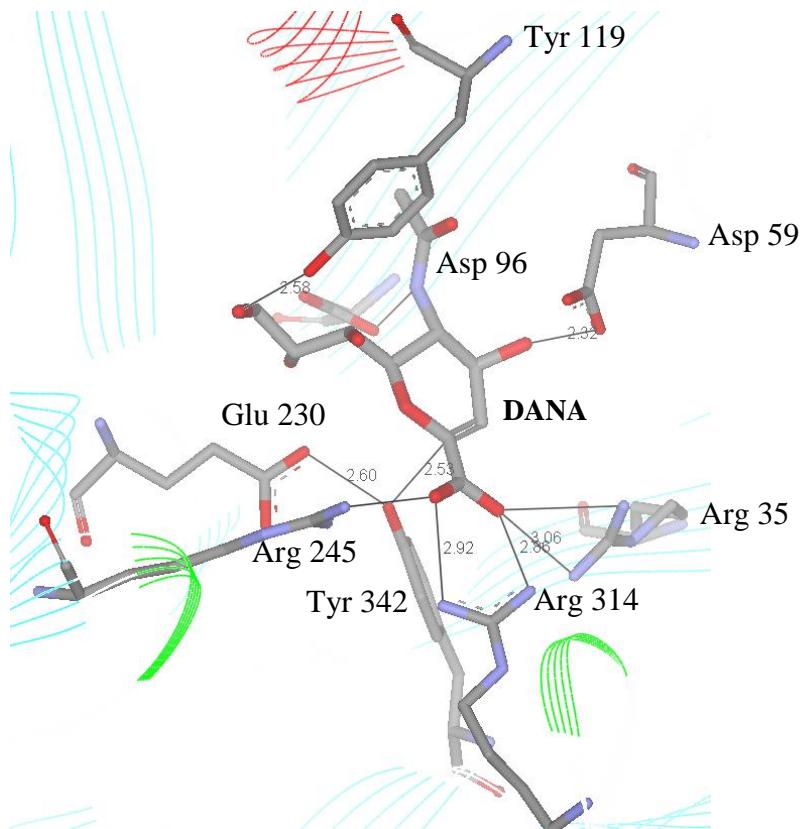
A estrutura de *trans*-sialidase de *T. cruzi* foi determinada a uma resolução de 1.6 Å e sua estrutura cristalográfica está disponível no PDB (“Protein Data Bank”) (AMAYA et al., 2003).

A Figura 13 mostra a estrutura unidimensional e tridimensional do inibidor DANA (2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil-ácido neuramínico), análogo de ácido siálico, e o complexo cristalográfico (código PDB: 1MS8) deste inibidor com a enzima TcTS.



**Figura 13** - Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS – DANA (Código PDB: 1MS8).

Dentre as interações entre TcTS e DANA, podemos destacar: uma tríade de aminoácidos Arg (Arg35, Arg245 e Arg314) que se liga ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico, um resíduo de ácido aspártico (Asp59), essencial para a atividade catalítica, e dois resíduos (Tyr342 e Glu230) na porção inferior do sítio ativo, os quais estão adequadamente posicionados para estabilizar os estados de transição (Figura 14) (NERES et al., 2008).



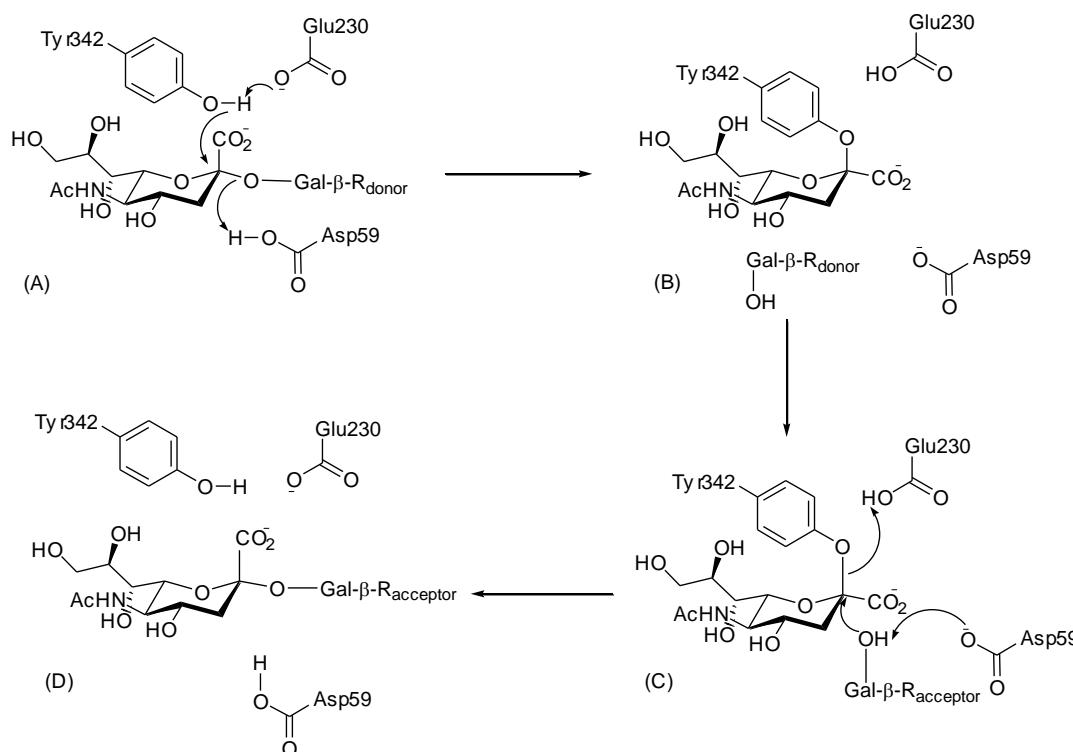
**Figura 14 - Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB.**

As principais funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS, fundamentais para o processo de transglicosilação estão resumidas na Tabela 1 (BUSCHIAZZO et al., 2002).

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

<b>Principais aminoácidos presentes no sítio catalítico de TcTS</b>	<b>Funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS no processo de transglicosilação</b>
Tríade de Arg: Arg35, Arg245 e Arg314	Ligam-se ao grupo carboxilato de ácido siálico.
Glu357	Estabiliza o resíduo de Arg35.
Asp59	É essencial para a catálise: realiza ligação de hidrogênio com 4-OH de ácido siálico e 3-OH de galactose.
Tyr342 e Glu230	Localizados na região inferior do sítio catalítico, estabilizam o estado de transição da reação de transglicosilação.
Val95, Leu176 e Trp120	Presentes na cavidade hidrofóbica, acomodam o grupo N-acetil.
Tyr119 e Tyr248	Estes resíduos, juntamente com os resíduos Trp120, Val203 e Trp312, definem o ambiente hidrofóbico que contribui para a exclusão de água do centro reacional, favorecendo a trans-glicosilação. Tyr119 também realiza ligação de hidrogênio com o resíduo de glicerol do ligante.
Pro283	Importante na transglicosilação em experimentos prévios de mutagênese.
Asp96	Sua orientação no sítio catalítico afeta a posição precisa de ácido siálico, pois interage com a porção glicerol.

A enzima TcTS catalisa a reação de transglicosilação por meio de um mecanismo conhecido como duplo-deslocamento (“ping pong”), tendo em vista que a ligação de lactose (substrato aceptor contendo galactose) ao sítio ativo enzimático ocorre somente após a entrada da molécula de ácido siálico (substrato doador) (Esquema 2). Após ligação do substrato doador de ácido siálico, o grupo hidroxilico de Tyr342, com assistência de Glu230 atuando como base, realiza ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (A), com deslocamento do grupo abandonador protonado e formação do intermediário TcTS-sialosídeo (B). Posteriormente, o grupo hidroxila 3-OH da molécula aceptor de lactose, na presença do resíduo Asp59 como base, realiza um segundo ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (C), resultando em retenção de configuração da molécula de ácido siálico (D) (NERES et al., 2008).



**Esquema 2 - Mecanismo da reação de transglicosilação catalisada por TcTS.**

#### 1.2.4 Inibidores de *trans-Sialidase de T. Cruzi*

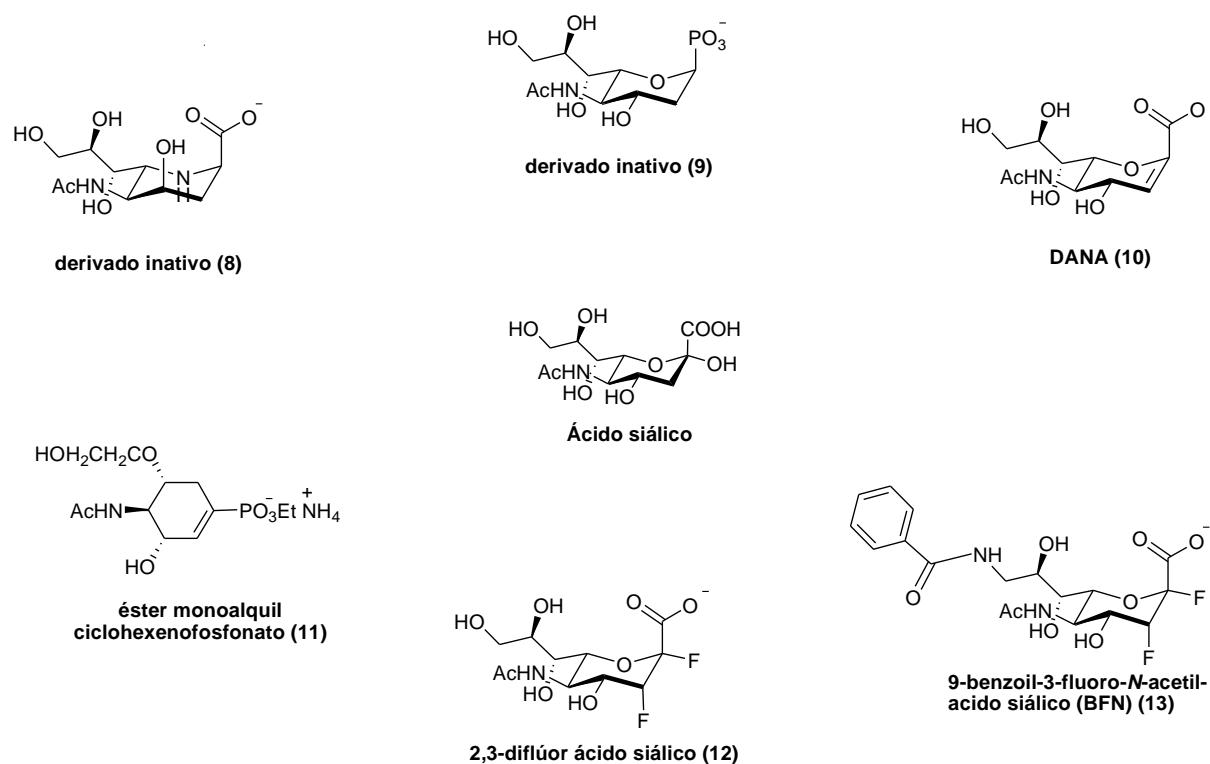
Apesar da importância de TcTS para a patogênese da doença de Chagas, sua inibição ainda é um desafio. Considerando a estrutura cristalográfica de TcTS, a maioria de seus inibidores foi classificada de acordo com a região do sítio ativo onde

eles se ligam, ou seja, sítio de ligação de ácido siálico (doador) e sítio de ligação de  $\beta$ -galactose (aceptor).

Assim os inibidores de TcTS são agrupados em três categorias: i) miméticos de substrato doador (ácido siálico), que se ligam na região do substrato doador, ii) miméticos de substratos aceitores (*lactose* e *galactose*), que se ligam na região do substrato aceitor e iii) miméticos do estado de transição (Esquema 2), que se ligam em ambas as regiões do sítio ativo (NERES et al., 2009).

#### 1.2.4.1 Inibidores miméticos de substrato doador

Dentre as estratégias utilizadas na busca de novos inibidores específicos de TcTS, houve predominância significativa no uso do bioisosterismo como método de modificação molecular na estrutura do ácido siálico (Figura 15) (MOREIRA et al., 2009).



**Figura 15 - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico**

De início, o átomo de oxigênio do anel pirano da estrutura de ácido siálico foi substituído por um átomo de nitrogênio ou o grupo carboxila foi substituído por grupo fosfato, porém essas modificações resultaram em moléculas inativas (**8** e **9**) frente TcTS. Num segundo momento foi considerada a estrutura do estado de transição de reações do ácido siálico, levando à síntese do derivado **10** (DANA) (Ki 12,3 mM) através da restrição conformacional do anel pirano e manutenção do farmacóforo básico (MOREIRA et al., 2009). Apesar de ser um potente inibidor de neuraminidase de influenza, DANA apresentou fraca inibição de TcTS.

Outra abordagem importante foi substituir o anel pirano presente no ácido siálico por cicloexeno com simultânea mudança do grupo carboxila por fosfato, molécula **11** ( $IC_{50}$  5,0 mM), que apresentou melhor atividade que o DANA (STREICHER; BUSSE, 2006). Também foi utilizada a estratégia de fluorinação do ácido siálico, que levou à síntese de derivados de ácido siálico 2,3 difluorados (**12** e **13**) que inibiram a enzima TcTS de forma tempo-dependente. No entanto, para completa inativação, houve necessidade de concentrações muito elevadas dos inibidores (20,0 mM) (BUCHINI et al., 2008 ;WATTS et al., 2003).

Ferrero-Garcia et al. investigaram estruturas não relacionadas com carboidratos (Figura 16), e como resultado desse trabalho foi obtido do composto **14** (piridoxal 5'-fosfato) (Ki 7,3 mM) (FERRERO-GARCIA et al., 1993). Posteriormente, Neres et al. sintetizaram os derivados de ácido benzóico **15** ( $IC_{50}$  0,54 mM) e de piridina **16** ( $IC_{50}$  0,44 mM), que apresentaram atividade inibitória moderada (NERES et al., 2007).



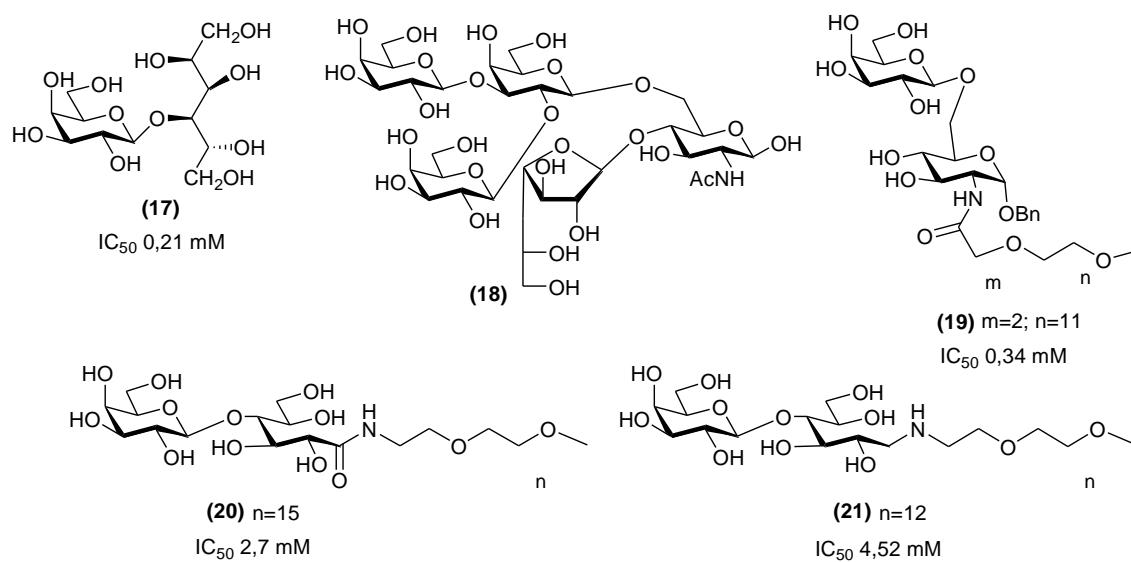
**Figura 16** - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico não relacionados com carboidratos.

### 1.2.4.2 Inibidores miméticos de substratos aceptores

O Lactitol **17** (Figura 17) foi o melhor inibidor análogo de lactose descoberto até o momento, com  $IC_{50}$  de 0,21 mM. No entanto, ele não inibe a atividade catalítica de TcTS, atuando somente como um acceptor preferencial de ácido siálico (AGUSTI et al., 2004).

Oligossacarídeos de aldítóis, tais como tetra- e pentassacarídeo aldítóis, contendo uma unidade externa de galactofuranose **18** (Figura 17) também foram sintetizados por Agusti e colaboradores como potenciais substratos para a transferência de ácido siálico, inibindo a transferência de ácido siálico para o substrato acceptor *N*-acetillactosamina com valores de  $IC_{50}$  entre 0,6 e 4,0 mM (AGUSTI et al., 2007).

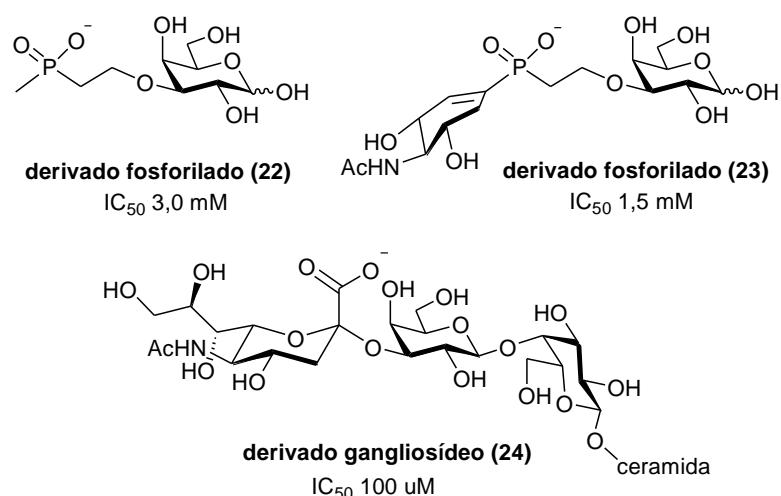
Tendo em vista que compostos ativos tais como lactitol apresentaram baixa meia-vida plasmática devido à elevada excreção renal ou inativação por enzimas plasmáticas, foi realizada conjugação de derivados de lactose com polietileno glicol (PEG) visando ao aumento da biodisponibilidade. Desta forma, o composto **19** apresentou a maior taxa de inibição de transferência (82%), com  $IC_{50}$  de 0,34 mM, enquanto os derivados **20** e **21** apresentaram somente 21% ( $IC_{50}$  2,7 mM) e 3,5% ( $IC_{50}$  4,52 mM) de inibição, respectivamente (EUGENIA-GIORGI et al., 2010).



**Figura 17** - Derivados miméticos de substratos aceptores de ácido siálico.

### 1.2.4.3 Inibidores miméticos do estado de transição

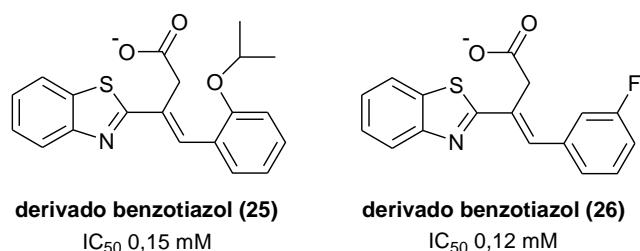
Dentre os inibidores planejados para ocupar ambas as regiões do sítio ativo de TcTS (Figura 18), destacam-se os derivados fosforilados de galactose **22** ( $IC_{50}$  3,0 mM) e **23** ( $IC_{50}$  1,5 mM) e o derivado de gangliosídeo **24** ( $IC_{50}$  na ordem de 100  $\mu$ M) (BUSSE et al., 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 1992).



**Figura 18** - Estruturas de derivados miméticos do estado de transição de TcTS.

Devido a esses resultados, a literatura sugere que a melhor estratégia para inibir a enzima deva envolver estruturas que ocupem tanto o sítio ativo doador quanto o sítio ativo acceptor de ácido siálico, representando os inibidores do estado de transição (NERES et al., 2009).

Neres e colaboradores relataram a descoberta de inibidores ativos de TcTS aplicando estratégia de *screening* virtual a partir de bibliotecas de compostos comercialmente disponíveis, considerando as interações destes compostos com o sítio ativo de TcTS. As maiores atividades encontradas são atribuídas aos compostos **25** ( $IC_{50}$  0,15 mM) e **26** ( $IC_{50}$  0,12 mM) (Figura 19) (NERES et al., 2009).

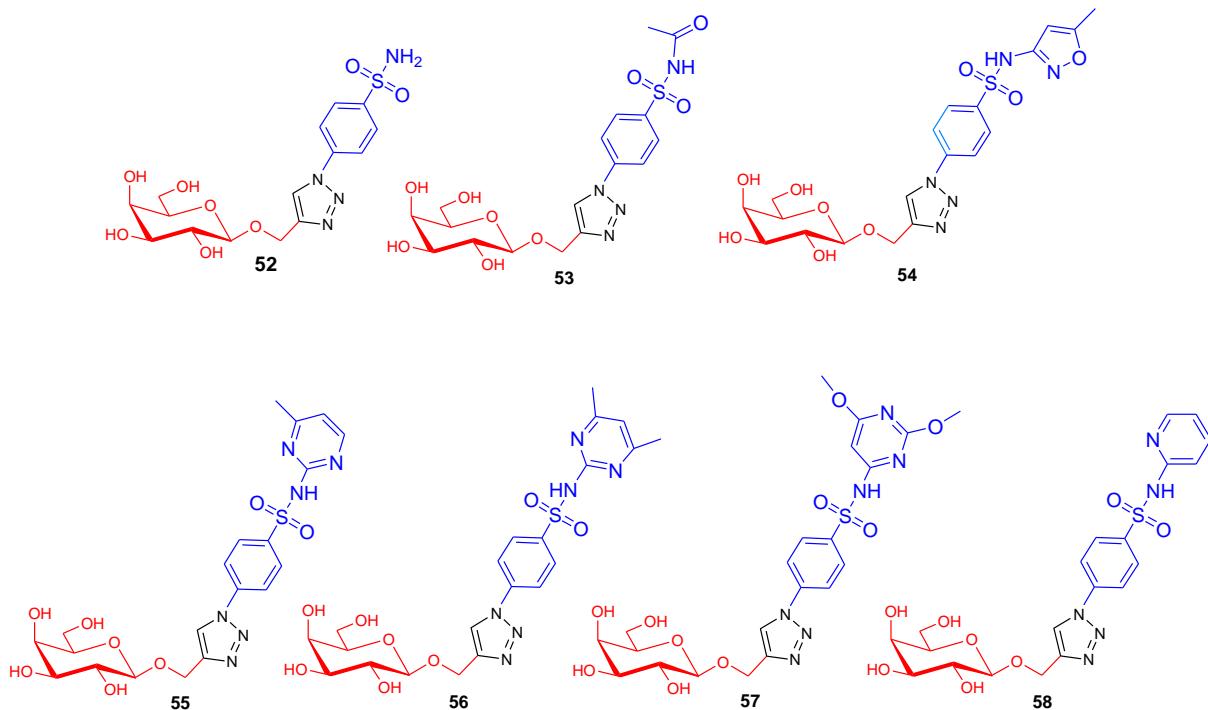


**Figura 19** - Estruturas de derivados benzotiazol miméticos do transição de TcTS.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto envolvem:

i) síntese de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi*, obtidos pela reação de ciclo-adição azido-alcino catalisada por Cu(I). O grupo galactosila (em vermelho) se ligaria à região do sítio acceptora de ácido siálico e o grupo benzenossulfonamida (em azul) se ligaria à região do sítio doadora de ácido siálico. O grupo sulfonamido livre (**52**) ou substituídos por diferentes grupos heterocíclicos (**53-58**) serão sintetizados com o propósito de investigar possíveis influências da propriedade sacadora de elétrons destes núcleos sobre o pKa dos produtos, a exemplo do que é observado na classe das sulfas antibacterianas. Ambos os grupos galactosila e benzenossulfonamida serão unidos pelo grupo triazol (em preto) para atuar como ponte de ligação estável e rígida entre os grupos galactosila e benzenossulfonamida, com propriedade de realizar possível interação com alvo biológico como acceptor de ligação de hidrogênio (Figura 20).



**Figura 20.** Estrutura dos produtos propostos como potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi*.

- ii) ensaio de inibição da enzima *trans*-sialidase com os produtos **52-58**.
- iii) ensaio de atividade tripanocida e citotóxica com os produtos **52-58**.

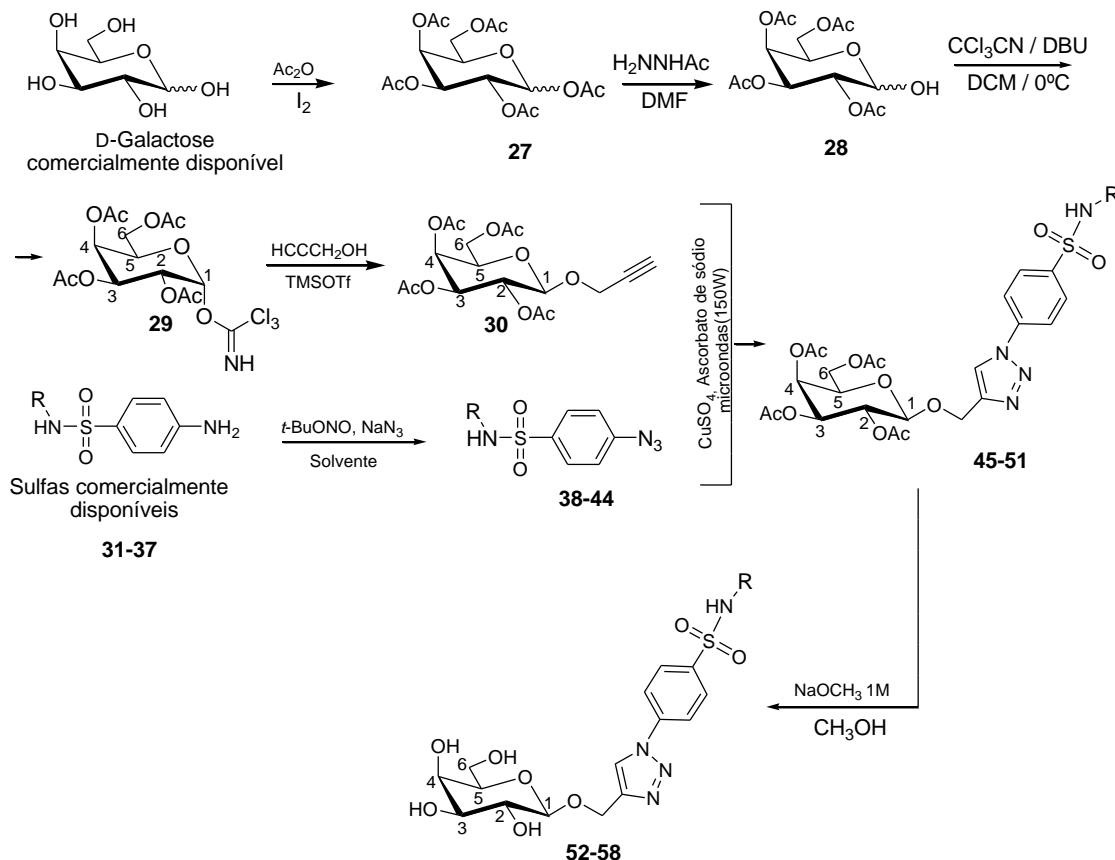
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão deste trabalho foi dividida em duas partes principais. Na primeira parte é descrita a síntese dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas obtidos pela reação de cicloadição azido-alcino catalisada por Cu(I), (CuAAC: “copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition”). A segunda parte está relacionada ao ensaio de inibição de TcTS e ao ensaio de atividade tripanocida e citotóxico.

#### 3.1 Síntese

##### 3.1.1 Estratégia sintética

Para alcançar os objetivos propostos no projeto foi elaborada uma rota sintética convergente partindo de compostos comercialmente disponíveis (Esquema 3).



**Esquema 3.** Rota sintética proposta para preparação dos potenciais inibidores de TcTS.

A estratégia sintética adotada para obtenção dos potenciais inibidores de TcTS **52-58** envolve a reação de ciclo-adição alcino-azido 1,3-dipolar catalisada por cobre (CuAAC), “Click Chemistry”, entre o derivado de galactose contendo o alcino terminal (**30**) e os derivados aril azidas com diferentes substituintes R **38-44** (Esquema 3).

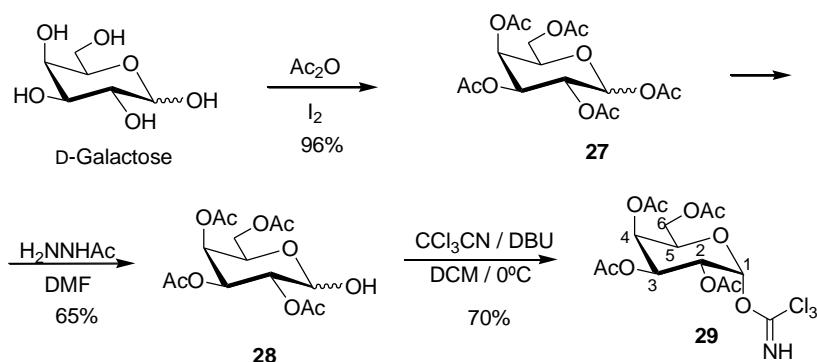
A seguir, cada etapa dessa rota será detalhada para um melhor entendimento e compreensão das reações realizadas.

### 3.1.2 Síntese regiosseletiva para obtenção do intermediário doador de galactose

Doadores glicosídicos são açúcares que apresentam grupos abandonadores ligados ao carbono anomérico (C-1), permitindo o ataque de um nucleófilo devidamente funcionalizado. Dentre os grupos abandonadores mais comuns podem ser citados os haletos, acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos. (JACOBSSON et al., 2006).

Nos últimos anos, o emprego do doador tricloroacetimidato cresceu e algumas vantagens podem ser citadas para justificar o interesse desse doador no estudo: (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. (WELL et al., 2006).

Portanto, a primeira parte do estudo teve como objetivo a preparação do monossacarídeo doador de galactose (**29**) em três etapas (Esquema 4).

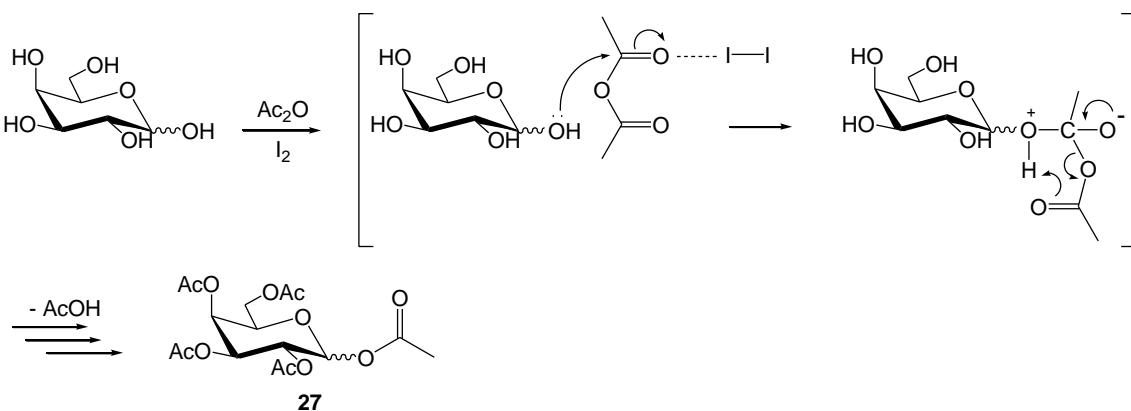


**Esquema 4.** Etapas da síntese do monossacarídeo doador de galactose **29**.

A rota foi iniciada com a per-O-acetilação do açúcar D-galactose em anidrido acético (solvente e reagente) e iodo para obtenção do derivado 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-galactopiranose (**27**) (KARTHA; FIELD, 1997).

Reações de acetilação são realizadas na presença de vários tipos de catalisadores, dentre os mais comuns temos piridina, acetato de sódio e iodo. A piridina é o catalisador mais empregado, no entanto, apresenta alta toxicidade, odor desagradável e é utilizado em grande quantidade, uma vez que também é o solvente da reação.

Para solucionar esse problema, as reações podem ser realizadas 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 (KARTHA; FIELD, 1997), como mostrado no mecanismo proposto no esquema 5.

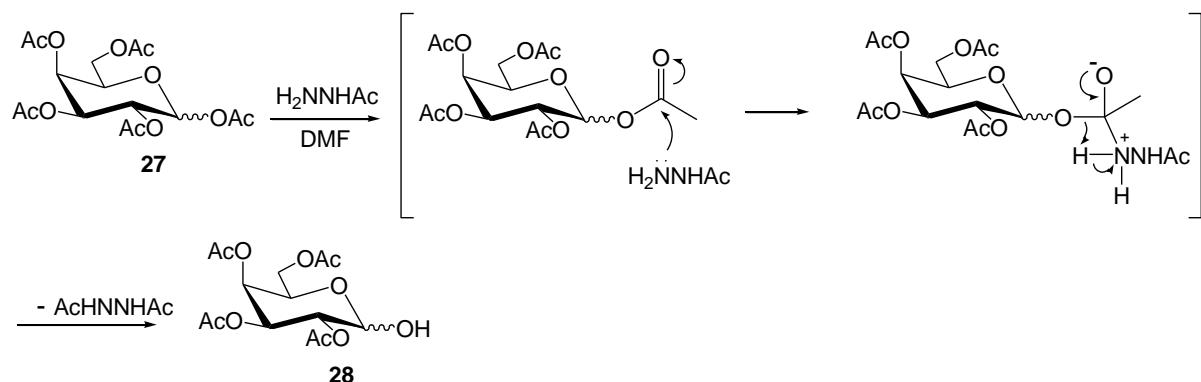


**Esquema 5.** Mecanismo proposto para per-O-acetilação de D-(+)-galactose

O procedimento levou à preparação do composto **27** com rendimento de 96%. A estrutura foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  que indicou 5 simpletos integrando para 15 hidrogênios na região de 2 ppm, característico de  $\text{CH}_3$  do grupo acetila.

Na sequência, o composto **27** foi tratado com acetato de hidrazina em DMF, com objetivo de remover seletivamente o grupo acetila da posição anomérica para obtenção de 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopiranose (**28**). Após purificação por cromatografia Flash em Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 18 mL/min; solvente: hexano/AcOEt; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)], o composto **28** foi obtido com 65 % de rendimento. O rendimento desta reação foi considerado satisfatório tendo em vista os resultados apresentados pela literatura (80%) (REN et al., 2001).

Evidências sugerem que o grupo amino livre do acetato de hidrazina atue como um nucleófilo e ataque o carbono carbonílico do grupo acetil da posição anomérica para formar o composto **28** e gerar também diacetato de hidrazina (Esquema 6).



**Esquema 6.** Mecanismo proposto para obtenção do composto **28**

A estrutura foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$ , que indicou 4 simples inteiros para 12 hidrogênios na região 2 ppm, característico de  $\text{CH}_3$  do grupo acetila. Adicionalmente, o espectro na região do infravermelho apresentou uma banda em 3485 cm $^{-1}$ , característica do grupo hidroxila.

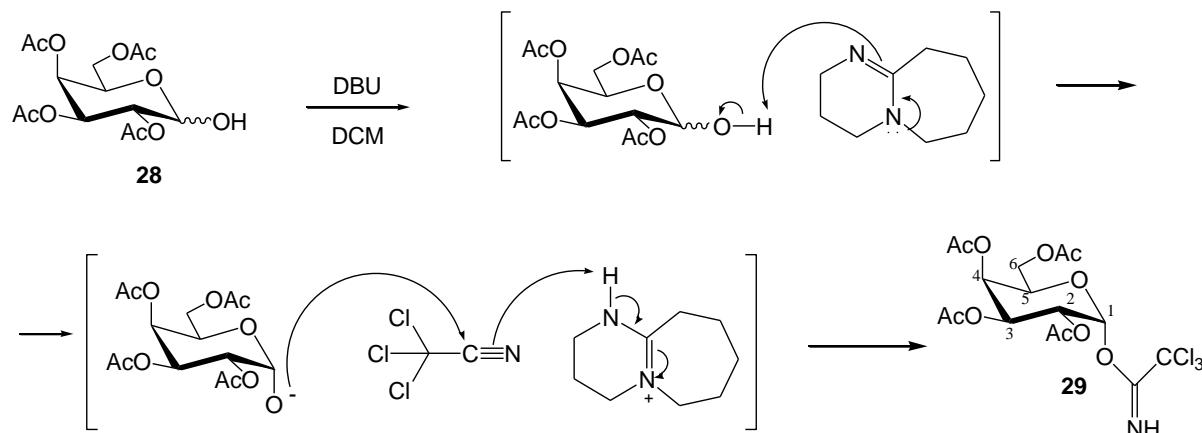
A última etapa dessa rota sintética envolveu ativação da posição anomérica com um bom grupo abandonador. A reação do grupo hidroxila da posição anomérica (catalisada por base) com nitrilas elétron-deficientes, como tricloroacetonitrilas e trifluoracetonitrilas, é um método muito conveniente para introduzir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

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 **29** com o grupo abandonador em posição  $\alpha$  permitirá que a ligação glicosídica com o acceptor seja na posição  $\beta$  (ataque pela face oposta ao grupo abandonador), fator importante para reconhecimento da enzima *trans*-sialidase.

Sendo assim, o procedimento escolhido levou à obtenção do 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopiranosila tricloroacetimidato (**29**) com rendimento de 70%. (CHENG et al., 2005). Este composto foi obtido após purificação por cromatografia Flash em Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 20 mL/min; solvente: hexano/AcOEt; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)].

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 2) apresentou um simpleto em 8,66 ppm que corresponde ao sinal do imidato ( $\text{NH}$ ) e um duploto em 6,60 ppm que corresponde ao H-1, com  $J_{1,2}$  3,6 Hz, acoplamento típico de H equatorial. A ausência de duploto com valor de  $J$  de aproximadamente 8,0 Hz, caraceterístico de H-1 axial, levou à conclusão de que apenas o anômero  $\alpha$  havia sido obtido. A formação de apenas o isômero  $\alpha$  é devido a hiperconjugação e a repulsão eletrônica. Em relação a hiperconjugação é proposto que ocorre a deslocalização de um par de elétrons do átomo de oxigênio (O-5) para o orbital antiligante não ocupado em C-1, favorecendo a posição axial. Já em relação repulsão eletrônica, é proposto que ocorre repulsão entre os pares de elétrons isolados do O-5 e O-1; além disso, em axial os vetores do momento dipolo ficam opostos, representando um sistema energeticamente favorecido.

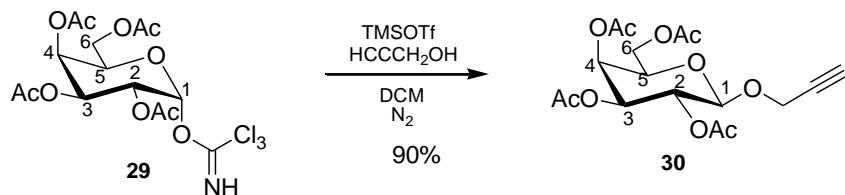
Em relação ao mecanismo dessa reação, acredita-se que DBU (base forte) retire o próton da hidroxila anomérica para formar o alcóxido, facilitando o ataque ao reagente tricloroacetonitrila (Esquema 7).



**Esquema 7.** Mecanismo proposto para obtenção do composto **29**

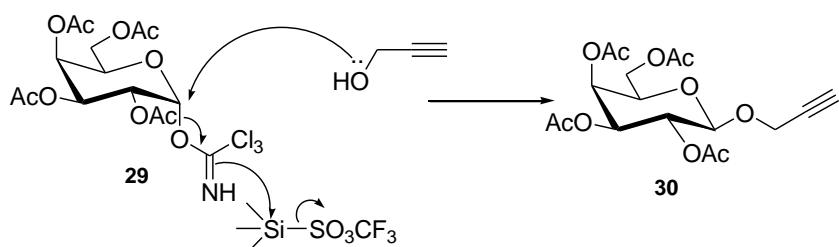
### 3.1.3 Síntese de derivado de galactose contendo a função alcino terminal

Nesta etapa, o composto **29** foi tratado com álcool propargílico e TMSOTf, fornecendo o produto 2'-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**30**) com rendimento de 90% (Esquema 8). (MUTHANA et al., 2007).



**Esquema 8.** Síntese do derivado de galactose contendo o grupo alcino terminal.

Em relação ao mecanismo, acredita-se que o promotor TMSOTf (ácido de Lewis) facilite a saída do grupo abandonador tricloroacetimidato no momento em que o álcool propargílico (nucleófilo) ataca a posição anomérica, como indicado no esquema 9.

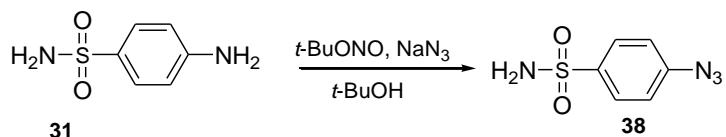


**Esquema 9.** Mecanismo proposto para obtenção do composto **30**

Este composto foi obtido após purificação por cromatografia Flash em Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 20 mL/min; solvente: hexano/acetato de etila; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)]. A estrutura foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 3), que indicou 1 triplete em 2,46 ppm, o qual corresponde ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono sp do alcino ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ). A presença de H-1 (dupletô em 4,74 ppm) com  $J_{1,2}$  8,0 Hz confirma a estrutura como 100 %  $\beta$ .

### **3.1.4 Síntese de derivados aril azidas**

O método inicialmente adotado para a síntese das azidas aromáticas, descrito por DAS e colaboradores, consiste no tratamento de aril aminas com azida de sódio e nitrito de *terc*-butila (*t*-BuONO) em álcool *terc*-butílico, conforme o esquema 10. (DAS et al., 2005)

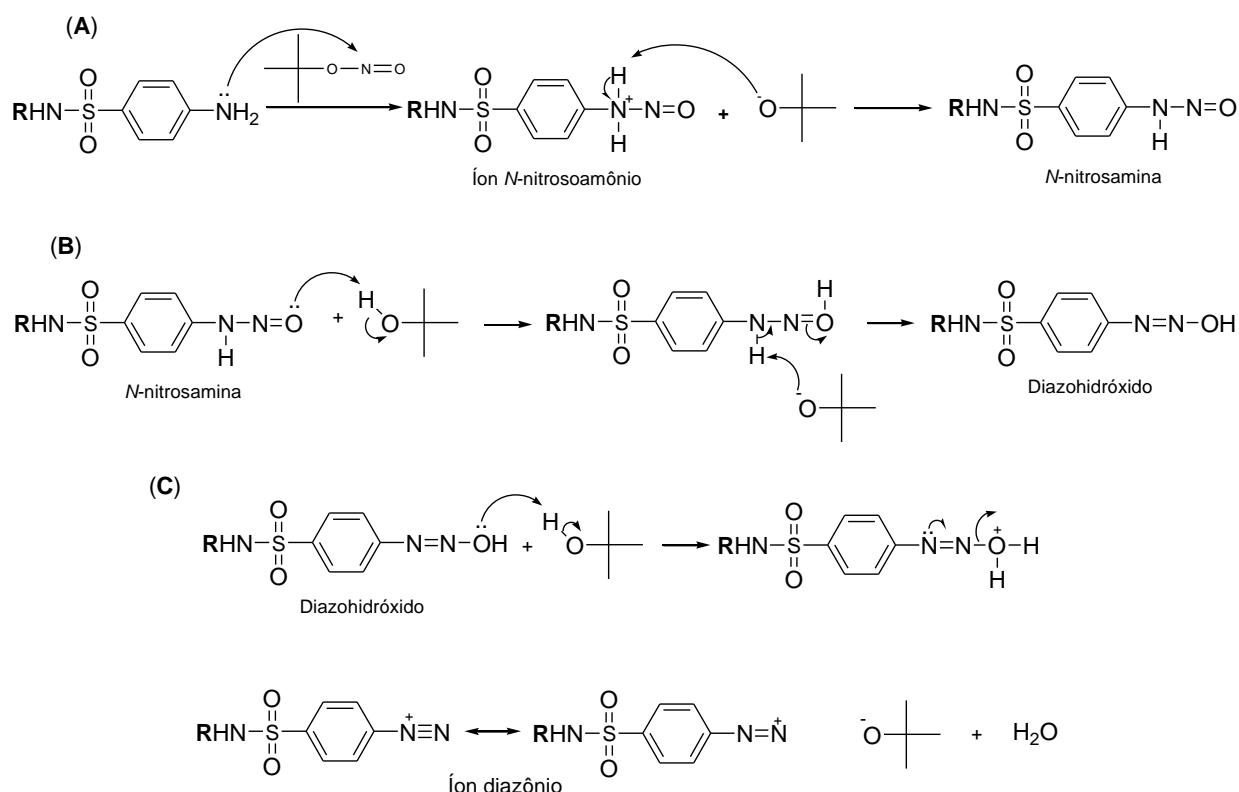


**Esquema 10.** Síntese do derivado aril azida 38

O mecanismo geral proposto de síntese das azidas aromáticas consiste na geração do íon diazônio *in situ*, processo denominado de diazotação (esquema 11), e posteriormente na reação direta entre o íon diazônio e o íon azida, sem a necessidade de catalisadores (esquema 12).

### **3.1.4.1 Diazotação**

Inicialmente, o nitrogênio da amina promove um ataque nucleófílico ao nitrogênio do *t*-BuONO, o qual atua como doador de NO. Em seguida, ocorre a formação de um íon *N*-nitrosoamônio instável como um intermediário. Este intermediário perde um próton para o alcóxido formado, gerando uma *N*-nitrosamina (A), que após reação ácido-base gera diazohidróxido (B). Por fim, em uma nova reação ácido-base, o diazohidróxido perde água para formar o íon diazônio (C) (Esquema 11).

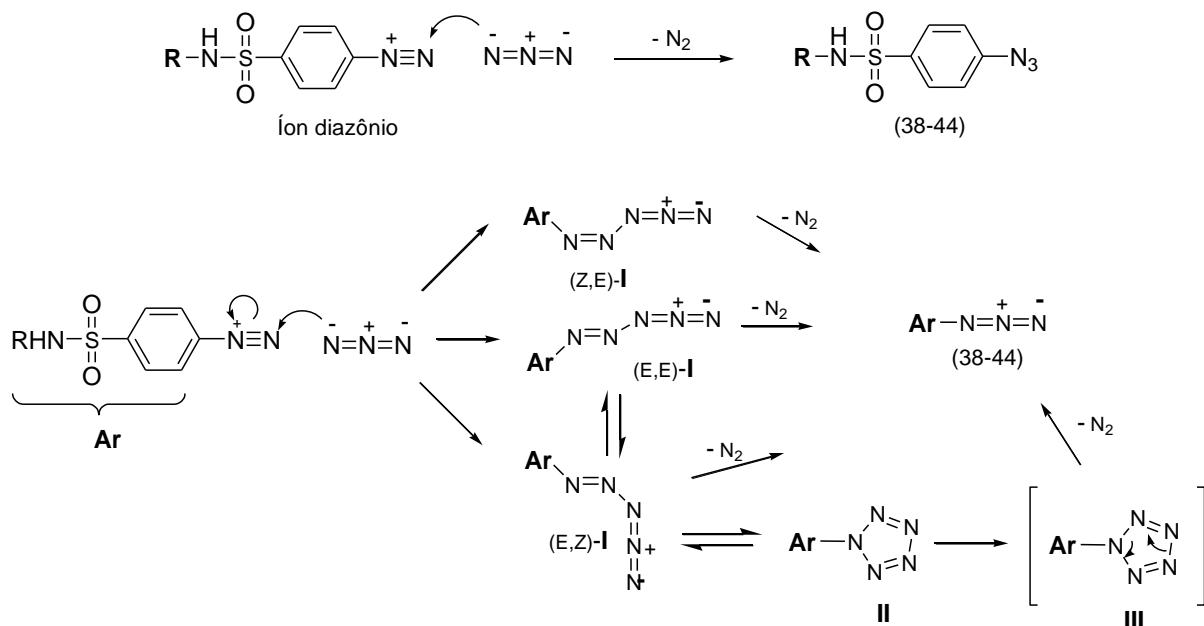


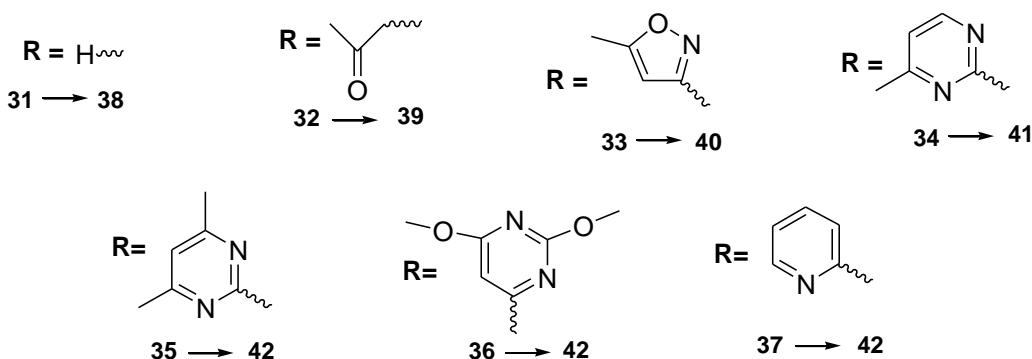
**Esquema 11.** Formação do íon diazônio como etapa intermediária na síntese de derivados aril azidas

### 3.1.4.2 Aril azidas a partir de compostos de Diazônio

O derivado aromático com íon diazônio gerado na etapa anterior é atacado pelo íon azida, obtendo assim os derivados aril azidas (Esquema 12).

O mecanismo reacional proposto têm sido objeto de polêmicas discussões desde a sua descoberta, no entanto, há consenso que ocorre a formação de intermediários pentazenos e pentazóis, que após perderem N<sub>2</sub> geram o derivado aril azida. Estudos envolvendo RMN <sup>1</sup>H e <sup>14</sup>N estabeleceram que três isômeros aril pentazenos, (Z,E)-I e (E,E)-I, (E,Z)-I, que podem estar em equilíbrio, são gerados pelo ataque do íon azida ao átomo de nitrogênio do íon diazônio. Sendo assim, é proposto um mecanismo para cada isômero aril pentzeno formado. O isômero (Z,E)-I forma o derivado aril azida direto pela clivagem da ligação N-N, sem rearranjar no isômero (E,E)-I. O isômero (E,E)-I pode gerar o derivado aril azida direto, assim como o isômero (Z,E)-I, ou pode rearranjar no isômero (E,Z)-I. O isômero (E,Z)-I após uma ciclo-adição forma um aril pentazol (II), que após uma eletro-ciclagem (III) libera N<sub>2</sub>, formando o derivado aril azida. O intermediário isômero (Z,E)-I é o mais favorecido em termos estereos e eletrônicos (BRASE et. al., 2005) (Esquema 12).



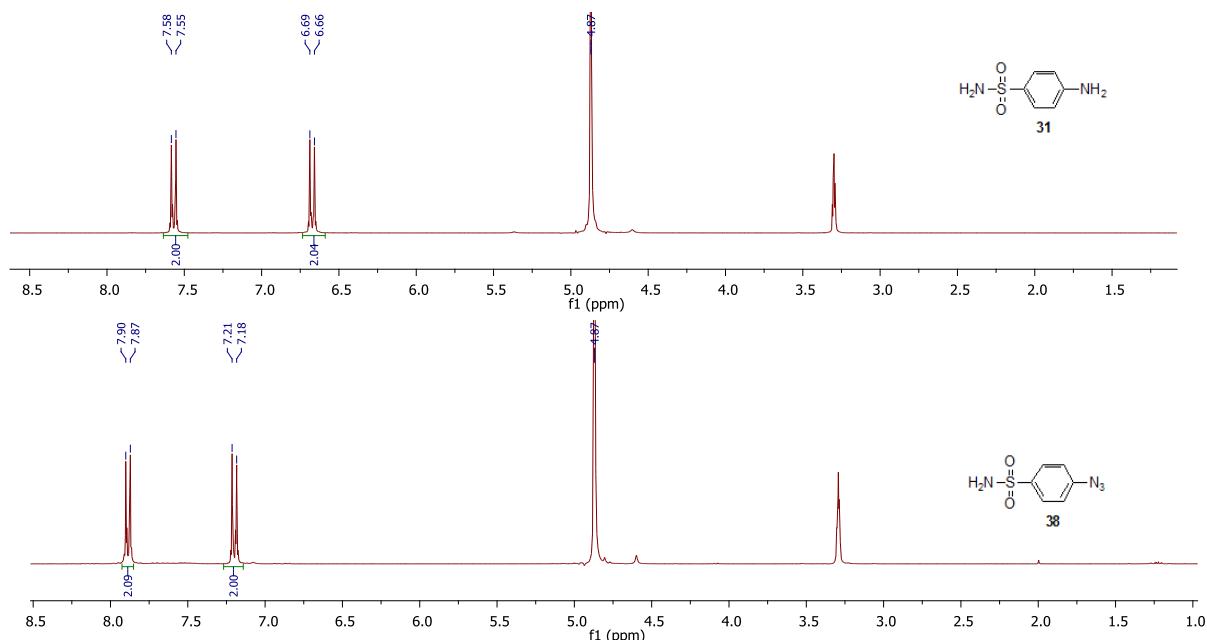


**Esquema 12.** Formação de aril azidas a partir de compostos de diazônio

As reações de síntese dos derivados aril azidas foram realizadas em aparelho de radiação de micro-ondas (150W) e o método de síntese empregado para cada derivado aril azida ficou estabelecido após algumas tentativas de otimização com o objetivo de aumentar os rendimentos obtidos.

Para a síntese dos derivados aril azidas **38-44** foram utilizados os compostos comercialmente disponíveis: sulfanilamina (**31**), sulfacetamida (**32**), sulfametoxazol (**33**), sulfamerazina (**34**), sulfametazina (**35**), sulfadimetoxina (**36**) e sulfapiridina (**37**).

O procedimento sintético inicialmente adotado e descrito na literatura levou à preparação do composto **38** com rendimento de 86%, superior ao relatado por Das e colaboradores, de 61% (DAS *et al.*, 2005). O rendimento superior pode ser explicado pelo emprego de radiação por micro-ondas (60°C em 35 min), ao invés de aquecimento convencional. A estrutura de **38** foi confirmada pelo espectro de infravermelho (Anexo 5.1), que apresentou uma banda em 2097 cm<sup>-1</sup>, característica do grupo azido. Adicionalmente, quando comparado o espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **38** (Anexo 5) com o de seu precursor sulfanilamina (**31**) (Anexo 4), foi constatado que houve um deslocamento dos sinais dos hidrogênios aromáticos para uma região mais desblindada em função da influência do grupo azido (Figura 21).



**Figura 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do precursor (31) e de seu derivado azido 38 em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

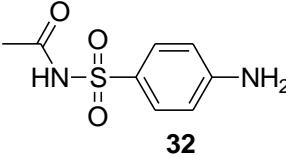
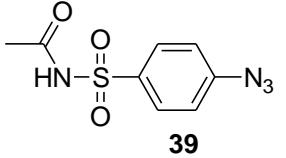
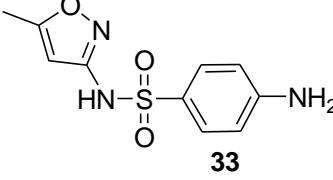
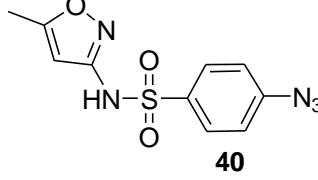
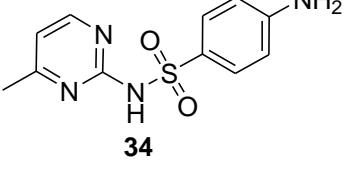
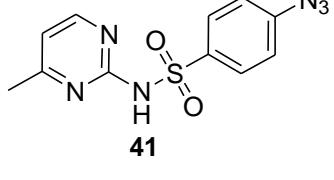
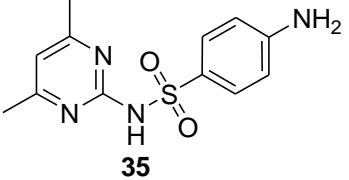
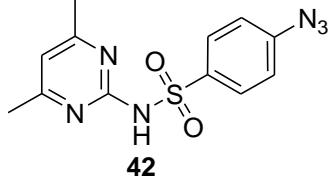
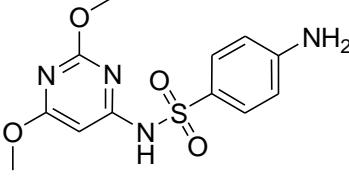
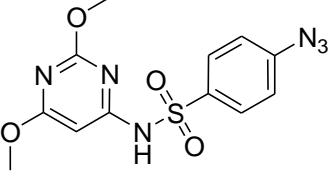
As reações de síntese dos compostos **39-41** a partir dos precursores **32-34** não ocorreram conforme o esperado, possivelmente devido à insolubilidade desses precursores no solvente utilizado na reação, o álcool *terc*-butílico. Sendo assim, a alternativa inicialmente adotada foi a substituição do solvente reacional por DMF. Desta forma, as reações com os precursores **32-34** foram realizadas em DMF e acompanhadas por CCD [hexano: acetato de etila 4:6 (v:v)]. No entanto, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  mostraram a presença de subproduto na reação, comprovado por CCD [hexano: acetato de etila 8:2 (v:v)], a qual mostrou a presença de dois compostos na placa cromatográfica. A mistura reacional foi purificada por cromatografia Flash em Biotage [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: hexano/AcOEt; gradiente: 0-10% e 10-10% (v:v)], e os produtos **39-41** foram obtidos em rendimentos inferiores a 10%.

Na busca de melhores rendimento outros solventes como acetona, acetonitrila, dioxano e THF foram testados (ZHANG, MOSES, 2009). No entanto não se observou a formação do produto desejado utilizando acetona como solvente reacional e, quando os solventes empregados foram acetonitrila, dioxano e THF, os produtos foram obtidos apenas em baixos rendimentos, de forma semelhante àquela anteriormente obtida com o uso de DMF.

Nova revisão da literatura (BARRAL, MOORHOUSE, MOSES, 2007; ZHANG, MOSES, 2009), permitiu que novos experimentos fossem realizados empregando os

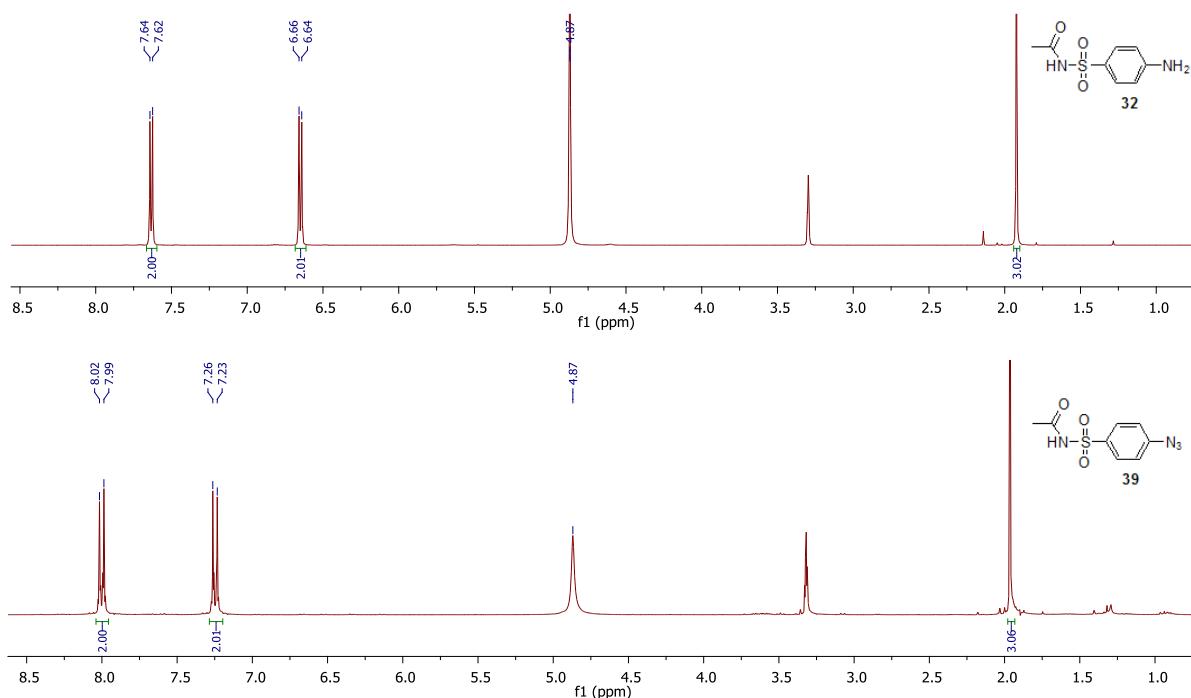
mesmos solventes anteriores, mas reduzindo a proporção do reagente *t*-BuONO para 4 equivalentes ao invés de 6 a 12 equivalentes. Sendo assim, as reações com os precursores **32-34** foram realizadas de acordo com a tabela 2, e o acompanhamento das reações por CCD [hexano: acetato de etila (AcOEt) 8:2 (v:v)] mostraram apenas a formação dos produtos **39-41**, resultado validado pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H (Anexo 7, 9 e 11, respectivamente).

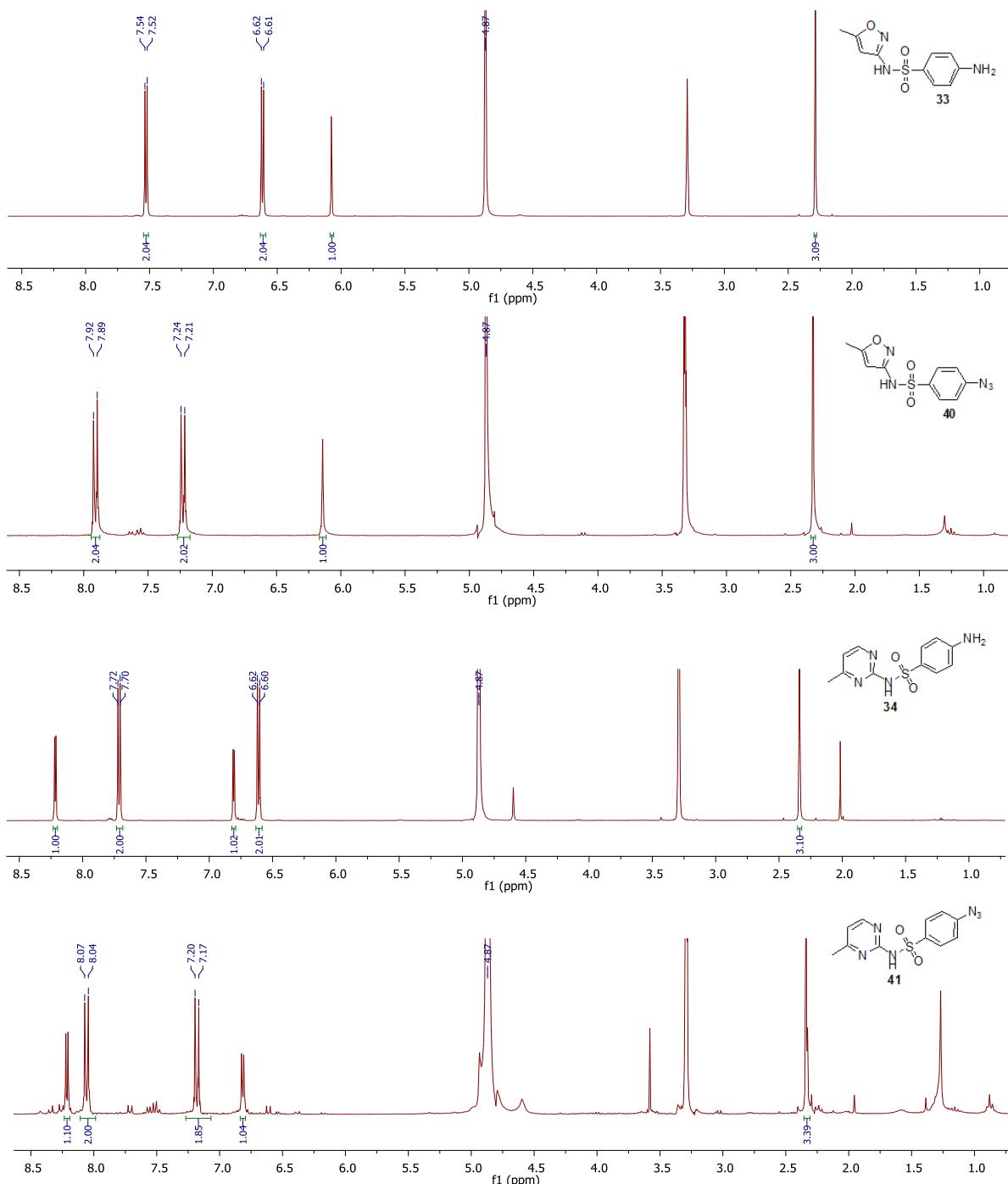
**Tabela 2.** Condições reacionais de síntese dos derivados aril azidas **39-44**

Precursor	Solvente	Condição reacional	Derivado aril azida	Rendimento
	Acetonitrila	40°C 35 minutos		83%
	Dioxano	50°C 20 minutos		82%
	Dioxano	55°C 20 minutos		74%
	Dioxano	55°C 20 minutos		71%
	THF	40°C 30 minutos		85%



Com relação ao material de partida **32**, a reação foi realizada em acetonitrila como solvente e levou a obtenção do composto **39** com 83% de rendimento. Com os materiais de partida **33** e **34**, as reações foram realizadas em dioxano e levaram a obtenção dos intermediários azidos **40** e **41**, com 82% e 74% de rendimento, respectivamente. As reações com os materiais de partida **33** e **34** também foram realizadas em acetonitrila, mas se obteve um melhor rendimento com a utilização do dioxano. As estruturas destes derivados azidos foram confirmadas pelos espectros de infravermelho, que apresentaram uma banda em  $\sim 2100\text{ cm}^{-1}$ , característica do grupo azido. Adicionalmente, quando os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **39-41** (Anexo 7, 9 e 11, respectivamente) foram comparados com seus respectivos materiais de partida **32-34** (Anexo 6, 8 e 10, respectivamente), foi observado que houve um deslocamento dos sinais dos hidrogênios aromáticos para uma região mais desblindada em função da influência do grupo azido (figura 22). Esse deslocamento foi em média de 0,5 ppm para os hidrogênios *ortho* ao grupo azido.





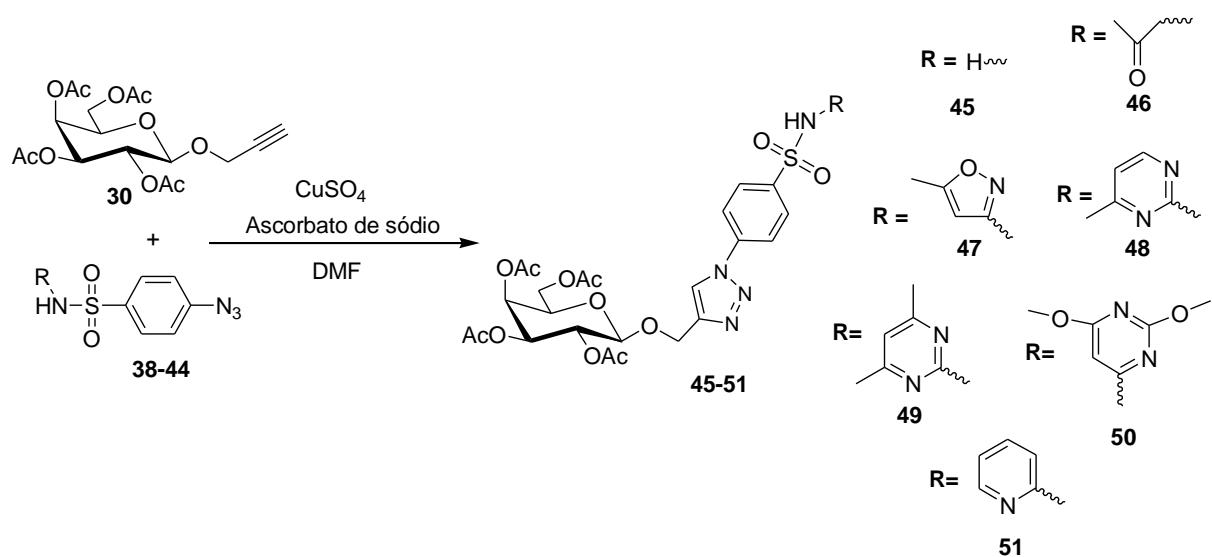
**Figura 22.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos precursores **32-34** e seus derivados azidos **39-41** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Após padronização do método, outras três sulfas comercialmente disponíveis foram utilizadas para a síntese de seus correspondentes derivados azidos (**42-44**), são elas : sulfametazina (**35**), sulfadimetoxina (**36**) e sulfapiridina (**37**) (Tabela 2).

Em relação ao material de partida **35**, a reação foi realizada em dioxano e levou a obtenção do composto **42** com 71% de rendimento. Já para os materiais de partida **36** e **37**, as reações foram realizadas em tetrahidrofuranano (THF) e levaram a

obtenção dos intermediários azidos **43** e **44** com 85% e 51% de rendimento, respectivamente. As reações com os materiais de partida **36** e **37** também foram realizadas em dioxano e acetonitrila, mas se obteve um melhor rendimento com a utilização do THF. Assim como nos outros derivados azidos, as estruturas destes compostos foram confirmadas pelos espectros de infravermelho (banda em ~2100 cm<sup>-1</sup>), como também pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H (Anexo 13, 15 e 17, respectivamente), que quando comparados com os materiais de partida **35-37** (Anexo 12, 14 e 16, respectivamente), também foram observados deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios aromáticos para uma região de maior desblindagem, em média 0,5 ppm, em função da influência do grupo azido (BARRAL, MOORHOUSE, MOSES, 2007; ZHANG, MOSES, 2009).

### 3.1.5 Reação de ciclo-adição 1,3 dipolar catalisada por cobre (CuAAC),"Click Chemistry", para obtenção dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas.



**Esquema 13.** Esquema geral de síntese dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas

A estratégia sintética adotada para a obtenção dos potenciais inibidores de TcTS 1,4 dissubstituídos envolveu a reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) (CuAAC), "Click Chemistry", em aparelho de microondas.

A utilização da radiação de microondas na síntese orgânica foi inicialmente descrita por Gedey e Giguere (GEDEY et al, 1986; GIGUERE et al., 1986). A partir

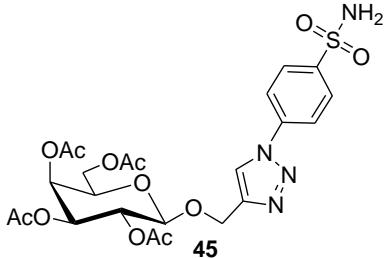
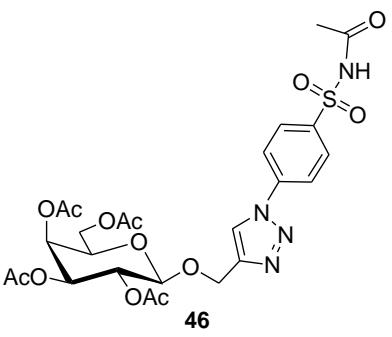
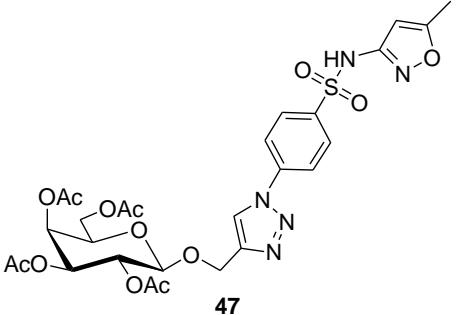
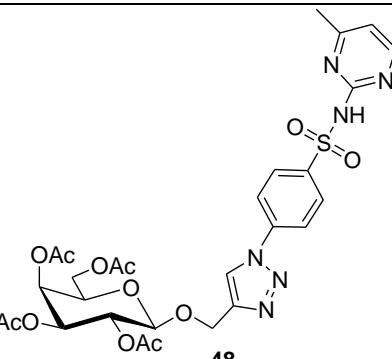
do final da década de 90 houve um crescimento considerável no número de trabalhos empregando radiação

de microondas, técnica com comprovada eficácia, pois apresenta tempo reacional reduzido (quando comparado com o aquecimento convencional), produtos obtidos em altos rendimentos, além de poder ser realizada em diferentes solventes e ser de fácil reproduzibilidade. Seu emprego em reações químicas está baseado no aquecimento eficiente de materiais que é dependente da constante dielétrica, o que depende da capacidade de um material específico, no caso reagente ou solvente, em absorver energia das microondas e convertê-la em calor (KAPPE, 2004).

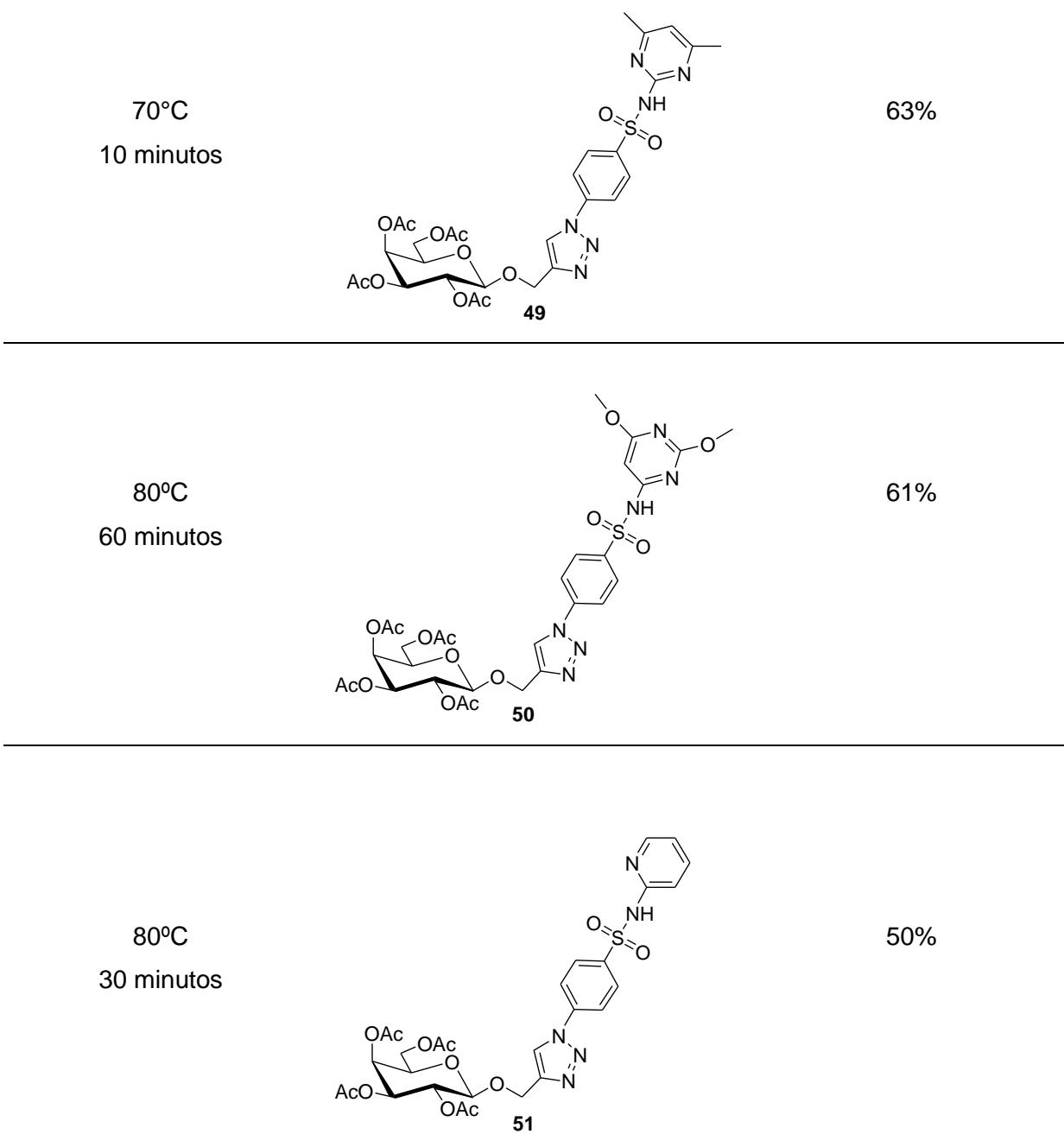
As reações CuAAC submetidas à radiação de microondas apresentam tempo reacional que variam de minutos a cerca de 1 hora, enquanto a ausência de radiação de micro-ondas, ou seja, reações realizadas com aquecimento convencional, resultam em tempo reacional superior à 16 horas.

O método de síntese empregado para cada derivado galactosil-triazolo-benzenossulfonamida ficou estabelecido após algumas tentativas de otimização das condições reacionais (temperatura e tempo) com o objetivo de aumentar os rendimentos obtidos. As reações realizadas em temperaturas acima de 90°C conduziram a degradação dos materiais de partida. Por outro lado, em temperaturas inferiores a 60°C não foi observado a formação do produto desejado. Sendo assim, a condensação entre o derivado de galactose contendo o alcino terminal **30** e os derivados aril azidas **38-44**, na presença de Cu(I), gerado a partir de CuSO<sub>4</sub> e ascorbato de sódio, foi realizada por radiação de microondas a 150W, e permitiu a síntese dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **45-51** que após purificação, cromatografia Flash em Biotage [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-50%, 50-100% e 100-100% (v:v)], foram obtidos em rendimentos satisfatórios, os quais são mostrados na tabela 3.

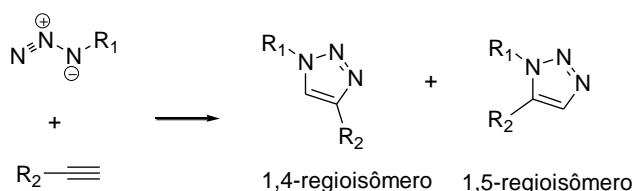
**Tabela 3.** Condição reacional, estrutura e rendimento dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **45-51**

Condição reacional	Estrutura	Rendimento
70°C 40 minutos	 <p><b>45</b></p>	60%
80°C 40 minutos	 <p><b>46</b></p>	60%
80°C 60 minutos	 <p><b>47</b></p>	50%
70°C 40 minutos	 <p><b>48</b></p>	60%

continuação...



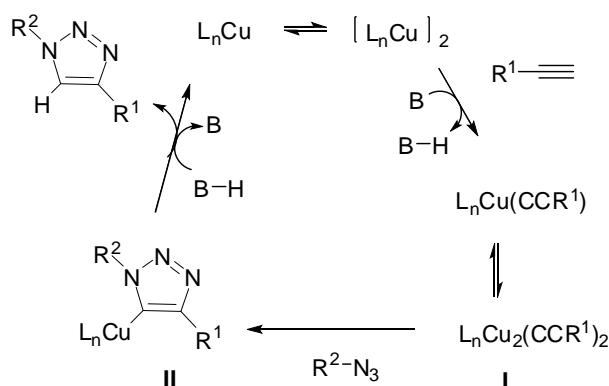
As reações clássicas de ciclização de Huisgen, descritas a mais de 40 anos fornecem 1,2,3-triazóis contendo misturas de 1,4 e 1,5 regioisômeros (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001) (Esquema 14).



**Esquema 14.** Produtos da reação de Huisgen sem o uso de catalisador.

No entanto, as descobertas descritas de forma independente por Medal e Sharpless, relacionadas ao uso de Cu(I), como catalisador da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar, deram novo impulso à sua utilização, uma vez que fornecem apenas o isômero 1,4-triazólico. Dessa forma, para obtenção apenas dos derivados 1,4-dissubstituídos **45-51** optou-se por utilizar Cu(I), gerado *in situ*, a partir de sulfato de cobre (II) e ascorbato de sódio (agente redutor) (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

O cobre é um metal de transição, o qual possui configuração eletrônica [Ar]  $3d^{10} 4s^1$ . Espécies de Cu(I) geradas *in situ*, a partir de ascorbato de sódio e Cu (II), formam um complexo  $\pi$  com a tripla ligação de um alcino terminal. Estudos têm demonstrado que a reação é de segunda ordem com relação ao Cu. Os ligantes utilizados são instáveis e fracamente coordenados. As três etapas gerais do mecanismo da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) é apresentada no esquema 15 e envolve: ativação do alcino terminal tal como Cu-acetileno **I**, ciclização formal para fornecer um intermediário Cu-C(triazol) **II** e quebra da ligação Cu-C para dar o composto triazólico e regenerar o catalisador. Sendo que, cada etapa pode envolver espécies de cobre multinucleares (RODIONOV et al., 2007). Adicionalmente, é proposto que a formação de **II** envolva, inicialmente, a substituição um dos ligantes de Cu pelo átomo de nitrogênio interno do grupo azido, ligado a R<sup>2</sup> e, posteriormente, o nitrogênio terminal do azido ataque o C-2 (ligado a R<sup>1</sup>) do acetileno (BOCK et al., 2006; HIMO et al., 2005; RODIONOV et al., 2005). No entanto, este mecanismo envolveria a formação de um metalociclo de 6 membros pouco comum, o qual não é considerado na descrição mais recente para formação da espécie **II** (RODIONOV,V. el al. 2007).

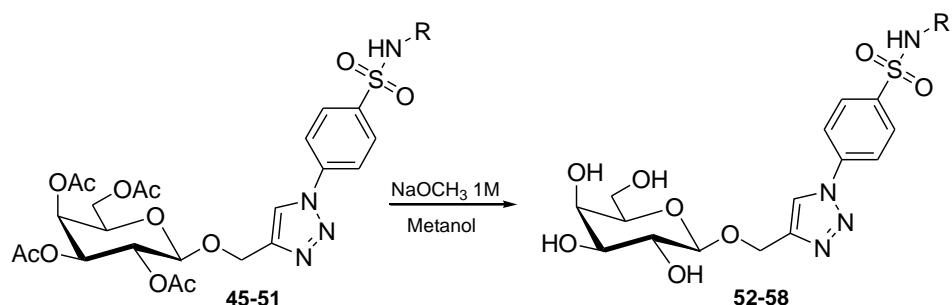


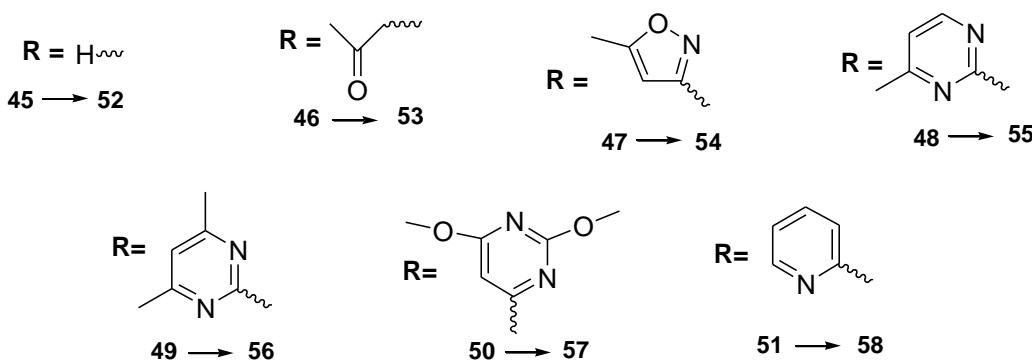
**Esquema 15.** Mecanismo reacional proposto para a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar formando 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos

O procedimento adotado levou à síntese dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **45-51**, que tiveram suas estruturas confirmadas por espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 18-24). A presença, bem como, a ausência de alguns sinais característicos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  corroboram a formação dos produtos. Os sinais mais característicos estão relacionados a um simpleto acima de 8,0 ppm, correspondente ao hidrogênio do anel triazólico; ausência de um tripleto em 2,46 ppm, correspondente ao hidrogênio do grupo alcino terminal do intermediário **30** e também o deslocamento e desdobramento dos sinais dos hidrogênios do grupo  $\text{CH}_2$  ligado ao anel triazólico, exemplificando a existência de um sistema AB (espectros de 2<sup>a</sup> Ordem). Neste caso, o sistema é rígido devido à presença do anel triazólico, fazendo com que os hidrogênios geminais do grupo  $\text{CH}_2$  estejam em ambientes químicos diferentes, não sendo mais magneticamente equivalentes e, consequentemente, gerando 2 dupletos com deslocamentos químicos diferentes (5,08-5,06 e 4,90-4,89) e acoplamentos ( $^2J$ ) acima de 12,5 Hz. Outra observação relevante foi a presença dos hidrogênios aromáticos em posição *ortho* ao anel triazólico em região acima de 7,85 ppm, um deslocamento de 0,6 ppm, em média, para campos mais altos quando comparado com o deslocamento dos hidrogênios *ortho* ao grupo azido (abaixo de 7,25 ppm), fato que pode ser explicado pelo efeito indutivo retirador de elétrons do anel triazólico ser superior ao do grupo azido. Os 12 hidrogênios dos grupos acetilas provenientes da galactose foram mantidos com deslocamentos de 1,98 a 2,16 ppm.

### 3.1.6. Desacetilação dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas

A última etapa de síntese consistiu na O-desacetilação dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **45-51** (Esquema 16).



**Esquema 16.** Esquema geral de O-desacetilação

Sendo assim, os derivados **45-51** foram tratados com quantidade catalítica de solução de metóxido de sódio ( $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em metanol (solvente) para promover total O-desacetilação, que após neutralização com resina ácida (DOWEX<sup>®</sup> 50WX8 H<sup>+</sup>) resultou na obtenção dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamida desprotegido **52-58** em rendimento quantitativo.

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 25-30) foram observadas as ausências dos 4 simples na região 1,98 a 2,16 ppm ( $\text{CH}_3$  do grupo acetil), o que caracterizou a reação de desacetilação. Na comparação entre os deslocamentos químicos de hidrogênios provenientes dos derivados com hidroxila acetilada e de seus respectivos derivados com hidroxila livre, foi possível observar que houve blindagem desses hidrogênios pela ausência do grupo éster acetílico, conforme indicado na tabela 4.

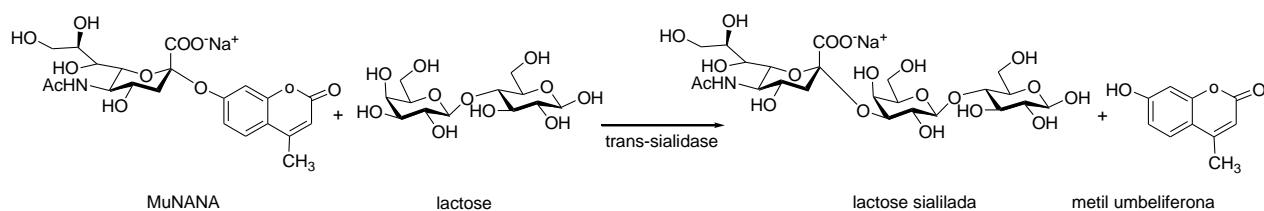
**Tabela 4.** Comparação entre os deslocamentos químicos dos intermediários com hidroxila acetilada e seus respectivos produtos com hidroxila livre.

Hidrogênios	Intermediário		Produto Livre $\delta ^1\text{H}$ (ppm)	
	Acetilado			
	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)			
H-2	5,23-5,27	3,55-3,58		
H-3	5,03-5,06	3,45-3,48		
H-4	5,40-5,43	3,80-3,96		
H-6a	4,19-4,23	3,56-3,79		
H-6b	4,13-4,14	3,71-3,74		

### 3.2 Ensaios biológicos

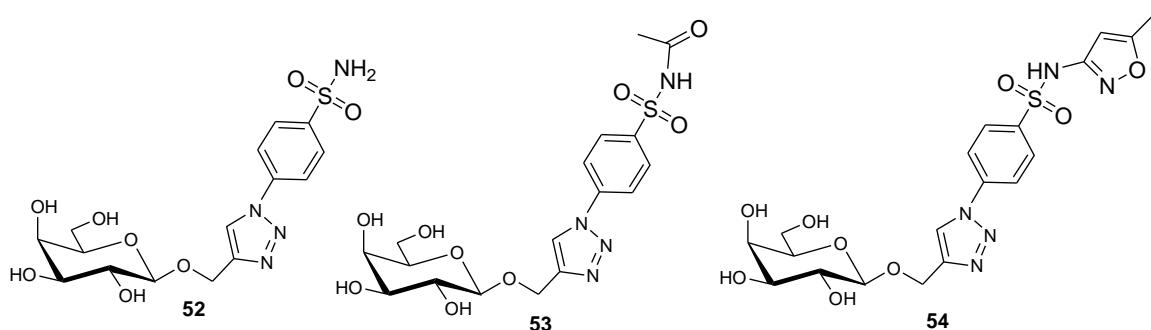
#### 3.2.1 Ensaio de inibição

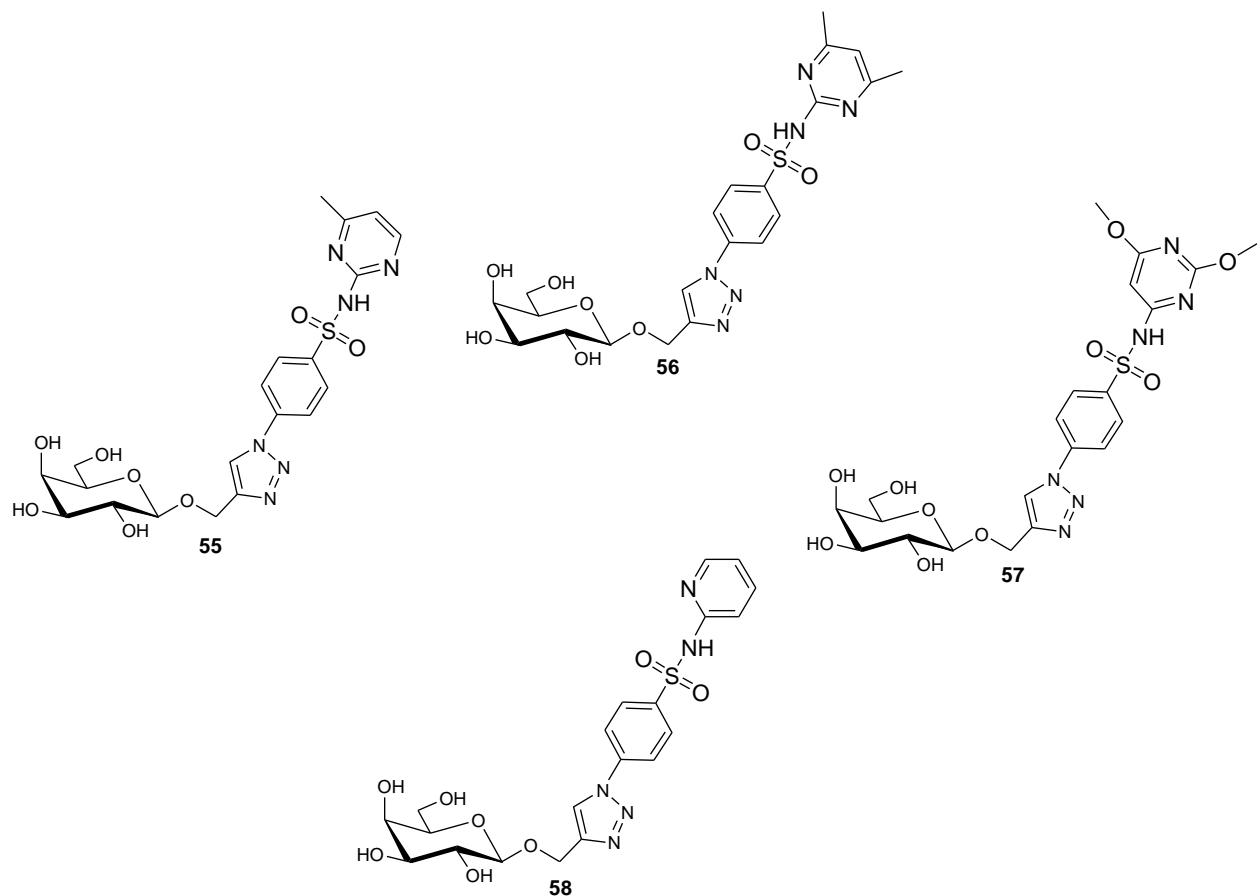
Dentro dos métodos descritos na literatura para determinar a atividade enzimática de TcTS (LEE; KIM 2000; SCHRADER et al., 2003; NERES et al., 2006), o método fluorimétrico é um dos mais sensíveis e mede diretamente a liberação do grupo fluorescente (fluoróforo) metil umbeliferona (Mu) a partir da clivagem da ligação glicosídica do doador ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetylneuramínico (MuNANA) pela ação de TcTS (Esquema 17).



**Esquema 17.** Reação de TcTS acompanhada em fluorímetro, com MuNANA como substrato doador e lactose como substrato aceptor.

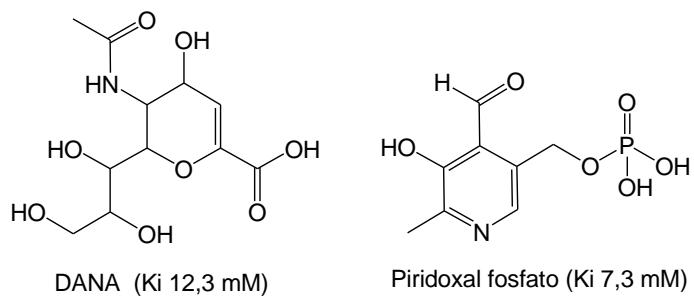
O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,0 (25,0  $\mu$ L), solução diluída da enzima *trans*-sialidase (25,0  $\mu$ L), solução dos derivados desprotegidos **52-58** (Figura 23) (25,0  $\mu$ L de uma solução 4,0 mM em tampão fosfato pH 7,0) e solução de substrato MuNANA (25,0  $\mu$ L de uma solução 0,4 mM). Sabendo que o volume final em cada poço foi de 100,0  $\mu$ L, a concentração final dos compostos e de substrato foi quatro vezes menor no poço, ou seja, 1,0 mM dos produtos e 0,1 mM de substrato.





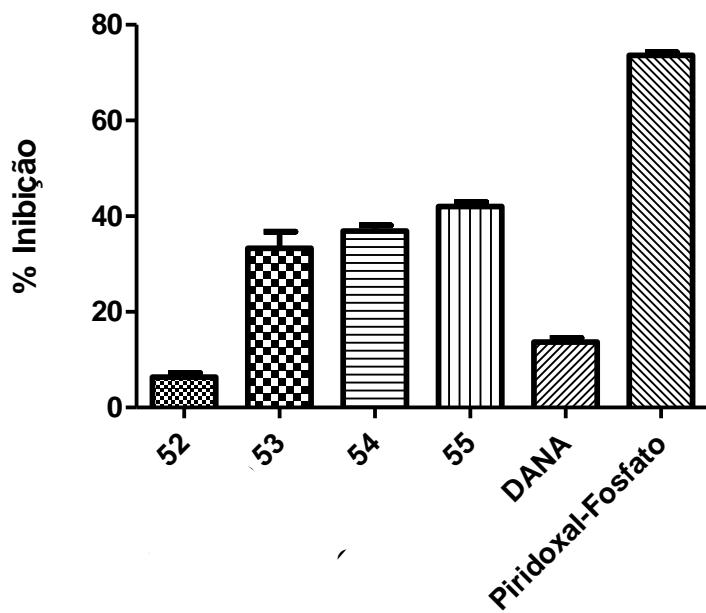
**Figura 23.** Compostos testados nos ensaios biológicos.

O ensaio também foi realizado com controle negativo (50,0 µL de tampão + 25,0 µL de enzima + 25,0 µL de MuNANA), e com controles positivos DANA (2-desoxi-2,3-dehidro-N-acetil ácido neuramínico) e piridoxal fosfato, ambos na concentração de 1,0 mM (Figura 24). Os compostos utilizados como controle positivo estão descritos na literatura como inibidores moderados de TcTS (NERES et al., 2007).

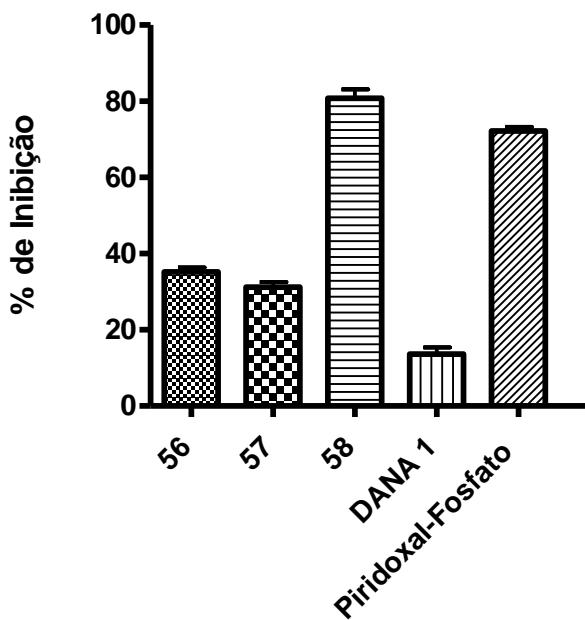


**Figura 24** - Estrutura dos compostos utilizados como controle positivo.

Os resultados do ensaio de inibição da enzima TcTS com os derivados galactosil-triazol-benzenossulfonamidas **52-58**, na concentração de 1,0 mM estão apresentados nos gráficos abaixo (Figura 25 e 26).

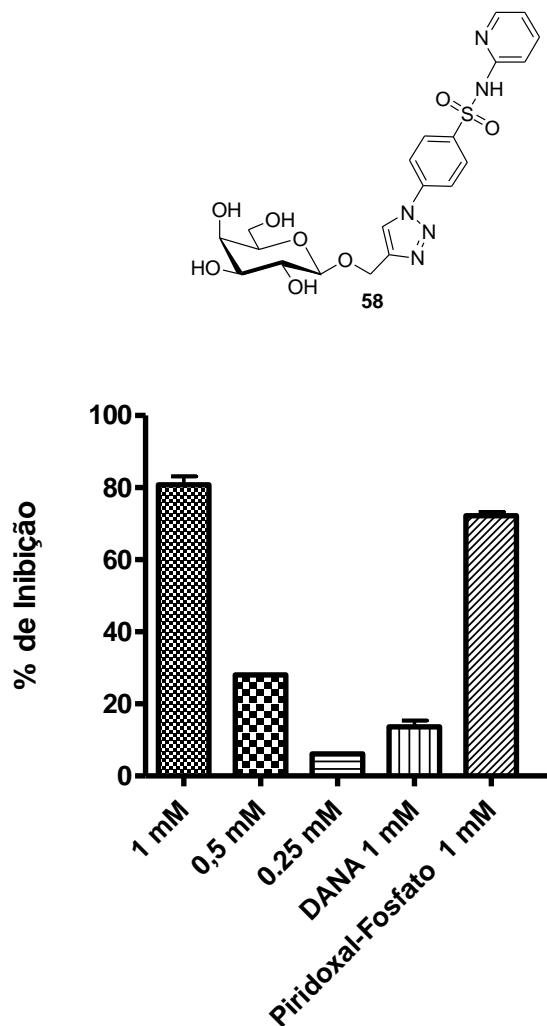


**Figura 25.** Resultados do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM com os compostos **52-55**.



**Figura 26.** Resultados do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> com os compostos **56-58**

Com base na figura 24 e 25, é possível observar a inibição da enzima *trans*-sialidase na presença dos compostos **52-58**. O composto **52** foi o que apresentou a menor porcentagem de inibição, com valor inferior ao DANA (15%), um fraco inibidor de TcTS. Já os compostos **53-57** apresentaram porcentagem de inibição em torno de 40%, um valor superior ao DANA, mas inferior ao piridoxal fosfato (73%). O composto **58**, contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfapiridina, foi o que demonstrou maior porcentagem de inibição (81%), com valor superior ao piridoxal-fosfato, na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Com base nestes resultados, foram realizados novos ensaios de inibição de TcTS empregando menores concentrações do produto de maior interesse **58**. Conforme pode ser visualizado na Figura 27, a redução da concentração do inibidor de 1 mmol.L<sup>-1</sup> para 0,5 e 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> ocasionou uma redução significativa na porcentagem de inibição de TcTS, demonstrando que o produto **58**, apesar de representar um protótipo interessante, necessita de ajustes e modificações químicas posteriores para a potencialização da sua atividade enzimática.



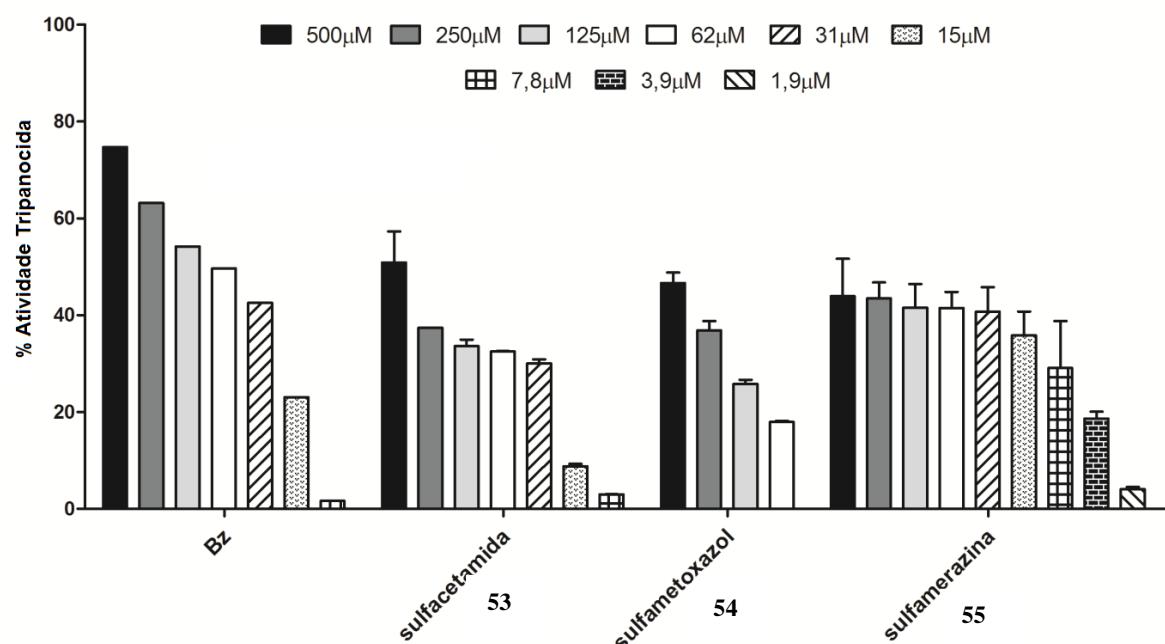
**Figura 27.** Resultados do ensaio de inibição de TcTS nas concentrações de 1,0 - 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> com o produto **58**

Os resultados obtidos com os compostos **52-58** são interessantes e bastante promissores, principalmente com os obtidos com o produto **58** (contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfapiridina), abrindo perspectivas para a síntese de um maior número de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas com diferentes substituintes em R, para o estabelecimento de estudos de relação estrutura-atividade. Vale ressaltar que os resultados obtidos neste estudo são inéditos e permitirá que novos inibidores de TcTS sejam sintetizados pelo emprego dos métodos otimizados aqui descritos.

### 3.2.2 Ensaio de atividade tripanocida e citotóxica

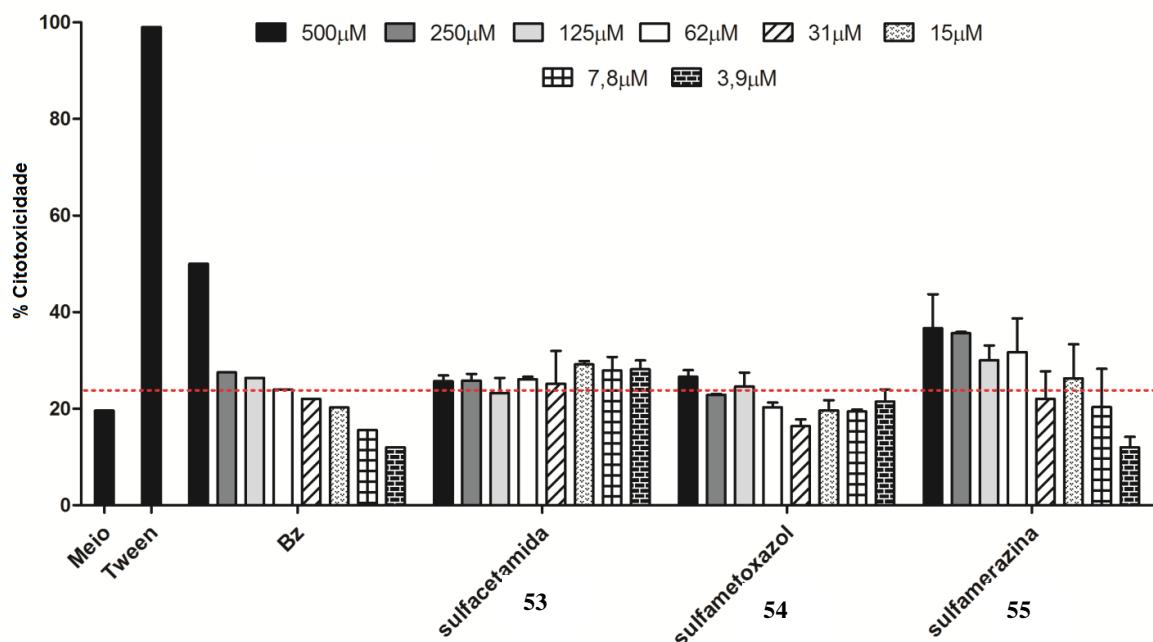
Os produtos **53-55** também foram testados em ensaios *in vitro*, envolvendo a forma tripomastigota de *T. cruzi* cepa Tulahuen e usando benznidazol (Bz) como controle, um trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP - USP), sob supervisão do Prof. Dr. João Santana da Silva (GUEDES et al., 2010).

Os resultados do ensaio de atividade tripanocida e citotóxica envolvendo os derivados **53-55** estão apresentados nos gráficos abaixo (Figura 28 e 29).



**Figura 28.** Atividade tripanocida dos compostos **53-55** em relação ao fármaco de referência benznidazol

(Bz).



**Figura 29** – Atividade citotóxica dos compostos **53-55** e benznidazol (Bz), avaliados em ensaios de cultura de células de baço de camundongos. A linha pontilhada demonstra os valores limites de toxicidade, ou seja, compostos com valores acima desta linha podem ser considerados tóxicos.

De acordo com o Figura 28, os compostos **53-55** apresentaram atividade tripanocida máxima de 50%, normalmente nas concentrações de 500 a 250 µM, com destaque para o derivado **55**, contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfamerazina, que apresentou atividade moderada, mas superior ao benznidazol nas concentrações mais baixas ( $15,0 - 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Por outro lado, de acordo com os resultados do ensaio de citotoxicidade (Figura 29), a atividade citotóxica foi observada apenas nas concentrações mais elevadas, similar ao benznidazol.

Os resultados do ensaio de atividade tripanocida com os compostos **53-55** não possibilitaram o cálculo do  $\text{IC}_{50}$  pelo fato destes compostos não terem atingido o mínimo de 50% de inibição nas diferentes concentrações, tendo uma manutenção fraca da atividade em doses mais reduzidas, o que não acontece com Bz.

O ensaio com os compostos **56-58** estão em andamento e não foram concluídos até o momento devido a problemas ocorridos com a manutenção e crescimento da cepa ativa Tulahuen no Laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### Aparelhagem Analítica:

- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ): Bruker Advance DRX 300, DRX 400 e DPX 500
- Espectroscopia na região do Infravermelho: Nicolet Protege 460
- Fluorímetro: Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader

#### Aparelhagem Laboratorial:

- Evaporador Rotatório: Büchi RE121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R215
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Luz ultra-violeta: Spectroline CM-10
- Cromatografia Flash de Alta Eficiência (CFAE): Biotage®
- Pipeta multicanal: Eppendorf
- Reator para irradiação de micro-ondas CEM® Discover

#### Solventes, Reagentes e Outros Materiais

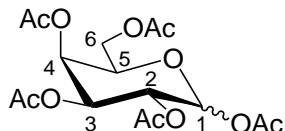
- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) e em Camada Preparativa (CCP) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF<sub>254</sub> da MERCK®.
- As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel tipo “Flash” (40-63 µm) da MERCK®.
- Alguns solventes e reagentes foram convenientemente purificados conforme métodos descritos na literatura (PERRIN et al., 1980).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Síntese

#### 4.2.1.1 Síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-1

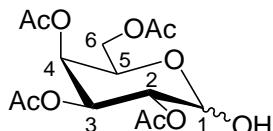
##### 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-galactopyranose



A uma suspensão do material de partida comercial D-galactose (5,0 g; 27,8 mmol) em anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (25,0 mL) foi adicionado iodo ( $\text{I}_2$ ) (0,25 g; 1,0 mmol) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente. O acompanhamento da reação por CCD [hexano: acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ) 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 tiossulfato 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Após secagem com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtração e concentração sob pressão reduzida da fase orgânica foi obtido um óleo amarelo claro, que foi cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O composto **27** foi obtido com rendimento de 96% (10,8 g; 26,7 mmol). A proporção entre os anômeros  $\alpha/\beta$  foi 5:1.

**Dados do composto  $\alpha$ :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 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), 5,28-36 (2H, m, 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,  $J_{5,6}$  6,8 Hz;  $J_{6a,6b}$  10,6 Hz, H-6a, H-6b), 2,17-2,12, (15H, 5 s, 5  $\text{COCH}_3$ ).

##### 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopyranose

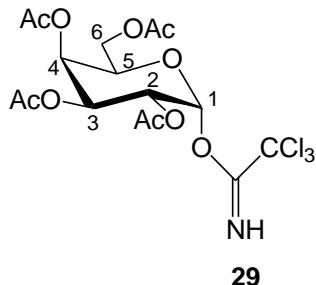


O composto **27** (3,0 g; 7,7 mmol), dissolvido em dimetilformamida (DMF) (9,0 mL), foi tratado com o reagente hidrazina acética ( $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) (0,832 g; 9,24 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação durante 24 horas a temperatura

ambiente. O acompanhamento da reação por CCD [hexano: acetato de etila (AcOEt) 1:1 (v:v)] mostrou a formação de apenas um composto. Em seguida, o sistema foi diluído com AcOEt e lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), filtrada e concentrada. A mistura foi purificada por cromatografia Flash em aparelho Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 18 mL/min; solvente: hexano/acetato de etila; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)]. para obtenção do composto **28** com rendimento de 65 % (2,0 g; 6,0 mmol) na proporção  $\alpha/\beta$  3:1.

**Dados do composto  $\alpha$ :**  $\delta_H$  (ppm) ( $CDCl_3$ , 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, dt,  $J_{4,5}$  1,2 Hz;  $J_{5,6}$  6,3 Hz, H-5), 4,14 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,6 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,1 Hz, H-6a), 4,08 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,8 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,1 Hz, H-6b), 3,12 (1H, s, OH), 2,15-2,00 (12H, 4 s, 4 COCH<sub>3</sub>).

#### 4.2.1.2 Síntese para obtenção de intermediário com grupo acetileno em C-1 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila

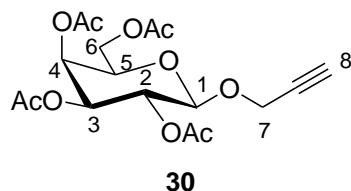


Uma solução de **28** (1,31 g; 3,76 mmol) em DCM (6,0 mL) destilado foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte (N<sub>2</sub>). Tricloroacetonitrila (CCl<sub>3</sub>CN) (1,51 mL; 15,04 mmol) e 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,17 mL; 1,13 mmol) foram adicionados à solução, a qual foi agitada por 1 hora nas condições mencionadas acima. O acompanhamento da reação por CCD [hexano: acetato de etila 4:6 (v:v)] mostrou a formação de apenas um composto. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por cromatografia Flash em aparelho Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 20 mL/min; solvente: hexano/acetato de etila; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)]. O composto **29** foi então

cristalizado em éter etílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ): hexano sendo obtido apenas o isômero  $\alpha$  com rendimento de 70 % (1,30 g; 2,63 mmol).

**Dados do composto :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  8,66 (1H, s,  $\text{NH}$ ), 6,60 (1H, d,  $J_{1,2}$  3,6 Hz, H-1), 5,56 (1H, d,  $J_{3,4}$  3,0 Hz, H-4), 5,42 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,9 Hz;  $J_{3,4}$  3,0 Hz, H-3), 5,36 (1H, dd,  $J_{1,2}$  3,6 Hz;  $J_{2,3}$  10,9 Hz, H-2), 4,44 (1H, t,  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 4,16 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6a), 4,08 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6b), 2,17-2,01 (12H, 4s, 4  $\text{COCH}_3$ ).

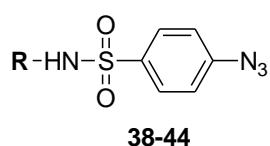
### 1-O-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopiranosila (**29**) (2,155 g; 4,37 mmol) foi dissolvido em diclorometano (DCM) destilado (40,0 mL) e submetido à atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ). Álcool propargílico (2,55 mL, 43 mmol) foi então adicionado à reação, a qual foi mantida sob agitação durante 30 minutos em banho de gelo seco (-40 °C). Triflato de trimetilsilila (TMSOTf) (0,16 mL, 0,94 mmol) diluído em diclorometano destilado (1 mL) foi lentamente gotejado à reação, a qual foi mantida sob agitação à -20°C durante 1 hora. O acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada (CCD) [hexano: acetato de Etila 1:1 (v:v)] mostrou a formação de apenas um composto. Trietilamina (0,1 mL) foi adicionada para neutralizar a reação e posteriormente, a mistura reacional foi filtrada, concentrada e purificada por cromatografia Flash em aparelho Biotage [coluna: 25 mm; fluxo: 20 mL/min; solvente: hexano/ acetato de etila; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)], sendo obtido um sólido branco com rendimento de 90 % (1,517g, 3,94 mmol).

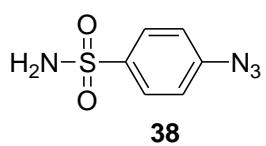
**Dados do composto :**  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) 5,40 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,4 Hz;  $J_{4,5}$  0,78 Hz, H-4), 5,22 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,8 Hz;  $J_{2,3}$  10,5 Hz, H-2), 5,06 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,5 Hz;  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-3), 4,74 (1H, d,  $J_{1,2}$  8,0 Hz, H-1), 4,38 (2H, d,  $J_{7,8}$  2,4 Hz,  $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 4,19 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,6 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,6 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6b), 3,94 (1H, dt,  $J_{4,5}$  1,1 Hz;  $J_{5,6}$  6,6 Hz, H-5), 2,46 (1H, t,  $J_{8,7}$  2,4 Hz,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 2,15 -1,99 (12H, 4 s, 4  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### 4.2.1.3 Procedimento geral de síntese para obtenção dos derivados aril azidas (38-44)



Em tubo apropriado para reações em reator de irradiação de micro-ondas (CEM® Discover) foram adicionados na seguinte ordem: azida de sódio (78 mg ;1,2 mmol; 3 equiv.) solubilizada com água (150 µl), solvente reacional (1 ml), material de partida 4-aminobenzenosulfonamida (**31-37**) (0,4 mmol: 1 equiv.) comercialmente disponível e nitrito de *terc*-butila (*t*-BuONO). Após a adição dos reagentes o tubo foi selado e mantido sob agitação em aparelho de irradiação de micro-ondas programado com os seguintes parâmetros: tempo reacional, temperatura reacional e potência de 150W no modo de operação Benchmate. A reação foi acompanhada por CCD [hexano: acetato de Etila (AcOEt) 4:1 (v:v)] que mostrou a formação de apenas um produto. Ao final da irradiação a mistura reacional foi submetida a extração usando acetato de etila (3 porções de 5 ml) e água (1 porção de 3 ml), eliminando desta maneira os sais presentes no meio reacional. Após extração, as fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após filtração, a fase orgânica foi concentrada e purificada por cromatografia Flash em aparelho Biotage [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: Hexano/ acetato de etila; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)], sendo obtido o produto desejado.

##### 4.2.1.3.1 4-azidobenzenosulfanilamina (**38**)



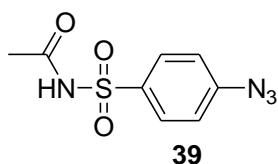
Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfanilamina (**31**) (68,8 mg), álcool *terc*-butílico como solvente reacional, *t*-BuONO (285 µl; 2,4

mmol; 6 equiv.), tempo reacional de 35 minutos e temperatura de 60°C.

**Rendimento:** 86% (0,344mmol)

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 300 MHz) 7,89 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,9 Hz, Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 7,21 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,9 Hz,  $CHCN_3$ ).

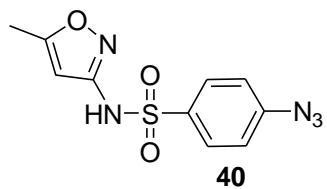
#### 4.2.1.3.2 4-azidobenzenosulfacetamida (39)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfacetamida (32) (85,6 mg) acetonitrila como solvente reacional, *t*-BuONO (190  $\mu$ l; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 35 minutos e temperatura de 40°C. **Rendimento:** 83%. (0,332 mmol).

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 300 MHz) 8,01 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8 Hz, Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 7,24 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8 Hz,  $CHCN_3$ ), 1,96 (3H, s,  $CH_3$  ).

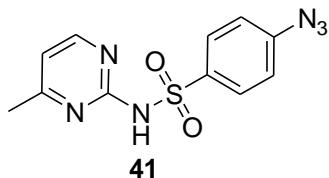
#### 4.2.1.3.3 4-azidobenzenosulfametoxazol (40)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfametoxazol (33) (101,3 mg), dioxano como solvente reacional, *t*-BuONO (190  $\mu$ l; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 20 minutos e temperatura de 50°C. **Rendimento:** 82% (0,328 mmol).

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 300 MHz) 7,91 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,9 Hz, Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 7,23 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,9 Hz,  $CHCN_3$ ), 6,14 (1H, s,  $H_{\text{isoxazol}}$ ); 2,33 (3H, s,  $CH_3$ ).

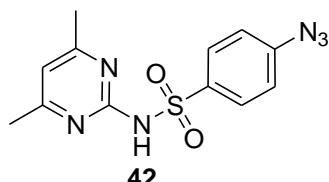
#### 4.2.1.3.4 4-azidobenzenosulfamerazina (41)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfamerazina (**34**) (105,6 mg), dioxano como solvente reacional, *t*-BuONO (190 µl; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 20 minutos e temperatura de 55°C. **Rendimento:** 74% (0,296 mmol).

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) 8,21 (1H, d, *J* 5,2 Hz, H<sub>pirimidina</sub>), 8,06 (2H, d, *J*<sub>ortho</sub> 8,8 Hz, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 7,19 (2H, d, *J*<sub>ortho</sub> 8,8 Hz, CHCN<sub>3</sub>) 6,82 (1H, d, *J* 5,2 Hz, H<sub>pirimidina</sub>), 2,34 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

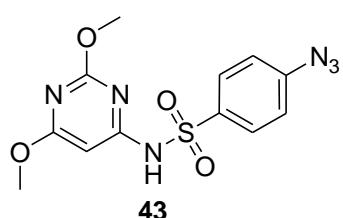
#### 4.2.1.3.5 4-azidobenzenosulfametazina (42)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfametazina (**35**) (111,3 mg), dioxano como solvente reacional, *t*-BuONO (190 µl; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 20 minutos e temperatura de 55°C. **Rendimento:** 71% (0,284 mmol)

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) 8,04 (2H, d, *J*<sub>ortho</sub> 8,6 Hz, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 7,16 (2H, d, *J*<sub>ortho</sub> 8,6 Hz, CHCN<sub>3</sub>), 6,67 (1H, s, H<sub>pirimidina</sub>), 2,26 (6H, s, 2CH<sub>3</sub>)

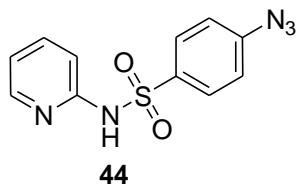
#### 4.2.1.3.6 4-azidobenzenosulfadimetoxina (43)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfadimetoxina (**36**) (124 mg), tetrahidrofuranano (THF) como solvente reacional, *t*-BuONO (190 µl; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 40 minutos e temperatura de 30°C.  
**Rendimento:** 85%.(0,34mmol)

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz), 7,92 (2H, d, *J*<sub>orto</sub> 8,8 Hz, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 7,16 (2H, d, *J*<sub>orto</sub> 8,8 Hz, CHCN<sub>3</sub>), 5,95 (1H, s, H<sub>pirimidina</sub> ), 3,79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

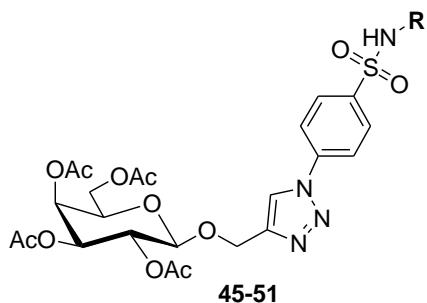
#### 4.2.1.3.7 4-azidobenzenosulfapiridina (44)



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-aminobenzenosulfapiridina (**37**) (99,6 mg), tetra-hidrofuranano (THF) como solvente reacional, *t*-BuONO (190 µl; 1,6 mmol; 4 equiv.), tempo reacional de 30 minutos e temperatura de 40°C.  
**Rendimento:** 51% (0,204 mmol).

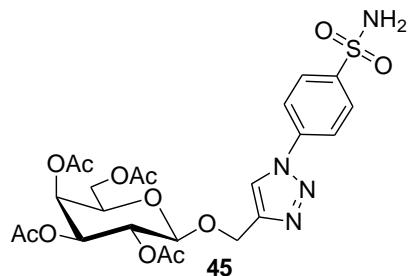
**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), 7,92 ( 1H, s, H<sub>piridina</sub>) 7,89 (2H, d, *J*<sub>orto</sub> 8,8 Hz, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 7,66 (1H, ddd, *J* 9,0 Hz, *J* 7,2 Hz, *J* 1,9 Hz, H<sub>piridina</sub> ) 7,18 (1H, dd, *J* 9,0 Hz, *J* 1,0 Hz H<sub>piridina</sub> ), 7,13 (2H, d, *J*<sub>orto</sub> 9,0 Hz, CHCN<sub>3</sub>), 6,84 (1H, ddd, *J* 7,2 Hz, *J* 5,9 Hz, *J* 1,0 Hz H<sub>piridina</sub> ).

#### 4.2.1.4 Procedimento geral de síntese para obtenção dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas (45-51)



Em tubo apropriado para reações em reator de irradiação de micro-ondas (CEM® Discover) foram adicionados na seguinte ordem: o derivado 4-azidobenzenosulfonamida (**38-44**) (0,2mmol; 1 equiv.), dimetilformamida (DMF) (0,3 ml), o derivado 1-O-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranose (**30**) (85,0 mg; 0,22 mmol; 1,1 equiv.), ascorbato de sódio (3,96 mg; 3,96 mg, 0,02 mmol; 0,1 equiv.) e solução de sulfato de cobre II 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (60 µL). Após a adição dos reagentes o tubo foi selado e mantido sob agitação em aparelho de irradiação de micro-ondas programado de acordo com os seguintes parâmetros: tempo, temperatura e potência de 150W no modo de operação Benchmate. A reação foi acompanhada por CCD [hexano: acetato de Etila (AcOEt) 1:9 (v:v)] que mostrou a formação de apenas um composto. Ao final da irradiação a mistura reacional foi tratada com tolueno (10 ml). A mistura foi concentrada sob pressão reduzida a fim de se eliminar o solvente (DMF). Após esta etapa foi realizada a extração do produto usando acetato de etila (3 porções de 5 ml) e água (1 porção de 3 ml), para eliminar os sais presentes no meio reacional. Após extração, as fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após filtração, a fase orgânica foi concentrada e purificada por cromatografia Flash em aparelho Biotage [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: Hexano/ acetato de etila; gradiente: 0-50%, 50-100% e 100-100% (v:v)], sendo então obtido o produto desejado.

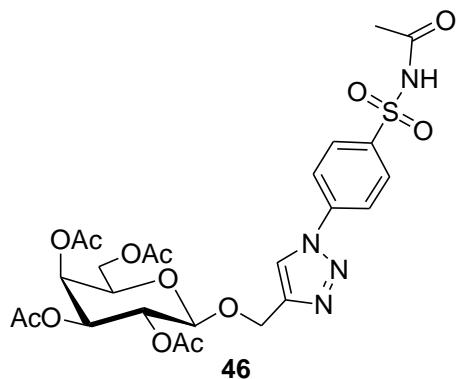
#### **4.2.1.4.1 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfanilamina (45).**



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfanilamina (**38**) (39,6 mg), tempo reacional de 40 minutos e temperatura de 70°C. **Rendimento:** 60% (0,12 mmol)

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 8,09 (1H, s,  $H_{triazol}$ ), 8,05 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,8, Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 7,86 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,8, Ar,  $CHC$ - triazol), 5,42 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,5 Hz;  $J_{4,5}$  1,1 Hz, H-4), 5,25 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,8 Hz;  $J_{2,3}$  10,4 Hz, H-2), 5,06 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,4 Hz;  $J_{3,4}$  3,5 Hz, H-3), 5,05 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 4,89 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 4,72 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1), 4,22 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,6 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,3 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,6 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,3 Hz, H-6b), 4,00 (1H, dt,  $J_{4,5}$  1,0 Hz;  $J_{5,6}$  6,6 Hz, H-5), 2,14-1,98 (12H, 4 s, 4  $CH_3CO$ ).

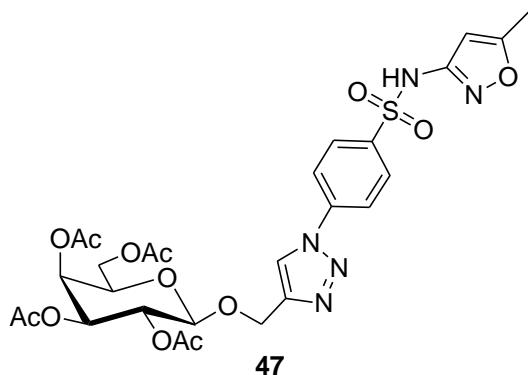
#### 4.2.1.4.2 4-(4-{{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfacetamida (46).



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfacetamida (39) (48 mg), tempo reacional de 40 minutos e temperatura de 80°C. **Rendimento:** 60% (0,12 mmol)

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 8,23 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,8, Ar,  $CHCSO_2NHR$  ), 8,09 (1H, s,  $H_{triazol}$ ), 7,94 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,8, Ar,  $CHC$ - triazol), 5,43 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,2 Hz;  $J_{4,5}$  0,7 Hz, H-4) 5,27 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,8 Hz;  $J_{2,3}$  10,3 Hz, H-2), 5,08 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 5,06 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,3 Hz;  $J_{3,4}$  3,2 Hz, H-3), 4,91 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 4,71 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1) 4,23 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,1 Hz, H-6a), 4,14 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,1 Hz, H-6b), 4,0 (1H, dt,  $J_{4,5}$  0,7 Hz;  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 2,16 (3H, s,  $CH_3$ ) 2,10-1,99 (12H, 4 s, 4  $CH_3CO$ ).

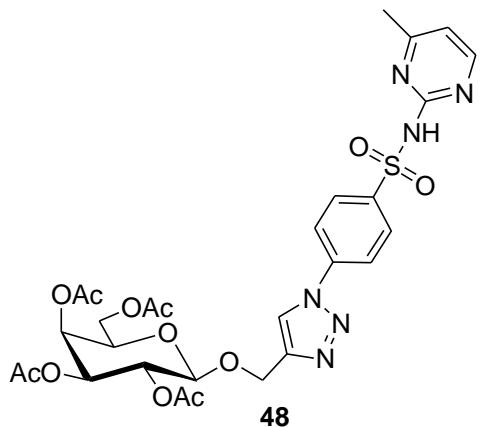
#### 4.2.1.4.3 4-(4-{{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfametoxazol (47).



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfametoxazol (**40**) (55,8 mg), tempo reacional de 60 minutos e temperatura de 80°C. **Rendimento:** 50% (0,1 mmol).

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 8,04 (1H, s,  $H_{triazol}$ ), 8,02 (2H, d,  $J_{orto}$  8,7, Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 7,88 (2H, d,  $J_{orto}$  8,7, Ar,  $CHC$ - triazol), 6,25 (1H, s,  $H_{isoxazol}$ ) 5,42 (1H, d,  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-4), 5,26 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,8 Hz;  $J_{2,3}$  10,3 Hz, H-2), 5,06 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 5,05 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,3 Hz;  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-3), 4,88 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 4,7 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1) 4,22 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6a), 4,14 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6b), 3,98 (1H, t,  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 2,39 (3H, s,  $CH_3$ ) 2,16-1,99 (12H, 4 s, 4  $CH_3CO$ ).

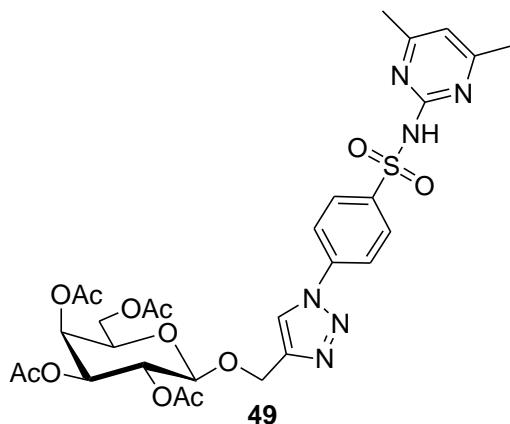
#### 4.2.1.4.4 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfamerazina (48).



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfametazina (**41**) (58 mg), tempo reacional de 40 minutos e temperatura de 70°C. **Rendimento:** 60% (0,12 mmol)

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 8,54 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 5,3 Hz, H<sub>pirimidina</sub>) 8,32 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,7, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR) 8,06 (1H, s, H<sub>triazol</sub>), 7,89 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,7, Ar, CHC- triazol), 6,84 (1H, d, J<sub>2,1</sub> 5,3 Hz, H<sub>pirimidina</sub>) 5,41 (1H, dd, J<sub>3,4</sub> 3,3 Hz; J<sub>4,5</sub> 0,78 Hz, H-4), 5,25 (1H, dd, J<sub>1,2</sub> 7,9 Hz; J<sub>2,3</sub> 10,4 Hz, H-2), 5,06 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 5,04 (1H, dd, J<sub>2,3</sub> 10,4 Hz; J<sub>3,4</sub> 3,3 Hz, H-3), 4,88 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 4,69 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 7,9 Hz, H-1) 4,20 (1H, dd, J<sub>5,6a</sub> 6,7 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,1 Hz, H-6a), 4,14 (1H, dd, J<sub>5,6b</sub> 6,7 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,1 Hz, H-6b), 3,97 (1H, dt, J<sub>4,5</sub> 0,78 Hz; J<sub>5,6</sub> 6,7 Hz, H-5), 2,44 (3H, s, CH<sub>3</sub>) 2,15-1,98 (12H, 4 s, 4 CH<sub>3</sub>CO).

#### 4.2.1.4.5 4-(4-{{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il})benzenosulfametazina (**49**).

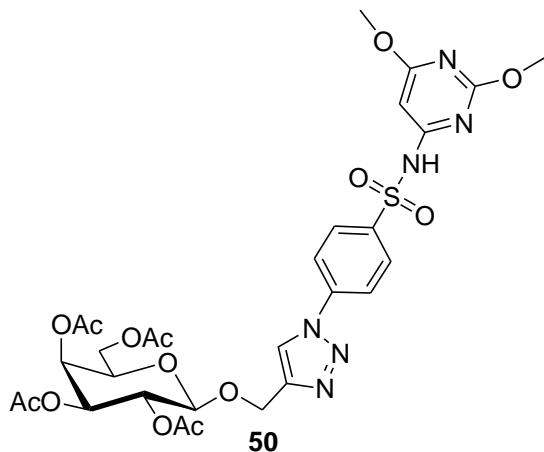


Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfametazina (**42**) (60,8 mg), tempo reacional de 10 minutos e temperatura de 70°C. **Rendimento:** 63% (0,126 mmol)

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 8,34 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,8; Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR) 8,06 (1H, s, H<sub>triazol</sub>), 7,90 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,8; Ar, CHC- triazol), 6,66 (1H, s, H<sub>pirimidina</sub>) 5,41 (1H, dd, J<sub>3,4</sub> 3,4 Hz; J<sub>4,5</sub> 1,0 Hz, H-4), 5,25 (1H, dd, J<sub>1,2</sub> 7,8 Hz; J<sub>2,3</sub> 10,3 Hz, H-2), 5,06 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 5,04 (1H, dd, J<sub>2,3</sub> 10,3 Hz; J<sub>3,4</sub> 3,4 Hz, H-3), 4,89 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 4,69 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 7,8 Hz, H-1) 4,21 (1H, dd, J<sub>5,6a</sub> 6,5 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,2 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd, J<sub>5,6b</sub> 6,5 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,2 Hz, H-6b),

3,97 (1H, dt,  $J_{4,5}$  1,0 Hz;  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 2,37 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>) 2,15-1,98 (12H, 4 s, 4 CH<sub>3</sub>CO).

**4.2.1.4.6 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfadimetoxina (50).**

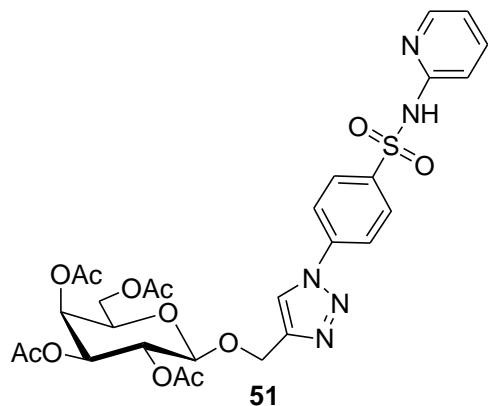


Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfadimetoxina (43) (67,2 mg), tempo reacional de 60 minutos e temperatura de 80°C.

**Rendimento:** 61% (0,122 mmol)

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) 8,14 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8; Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR) 8,04 (1H, s, H<sub>triazol</sub>), 7,91 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8; Ar, CHC- triazol), 6,24 (1H, s, H<sub>pirimidina</sub>) 5,41 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,4 Hz;  $J_{4,5}$  1,0 Hz, H-4), 5,25 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,8 Hz;  $J_{2,3}$  10,3 Hz, H-2), 5,06 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 5,05 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,3 Hz;  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-3), 4,89 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol), 4,69 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1) 4,21 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6b), 3,98 (1H, dt,  $J_{4,5}$  1,0 Hz;  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 3,92 (3H, s, CH<sub>3</sub>O) 3,90 (3H, s, CH<sub>3</sub>O) 2,16-1,99 (12H, 4 s, 4 CH<sub>3</sub>CO).

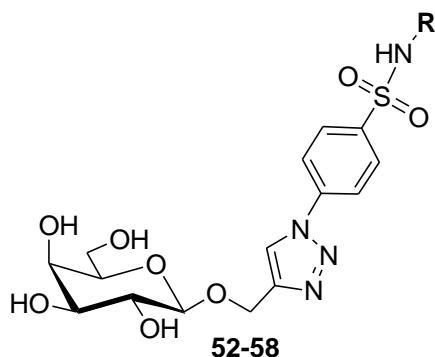
**4.2.1.4.7 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfapiridina (51).**



Seguindo o procedimento geral, empregando 4-azidobenzenosulfapiridina (**44**) (55 mg), tempo reacional de 30 minutos e temperatura de 80°C. **Rendimento:** 50% (0,1 mmol)

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 8,32 (1H, dd,  $J_{1,2}$  6,2 Hz;  $J_{1,3}$  1,0 Hz,  $H_{\text{piridina}}$ ) 8,1 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8; Ar,  $CHCSO_2NHR$ ) 8,04 (1H, s,  $H_{\text{triazol}}$ ), 7,86 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8; Ar,  $CHC$ - triazol), 7,75 (1H, ddd,  $J_{1,2}$  9,0 Hz;  $J_{1,3}$  6,2 Hz, ;  $J_{1,3}$  1,9 Hz  $H_{\text{piridina}}$ ) 7,44 (1H, dt,  $J_{3,2}$  9,0 Hz,  $J_{3,2}$  1,0 Hz  $H_{\text{piridina}}$ ) 6,84 (1H, dt,  $J_{4,3}$  6,2 Hz,  $J_{4,2}$  1,0 Hz,  $H_{\text{piridina}}$ ) 5,40 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,5 Hz;  $J_{4,5}$  0,9 Hz, H-4), 5,23 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,9 Hz;  $J_{2,3}$  10,3 Hz, H-2), 5,05 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 5,03 (1H, dd,  $J_{2,3}$  10,3 Hz;  $J_{3,4}$  3,5 Hz, H-3), 4,87 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol), 4,69 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,9 Hz, H-1) 4,19 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,3 Hz, H-6a), 4,14 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,3 Hz, H-6b), 3,97 (1H, dt,  $J_{4,5}$  0,9 Hz;  $J_{5,6}$  6,5 Hz, H-5), 2,14-1,97 (12H, 4 s, 4  $CH_3CO$ ).

#### 4.2.1.4.8 Procedimento geral de desacetilação dos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas



O derivado galactosil-triazolo-benzenossulfonamida (**45-51**) (0,1 mmol) previamente dissolvido em metanol (2,0 mL) foi tratado com 5 gotas de solução de metóxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> e o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, o meio reacional foi neutralizado com resina ácida (DOWEX® 50WX8 H<sup>+</sup>) filtrado e concentrado, sendo obtido o derivado galactosil-triazolo-benzenossulfonamida com hidroxila livre (**52-58**) em rendimento quantitativo.

#### Dados do composto:

##### **4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzeno sulfacetamida (53).**

**Dados do composto:** ( $\delta_H$  (ppm) (DMSO, 400 MHz) 8,98 (1H, s, H<sub>triazol</sub>), 8,17 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,7, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR ), 8,11 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  8,8, Ar, CHC- triazol), 4,94 (1H, d,  $^2J$  12,6 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,75 (1H, d,  $^2J$  12,6 Hz , CH<sub>2</sub>-triazol) 4,28 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,3 Hz, H-1) 3,64 (1H, s, H-4), 3,56 (2H,m, H-6) 3,42-3,28 (3H,m, H-2, H-3, H-5), 1,95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).  $\delta_C$  (ppm) (DMSO, 125 MHz) 169,24 (NHCOCH<sub>3</sub>), 145,65 (C triazol), 139,84 (CN triazol), 139,03 (CSO<sub>2</sub>), 130,0 (CH triazol) 122,8 (CH orto triazol), 122,8 (CH orto triazol), 120,27 (C orto SO<sub>2</sub>), 120,27 (C orto SO<sub>2</sub>), 102,98 (C-1), 75,36 (C-5), 73,36 (C-3), 70,5 (C-2), 68,23 (C-4), 61,34 (OCH<sub>2</sub>-triazol), 60,63 (C-6), 23,43 (CCONH).

##### **4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzeno sulfametoxazol (54)**

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) 8,67 (1H, s, H<sub>triazol</sub>), 8,07 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  9,0, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 8,04 (2H, d,  $J_{\text{ortho}}$  9,0, Ar, CHC- triazol), 6,14 (1H, s, H<sub>isoxazol</sub>) 5,01 (1H,d,  $^2J$  12,9 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,88-4,86 (1H,m, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,36 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1) 3,80 (1H, d,  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-4), 3,77 (1H, dd,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6a), 3,70 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  5,0 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,2 Hz, H-6b) 3,56-3,54 (1H,m, H-2), 3,54-3,52 (1H,m, H-5) 3,45 (1H, dd,  $J_{2,3}$  9,6 Hz;  $J_{3,4}$  3,4 Hz, H-3) 2,29 (3H, s, CH<sub>3</sub>).  $\delta_C$  (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) 171,0 (OCCH<sub>3</sub> isoxazol), 157,7 (CHCN isoxazol), 146,07 (C triazol), 140,22 (CSO<sub>2</sub>), 139,7 (CN triazol), 120,37 (CH orto triazol),

120,37 (CH orto triazol), 123,8 (CH orto SO<sub>2</sub>), 123,8 (CH orto SO<sub>2</sub>), 122,39 (CH triazol), 95,13 (CH isoxazol), 103,1 (C-1), 75,3 (C-5), 73,53 (C-3), 71,12 (C-2), 69,01 (C-4), 61,74 (OCH<sub>2</sub>-triazol), 61,30 (C-6), 10,9 (CH<sub>3</sub> isoxazol).

**4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzeno sulfamerazina (55)**

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) 8,62 (1H, s, H<sub>triazol</sub>) 8,27 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 5,9 Hz, H<sub>pirimidina</sub>) 8,16 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,7, Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 7,95 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,7, Ar, CHC- triazol), 6,92 (1H, d, J<sub>2,1</sub> 5,6 Hz, H<sub>pirimidina</sub>) 5,11 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,99 (1H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,57 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 7,7 Hz, H-1) 3,96 (1H, d, J<sub>3,4</sub> 3,2 Hz; H-4), 3,84-3,78 (2H, m, H-6), 3,77-3,74 (1H, m, H-5) 3,68 (1H, dd, J<sub>2,3</sub> 10,0 Hz; J<sub>3,4</sub> 3,3 Hz, H-3) 3,58 (1H, dd, J<sub>1,2</sub> 7,8 Hz; J<sub>2,3</sub> 9,7 Hz, H-2), 2,46 (3H, s, CH<sub>3</sub>). δ<sub>C</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) 155,5 (C pirimidina), 155,5 (CCH<sub>3</sub> pirimidina), 144,6 (NCH pirimidina), 141,3 (C-triazol), 139,0 (CSO<sub>2</sub>), 139,0 (CN triazol), 128,8 (CH orto triazol), 128,8 (CH orto triazol), 123,8 (CH orto SO<sub>2</sub>), 123,8 (CH orto SO<sub>2</sub>), 121,0 (CH triazol), 111,8 (CCH pirimidina), 102,3 (C-1), 75,3 (C-5), 72,7 (C-3), 70,7 (C-2), 68,6 (C-4), 61,8 (OCH<sub>2</sub>-triazol), 61,0 (C-6), 31,3 (CH<sub>3</sub> pirimidina).

**4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzeno sulfametazina (56)**

**Dados do composto:** δ<sub>H</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) 8,66 (1H, s, H<sub>triazol</sub>) 8,23 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,9; Ar, CHCSO<sub>2</sub>NHR), 8,0 (2H, d, J<sub>orto</sub> 8,9; Ar, CHC- triazol), 6,67 (1H, s, H<sub>pirimidina</sub>) 5,02 (2H,d, <sup>2</sup>J 12,8 Hz, CH<sub>2</sub>-triazol) 4,37 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 7,5 Hz, H-1) 3,81 (1H, dd, J<sub>3,4</sub> 3,1 Hz; J<sub>4,5</sub> 0,9 Hz, H-4), 3,76 (1H, dd, J<sub>5,6a</sub> 5,0 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,3 Hz, H-6a), 3,71 (1H, dd, J<sub>5,6b</sub> 5,0 Hz; J<sub>6a,6b</sub> 11,5 Hz, H-6b) 3,55 (1H, dd, J<sub>1,2</sub> 7,5 Hz; J<sub>2,3</sub> 9,7 Hz, H-2), 3,55 (1H, d, J<sub>5,6</sub> 6,5 Hz, H-5) 3,46 (1H, dd, J<sub>2,3</sub> 9,7 Hz; J<sub>3,4</sub> 3,3 Hz, H-3), 2,29 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm) (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) 160,12 ( C pirimidina), 160,12 ( CN pirimidina) , 160,12 ( CN pirimidina), 150 (C-triazol), 145,2 (CSO<sub>2</sub>) 143,5 (CN triazol) 133,9 (CH orto SO<sub>2</sub>), 133,9 (CH orto SO<sub>2</sub>), 126,7 (CH triazol) 123,4 (CH orto triazol), 123,4 (C orto triazol), 116,3 (CH pirimidina) 106,9 (C-1) 79,4 (C-5), 77,4 (C-2), 75,0 (C-3), 72,9 (C-4), 65,6 (OCH<sub>2</sub>-triazol), 65,2 (C-6), 25,5 (CH<sub>3</sub> pirimidina), 25,5 (CH<sub>3</sub> pirimidina).

**4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzeno  
sulfadimetoxina (57)**

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 400 MHz) 8,67 (1H, s,  $H_{triazol}$ ) 8,17 (2H, d,  $J_{ortho}$  9,0; Ar,  $CHCSO_2NHR$ ), 8,06 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,8; Ar,  $CHC$ - triazol), 6,06 (1H, s,  $H_{pirimidina}$ ) 5,03 (1H,d,  $^2J$  12,9 Hz,  $CH_2$ -triazol) 4,90-4,86 (1H,m,  $CH_2$ -triazol) 4,38 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,5 Hz, H-1) 3,84 (3H, s,  $CH_3O$ ) 3,83 (3H, s,  $CH_3O$ ) 3,83 (1H, dd,  $J_{3,4}$  3,5 Hz;  $J_{4,5}$  1,2 Hz, H-4), 3,80-3,76 (1H, m, H-6a) 3,72 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  4,9 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,4 Hz, H-6b) 3,58 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,5 Hz;  $J_{2,3}$  9,7 Hz, H-2) 3,58 (1H, dt,  $J_{4,5}$  1,2 Hz;  $J_{5,6}$  6,0 Hz, H-5) 3,47 (1H, dd,  $J_{2,3}$  9,7 Hz;  $J_{3,4}$  3,3 Hz, H-3).  $\delta_C$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 125 MHz) 171,7 ( $COCH_3$  pirimidina), 159,9 (CN primidina) 159,9 ( $COCH_3$  pirimidina), 145,5 (C triazol), 139,5 (CN triazol) 139,5 ( $CSO_2$ ) 129,1 (CH orto triazol), 129,1 (CH orto triazol) 122,9 (CH triazol), 120,3 (CH orto  $SO_2$ ), 120,3 (CH orto  $SO_2$ ), 102,8 (C-1), 84,7 (CH pirimidina), 75,3 (C-2), 73,3 (C-3), 70,5 (C-5), 68,2 (C-4), 61,2 ( $OCH_2$ -triazol), 60,85 (C-6), 55,6 ( $OCH_3$ -pirimidina), 53,9 ( $OCH_3$ -pirimidina)

**4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzeno  
sulfapiridina (58):**

**Dados do composto:**  $\delta_H$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 400 MHz) 8,64 (1H, s,  $H_{triazol}$ ) 8,1 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,7; Ar,  $CHCSO_2NHR$ ) 7,98 (2H, d,  $J_{ortho}$  8,7; Ar,  $CHC$ - triazol) 7,94 (1H, d,  $J_{1,2}$  5,7 Hz;  $H_{piridina}$ ), 7,74 (1H, m,  $H_{piridina}$ ) 7,29 (1H, d,  $J_{1,2}$  8,8 Hz,  $H_{piridina}$ ) 6,86 (1H, t,  $J_{4,3}$  6,1 Hz,  $H_{piridina}$ ) 5,01 (1H,d,  $^2J$  12,8 Hz,  $CH_2$ -triazol) 4,95 (1H,d,  $^2J$  12,9 Hz,  $CH_2$ -triazol) 4,37 (1H, d,  $J_{1,2}$  7,6 Hz, H-1) 3,81 (1H, d,  $J_{3,4}$  3,2 Hz; H-4) 3,77 (1H, m, H-6a), 3,71 (1H, dd,  $J_{5,6b}$  4,9 Hz;  $J_{6a,6b}$  11,4 Hz, H-6b) 3,55 (1H, dd,  $J_{1,2}$  7,6 Hz;  $J_{2,3}$  9,6 Hz, H-2), 3,55 (1H, m, H-5) 3,46 (1H, dd,  $J_{2,3}$  9,7 Hz;  $J_{3,4}$  3,3 Hz, H-3).  $\delta_C$  (ppm) ( $CD_3OD$ , 125 MHz) 145,9 (C-piridina), 145,9 (C-triazol), 142,35 (CH piridina), 141,26 (CH piridina), 139,35 ( $CSO_2$ ), 139,35 (CN triazol), 128,38 (CH orto triazol), 128,38 (CH orto triazol), 122,8 (CH triazol), 120,1 (CH orto  $SO_2$ ), 120,1 (CH orto  $SO_2$ ), 115 (CH piridina), 115,3 (CH piridina), 103,1 (C-1), 75,5 (C-5), 73,5 (C-3), 71,08 (C-2), 69,0 (C-4), 61,7 ( $OCH_2$ -triazol), 61,2 (C-6) .

## 6.2.2 Ensaios biológicos

### 6.2.2.1 Ensaio de inibição

O ensaio de inibição enzimática foi realizado utilizando o método fluorimétrico contínuo já descrito na literatura (NERES et al., 2006). Todas as medidas de fluorescência foram lidas no fluorímetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader através do programa Gen5. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,0 (25,0 µL), solução diluída da enzima *trans*-sialidase recombinante (25,0 µL) e solução de um dos compostos (**52-58**) (25,0 µL de uma solução 4,0 mM). Essa mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 25 °C e a reação foi iniciada com adição do substrato ácido 2'-(4-metilumbeliférril)- $\alpha$ -D-N-acetylneurâmico (MuNANA) (25,0 µL de uma solução 0,4 mM). A fluorescência liberada pelo composto foi monitorada a 25°C durante 10 minutos, em comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão), e seus dados foram analisados no programa GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA, USA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 6.2.2.2 Ensaio de atividade tripanocida e citotoxicidade

Células de rim de macacos (LLC-MK2 strain- ATCC) foram ressuspensas em meio RPMI na ausência de vermelho fenol (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY) contendo 10 % de soro fetal bovino (Life Technologies Inc., Bethesda, MD) e antibióticos (Sigma Chemical Co., St. Louis). Em placas de 96 poços foram cultivadas  $2,0 \times 10^3$  células/poço por 24 horas. As células foram então infectadas com  $1,0 \times 10^4$  de parasitas da forma tripomastigota de *T. cruzi* cepa Tulahuen, a qual expressa o gene de  $\beta$ -galactosidase a partir de *E. coli*, e após 24 horas os compostos foram adicionados nas concentrações de 500 µM a 1,9 µM. Após 4 dias de cultura, 50,0 µl de PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e 100,0 µM “Chlorophenol Red- $\beta$ -D-galactoside” (CPRG -Sigma) foram adicionados. As placas foram incubadas a 37°C por 4 horas e os valores de absorbância foram lidos a 570 nm (BUCKNER et al., 1996)

A citotoxicidade dos compostos sobre células de mamíferos foi avaliada da seguinte maneira: células de baço de camundongos C57BL/6 (SILVA et al., 2008)

foram isoladas por dissociação e incubadas por 5 minutos com tampão para lise das hemáceas (uma parte de 0,17 M Tris-HCl pH 7,5 e nove partes de 0,16 M cloreto de amônio). As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e cultivadas em placas de 96 poços contendo  $5,0 \times 10^5$  célula/poço com diferentes concentrações dos compostos (500 µM a 3,9 µM) a 37°C por 24 horas. Tween 20 a 0,5% foi utilizado como controle positivo de morte celular. As células foram separadas, incubadas com 10,0 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma) e os resultados obtidos analisadas no aparelho FACSCantoll (Becton-Dickinson Immunocytometry System Inc., San Jose, CA, USA). pelo programa FlowJo (Ashland, Oregon, USA).

## 5. CONCLUSÕES

Frente às dificuldades encontradas na síntese, é importante destacar que o método utilizado na preparação de vários compostos foi reavaliado, repetido e/ou alterado a fim de que os rendimentos fossem otimizados.

O trabalho permitiu a síntese do intermediário de galactose contendo a função alcino terminal **30**, bem como dos derivados aril azidas **38-44**, que após reação de CuAAC resultaram nos derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas acelilados **45-51**. A desacetilação permitiu a obtenção dos produtos galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas **52-58** em rendimentos satisfatórios.

Por fim, os produtos **52-58** foram submetidos a ensaio de inibição de TcTS. A inibição de 81% apresentada pelo produto **58** (1,0 mM), derivado contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfapiridina, foi bastante promissora e abre perspectivas para a síntese de um maior número de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas com diferentes substituintes em R para o estabelecimento de estudos de relação estrutura-atividade e a taxa de inibição da enzima *trans*-sialidase.

Os produtos **53-55** também foram testados em ensaios *in vitro*, envolvendo a forma tripomastigota de *T. cruzi* cepa Tulahuen, trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP - USP). O resultado apresentado pelo produto **55**, derivado contendo o grupo galactosil-triazólico ligado a sulfamerazina, parece ser bastante promissor, pois sua atividade foi superior ao benznidazol nas concentrações mais baixas. A realização dos estudos sobre a influência do pKa sobre a atividade tripanocida dependerá dos resultados de atividade tripanocida apresentada pelos produtos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein superfamily of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 114, p.143-150, 2001.
- AGRELLOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Ac $\alpha$ 2→3 Galp $\beta$ 1→6(Galf $\beta$ 1→4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.93-96, 2003.
- AGUSTI, R.; PARIS, G.; RATIER, L.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v.14, p.659-670, 2004.
- AGUSTI, R.; GIORGI, M. E.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; LEDERKREMER, R. M. Comparative rates of sialylation by recombinant trans-sialidase and inhibitor properties of synthetic oligosaccharides from *Trypanosoma cruzi* mucins-containing galactofuranose and galactopyranose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2611-2616, 2007.
- AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Chagas disease centenary. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p.381-382, 2009.
- 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.
- ANDRIANI, G; AMATA, E; BEATTY, J; CLEMENTS, Z; COFFEY, B; COURTEMANCHE, G ; DEVINE, W; ERATH, J; JUDA, C; WAWRZAK, Z; WOOD, J; LEPESHEVA, G; RODRIGUEZ, A; POLLASTRI, M. Antitrypanosomal Lead Discovery: Identification of a Ligand-Efficient Inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and Parasite Growth. **J. Med. Chem.**,v. 56, p. 2556–2567, 2013
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related Alpha-keto Acids: an Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews**, v.102, p.439-469, 2002.
- BARRAL, K; MOORHOUSE, A. D. ; MOSES, J. E. Efficient conversion of aromatic amines into azides: a One-Pot synthesis of triazole linkages. **Organic Letters**, vol. 9, n. 9, p. 1809-1811, 2007
- BOCANEGRA-GARCIA, V.; VILLALOBOS-ROCHA, J.; NOGUEDA-TORRES, B.; LEMUS- HERNANDEZ, M .; CAMARGO-ORDÓÑEZ, A.; ROSAS-GARCIA, N.; RIVERA, G. Synthesis and Biological Evaluation of New Sulfonamide Derivatives as Potential Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1039-1044, 2012

- BRASE, S.; GIL, C.; KNEPPER, K.; ZIMMERMANN, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. **Angew. Chem. Int. Ed**, v.44, p. 5188-5240, 2005.
- BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. Cu(I)-catalyzed alkyne-azide click cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 1, p. 51-68, 2006.
- BUCHINI, S.; BUSCHIAZZO, A.; WITHERS, S. G. A New Generation of Specific *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase Inhibitors. **Angew. Chem. Int. Ed**, v.47, p.2700-2703, 2008.
- 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.
- BUSSE, H.; HAKODA, M., STANLEY, M.; STREICHER, H. Galactose-phosphonates as mimetics of the sialyltransfer by trypanosomal sialidases. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.26, p.159-194, 2007.
- CHATELAIN, E.; LOSET, J-R. Drug discover and development for neglected diseases: the DND*i* model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 175-181, 2011.
- 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.
- CLAYTON, J. **Outlook Nature**, p.S4-S5. Disponível em: <<http://www.nature.com/outlooks>>. Acesso em: 15 fev. 2011 .
- CLAYTON, J. **Outlook Nature**, p. S12-S15. Disponível em: <<http://www.nature.com/outlooks>>. Acesso em: 15 fev. 2011.
- CLAYTON, J. **Outlook Nature**, p. S16-S17. Disponível em: <<http://www.nature.com/outlooks>>. Acesso em: 15 fev. 2011 .
- 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.
- 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.
- DA SILVA, R.; DE SOUZA, G.H.; DA SILVA, A.A.; DE SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; DONATE, P.M.; DE MATOS ARAUJO, A.L.; CARVALHO, J.C.; BASTOS, J.K. Synthesis and biological activity evaluation of

- lignan lactones derived from (-)-cubebin. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.15, p.1033–1037, 2005
- DA SILVA , A.; LOPES , R.; LIMA , R.; TOZATTI , C.; MARQUES, M.; ALBUQUERQUE, S.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. Synthesis and biological activity against Trypanosoma cruzi of substituted 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry.** V.60, p.51e56, 2013
- DA SILVA, L.E.; JOUSSEF A.C.; PACHECO, LK.; DA SILVA, D.G.; STEINDEL, M.; REBELO R.A. Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-ylarylsulfonamides. **Bioorg. Med. Chem.** v.15, p.7553-7560, 2007
- DAS, J.; PATIL, S. N.; AWASTHI, R.; NARASIMHULU, C. P.; TREHAN, S. An easy access to aryl azides from aryl amines under neutral conditions. **Synthesis**, v.11, p. 1801-1806, 2005.
- DENINNO, M. P. The synthesis and glycosidation of. *N*-acetylneuraminic acid. **Synthesis**, v. 8, p. 593, 1991.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da Doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova**, v 32, n.9, p.2444-2457, 2009.
- 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.
- DI-NOIA, J. M.; POLLEVICK, G. D.; XAVIER, M. T.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.32078-32083, 1996.
- DO CAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, p.1157-1164, 2001.
- EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, p.409-415, 2005.
- ESPERANDIM, V; FERREIRA , D; REZENDE, K; CUNHA, W; SARAIWA, J; BASTOS , J; ANDRADE, J; ALBUQUERQUE, S. Evaluation of the *in vivo* therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-hinokinin against Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology** , v.133 p. 442–446, 2013
- FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chaga's Disease. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59, supl.II, p.179-187, 1999.
- FERRERO-GARCIA, M. A.; TROMBETTA, S. E.; SANCHEZ, D. O.; REGLERO, A.; FRASCH, A. C. C.; PARODI, A. J. The action of *Trypanosoma cruzi trans-sialidase*

- on glycolipids and glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v.213, p.765-771, 1993.
- FRASCH, A. C. C.; BUSCAGLIA, C. A.; LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the enzymatic domain. **Journal of Infectious Disease**, v.177, p.431, 1998.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Centenário de Descoberta da Doença de Chagas**. Portal da Fiocruz, 2009. Disponível em: <[www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)>. Acesso em: 17 de janeiro de 2011.
- GALLERANO R., MARR J., SOSA R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; v. 43 p.159–66, 1990.
- GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Lett.**, v.27, p. 279-282, 1986.
- GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, M. S.; MAJETICH, G.. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Lett.**, v. 27, p. 4945-4948, 1986.
- GRAEBIN, C. S.; UCHOA, F. D.; BERNARDES, L.S.C.; CAMPO, V.L.; CARVALHO, I.; EIFLER-LIMA, V. L. Antiprotozoal Agents: An Overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.345-366, 2009.
- GUEDES, P. M.M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; DA SILVA, G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; DO VALLE MATTA, M. A.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. BR. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO]<sup>2+</sup> as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **Journal of Pharmacology**, v.160, n.2, p.270 -282, 2010.
- 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- $\alpha$ -2,3-Gal- $\beta$ -O-PNP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.141-144, 2001.
- HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 210-216, 2005.
- JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic O-glycosylation. **Carbohydrate Research**, v.341, p.1266-1281, 2006.
- JUNIOR, E. N. S.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; SILVA, R. S. F.; TEIXEIRA, D. V.; SOUZA, M.C.B.V.; SIMONE, C. A.; CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active

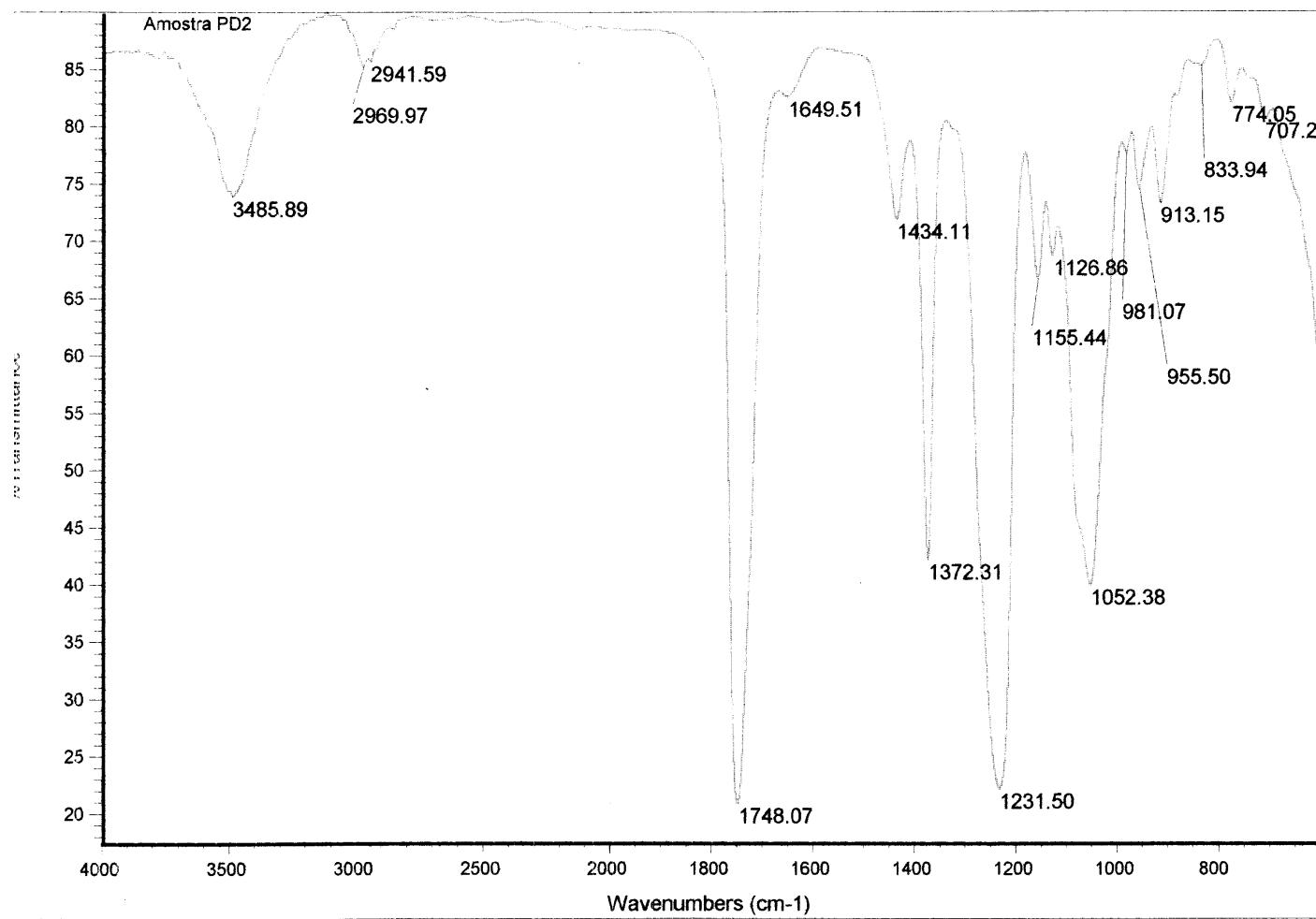
- against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p. 1774-1780, 2008.
- KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v.53, n.34, p.11753 11766, 1997.
- KAPPE, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 43, p. 6250 –6284, 2004.
- KIM, J. H.; RYU, H. W.; SHIM, J. H.; PARK, K. H.; WITHERS, S. G. Development of New and Selective *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase Inhibitors from Sulfonamide Chalcones and Their Derivatives. **Chembiochem**, v.10, p.2475-2479, 2009.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angew. Chem. Int Edn** v. 40, p. 2004–2021, 2001.
- KRAUS J. M.; VERLINDE, C. L.; KARIMI, M.; LEPESHEVA, G. I.; GELB, M. H.; BUCKNER, F. S. Rational Modification of a Candidate Cancer Drug for Use Against Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.1639–1647, 2009.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COOMBS, G. H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. **Parasitology Today**, v.15, p.404-409, 1999
- LEE, S-G.; KIM, B-G. Development of spectrophotometric method for monitoring trans-sialidase reaction and its application **Biotechnology Letters**, v.22, p.819-823, 2000.
- MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; URBINA. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 137-140, 2000.
- MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current Drug Targets**, v.10, p.212-231, 2009.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p.17-30, 2009.
- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.401-404, 1999.
- MUELAS, S.; SUÁREZ, M.; PËREZ, 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.

- MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; GÓMEZ-BARRO, 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.
- MUTHANA, S.; YU, H.; HUANG, S.; CHEN, X. Chemoenzymatic Synthesis of Size Defined Polysaccharides by Sialyltransferase-Catalyzed Block Transfer of Oligosaccharides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 11918-11919, 2007.
- NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous Fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **Analytical Biochemistry**, v.357, p.302-304, 2006.
- NERES, J.; BONNET, P.; EDWARDS, P. N.; KOTIAN, P. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2106-2119, 2007.
- NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 110-117, 2008.
- NERES, J.; BREWER, M. L.; RATIER, L.; BOTTI, H.; BUSCHIAZZO, A.; EDWARDS, P. N.; MORTENSON, P. N.; CHARLTON, M. H.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase from in silico screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 589-596, 2009.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9a. edição, Ed. Atheneu, Belo Horizonte, 1995, p.82.
- NWAKA, S.; RAMIREZ, B.; BRUN, R.; MAES, L.; DOUGLAS, F.; RIDLEY, R. Advancing drug innovation for neglected diseases- Criteria for Lead Progression. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 1-13, 2009.
- OMS. Report sobre la enfermedad de Chagas. Actualizado en Julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas>>. Acesso em: 30 jan. 2011.
- OSBORN, H. M. I. **Synthetic Methods of Carbohydrates**; 1º ed.; The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, UK, Academic Press, 2003.
- PAGLIERO, R.J.; LUSVARGHI, S.; PIERINI, A.B.; BRUN, R.; MAZZIERI, MR. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquino-lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p.142-150, 2010.

- 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.
- 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.
- PEREIRA-CHIOCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; DE ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A. J.; 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.
- PEREZ-MAZLIAH, D; ALVAREZ, M; COOLEY, G; LOCOCO, B; BERTOCCHI, G; PETTI, M; ALBAREDA, M; ARMENTI, A; TARLETON, R; LAUCELLA, S; R. VIOTTI. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p. 424-437, 2013
- PETHERICK, A. **Outlook Nature**, p. S10-S11. Disponível em: <<http://www.nature.com/outlooks>>. Acesso em: 15 fev. 2011
- 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.
- RAMOS, A. M.; DUSCHAK, V. G.; GEREZ DE BURGOS, N. M.; BARBOZA, M.; REMEDI, M. S.; VIDES, M. A.; CHIABRANDOA, G. A. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human  $\alpha$ -2-macroglobulin and pregnancy zone protein. **Experimental Parasitology**, v.100, p.121-130, 2002.
- RASSI, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v.95, p.524-534, 2009.
- REN, T.; ZHANG, G.; LIU, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.1007–1010, 2001.
- RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCIA, V.; ORDAZ-PICHARDO, C.; NOGUEDA-TORRES, B.; MONGE, A. New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi*, advances and perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3286-3293, 2009.

- RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the Ligand-Free Cu-I-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 44, p. 2215-2220, 2005.
- SANCHEZ-MORENO, M.; SANZ, A. M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACIAS, I.; ROSALES, M. J.; OLMO, F.; GARCIA-ARANDA, I.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; ARREBOLA, F.; YUNTA, M. J. R. *In Vivo* Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[g]phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p.970-979, 2011.
- SCHRADER, S.; TIRALONGO, E.; PARIS, G.; YOSHINO, T.; SHAUER, R. A nonradioactive 96-well plate assay for screening of *trans*-sialidase activity. **Analytical Biochemistry**, v.322, p.139-147, 2003.
- STEVERDING D. AND. TYLER, K. M. Novel antitrypanosomal agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.14, p.939-955, 2005.
- STREICHER, H.; BUSSE, H. Building a successful structural motif into sialylmimetics-cyclohexene phosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.1047-1057, 2006.
- STTOPANI, A. O. M. Quimioterapia de La Enfermidade de Chagas. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59 (Supl II), p.147-165, 1999.
- STRAUSS, M; LO PRESTI, M; BAZÁN, P; BAEZ, A; FAURO, R; ESTEVES, B; NEGRETE, O; CREMONEZZI, D; PAGLINI-OLIVA, P; RIVAROLA, H. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology International** , v.62, p.293–299, 2013.
- 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.
- URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.
- VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; TOMLINSON, S.; KISO, M., YOSHIDA, M.; HASEGAWA, A.; NUSSENZWEIG, V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase. **Glycobiology**, v.2, p.541-548, 1992.
- 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.

- VEIGA-SANTOS, P; BARRIAS, E; SANTOS, J; MOREIRA, T; CARVALHO, T; URBINA, J; SOUZA, W. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 61– 71, 2012
- VIK, A.; PROSZENYÁK, A.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L.; GUNDERSEN, L. L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for visceral leishmaniasis and Chagas disease. **Molecules**, v.14, p.279-288, 2009.
- WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; AMAYA, M. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.532-7533, 2003.
- WENDEL, S.; GONZAGA, A. L. Chaga's Disease and Blood Transfusion: a new world problem? **Vox Sanguinis**, v.64, p.1-12, 1993.
- WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs upped investment, **Nature Medicine**, v. 19, p. 2, 2013.
- ZHANG, F.; MOSES, J. E. Benzyne Click Chemistry with in Situ Generated Aromatic Azides. **Organic Letters**, vol. 11, n. 7, p. 1587-1590, 2009
- 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.



Anexo 1. Espectro na região do infravermelho do composto 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosídeo (**28**)

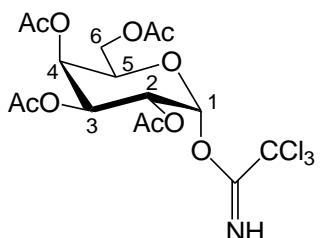
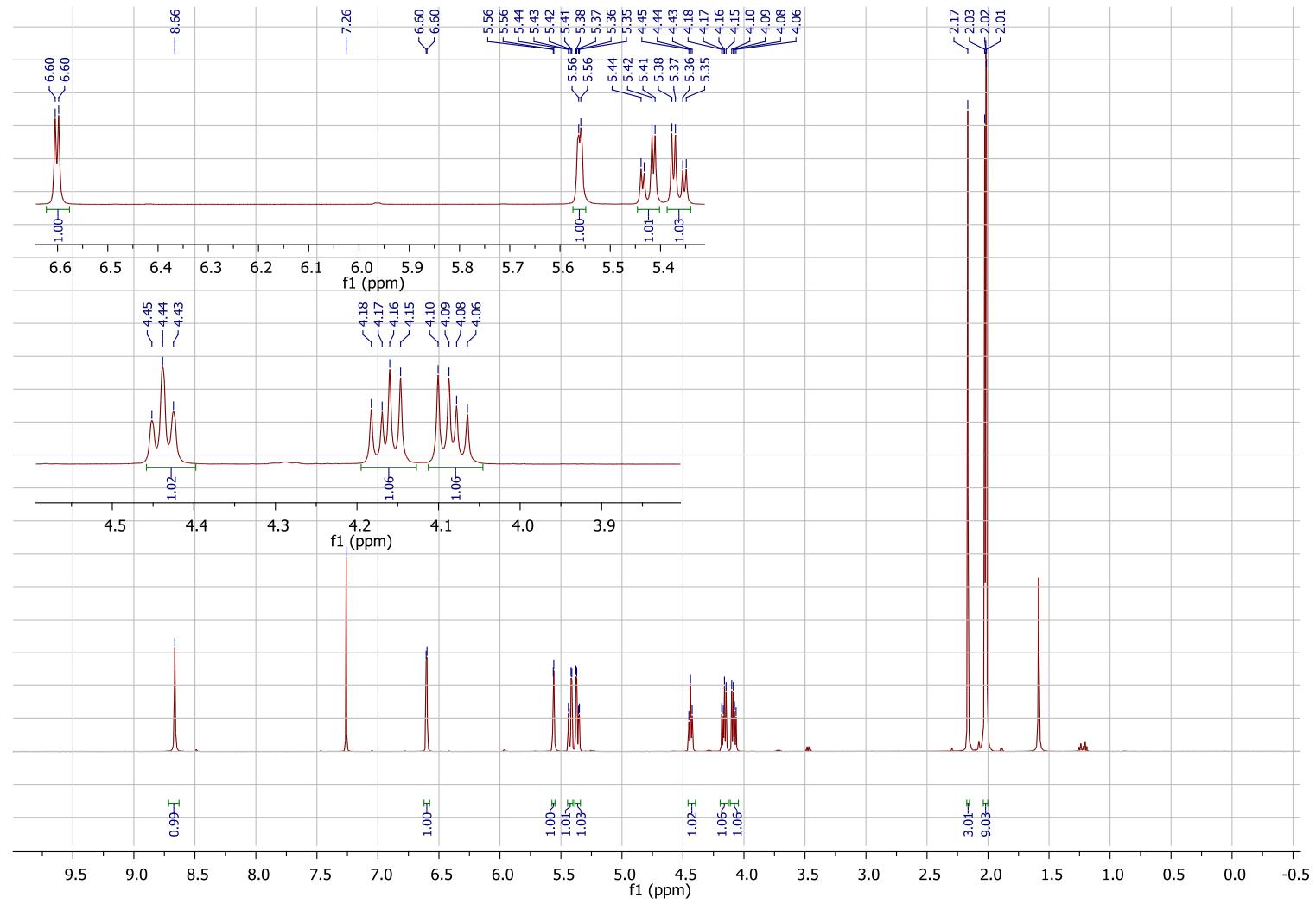


Tabela 5. Dados espectroscópicos do composto **29**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	6,60	1	d	$J_{1,2} = J_{1,2} = 3,6$
2	5,36	1	dd	$J_{1,2} = 3,6; J_{2,3} = 10,9$
3	5,42	1	dd	$J_{2,3} = 10,9; J_{3,4} = 3,1$
4	5,56	1	d	$J_{3,4} = 3,0$
5	4,44	1	t	$J_{5,6} = 6,6$
6a	4,16	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	4,08	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
NH	8,66	1	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,17-2,01	12	s	-



**Anexo 2.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopiranosila (29)

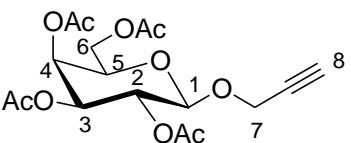
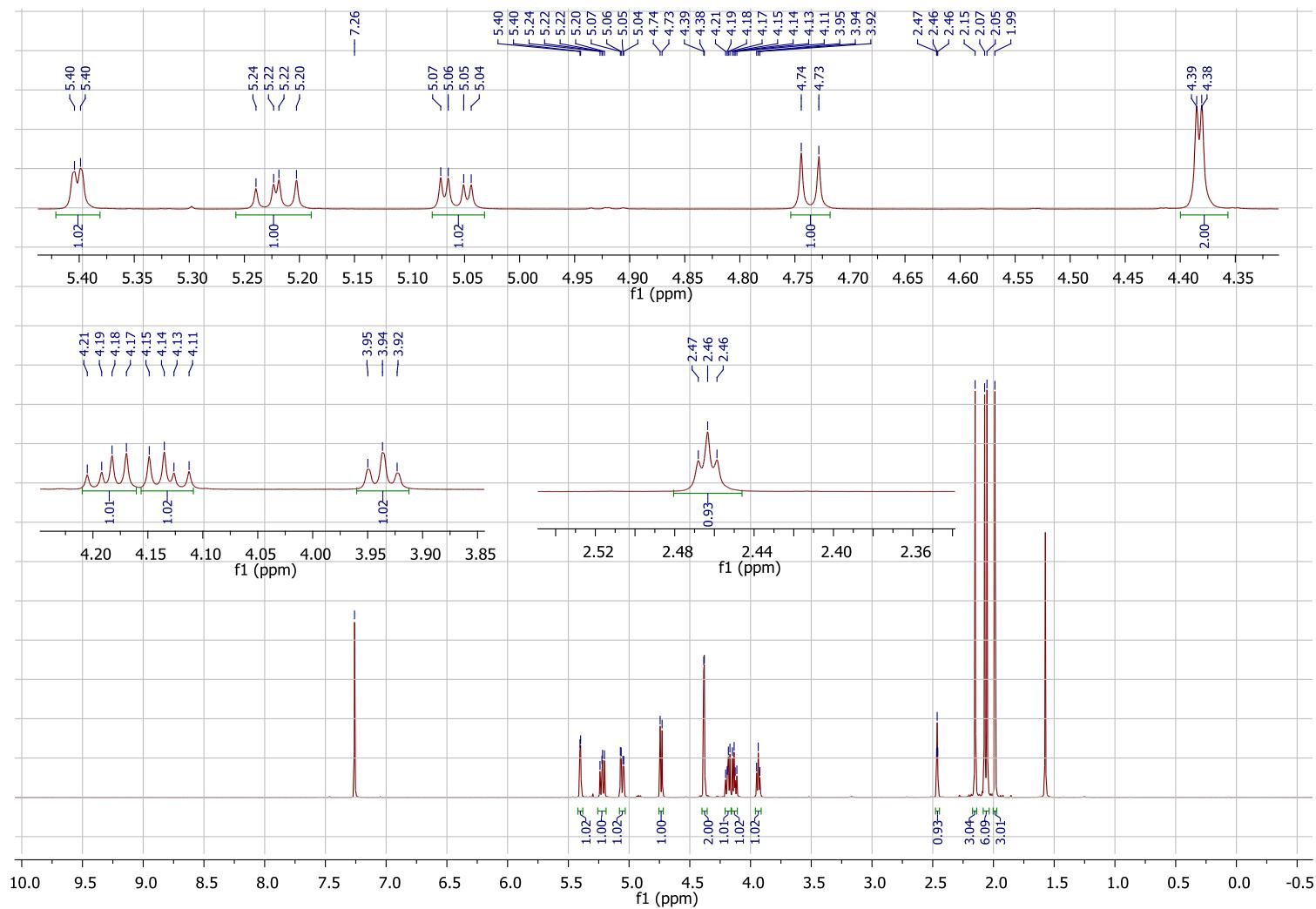


Tabela 6. Dados espectroscópicos do composto **30**

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,74	1	d	$J_{1,2} = J_{1,2}, 8,0$
2	5,22	1	dd	$J_{1,2} = 7,9; J_{2,3} = 10,5$
3	5,06	1	dd	$J_{2,3} = 10,5; J_{3,4} = 3,6$
4	5,40	1	dd	$J_{3,4} 3,4; J_{4,5} 1,1$
5	3,94	1	dt	$J_{4,5} 1,1 J_{5,6} = 6,8$
6a	4,19	1	dd	$J_{5,6a} = 6,6; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	4,13	1	dd	$J_{5,6b} = 6,6; J_{6a,6b} = 11,2$
OCH <sub>2</sub> CCH	4,38	2	d	$J= 2,4$
CH <sub>2</sub> CCH	2,46	1	t	$J= 2,4$
COCH <sub>3</sub>	2,15-1,99	12	s	-



Anexo 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 1-O-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**30**)

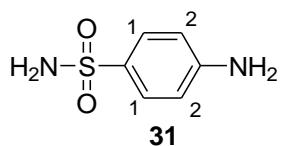
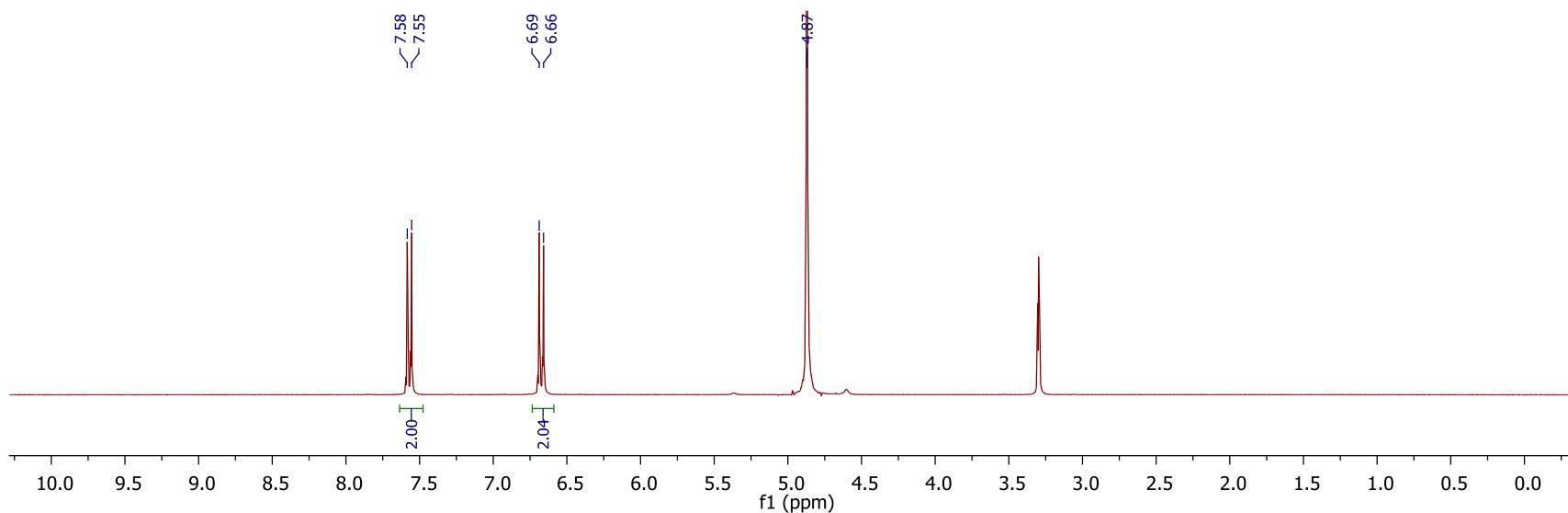


Tabela 7- Dados espectroscópicos do composto **31**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,56	2	d	$J_{1,2} = 8,9$
2	6,68	2	d	$J_{1,2} = 8,9$



**Anexo 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfanilamina (**31**).

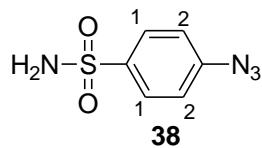
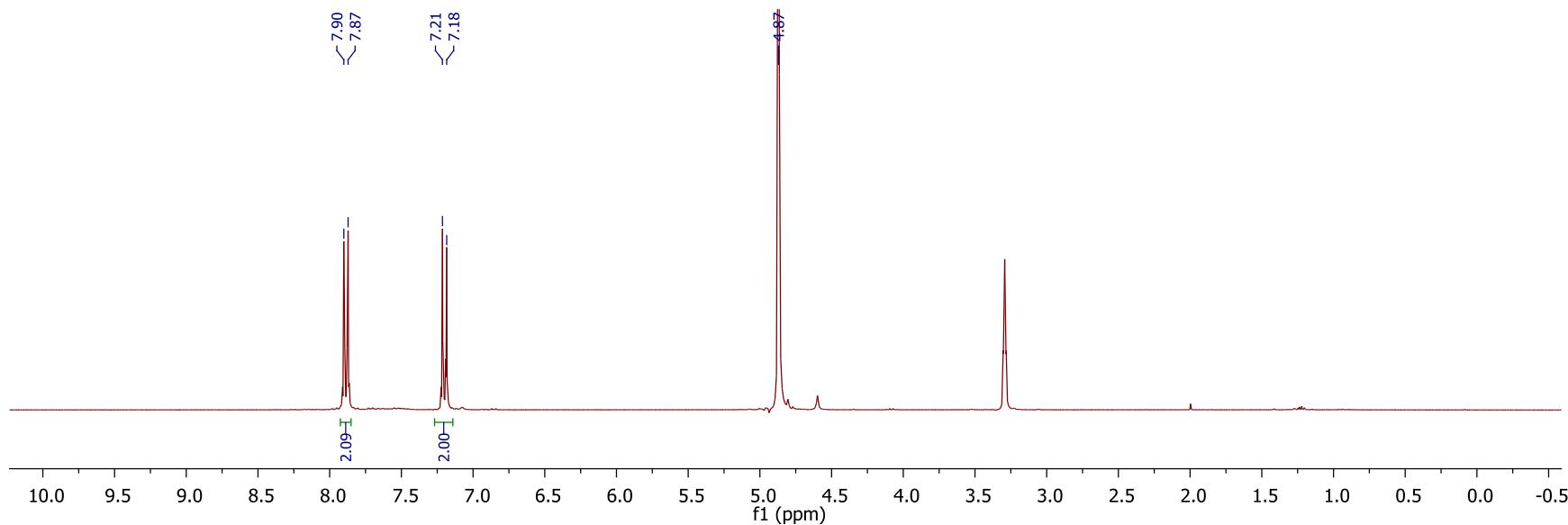
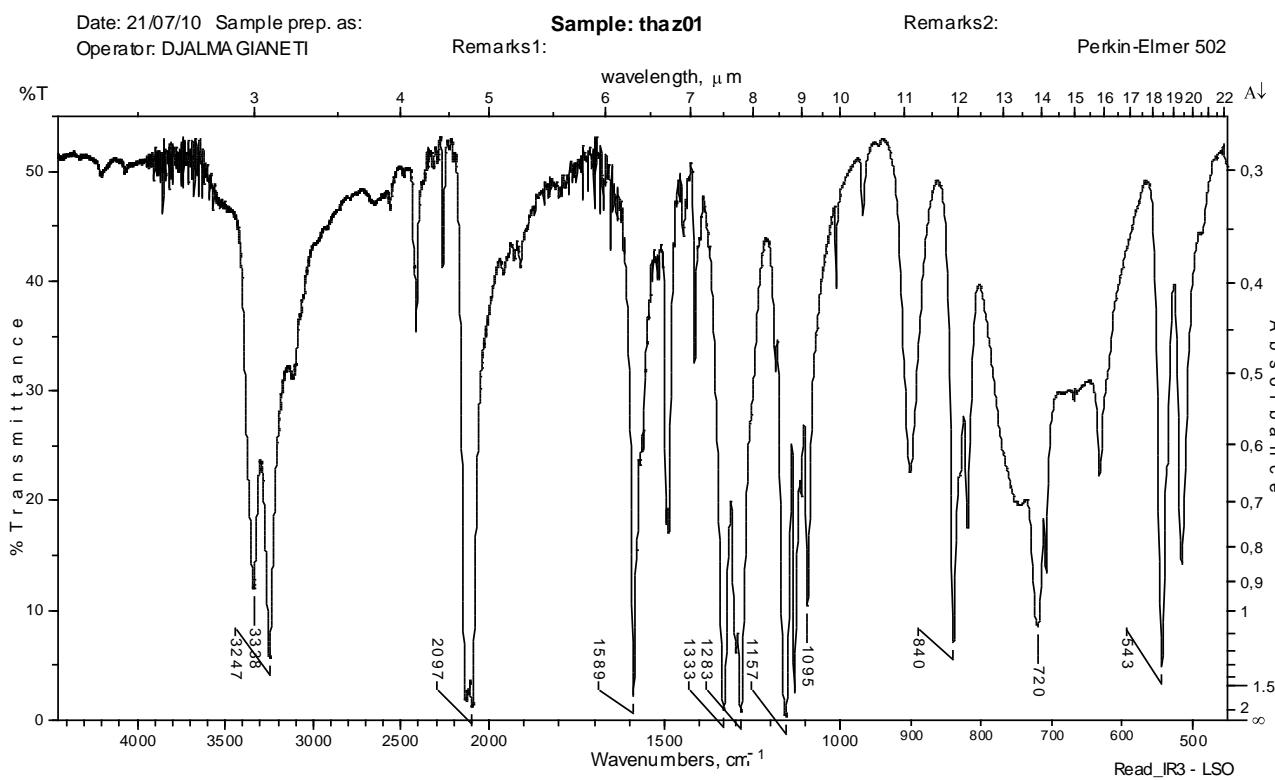


Tabela 8- Dados espectroscópicos do composto **38**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,89	2	d	$J_{1,2} = 8,9$
2	7,21	2	d	$J_{1,2} = 8,9$



**Anexo 5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfanilamina (**38**).



**Anexo 5.1- Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfanilamina (38)**

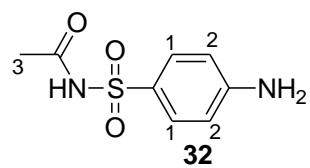
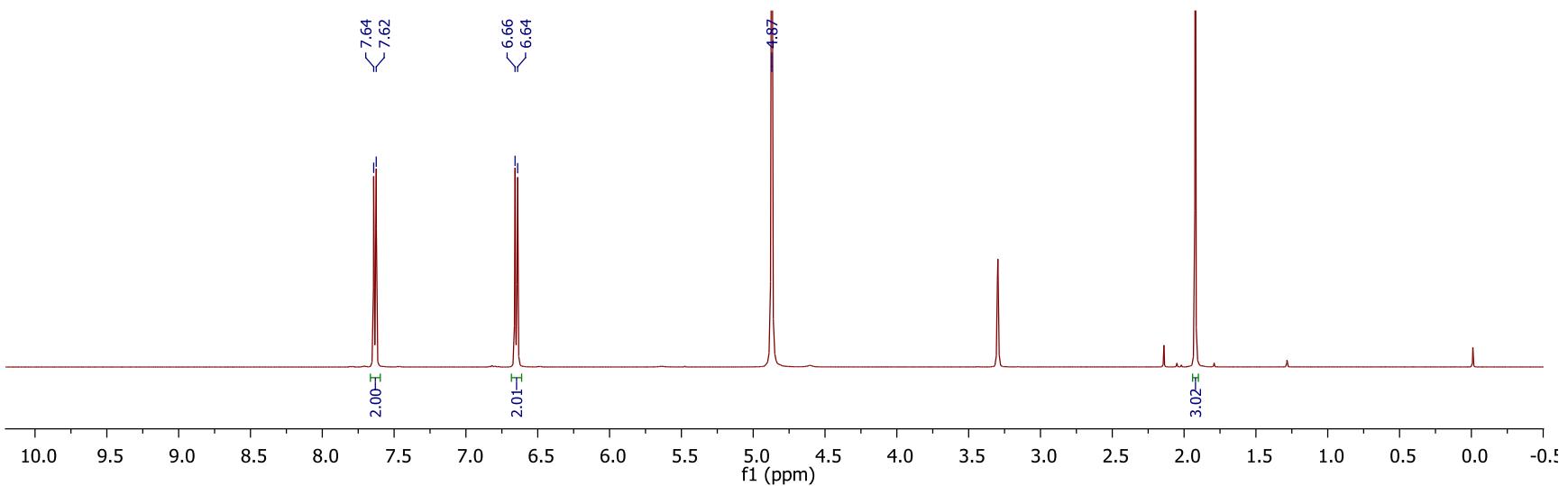


Tabela 9- Dados espectroscópicos do composto **32**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,63	2	d	$J_{1,2} = 8,9$
2	6,65	2	d	$J_{1,2} = 8,9$
3	1,95	3	s	-



Anexo 6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfocetamida (**32**).

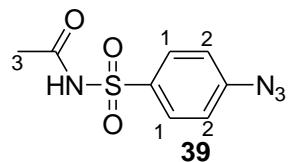
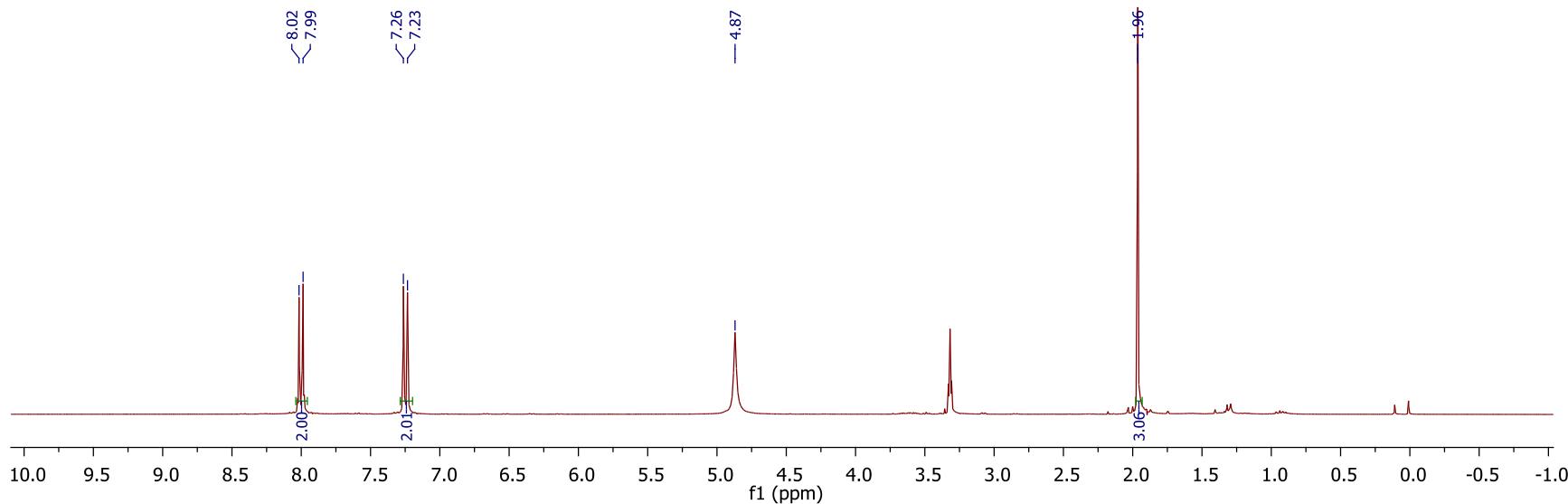
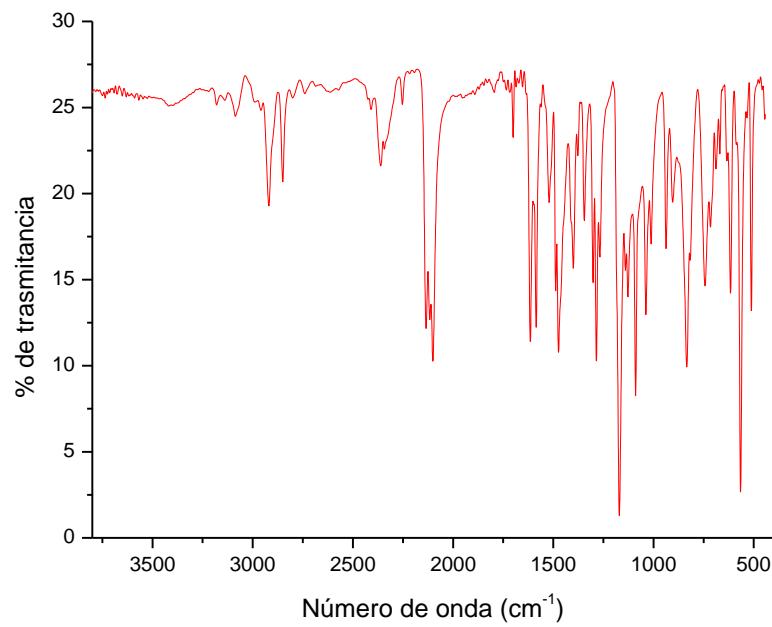


Tabela 10 - Dados espectroscópicos do composto **39**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	8,01	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,24	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	1,96	3	s	-



Anexo 7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfacetamida (**39**).



**Anexo 7.1 - Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfacetamida (39)**

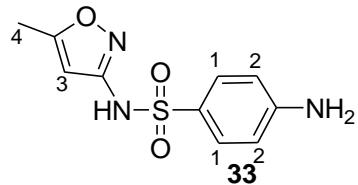
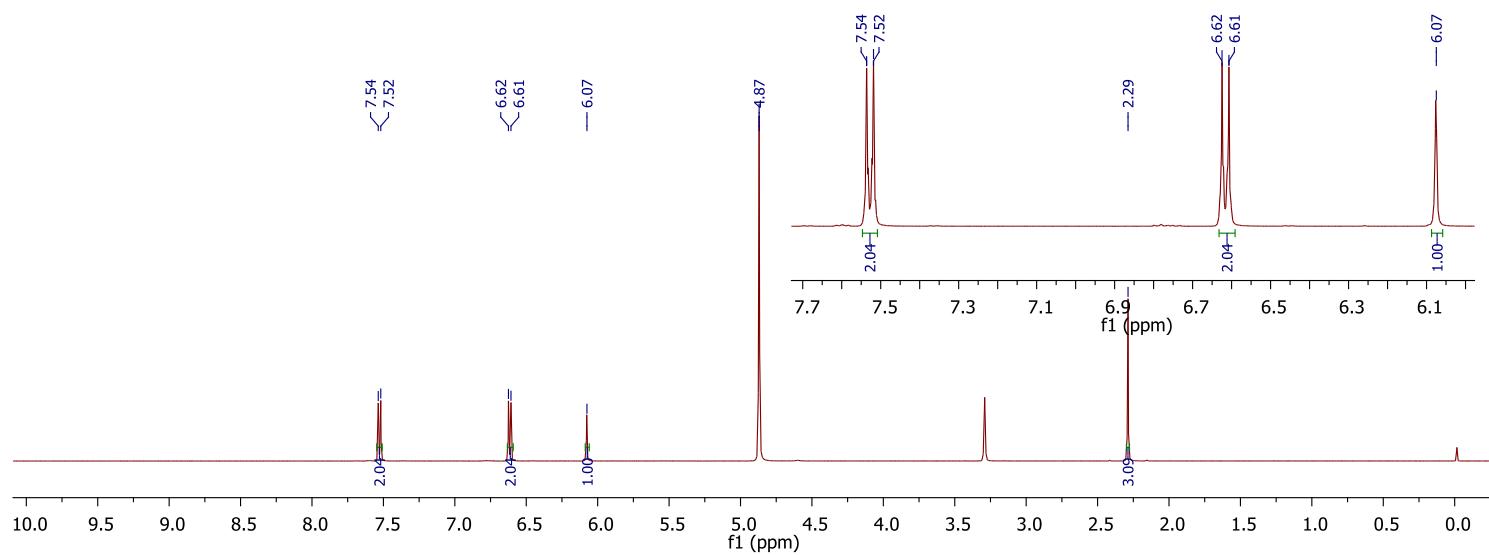


Tabela 11 - Dados espectroscópicos do composto **33**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,53	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	6,61	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	6,07	1	s	-
4	2,29	1	s	-



**Anexo 8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfametoazol (33).

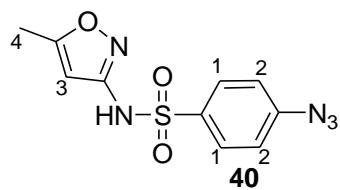
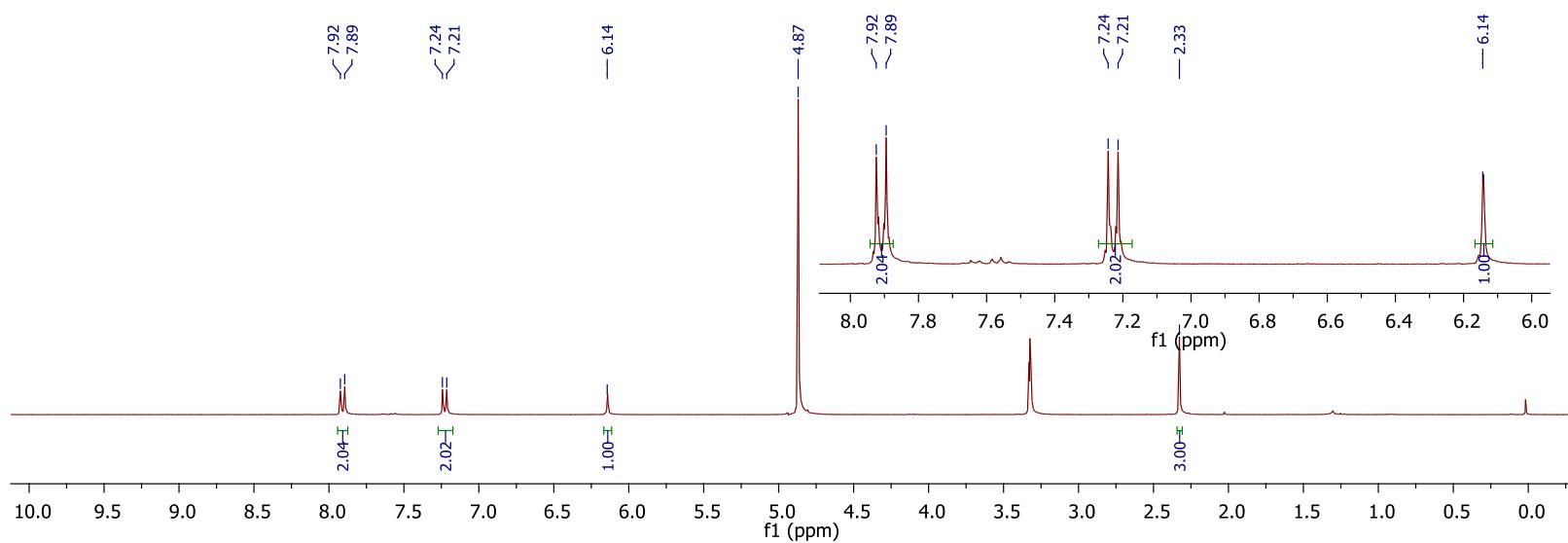
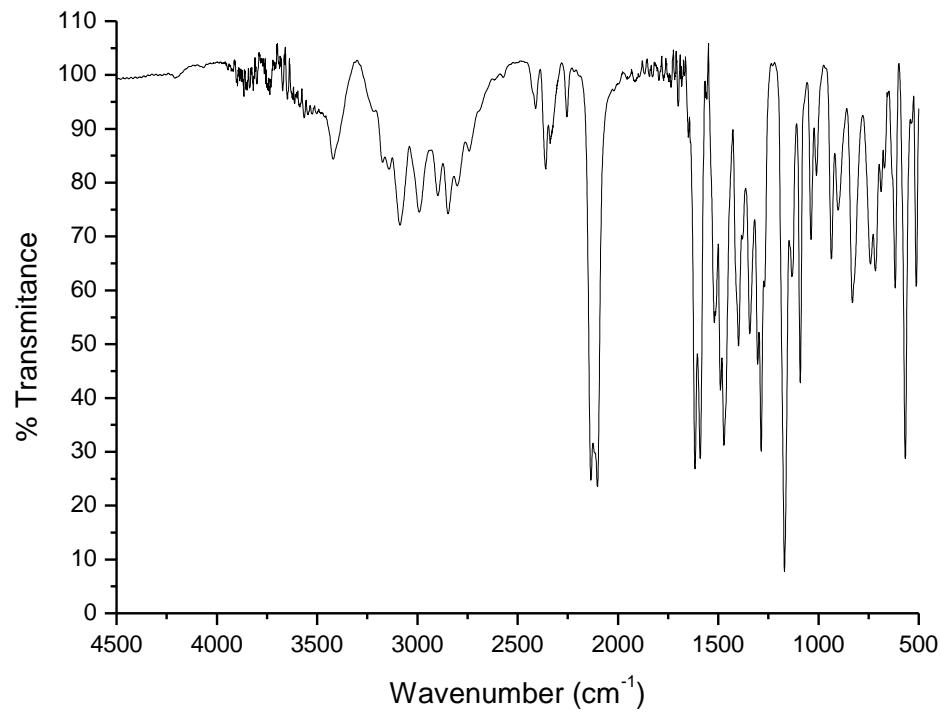


Tabela 12 - Dados espectroscópicos do composto **40**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,91	2	d	$J_{1,2} = 8,7$
2	7,23	2	d	$J_{1,2} = 8,7$
3	6,14	1	s	-
4	2,33	3	s	-



**Anexo 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfametoxazol (**40**).



Anexo 9.1 - Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfametoxazol (**40**)

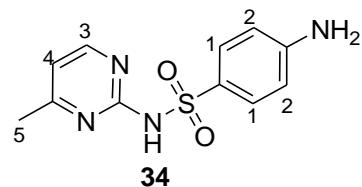
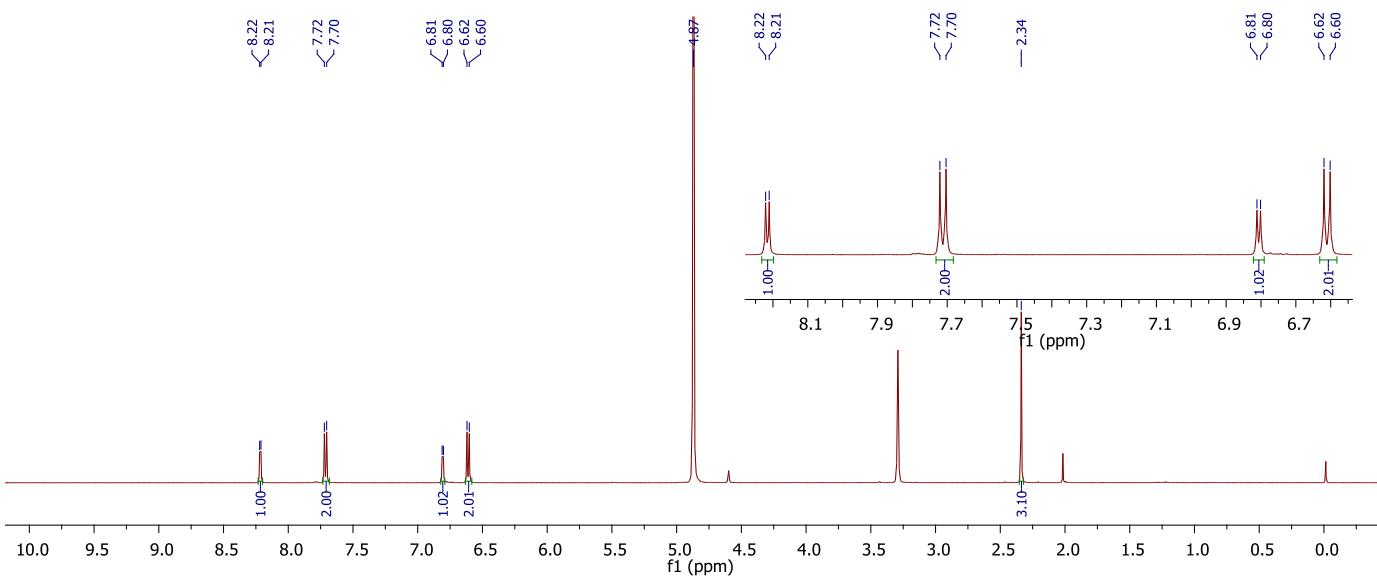


Tabela 13 - Dados espectroscópicos do composto **34**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,71	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	6,61	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	8,21	1	d	$J_{3,4} = 5,2$
4	6,80	1	d	$J_{3,4} = 5,2$
5	2,34	3	s	-



**Anexo 10.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfamerazina (**34**).

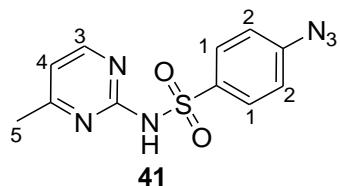
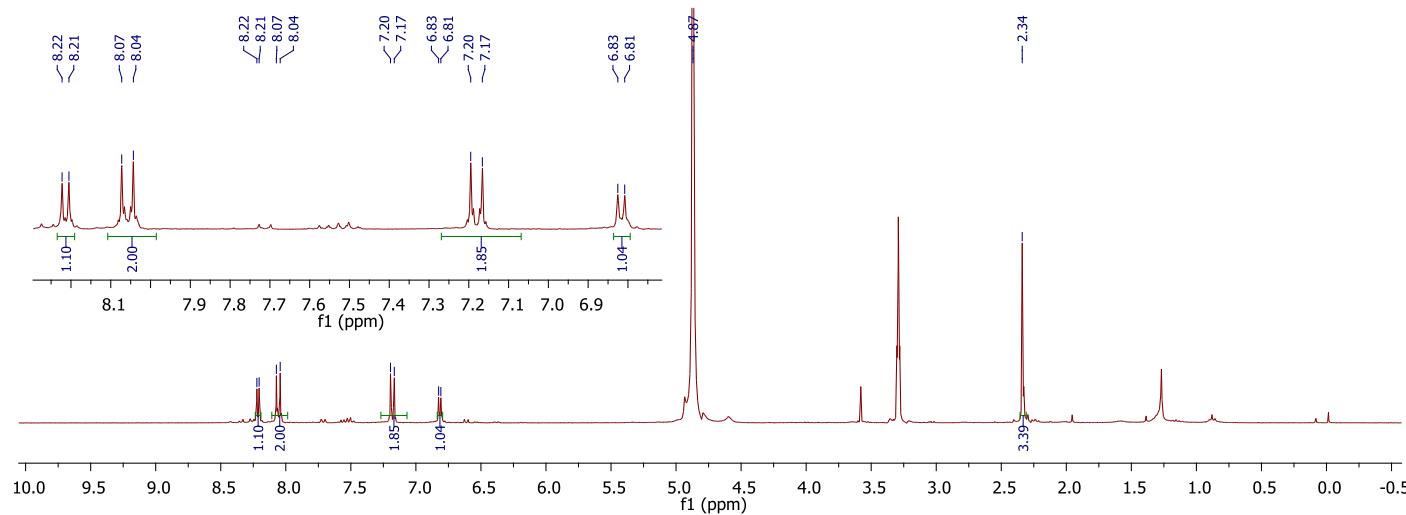
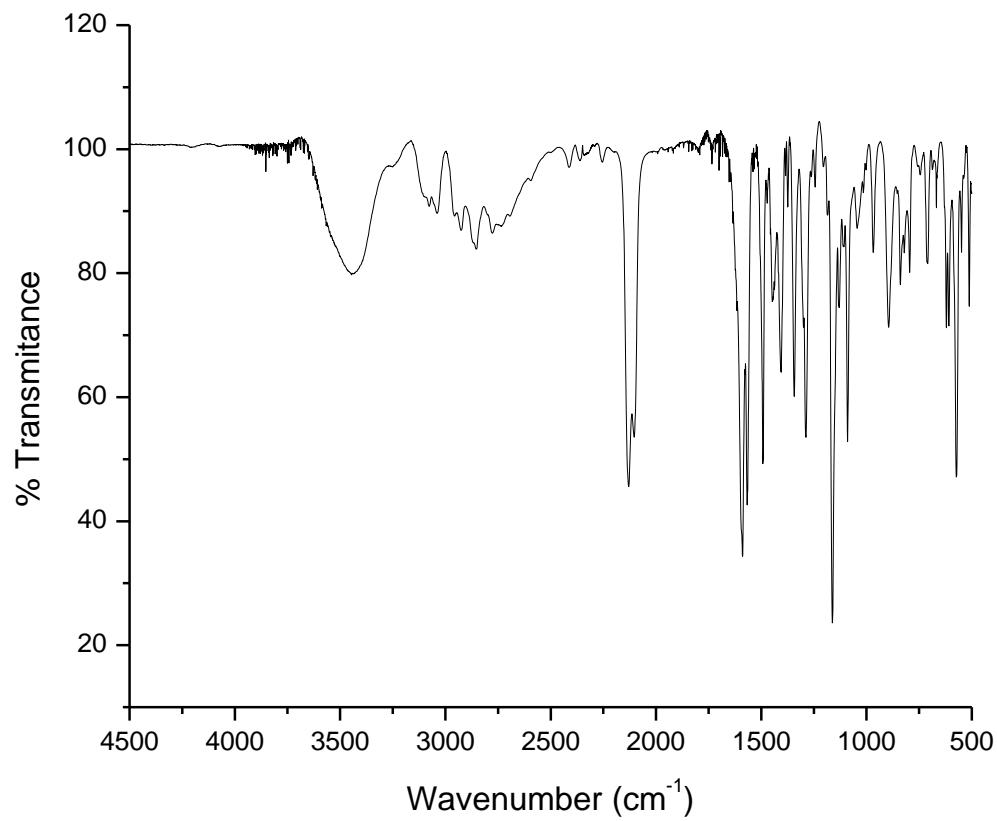


Tabela 14 - Dados espectroscópicos do composto **41**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	8,06	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,19	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	8,21	1	d	$J_{3,4} = 5,2$
4	6,82	1	d	$J_{3,4} = 5,2$
5	2,34	3	s	-



Anexo 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfamerazina (**41**).



Anexo 11.1- Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfamerazina (**41**)

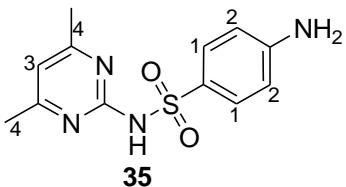
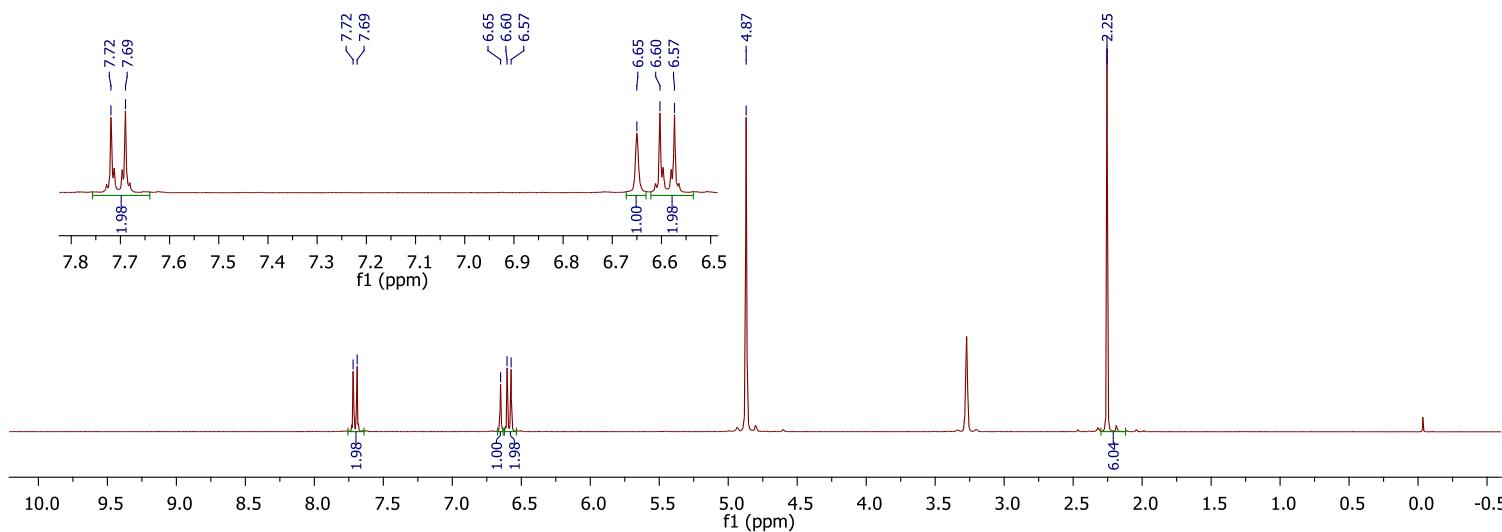


Tabela 15 - Dados espectroscópicos do composto **35**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,70	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	6,58	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	6,65	1	s	-
4	2,25	6	s	-



Anexo 12. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfametazina (**35**).

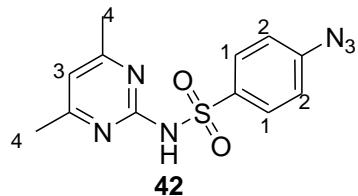
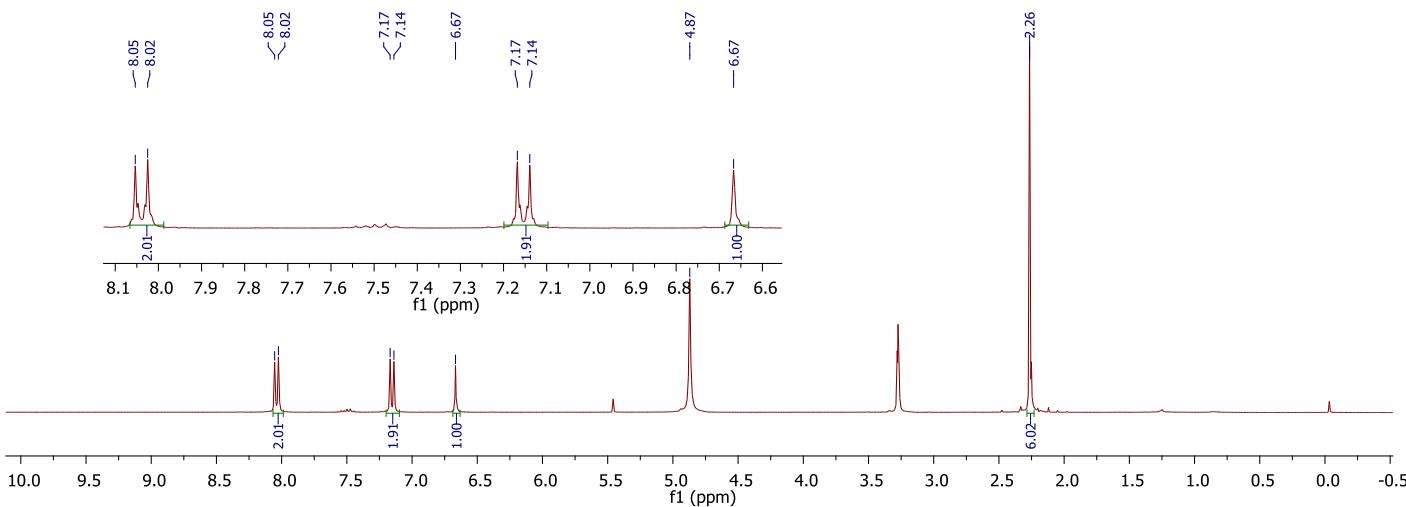
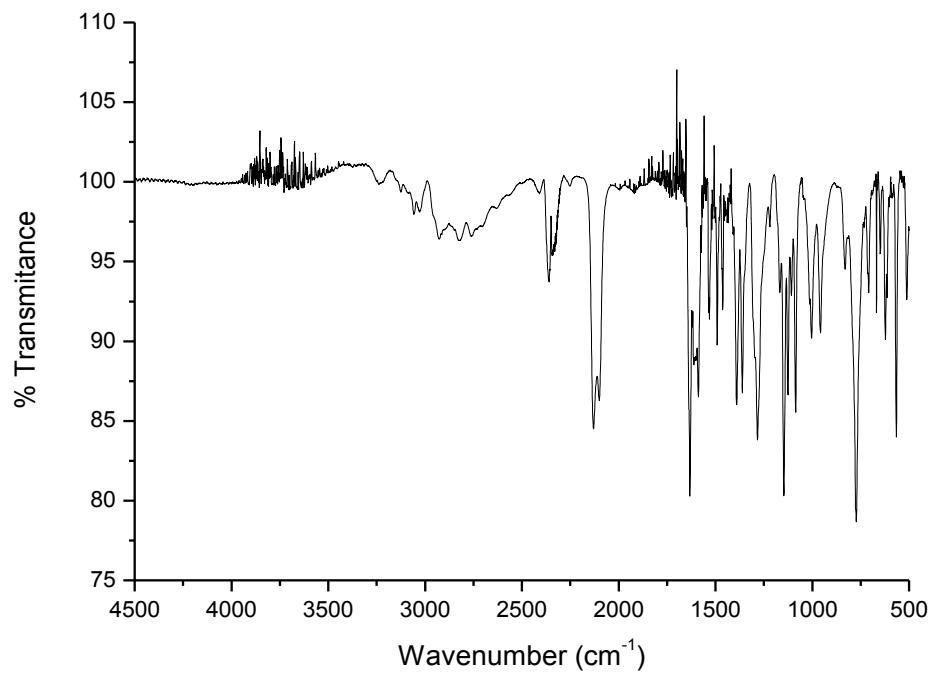


Tabela 16 - Dados espectroscópicos do composto **42**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	8,04	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,16	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	6,67	1	s	-
4	2,26	6	s	



**Anexo 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfametazina (42).



**Anexo 13.1-** Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfametazina (**42**)

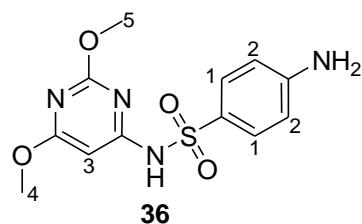
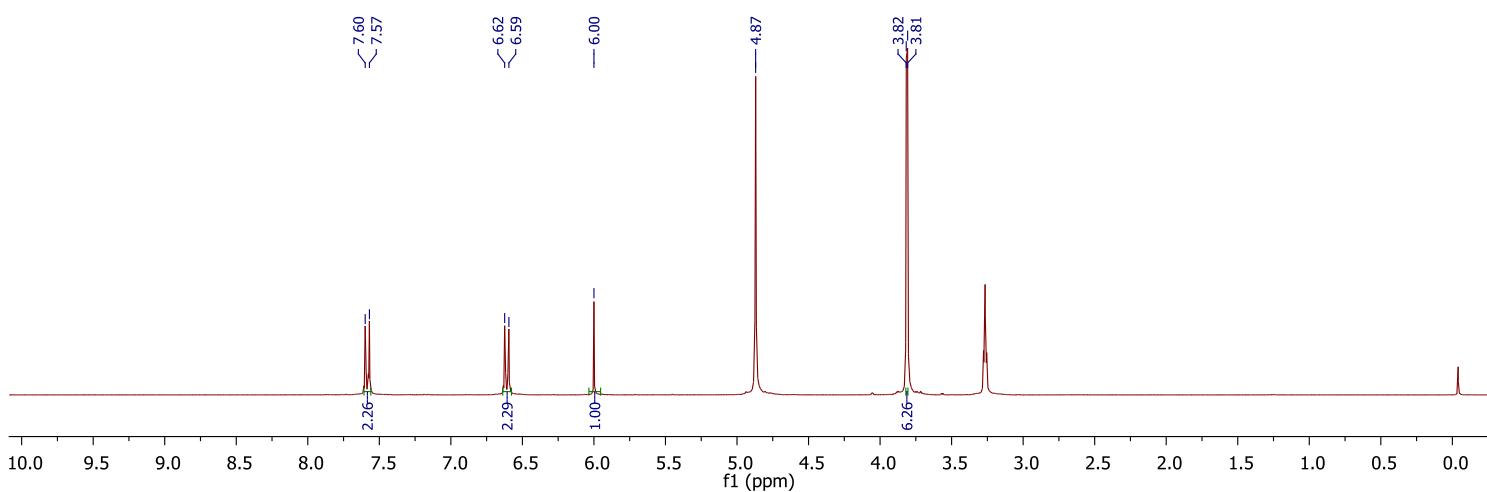


Tabela 17 - Dados espectroscópicos do composto **36**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,58	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	6,60	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	6,0	1	s	-
4	3,81	3	s	-
5	3,82	3	s	-



Anexo 14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfadimetoxina (**36**).

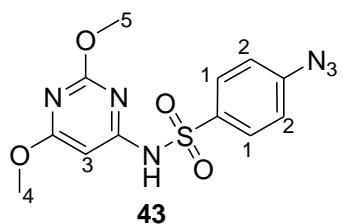
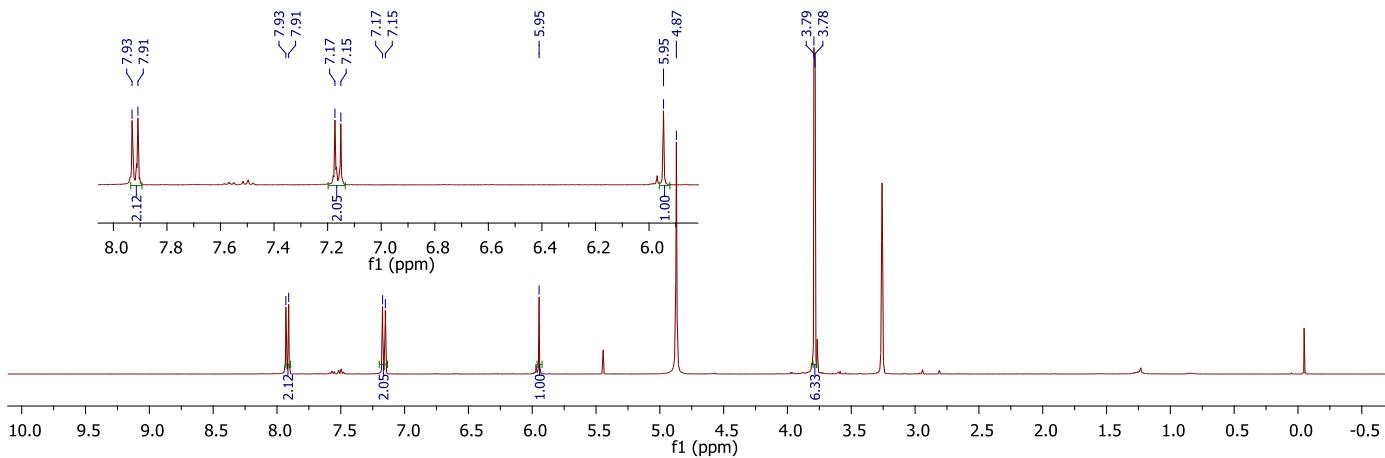
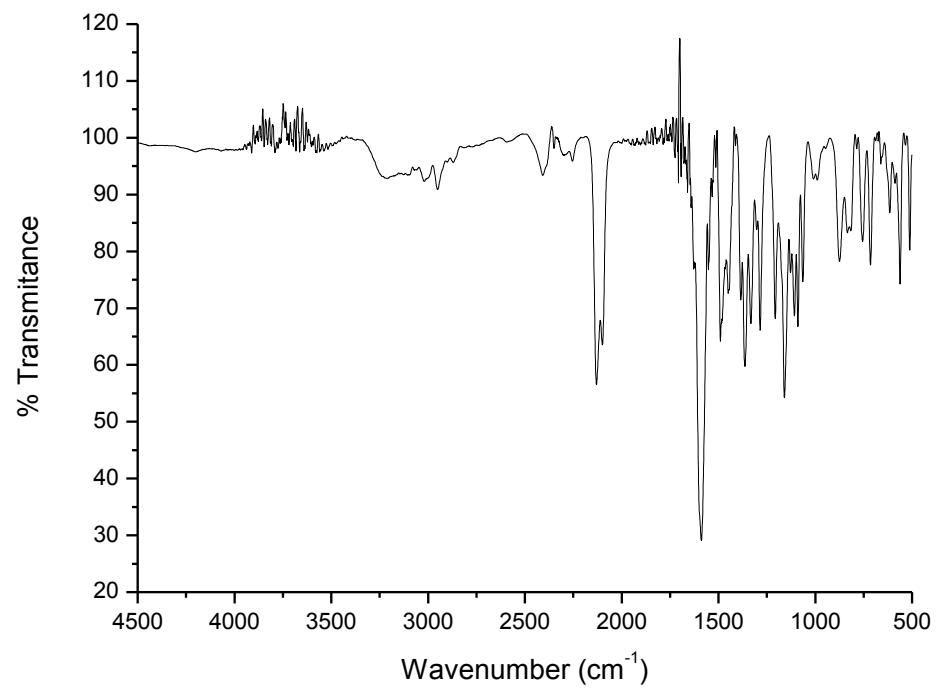


Tabela 18 - Dados espectroscópicos do composto **43**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,92	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,16	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	5,95	1	s	-
4	3,78	3	s	-
5	3,79	3	s	-



Anexo 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfadimetoxina (**43**).



**Anexo 15.1:** Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfadimetoxina (**43**)

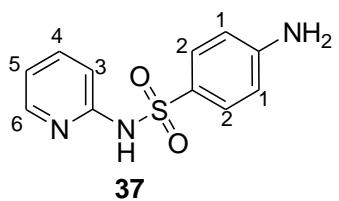
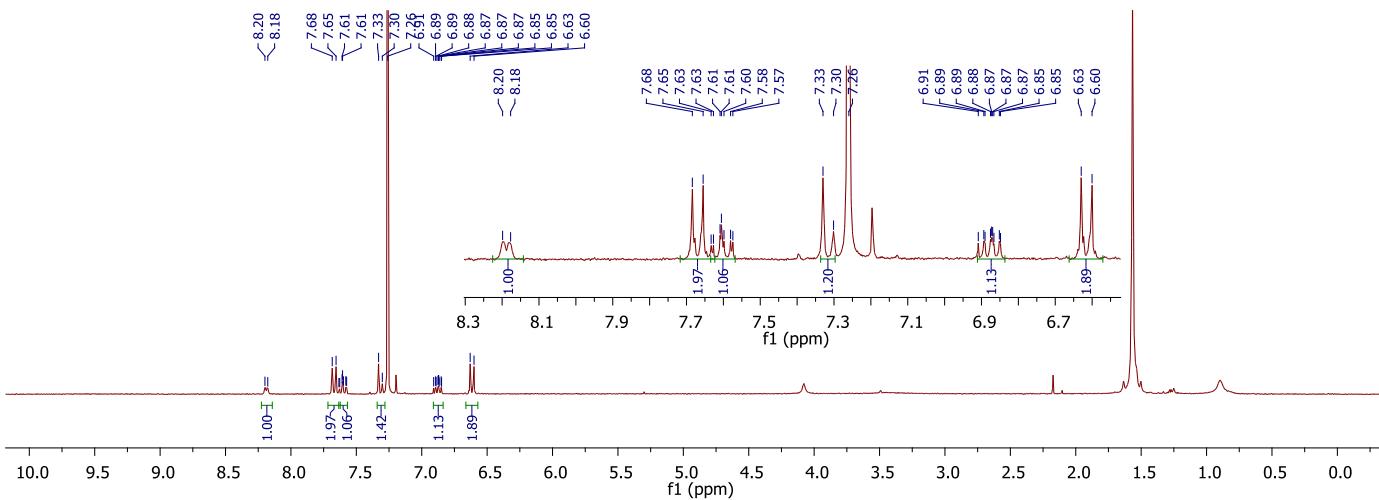


Tabela 19 - Dados espectroscópicos do composto **37**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	6,61	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,67	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	7,32	1	d	$J_{3,4} = 8,6$
4	7,60	1	ddd	$J_{4,5} = 9,3; J_{3,4} = 7,3; J_{4,6} = 1,9$
5	6,87	1	m	-
6	8,19	1	d	$J_{6,5} = 6,5$



**Anexo 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-aminobenzenosulfapyridina (**37**).

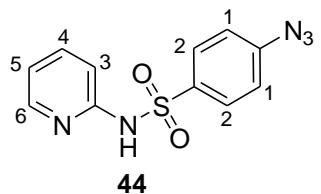
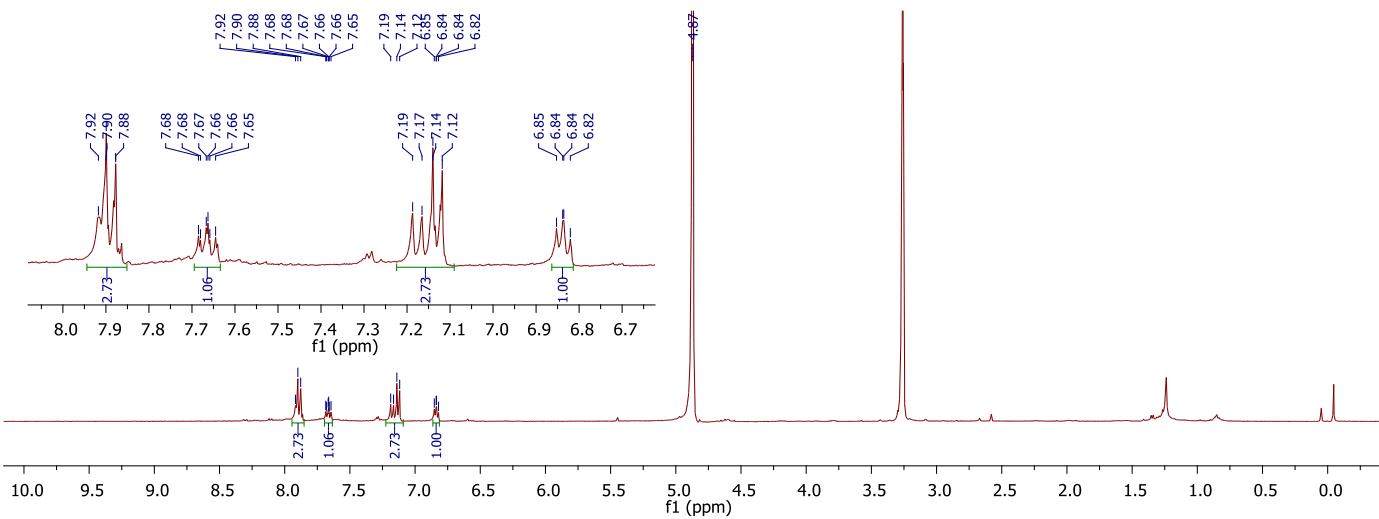
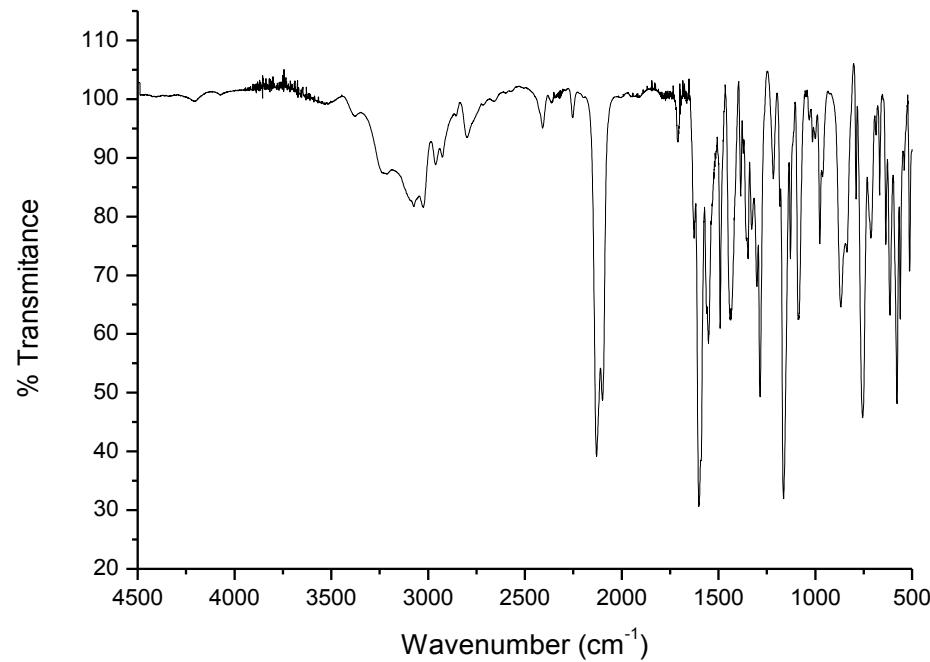


Tabela 20 - Dados espectroscópicos do composto **44**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	7,13	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
2	7,89	2	d	$J_{1,2} = 8,8$
3	7,18	1	d	$J_{3,4} = 8,6$
4	7,66	1	m	-
5	6,83	1	dd	$J_{5,6} = 6,9; J_{5,4} = 5,9$
6	7,90	1	s	-



**Anexo 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-azidobenzenosulfapiridina (**44**).



**Anexo 17.1:** Espectro de infravermelho do composto 4-azidobenzenosulfapiridina (**44**)

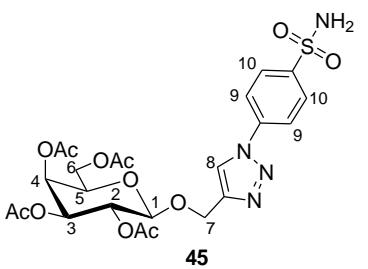
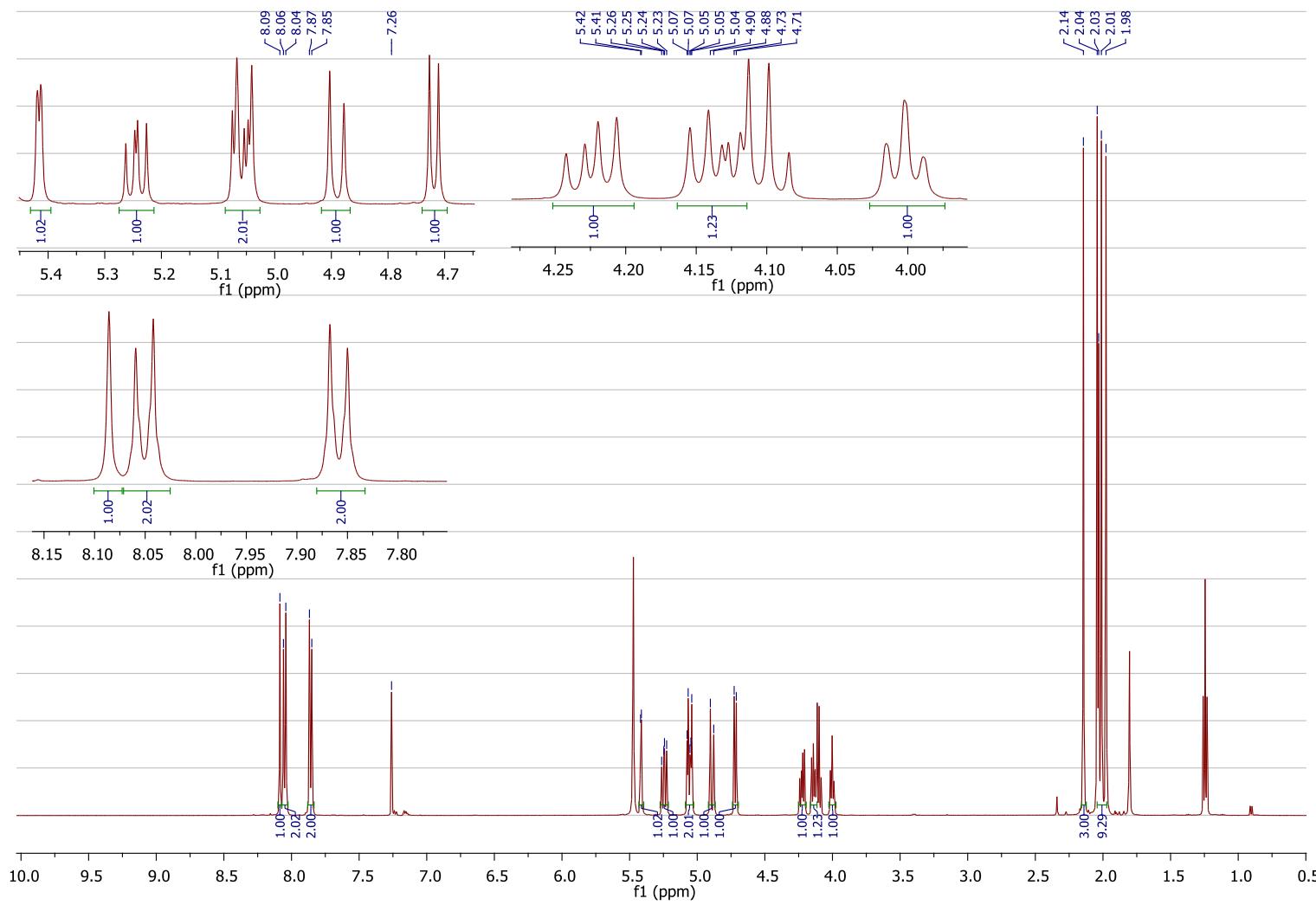


Tabela 21. Dados espectroscópicos do composto **45**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,72	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	5,25	1	dd	$J_{1,2} = 7,9; J_{2,3} = 10,4$
3	5,06	1	dd	$J_{2,3} = 10,4; J_{3,4} = 3,5$
4	5,42	1	dd	$J_{3,4} = 3,5; J_{4,5} = 1,1$
5	4,00	1	dt	$J_{4,5} = 1,1; J_{5,6} = 6,6$
6a	4,22	1	dd	$J_{5,6a} = 6,6; J_{6a,6b} = 11,3$
6b	4,13	1	dd	$J_{5,6b} = 6,6; J_{6a,6b} = 11,3$
7a	5,05	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,89	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,09	1	s	-
9	7,86	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
10	8,05	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
COCH <sub>3</sub>	2,14-1,98	12	s	-



**Anexo 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfanilamina (**45**).

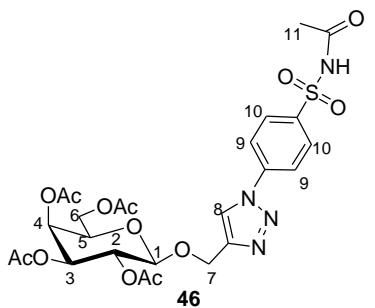
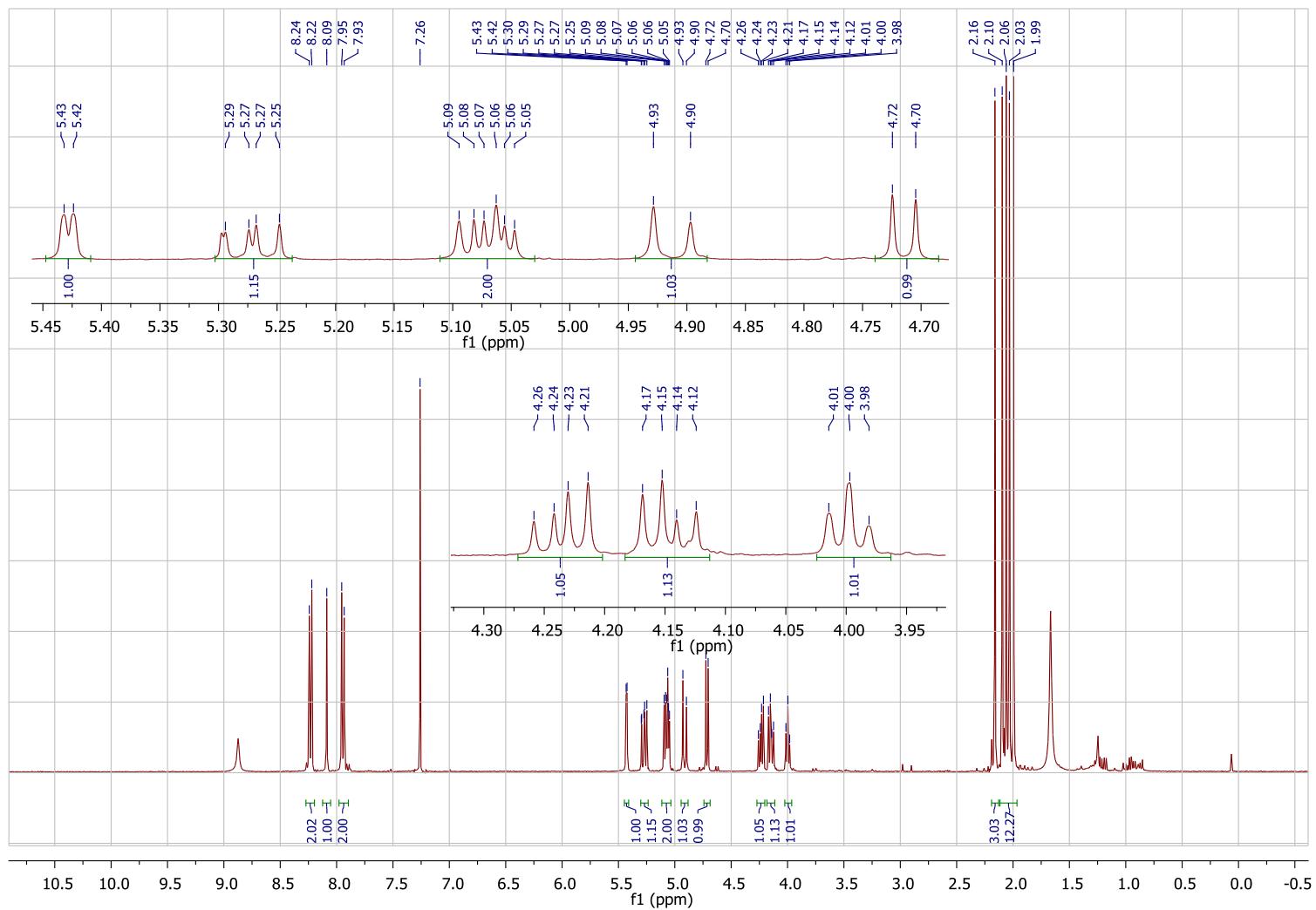


Tabela 22. Dados espectroscópicos do composto **46**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,71	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	5,27	1	dd	$J_{1,2} = 7,8; J_{2,3} = 10,3$
3	5,06	1	dd	$J_{2,3} = 10,3; J_{3,4} = 3,2$
4	5,43	1	dd	$J_{3,4} = 3,2; J_{4,5} = 0,7$
5	4,00	1	dt	$J_{4,5} = 0,7; J_{5,6} = 6,5$
6a	4,23	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,1$
6b	4,14	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,1$
7a	5,08	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,91	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,09	1	s	-
9	7,84	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
10	8,23	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
11	2,16	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,10-1,99	12	s	-



**Anexo 19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfacetamida (**46**).

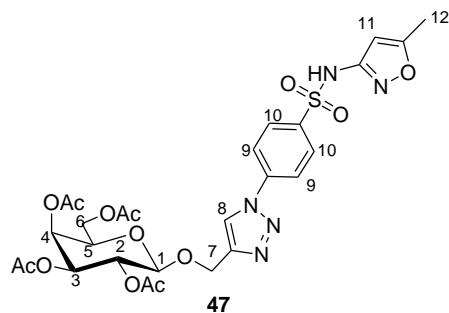
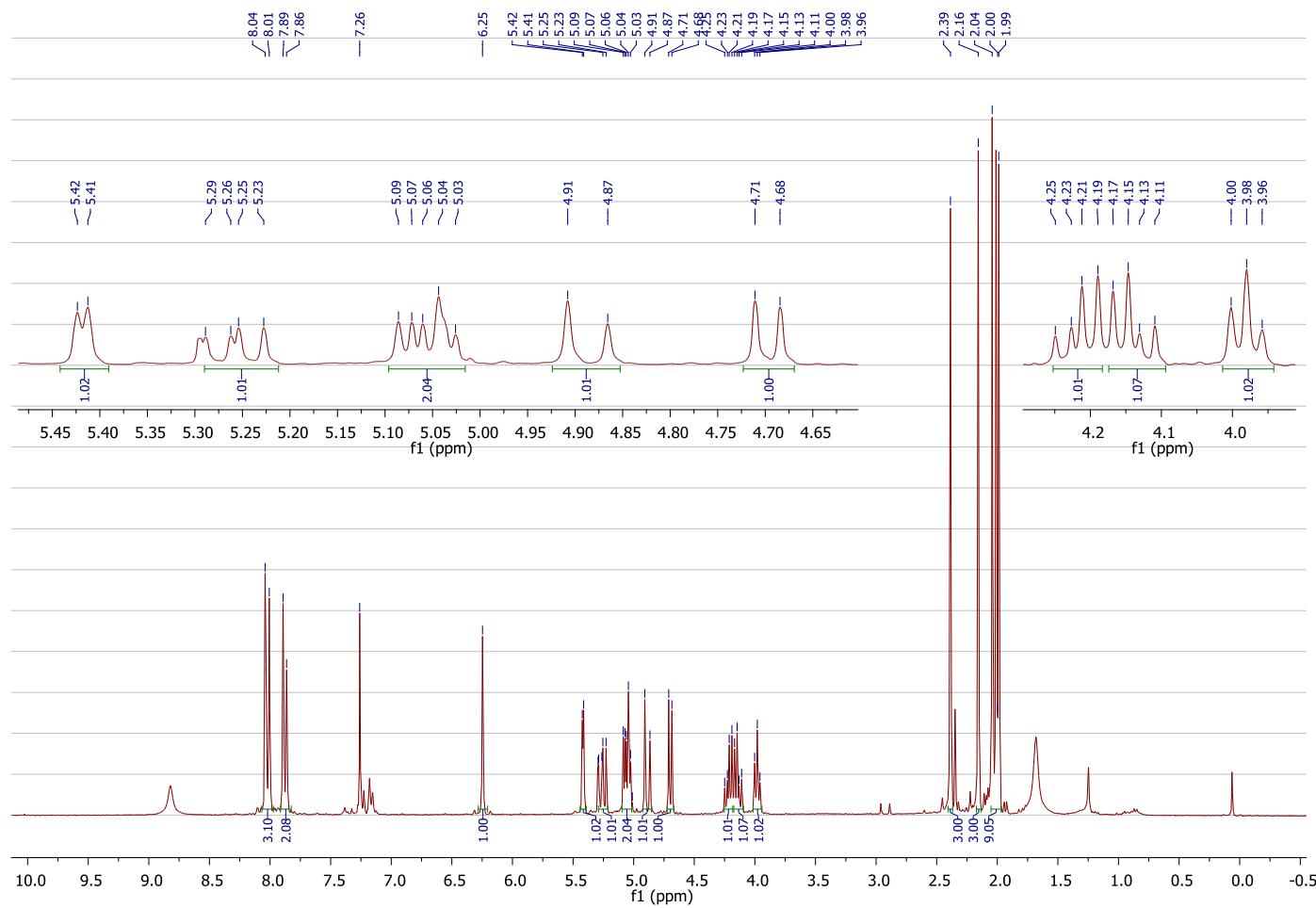


Tabela 23. Dados espectroscópicos do composto **47**

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,70	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	5,26	1	dd	$J_{1,2} = 7,8; J_{2,3} = 10,3$
3	5,05	1	dd	$J_{2,3} = 10,3; J_{3,4} = 3,4$
4	5,42	1	d	$J_{3,4} = 3,4$
5	3,98	1	t	$J_{5,6} = 6,5$
6a	4,22	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	4,14	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
7a	5,06	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,88	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,04	1	s	-
9	7,88	2	d	$J_{9,10} = 8,7$
10	8,02	2	d	$J_{9,10} = 8,7$
11	6,25	1	s	-
12	2,39	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,16-1,99	12	s	-



**Anexo 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 4-(4- $\{\text{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-\beta-D-galactopiranosi]oximetil}\}-1-H-1,2,3-triazol-1-il\}benzenosulfametoazol (47).$

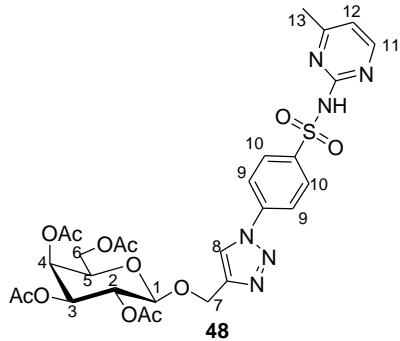
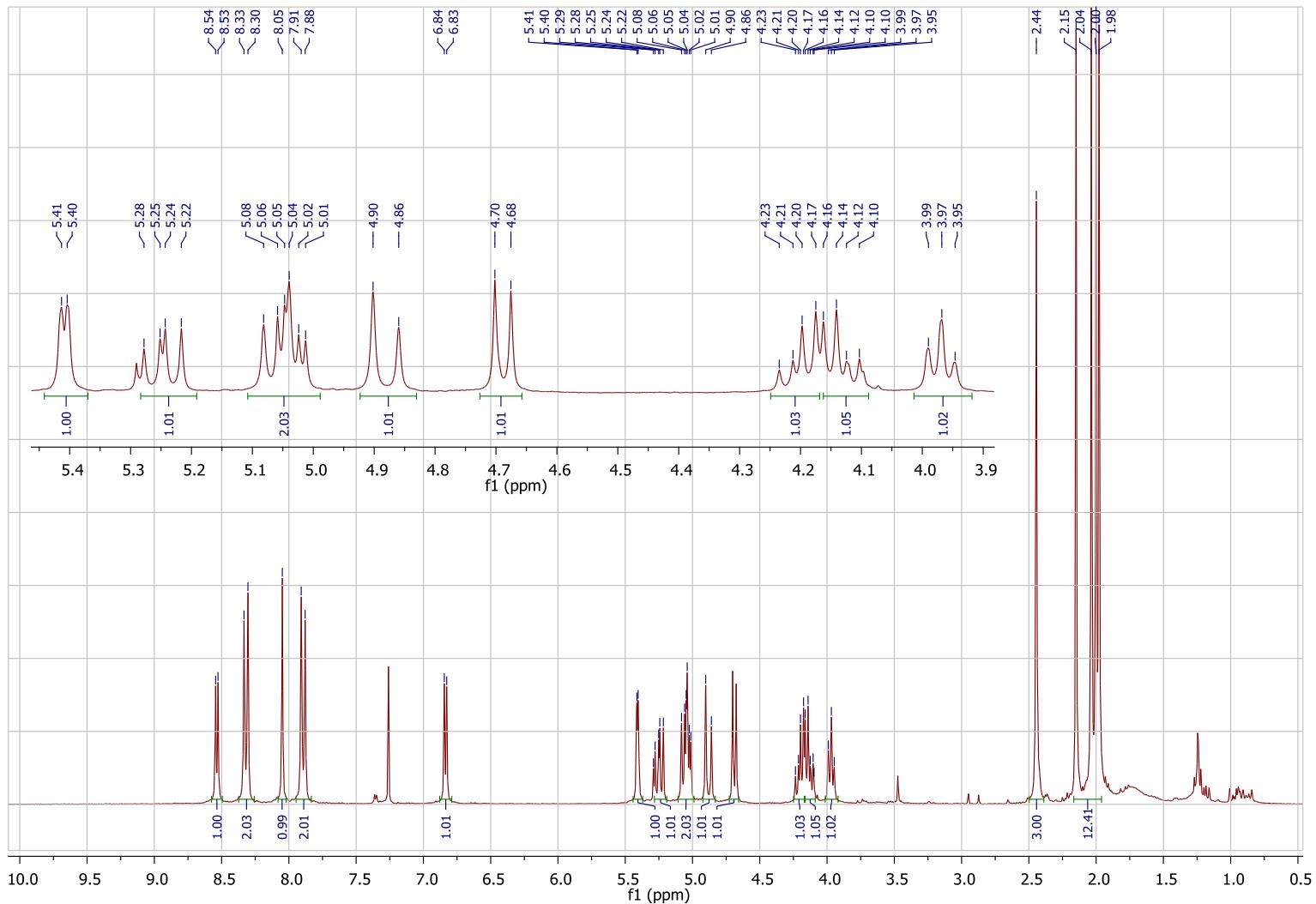


Tabela 24 - Dados espectroscópicos do composto **48**

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,69	1	d	$J_{1,2} = 7,9$
2	5,25	1	dd	$J_{1,2} = 7,9; J_{2,3} = 10,4$
3	5,04	1	dd	$J_{2,3} = 10,4; J_{3,4} = 3,3$
4	5,41	1	dd	$J_{3,4} = 3,3; J_{4,5} = 0,78$
5	3,97	1	dt	$J_{4,5} = 0,78; J_{5,6} = 6,5$
6a	4,20	1	dd	$J_{5,6a} = 6,7; J_{6a,6b} = 11,1$
6b	4,14	1	dd	$J_{5,6b} = 6,7; J_{6a,6b} = 11,1$
7a	5,06	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,88	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,05	1	s	-
9	7,89	2	d	$J_{9,10} = 8,7$
10	8,32	2	d	$J_{9,10} = 8,7$
11	8,54	1	d	$J_{11,12} = 5,3$
12	6,84	1	d	$J_{11,12} = 5,3$
13	2,44	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,15-1,98	12	s	-



**Anexo 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfamerazina (**48**).

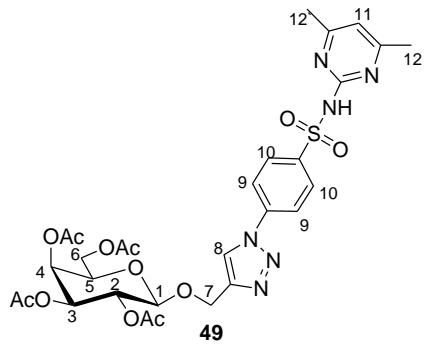
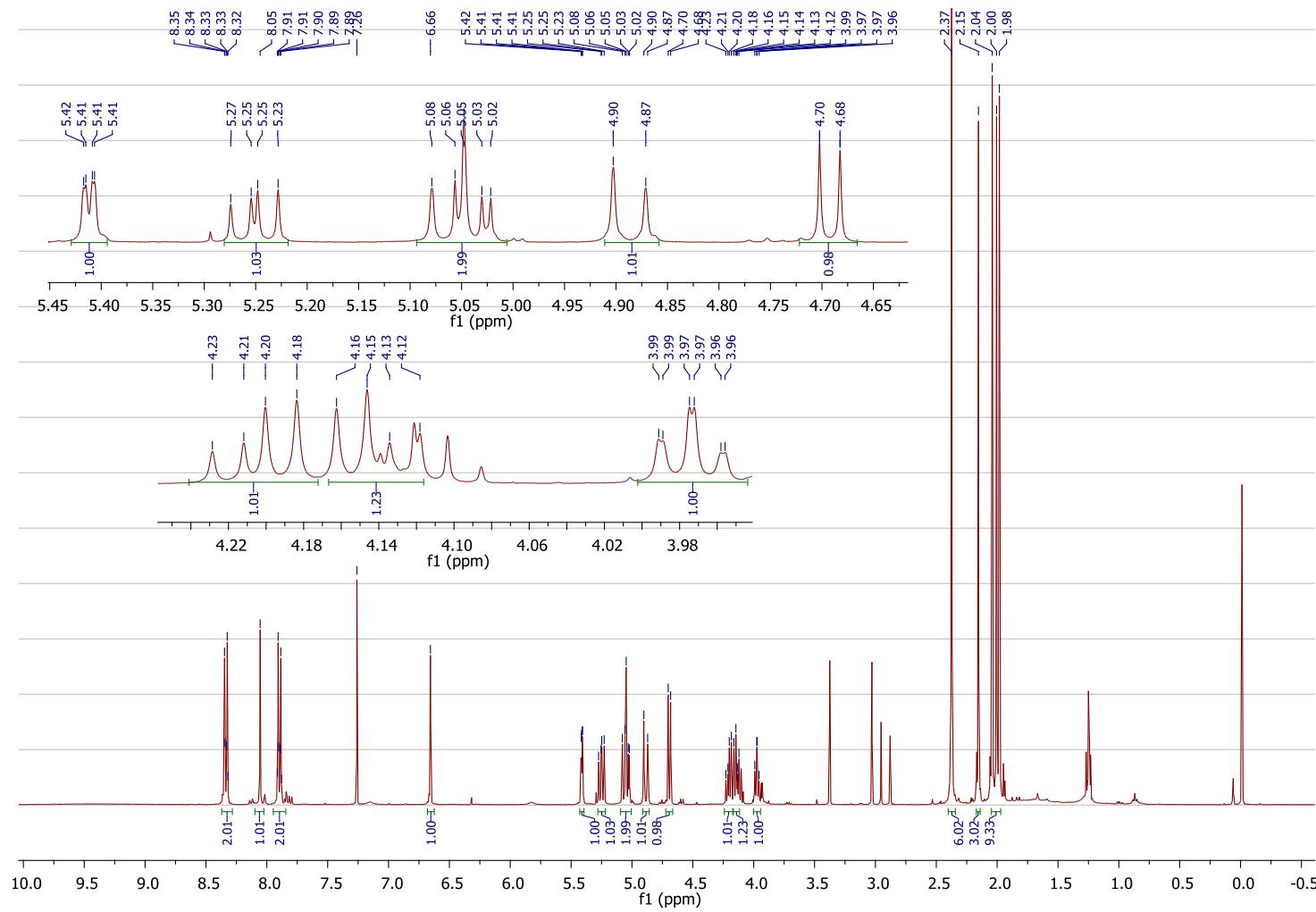


Tabela 25 - Dados espectroscópicos do composto **49**

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,69	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	5,25	1	dd	$J_{1,2} = 7,8; J_{2,3} = 10,3$
3	5,04	1	dd	$J_{2,3} = 10,3; J_{3,4} = 3,4$
4	5,41	1	dd	$J_{3,4} = 3,4; J_{4,5} = 1,2$
5	3,97	1	dt	$J_{4,5} = 1,2; J_{5,6} = 6,5$
6 <sup>a</sup>	4,21	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	4,13	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
7 <sup>a</sup>	5,06	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,89	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,05	1	s	-
9	7,90	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
10	8,34	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
11	6,66	1	s	-
12/12'	2,37	6	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,15-1,98	12	s	-



**Anexo 22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-(4-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil)-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfametazina (**49**).

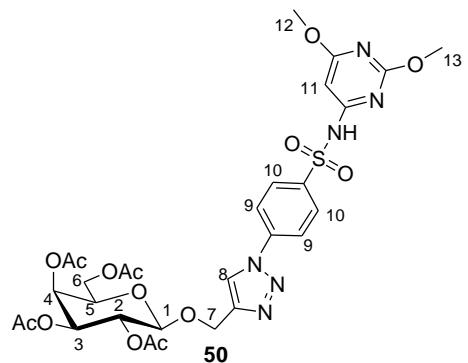
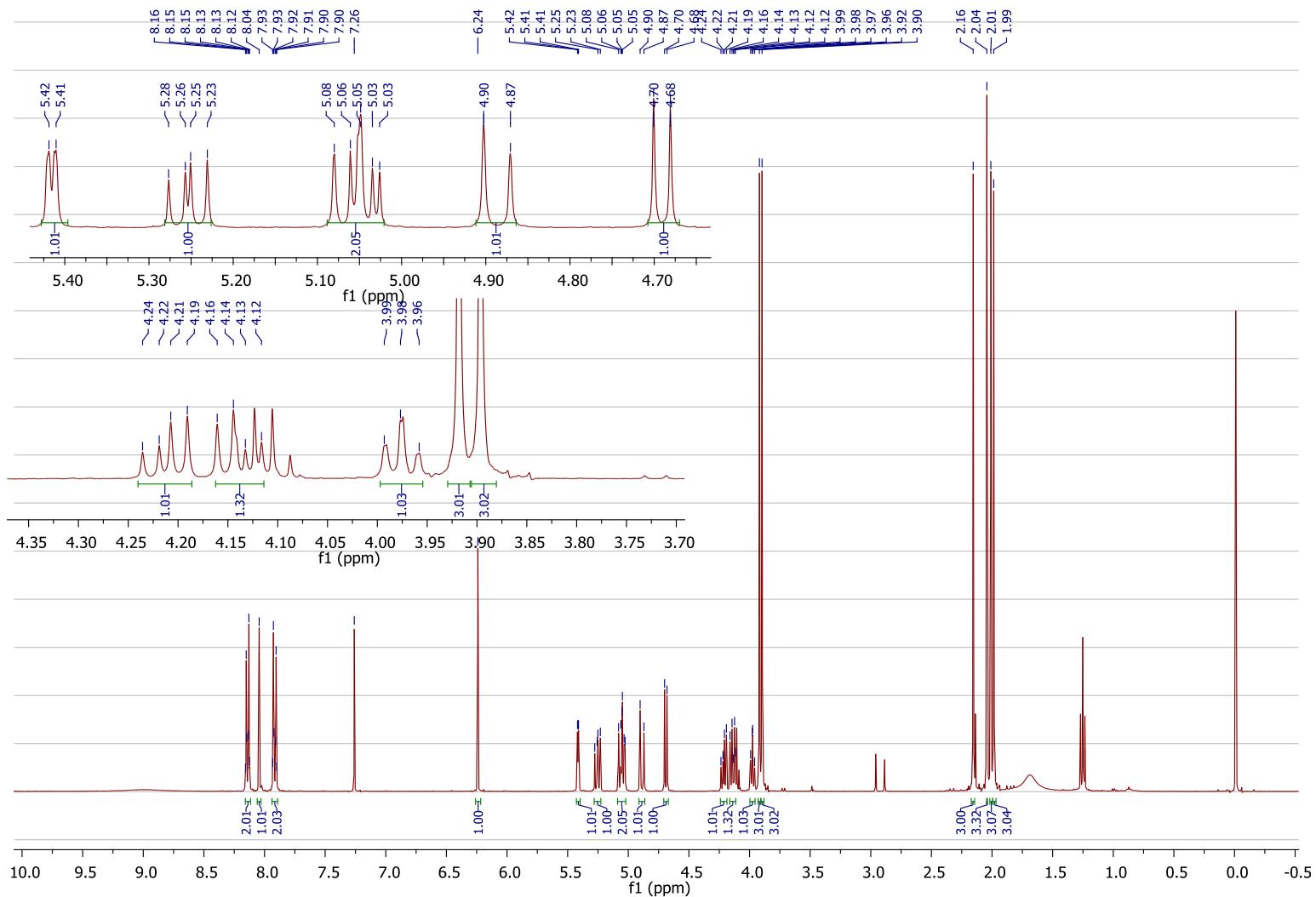


Tabela 26 - Dados espectroscópicos do composto **50**

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,69	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	5,25	1	dd	$J_{1,2} = 7,8; J_{2,3} = 10,6$
3	5,05	1	dd	$J_{2,3} = 10,3; J_{3,4} = 3,4$
4	5,41	1	dd	$J_{3,4} = 3,5; J_{4,5} = 1$
5	3,98	1	dt	$J_{4,5} = 1; J_{5,6} = 6,5$
6a	4,21	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	4,13	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,3$
7a	5,06	1	d	$J_{7a,7b} = 12,6$
7b	4,89	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,04	1	s	-
9	7,91	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
10	8,14	2	d	$J_{9,10} = 9$
11	6,24	1	s	-
12	3,92	3	s	-
13	3,90	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,15-1,99	12	s	-



**Anexo 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-(4-{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfadimetoxina (**50**).

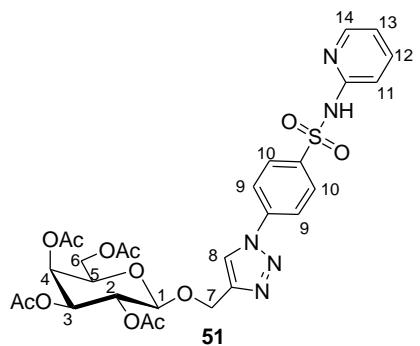
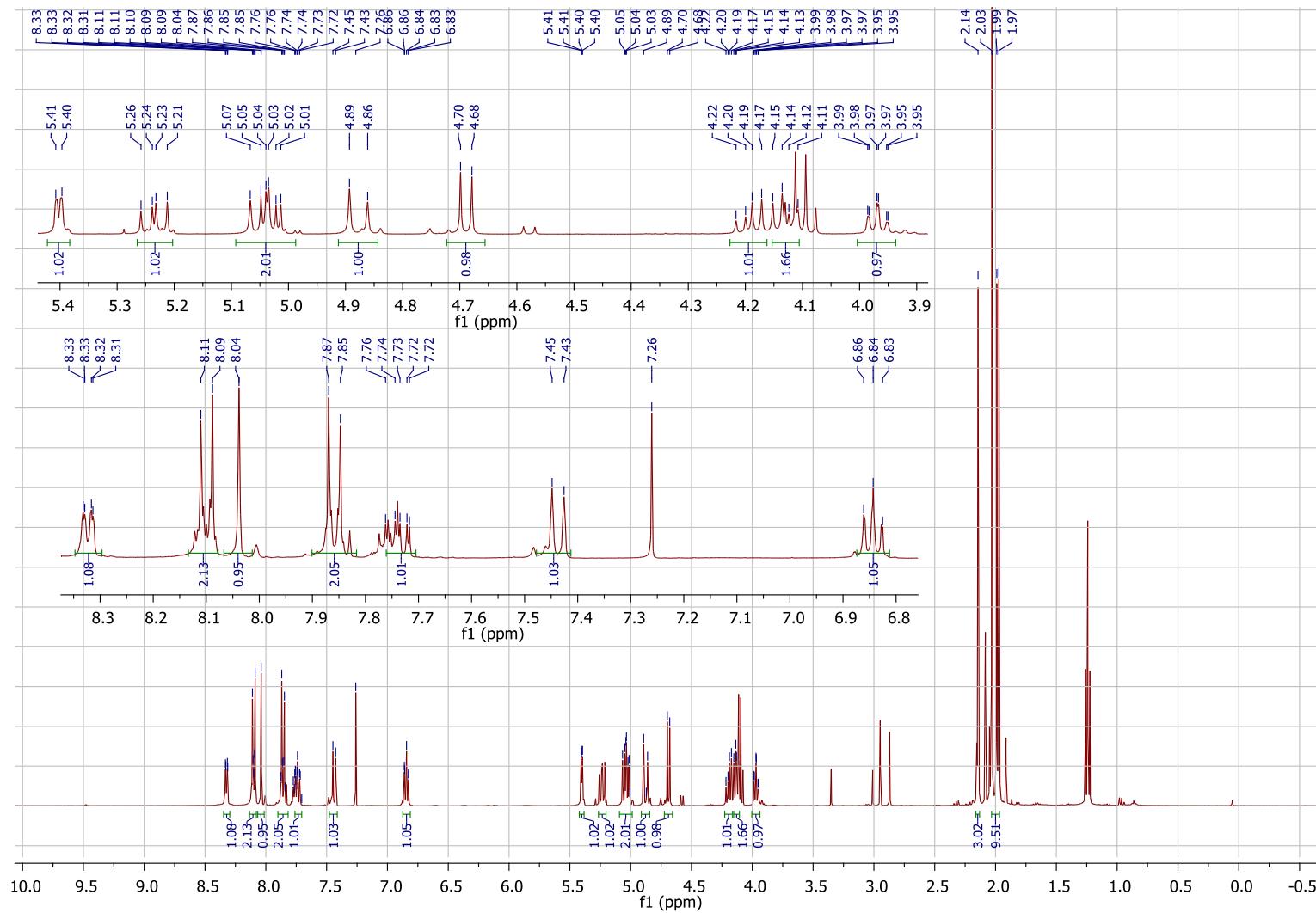


Tabela 27 - Dados espectroscópicos do composto **51**

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,69	1	d	
2	5,23	1	dd	$J_{1,2} = 7,9$
3	5,03	1	dd	$J_{2,3} = 10,3$ ; $J_{3,4} = 3,5$
4	5,40	1	dd	$J_{3,4} = 3,5$ ; $J_{4,5} = 0,9$
5	3,97	1	dt	$J_{4,5} = 0,9$ ; $J_{5,6} = 6,5$
6a	4,19	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5$ ; $J_{6a,6b} = 11,3$
6b	4,14	1	dd	$J_{5,6b} = 6,5$ ; $J_{6a,6b} = 11,3$
7a	5,05	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	4,88	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	8,04	1	s	-
9	7,86	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
10	8,10	2	d	$J_{9,10} = 8,8$
11	7,44	1	dt	$J_{11,12} = 9$ ; $J_{11,13} = 1$
12	7,75	1	ddd	$J_{11,12} = 9$ ; $J_{12,13} = 5,6$ ; $J_{12,14} = 1,9$
13	6,84	1	dt	$J_{12,13} = 6,3$ ; $J_{11,13} = 1$
14	8,32	1	dd	$J_{11,12} = 6,2$ ; $J_{11,13} = 1,1$
COCH <sub>3</sub>	2,14-1,97	12	s	-



**Anexo 24.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto 4-(4-{{[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfapiridina (**51**).

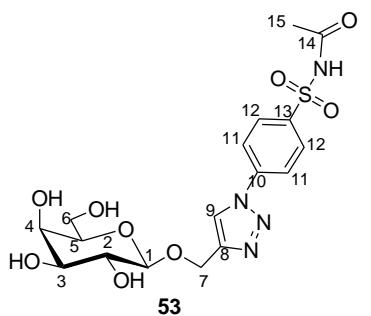
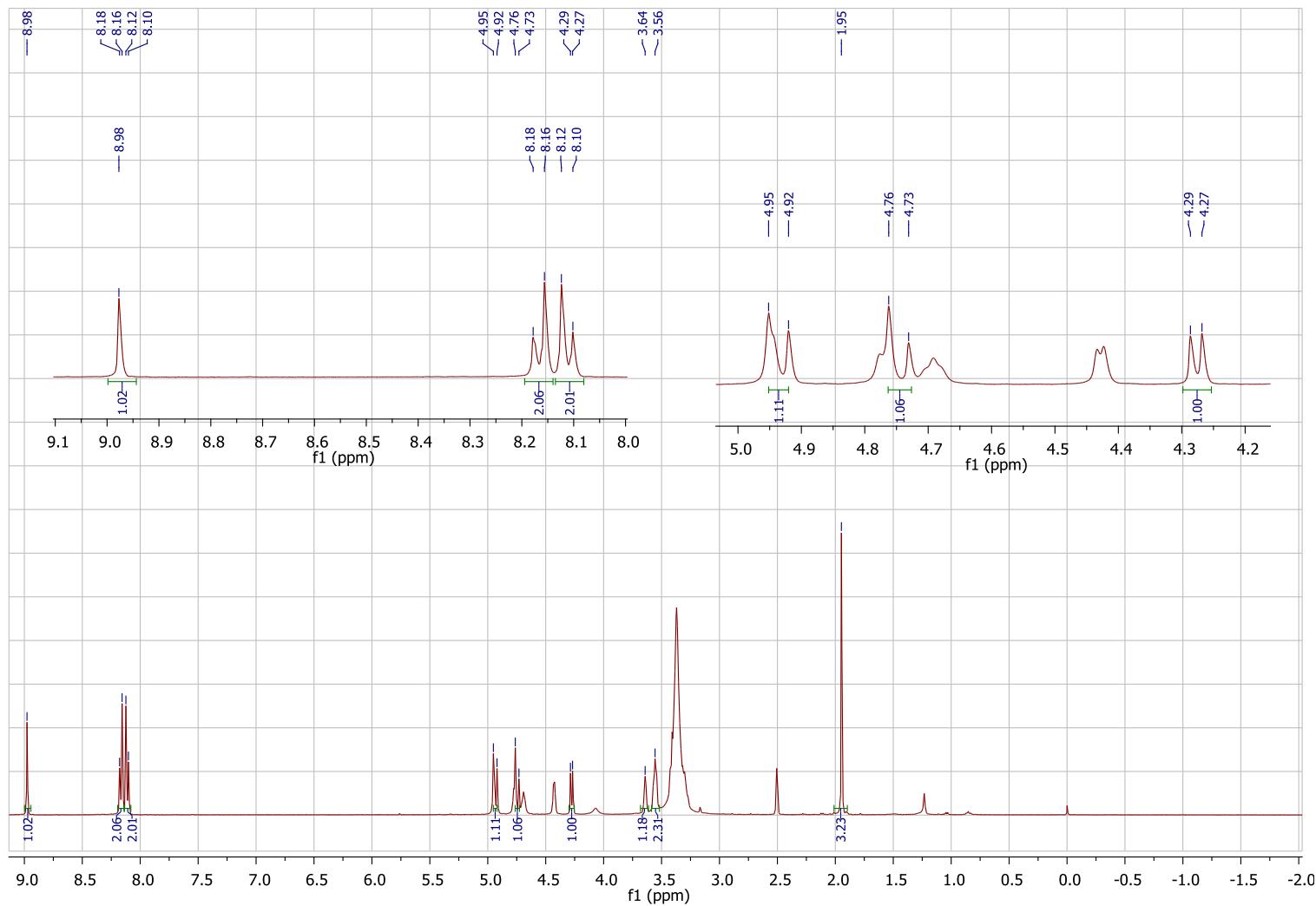
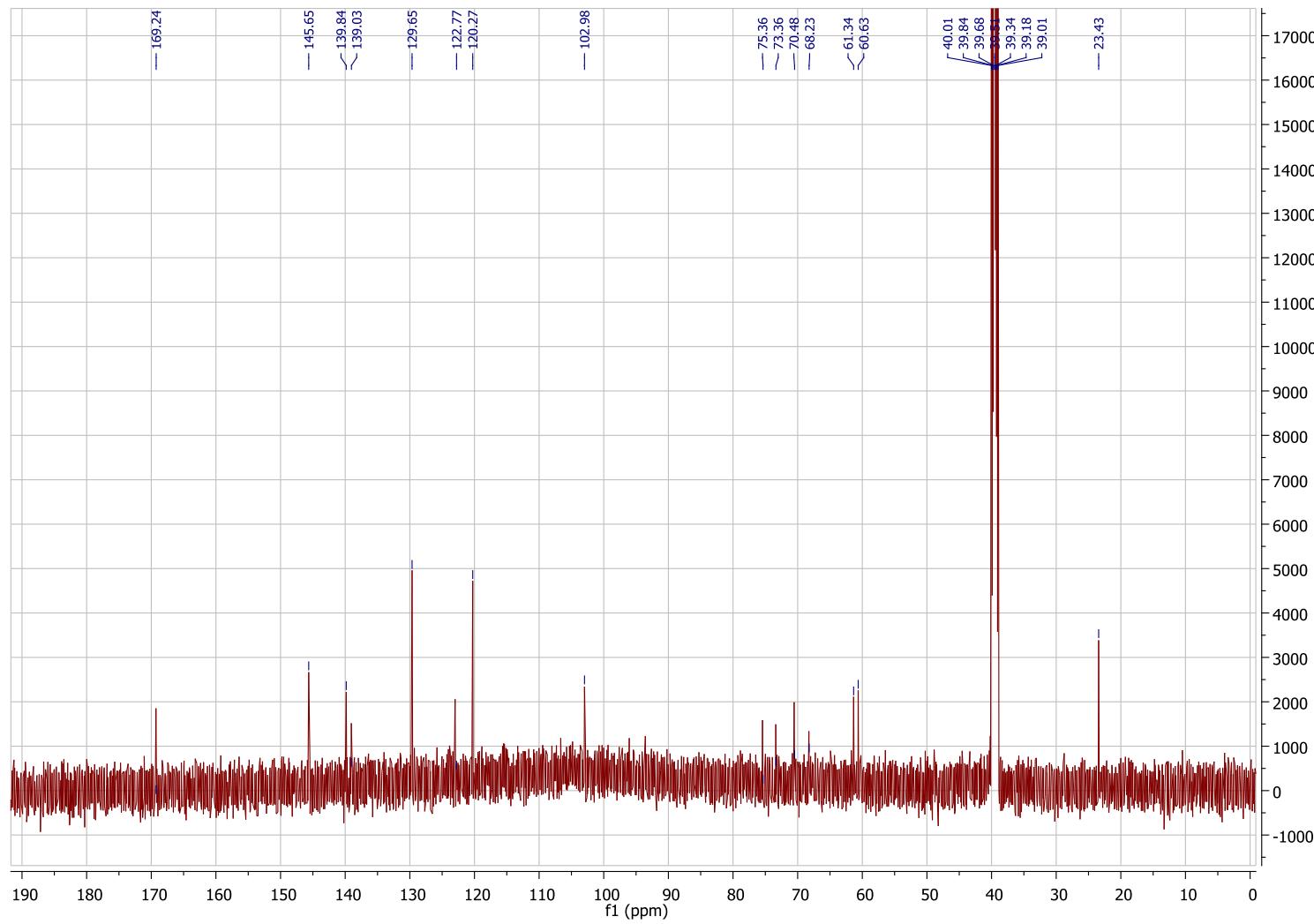


Tabela 28. Dados espectroscópicos do composto **53**

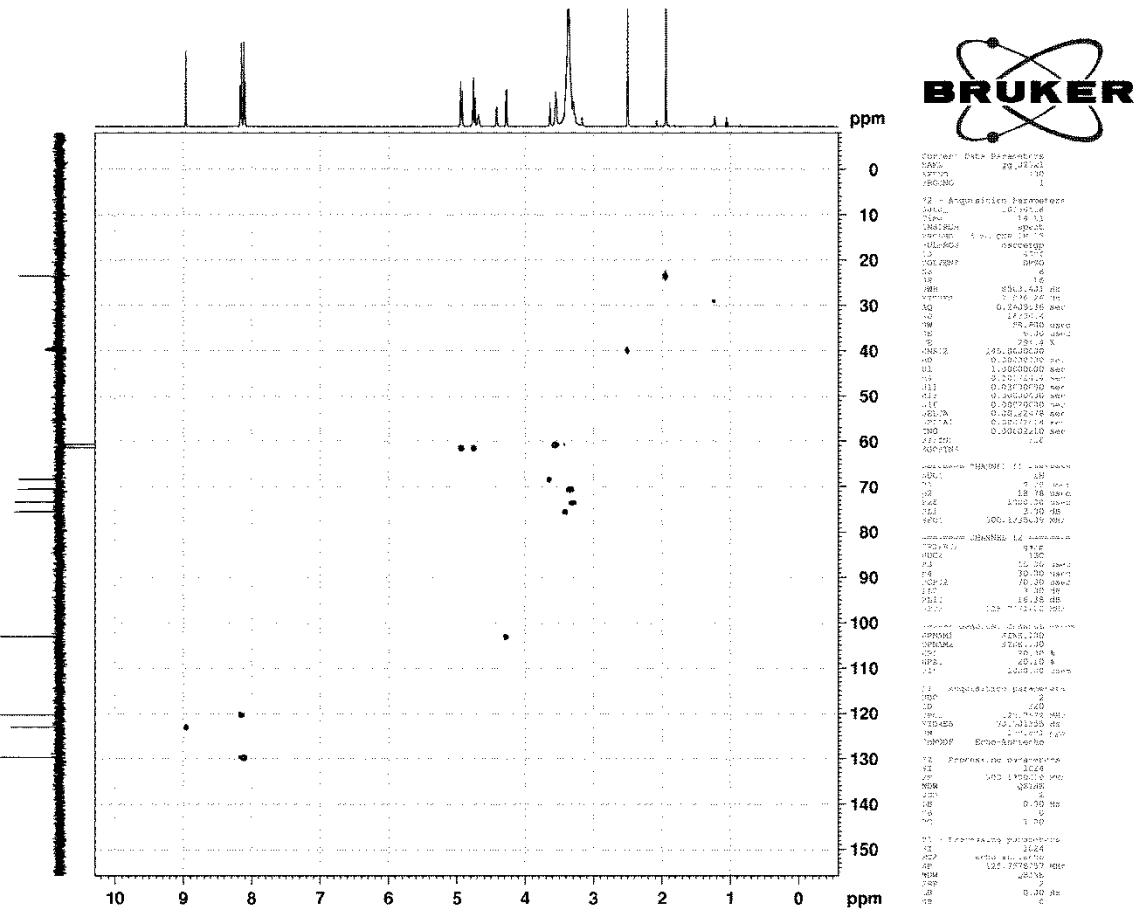
Número	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	103	4,28	1	d	$J_{1,2} = 7,3$
2	70,5	3,42-3,28	1	m	-
3	73,4	3,42-3,28	1	m	-
4	68,23	3,64	1	s	-
5	75,4	3,42-3,28	1	m	-
6a	60,7	3,56	1	s	-
6b	-	3,56	1	s	-
7a	61,34	4,94	1	d	$J_{7a,7b} = 12,6$
7b	-	4,75	1	d	$J_{7a,7b} = 12,6$
8	145,7	-	-	-	-
9	130	8,98	1	s	-
10	139,9	-	-	-	-
11	122,8	8,11	2	d	$J_{11,12} = 8,7$
12	120,3	8,17	2	d	$J_{11,12} = 8,7$
13	139	-	-	-	-
14	169,24	-	-	-	-
15	23,4	1,95	3	s	-



**Anexo 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO, 500 MHz) do composto 4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1- $H$ -1,2,3-triazol-1-il)benzeno sulfacetamida (**53**)



**Anexo 25.1.** Espectro de RMN  ${}^{13}\text{C}$  (DMSO, 500 MHz) do composto 4-(4-{{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1i)benzeno sulfacetamida  
(53)



**Anexo 25.2.** Espectro de HMQc (DMSO, 125 MHz) do composto do composto 4-(4-[β-D-galactopiranosil]-oximetil)-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzeno sulfacetamida (53)

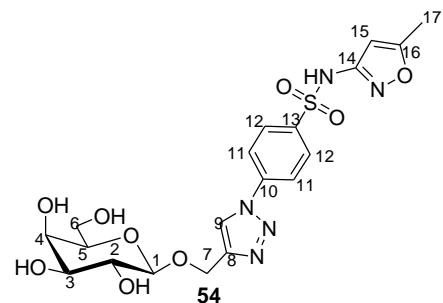
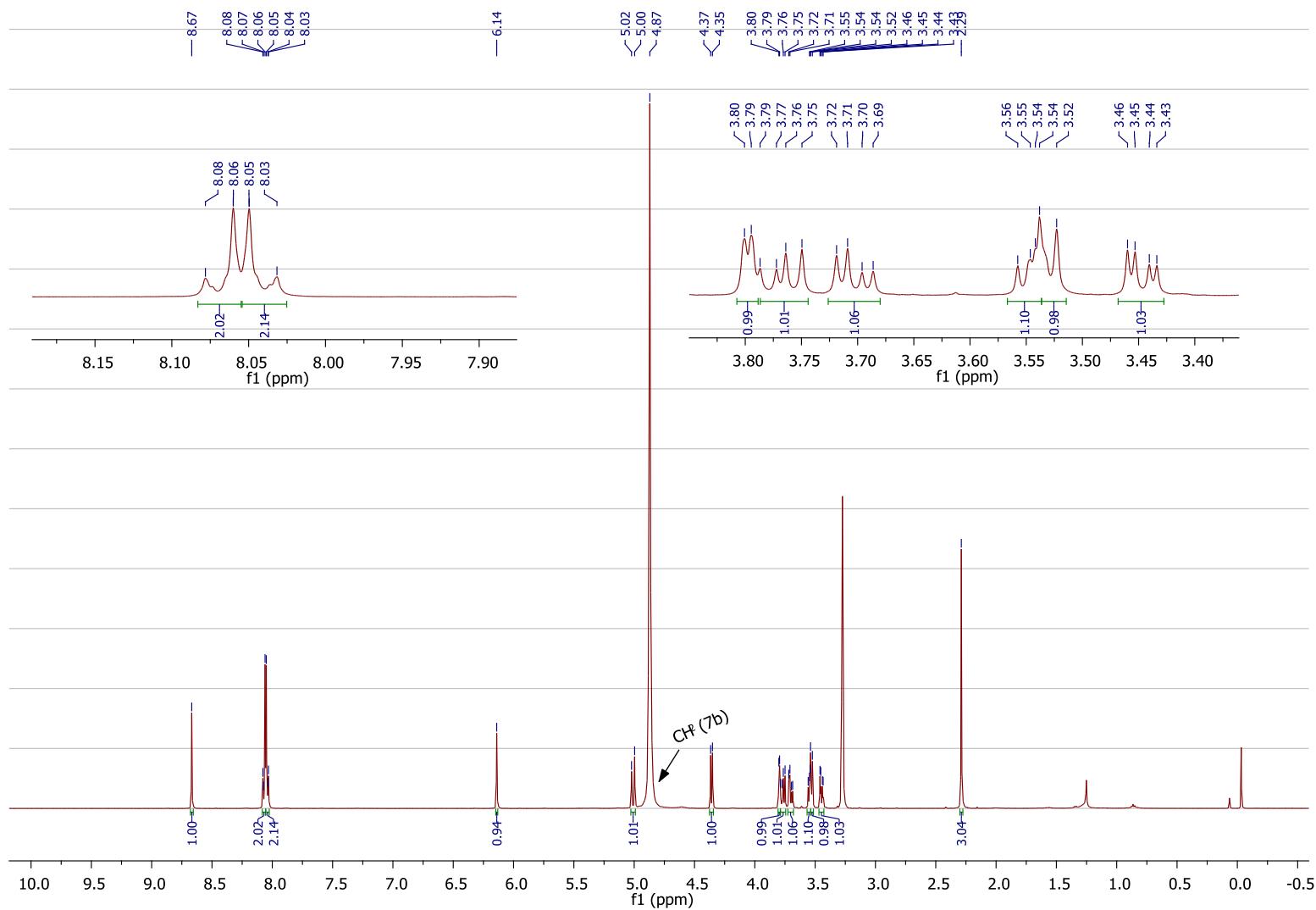
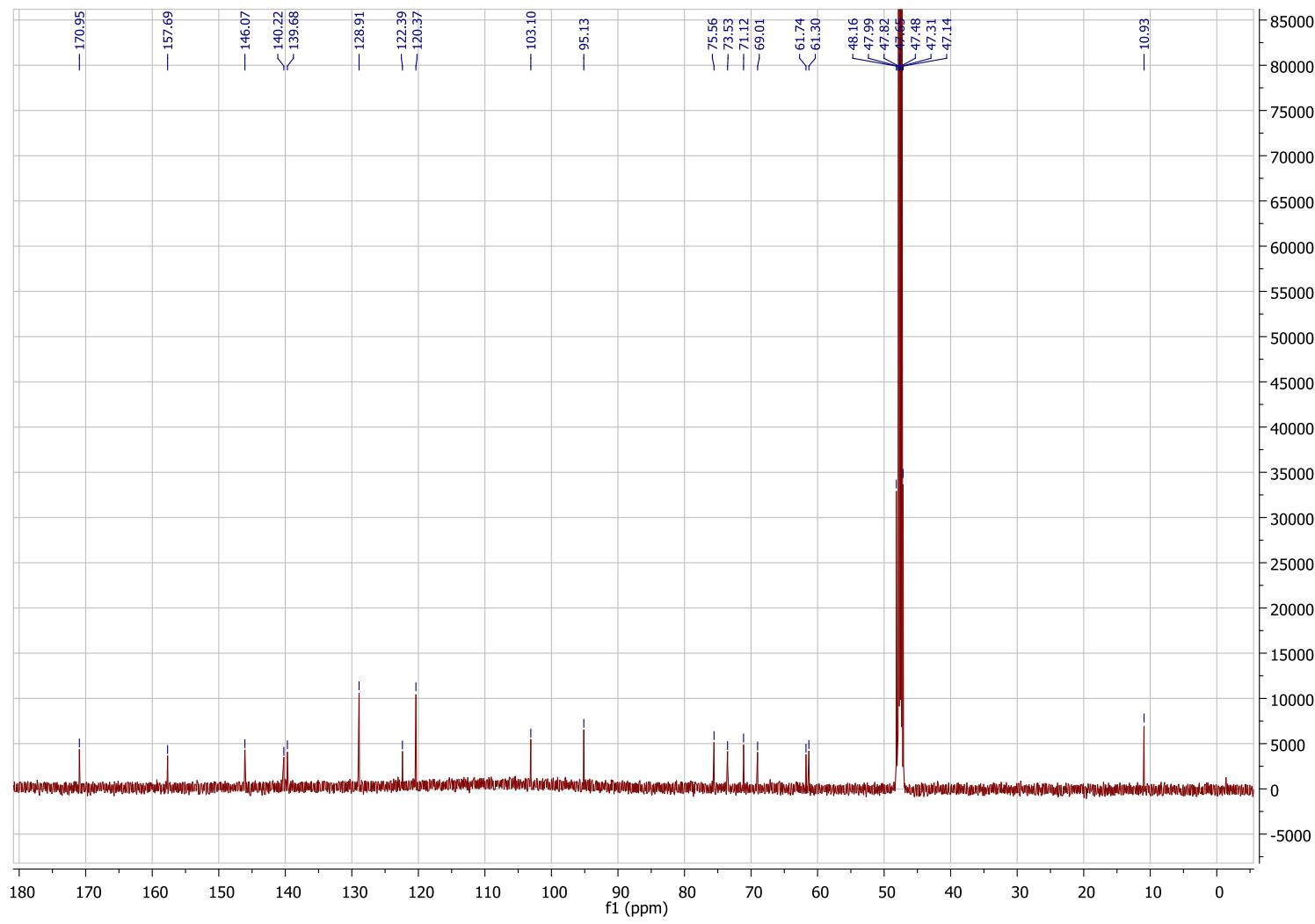


Tabela 29. Dados espectroscópicos do composto **54**

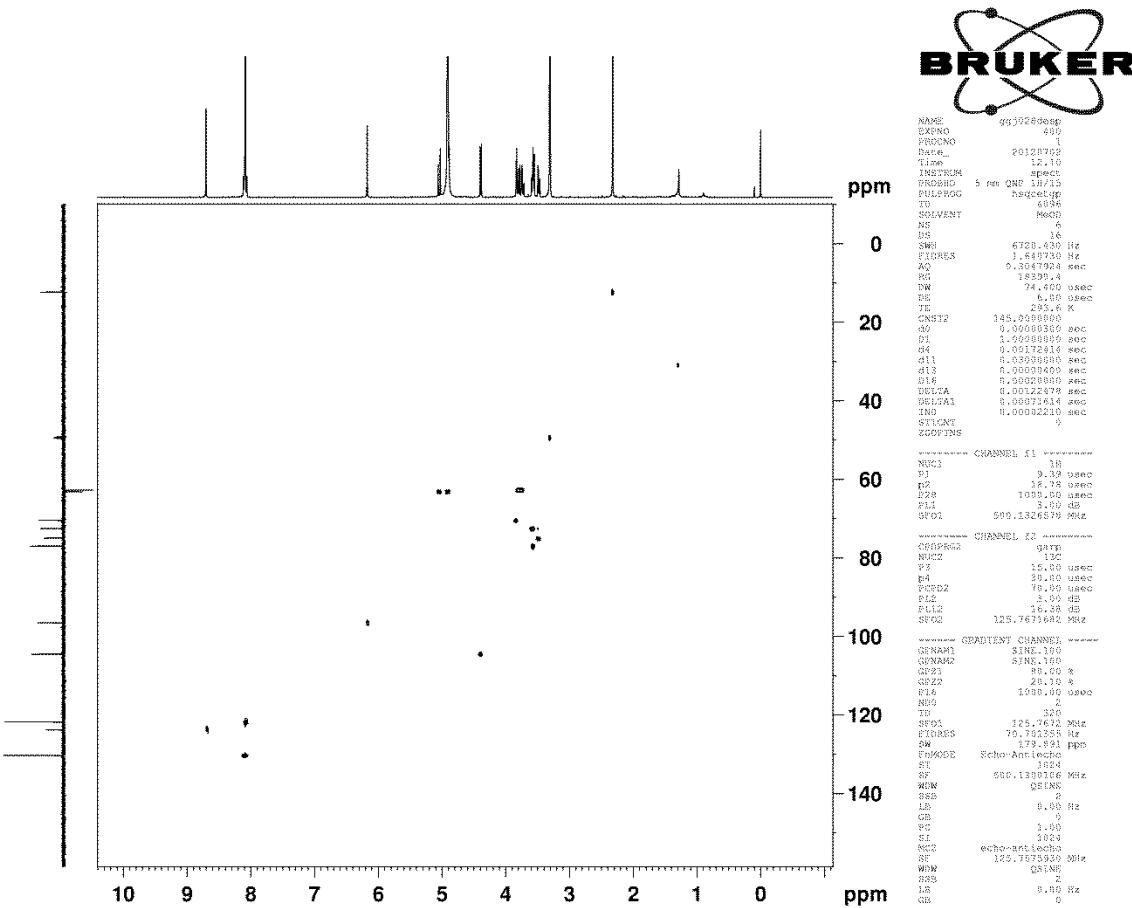
Número	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	103,1	4,36	1	d	$J_{1,2} = 7,8$
2	71,1	3,56-3,54	1	m	-
3	73,5	3,45	1	dd	$J_{2,3} = 9,6; J_{3,4} = 3,4$
4	69	3,80	1	d	$J_{3,4} = 3,1$
5	75,3	3,54-3,52	1	m	-
6a	61,3	3,77	1	dd	$J_{5,6a} = 6,5; J_{6a,6b} = 11,2$
6b	-	3,70	1	dd	$J_{5,6b} = 5,0; J_{6a,6b} = 11,2$
7a	61,7	5,01	1	d	$J_{7a,7b} = 12,9$
7b	-	4,88-4,86	1	m	-
8	146,1	-	-	-	-
9	122,4	8,67	1	s	-
10	139,7	-	-	-	-
11	120,4	8,04	2	d	$J_{11,12} = 9,0$
12	128,9	8,07	2	d	$J_{11,12} = 9,0$
13	140,2	-	-	-	-
14	157,7	-	-	-	-
15	95,1	6,14	1	s	-
16	171	-	-	-	-
17	11	2,29	3	s	-



**Anexo 26.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) do composto 4-(4-([β-D-galactopiranosil]-oximetil)-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfametoxazol (**54**)



Anexo 26.1. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do composto 4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfametoazol (54)



**Anexo 26.2.** Espectro de HMQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) do composto 4-(4-{{[}\beta\text{-D-galactopiranosil]}-\text{oximetil}})-1-*H*-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfametoxazol (54)

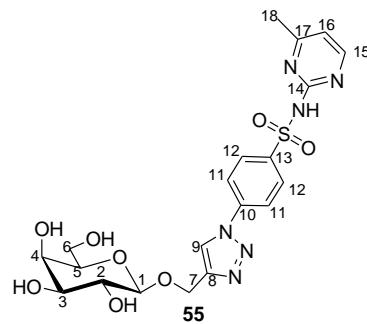
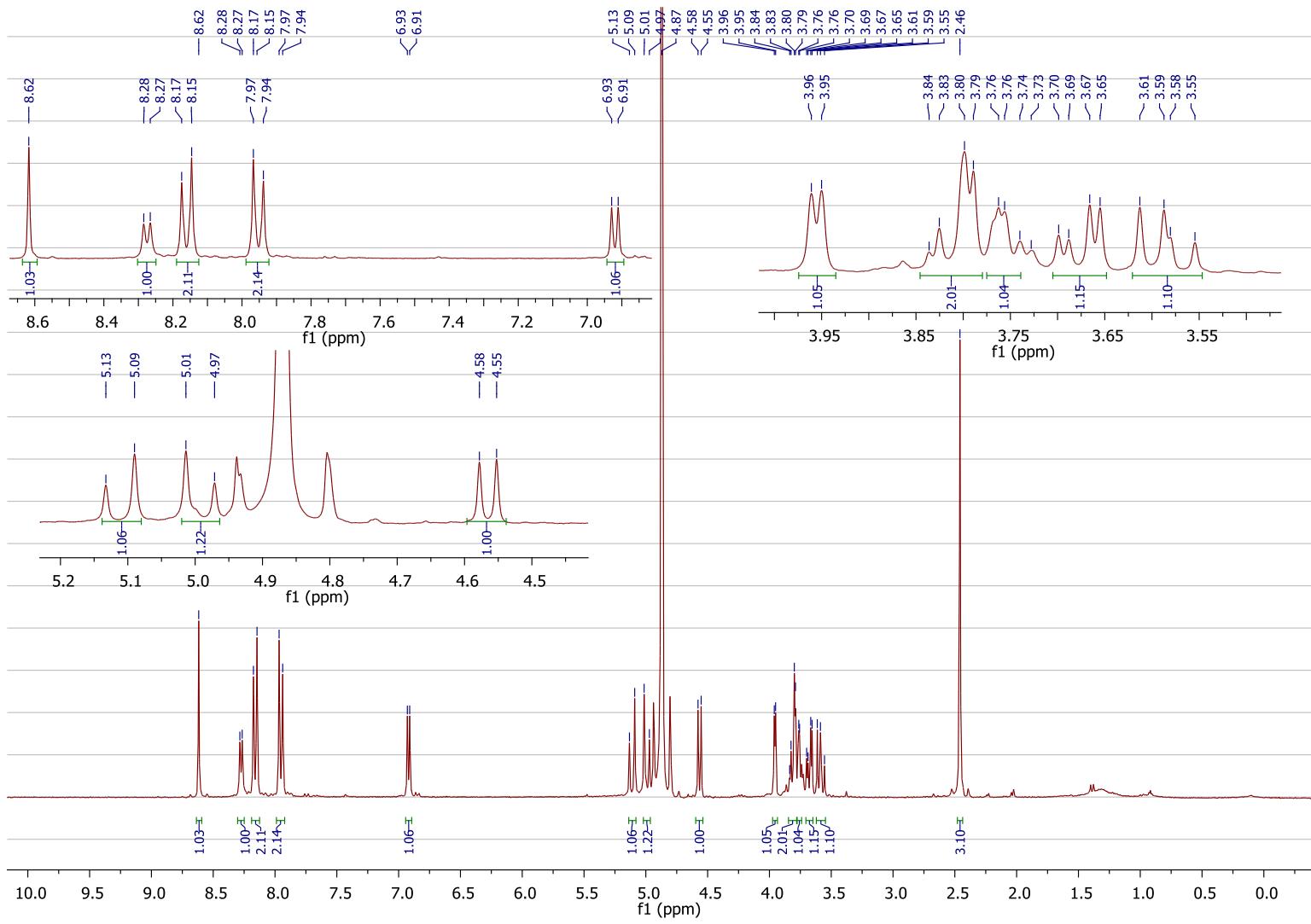
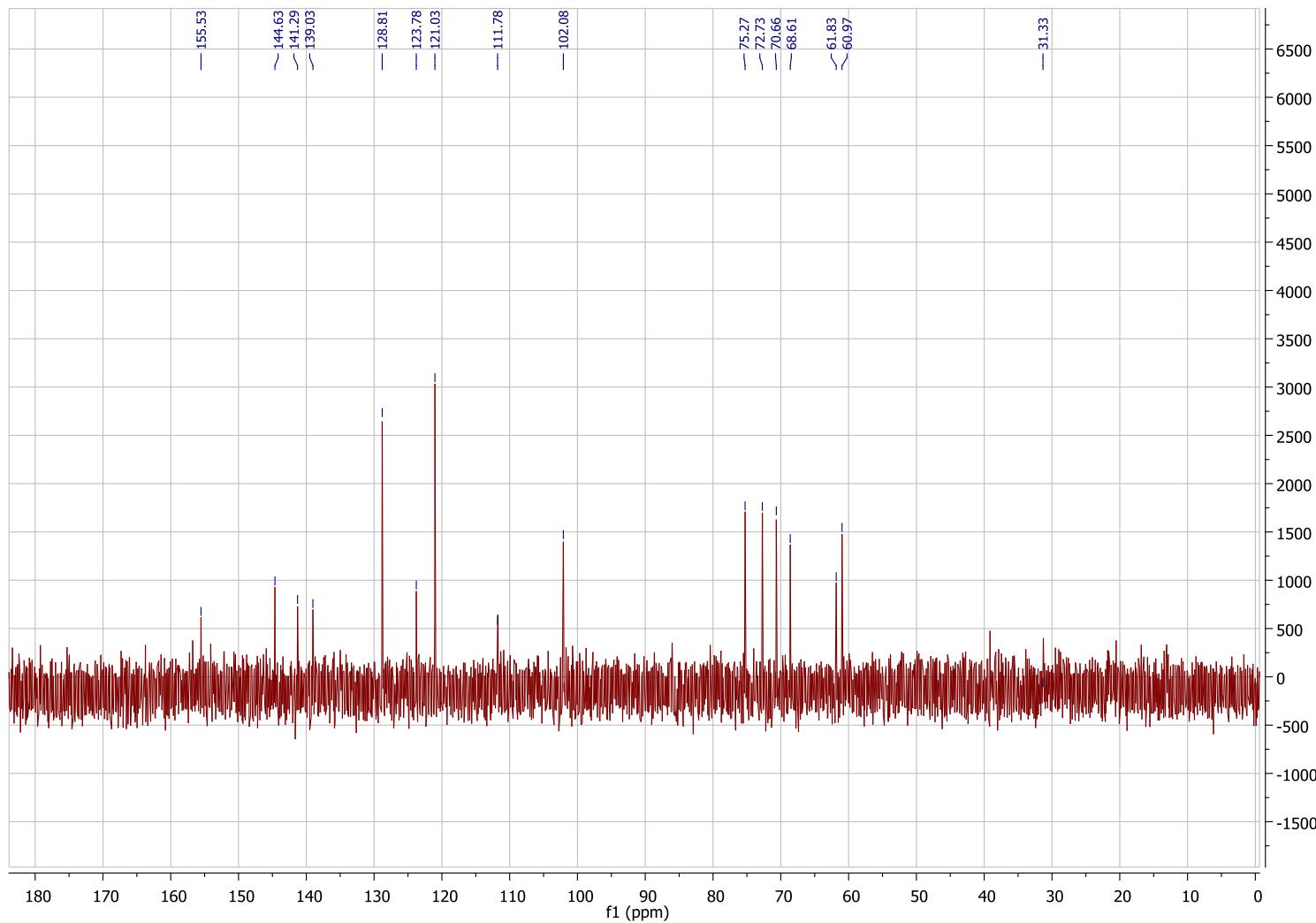


Tabela 30 - Dados espectroscópicos do composto **55**

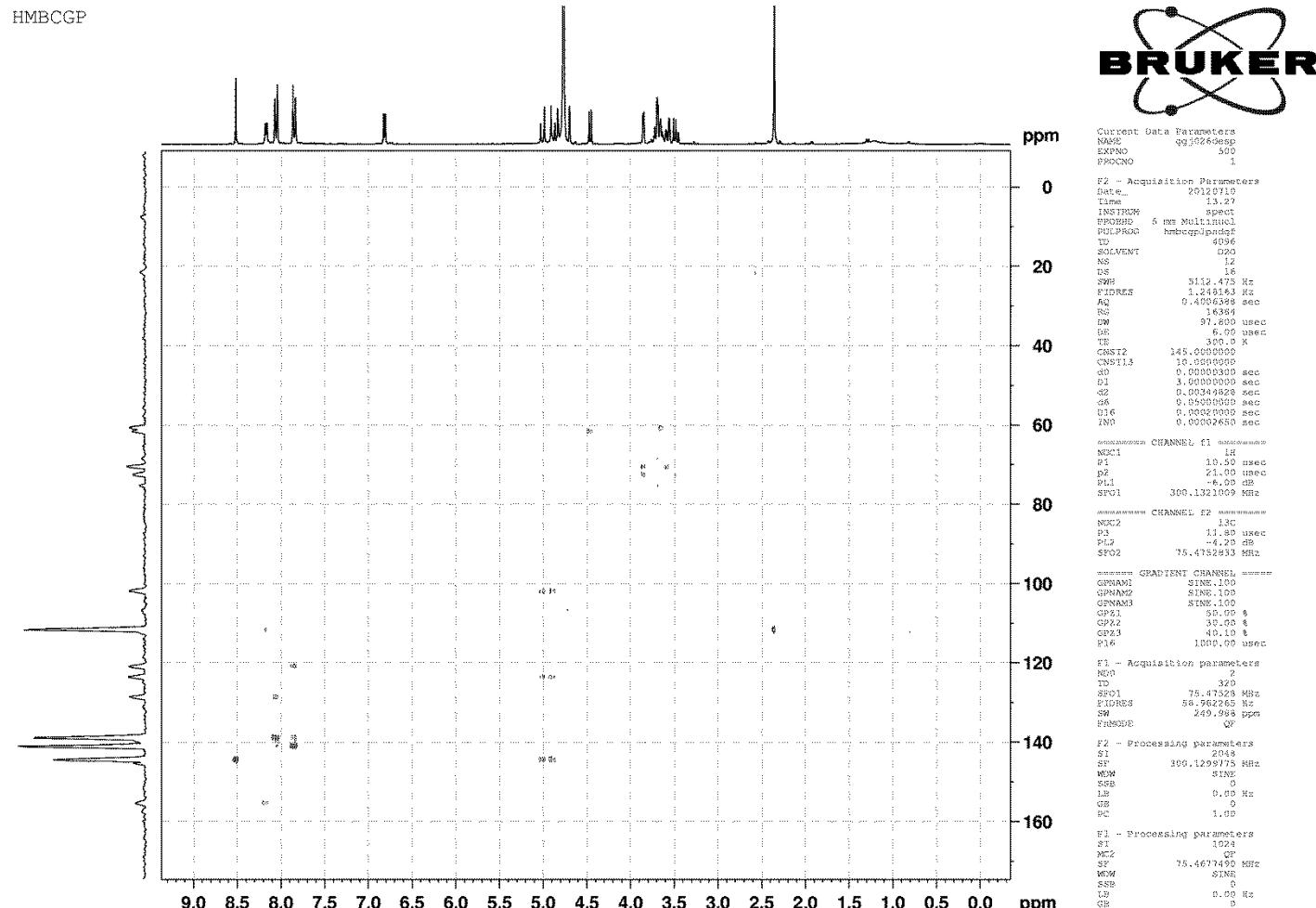
Número	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	102,1	4,57	1	d	$J_{1,2} = 7,7$
2	70,7	3,58	1	dd	$J_{1,2} = 7,8; J_{2,3} = 9,7$
3	72,7	3,68	1	dd	$J_{2,3} = 10,0; J_{3,4} = 3,3$
4	68,6	3,96	1	d	$J_{3,4} = 3,4$
5	75,3	3,76	1	dt	$J_{4,5} = 0,78; J_{5,6} = 6,5$
6a	61	3,84-3,78	1	m	-
6b	-	3,84-3,78	1	m	--
7a	61,8	5,11	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	-	4,99	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
8	141,3	-	-	-	-
9	121	8,62	1	s	-
10	139	-	-	-	-
11	128,9	7,95	2	d	$J_{11,12} = 8,7$
12	123,8	8,16	2	d	$J_{11,12} = 8,7$
13	139,3	-	-	-	-
14	155	-	-	-	-
15	144,6	8,27	1	d	$J_{15,16} = 5,6$
16	111,8	6,92	1	d	$J_{15,16} = 5,9$
17	155	-	-	-	-
18	31,3	2,46	3	s	-



**Anexo 27.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) do composto 4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfamerazina(**55**)



Anexo 27.1. Espectro de RMN  ${}^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) do composto 4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfamerazina (**55**)



Anexo 27.2. Espectro de HMBC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz) do composto 4-(4- $\{\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil)-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfamerazina (55)

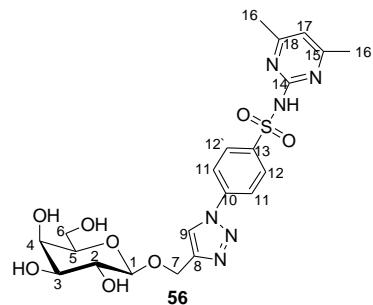
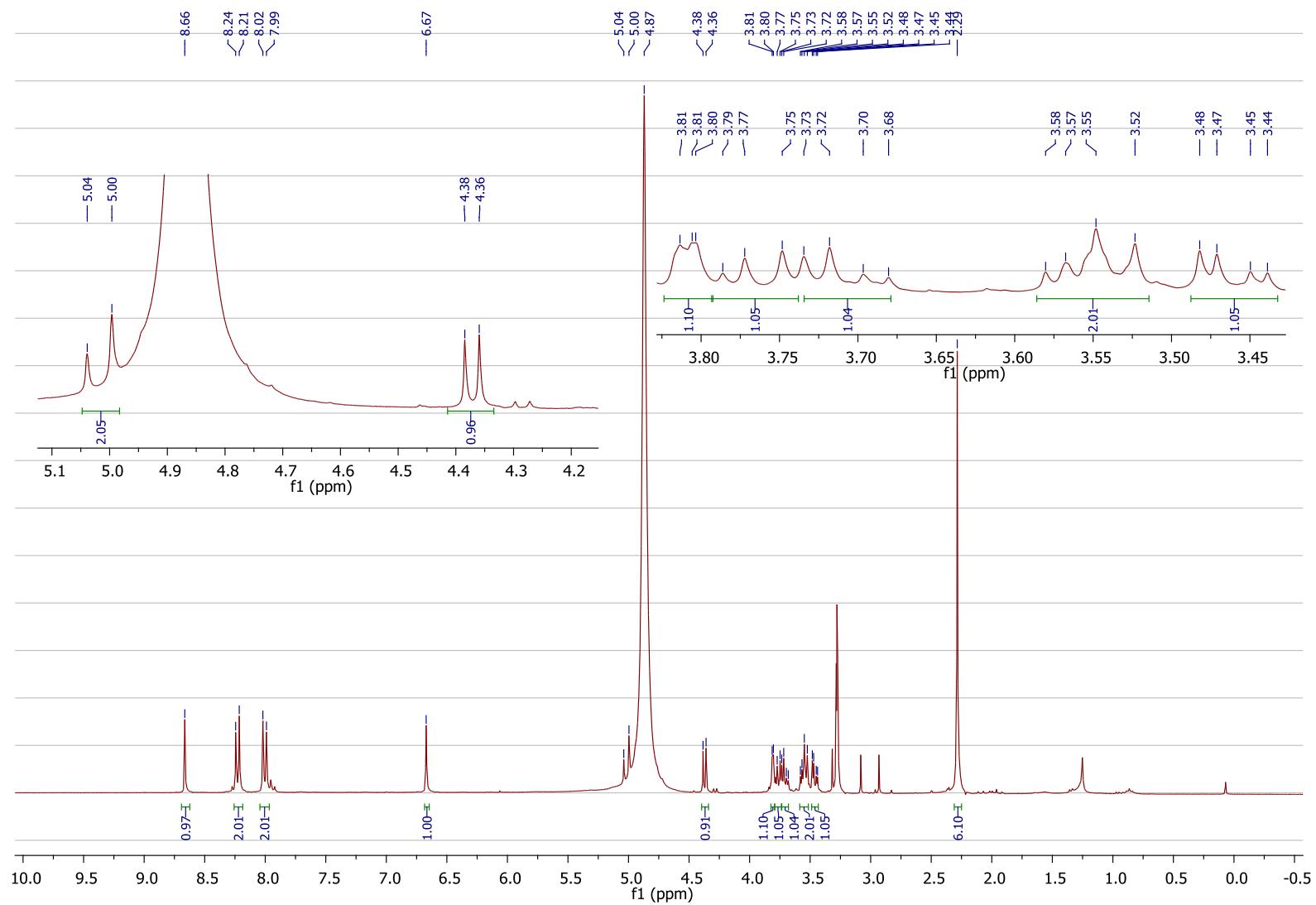
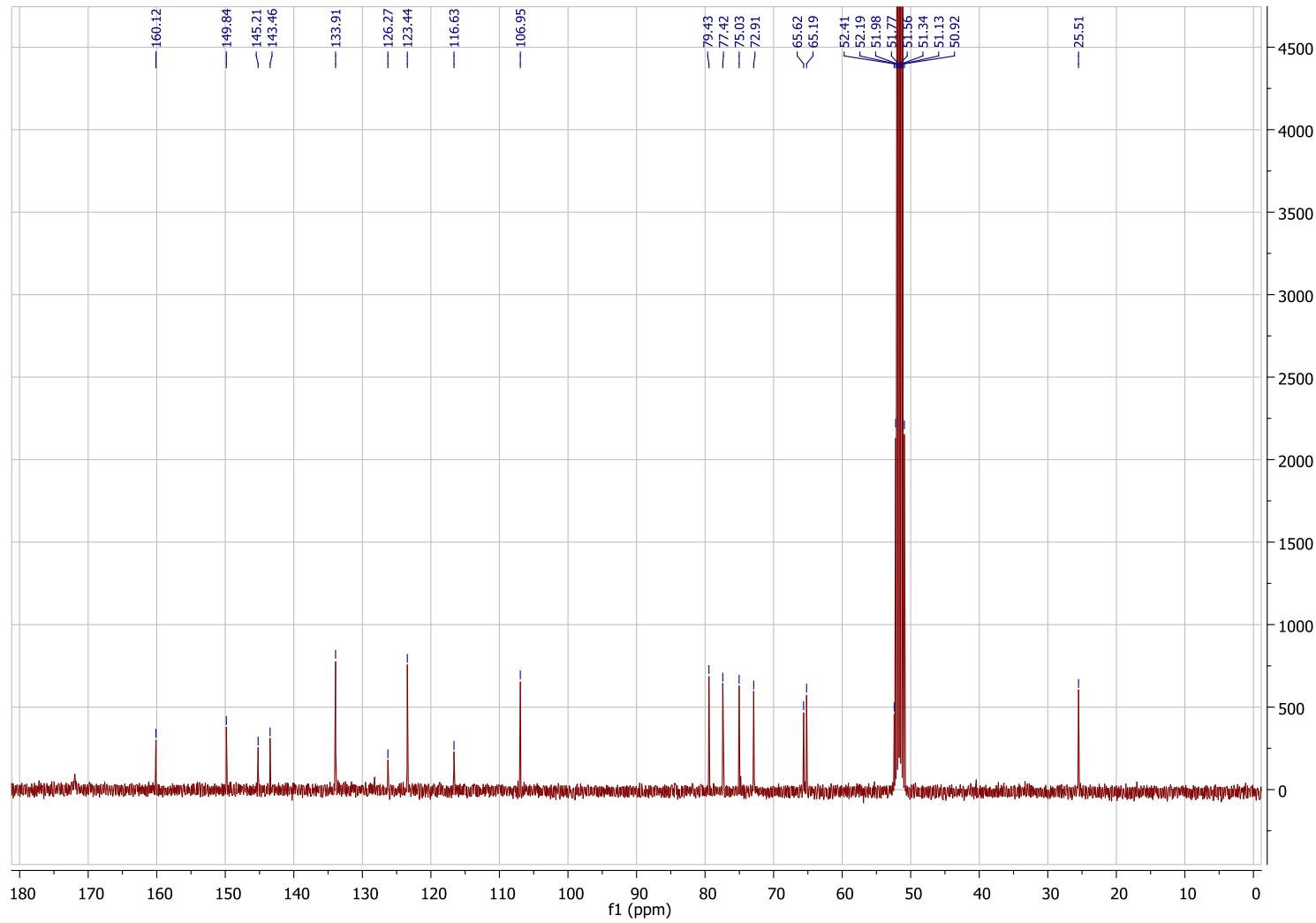


Tabela 31 - Dados espectroscópicos do composto **56**

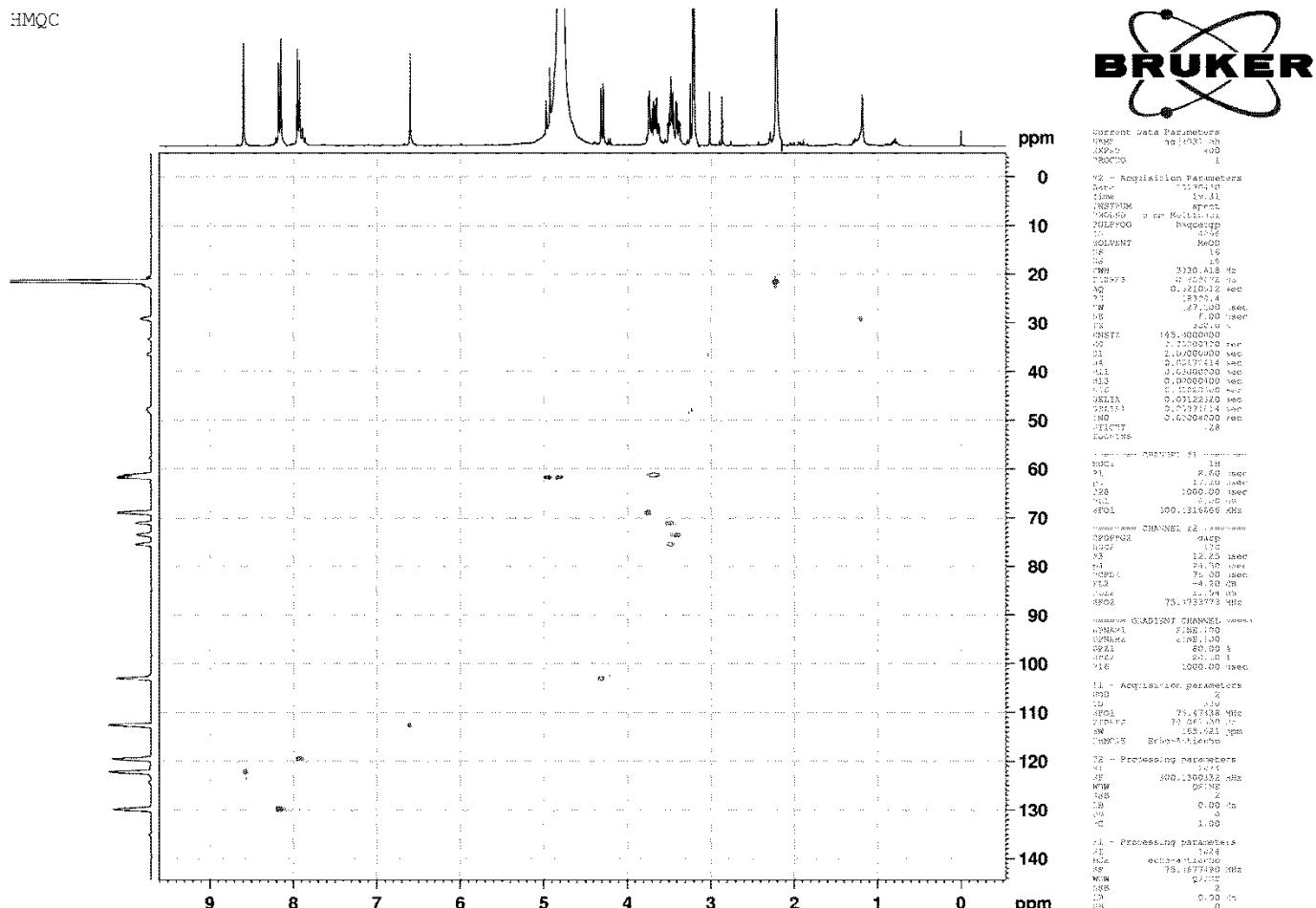
Número	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	107	4,37	1	d	$J_{1,2} = 7,5$
2	75	3,55	1	dd	$J_{1,2} = 7,5; J_{2,3} = 9,7$
3	77,4	4,46	1	dd	$J_{2,3} = 9,7; J_{3,4} = 3,3$
4	72,9	3,81	1	dd	$J_{3,4} = 3,1; J_{4,5} = 0,9$
5	79,4	3,55	1	d	$J_{5,6} = 6,5$
6a	65,2	3,76	1	dd	$J_{5,6a} = 5,0; J_{6a,6b} = 11,3$
6b	-	3,71	1	dd	$J_{5,6b} = 5,0; J_{6a,6b} = 11,5$
7	65,6	5,02	2	d	$J = 12,8$
8	149,8	-	-	-	-
9	126,3	8,66	1	s	-
10	143,5	-	-	-	-
11	123,4	8,0	2	d	$J_{11,12} = 8,9$
12	133,9	8,23	2	d	$J_{11,12} = 8,9$
13	145,21	-	-	-	-
14	160,1	-	-	-	-
15	160,1	-	-	-	-
16	25,5	2,29	6	s	-
17	116,6	6,67	1	s	-
18	160,1	-	-	-	-



**Anexo 28.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) do composto 4-(4-[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil)-1- $H$ -1,2,3-triazol-1il)benzenosulfametazina (**56**)



**Anexo 28.1.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) do composto 4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfamerazina  
(56)



**Anexo 28.2.** Espectro de HMQc ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) do composto 4-(4-[[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil]-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfamerazina (56)

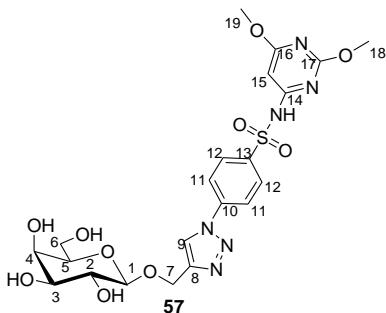
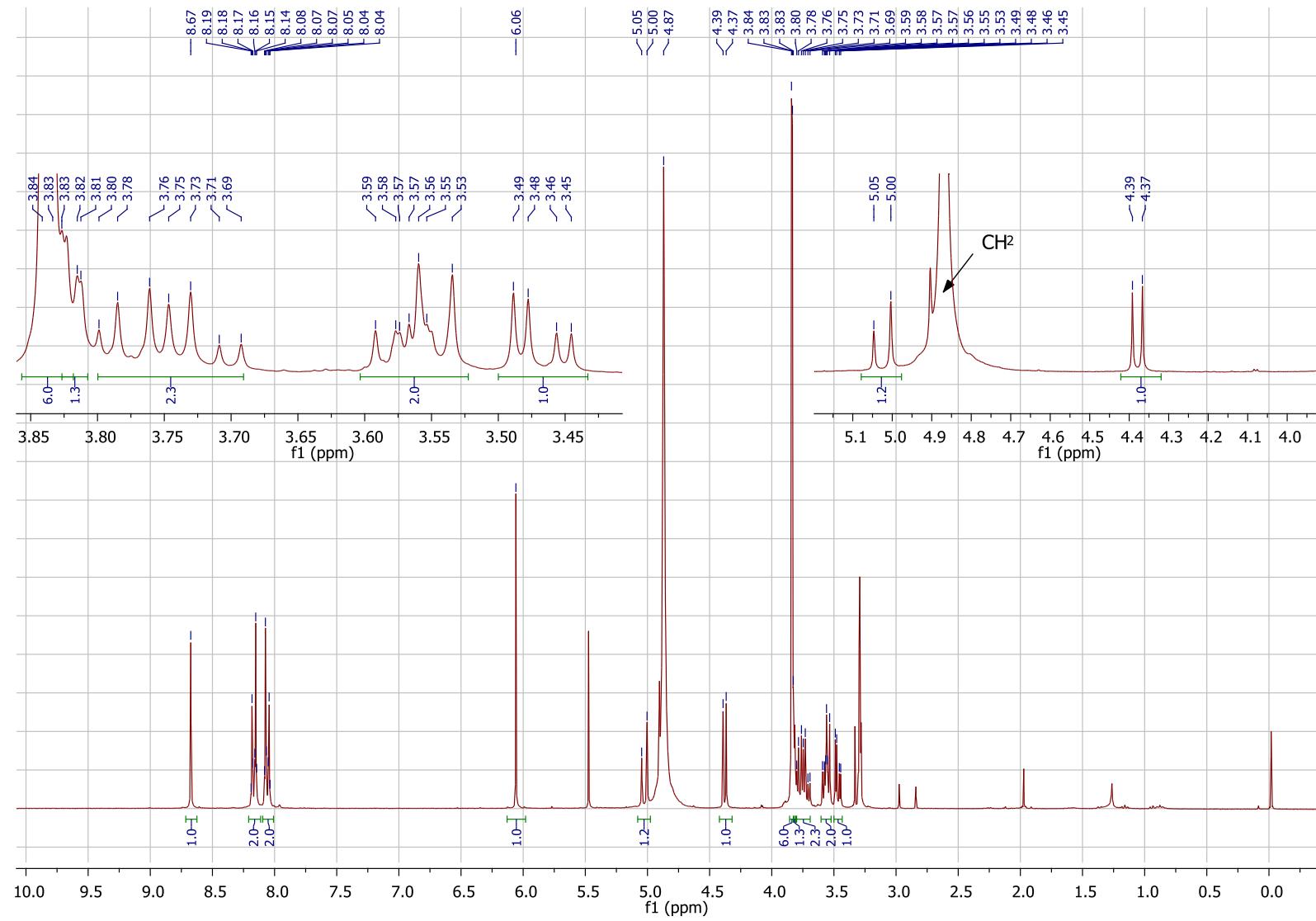
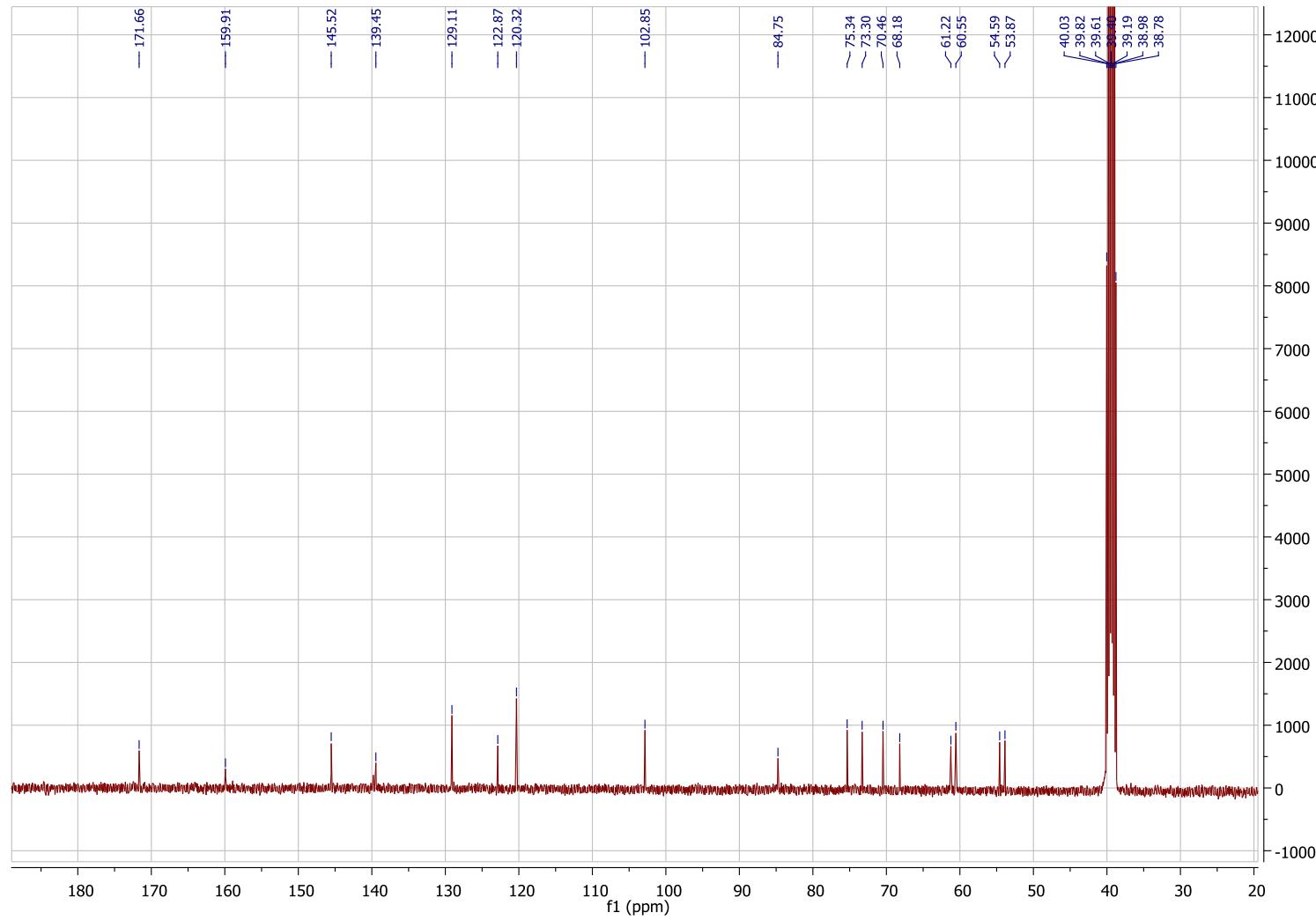


Tabela 32.- Dados espectroscópicos do composto **57**

Número	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	102,9	4,38	1	d	$J_{1,2} = 7,5$
2	75,3	3,58	1	dd	$J_{1,2} = 7,5; J_{2,3} = 9,7$
3	73,3	3,47	1	dd	$J_{2,3} = 9,7; J_{3,4} = 3,3$
4	68,2	3,83	1	dd	$J_{3,4} = 3,5; J_{4,5} = 1,2$
5	70,5	3,58	1	dt	$J_{4,5} = 1,2; J_{5,6} = 6,0$
6a	60,9	3,80-3,76	1	m	-
6b	-	3,72	1	dd	$J_{5,6b} = 4,9; J_{6a,6b} = 11,4$
7a	61,2	5,03	1	d	$J_{7a,7b} = 12,9$
7b	-	4,9-4,87	1	m	-
8	145,2	-	-	-	-
9	122,9	8,67	1	s	-
10	139,5	-	-	-	-
11	129,1	8,06	2	d	$J_{11,12} = 8,8$
12	120,3	8,17	2	d	$J_{11,12} = 8,8$
13	139,5	-	-	-	-
14	159,9	-	-	-	-
15	84,8	6,06	1	s	-
16	171,7	-	-	-	-
17	159,9	-	-	-	-
18	55,6	3,84	3	s	-
19	53,9	3,83	3	s	-

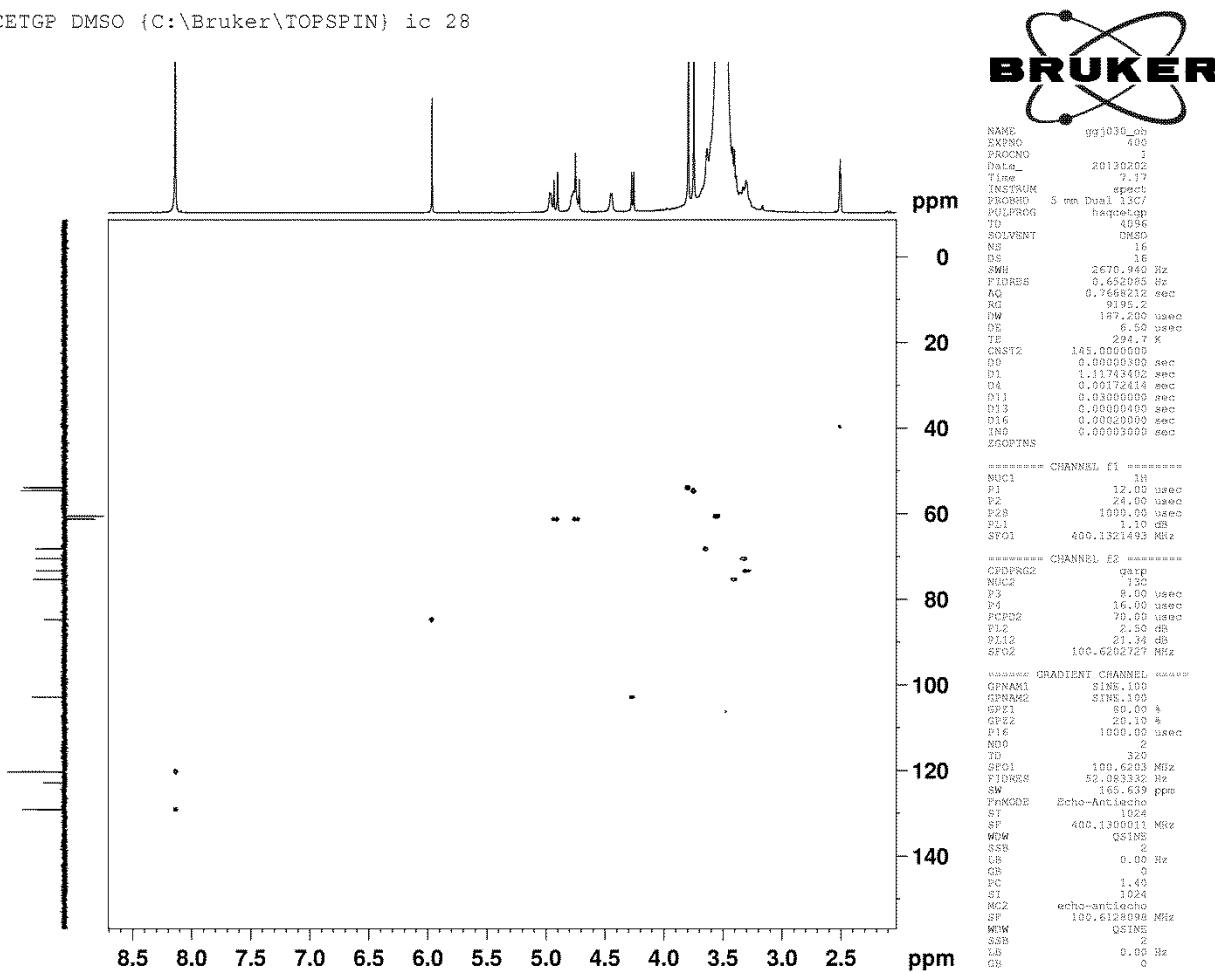


**Anexo 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) do composto 4-(4-[[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil]-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfadimetoxina (**57**)



Anexo 29.1. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) do composto 4-(4-<{[\beta-\text{D-galactopiranosil]}-\text{oximetil}})-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfadimetoxina  
(57)

HSQCETGP DMSO {C:\Bruker\TOPSPIN} ic 28



Anexo 29.2. Espectro de HMQc (DMSO, 125 MHz) do composto 4-(4-{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1-il)benzenosulfadimetoxina (**57**)

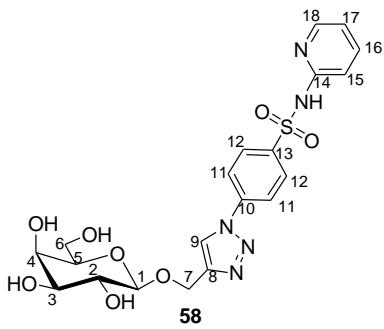
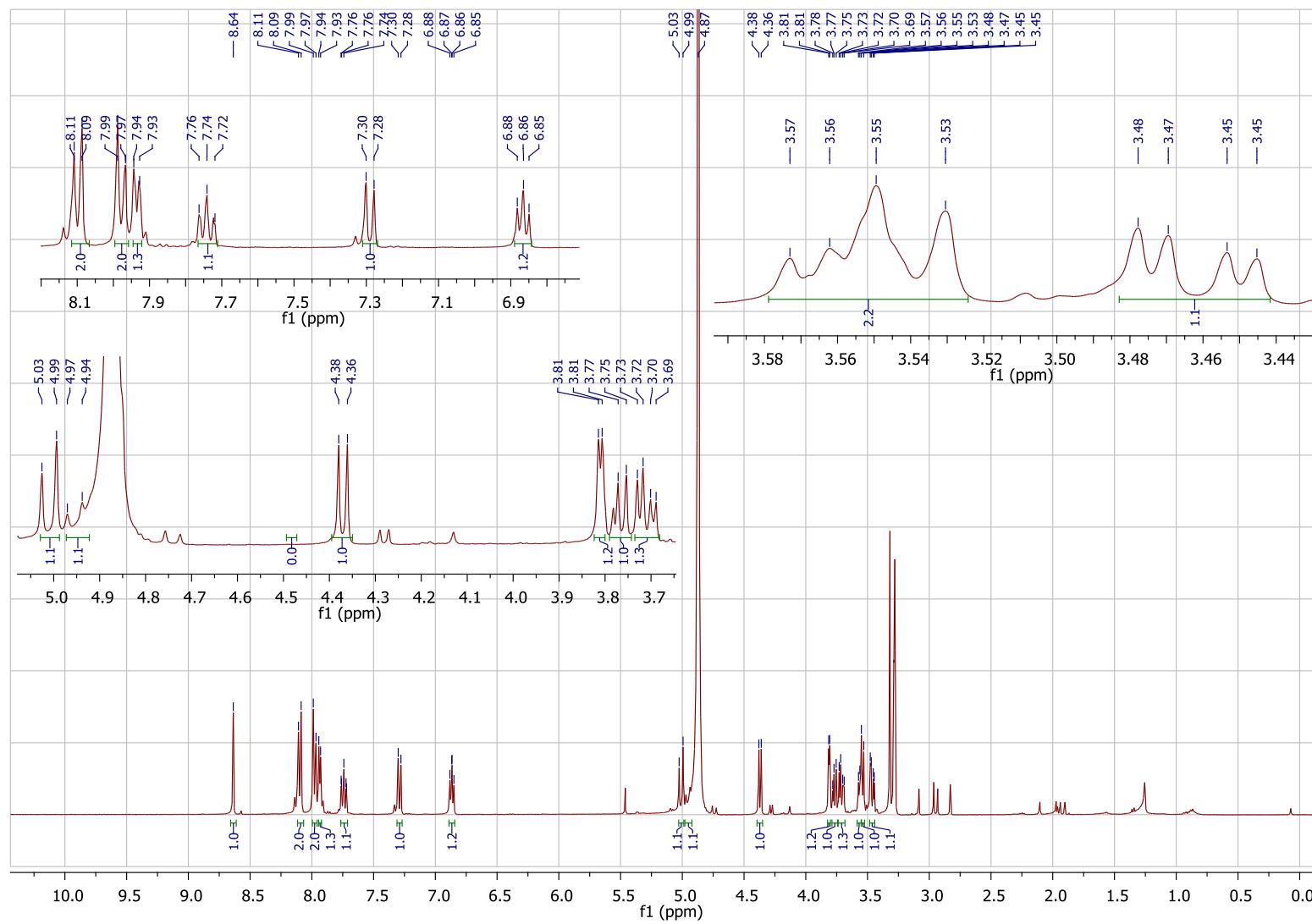
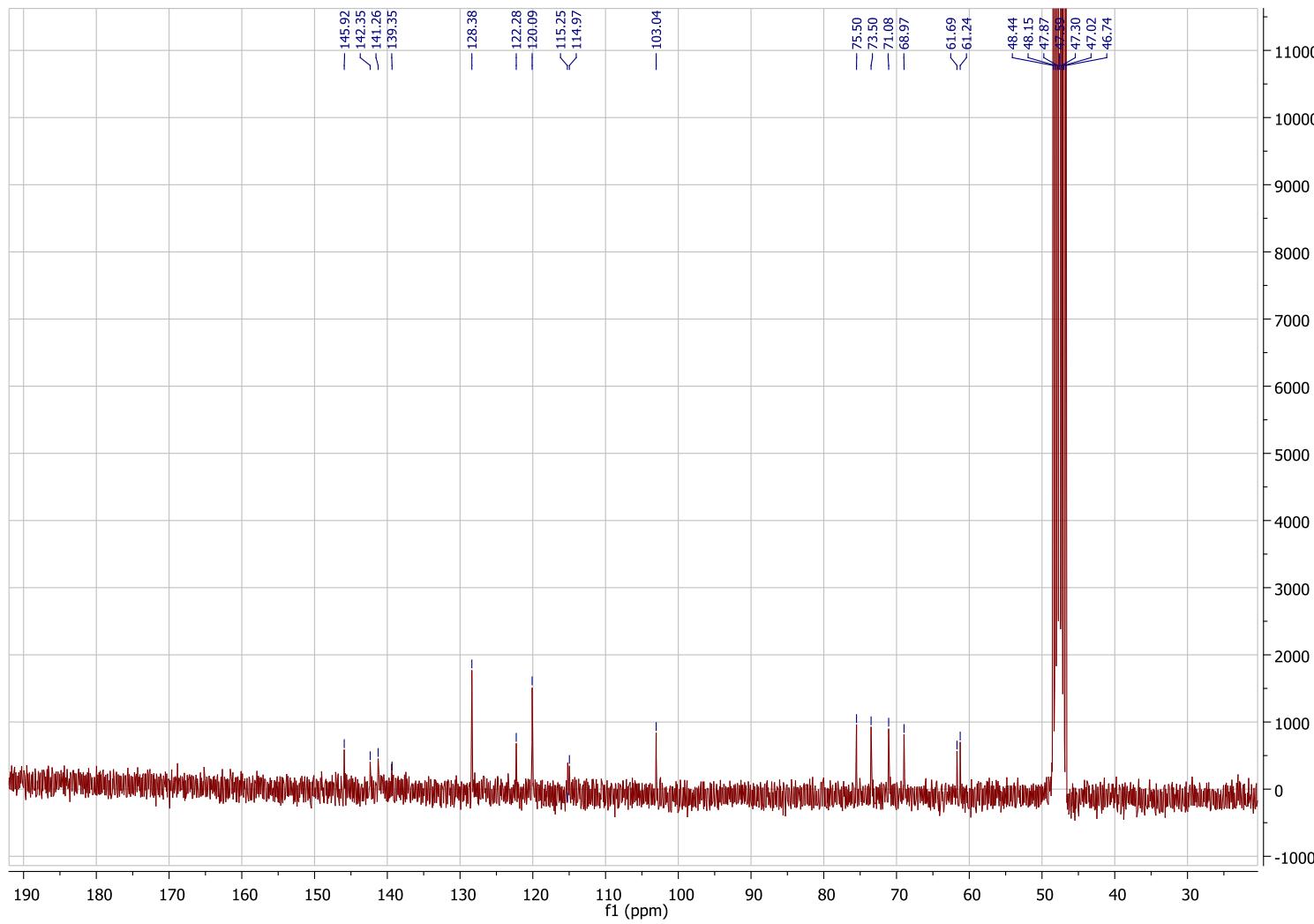


Tabela 33 - Dados espectroscópicos do composto **58**

Número	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	103	4,37	1	d	$J_{1,2} = 7,6$
2	71,1	3,55	1	dd	$J_{1,2} = 7,6; J_{2,3} = 9,6$
3	73,5	3,46	1	dd	$J_{2,3} = 9,7; J_{3,4} = 3,3$
4	69,0	3,81	1	d	$J_{3,4} = 3,2$
5	75,5	3,55	1	m	-
6a	61,2	3,77	1	m	-
6b	-	3,71	1	dd	$J_{5,6b} = 4,9; J_{6a,6b} = 11,4$
7a	61,7	5,01	1	d	$J_{7a,7b} = 12,8$
7b	-	4,95	1	d	$J_{7a,7b} = 12,9$
8	145,9	-	1	s	-
9	121,7	8,64	1	s	-
10	139,4	-	-	-	-
11	128,4	7,98	1	d	$J_{11,12} = 8,7$
12	120,1	8,1	1	d	$J_{11,12} = 8,7$
13	139,4	-	-	-	-
14	145,9	-	-	-	-
15	115	7,29	1	d	$J = 8,8$
16	141,3	7,74	1	m	-
17	115,3	6,87	1	t	$J = 6,1$
18	142,4	7,94	1	d	$J = 5,7$



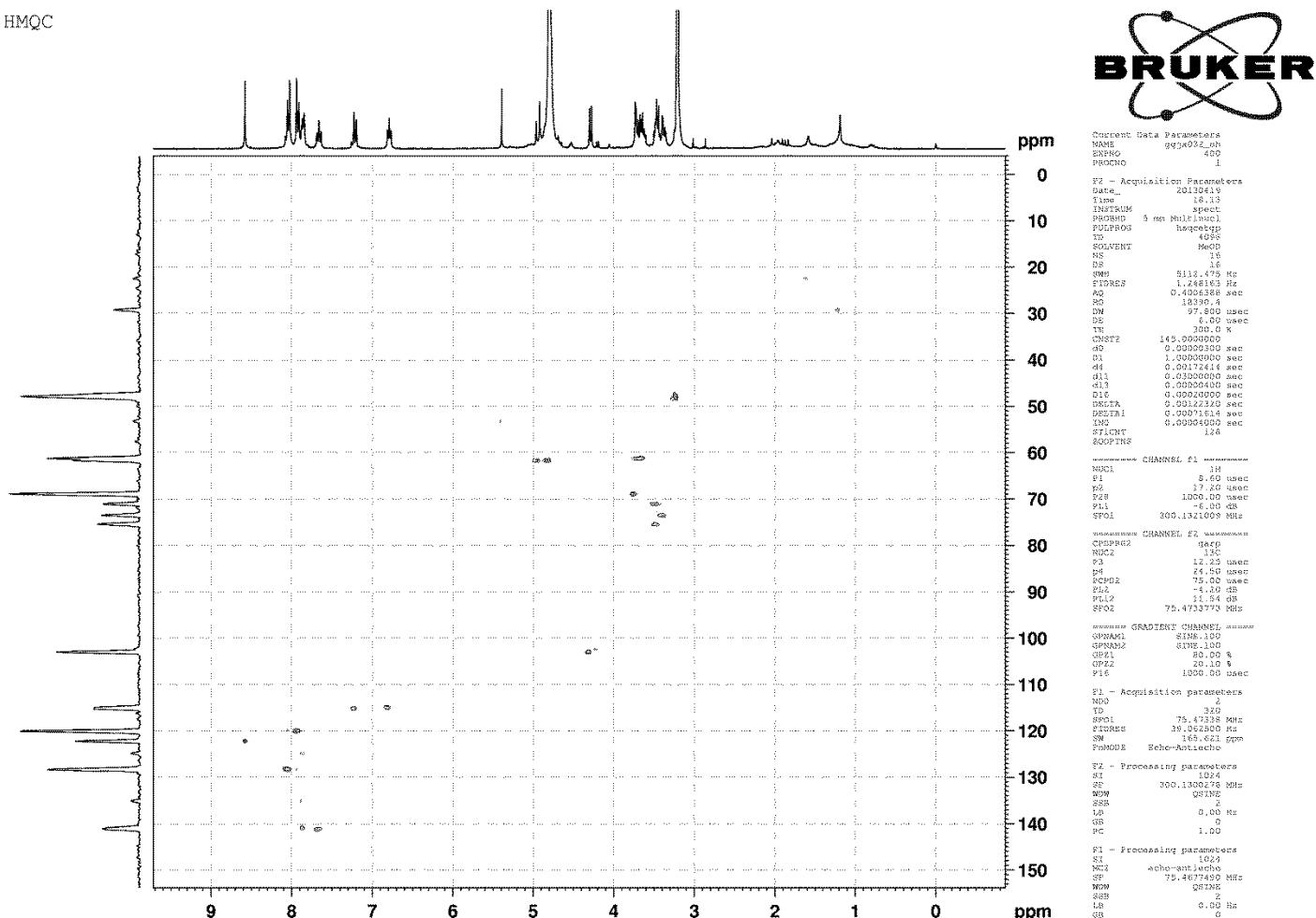
**Anexo 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do composto 4-(4-{{[ $\beta$ -D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfapiridina (**58**)



Anexo 30.1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) do composto 4-(4-{{ $\beta$ -D-galactopiranosil}-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfapiridina

(58)

HMQC



Anexo 30.2. Espectro de HMQc (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) do composto 4-(4-{[β-D-galactopiranosil]-oximetil}-1-H-1,2,3-triazol-1il)benzenosulfapiridina (58)