UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento
de fármacos inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***

Vanessa Leiria Campo

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento
de fármacos inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos naturais e sintéticos

Orientada: Vanessa Leiria Campo

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto

2007

“Não é o crítico que importa, não importa o homem que aponta quando o forte tropeça ou mostra de que maneira aquele que faz as coisas poderia ter feito melhor.

O crédito é do homem que está na arena, com o rosto marcado de poeira, suor e sangue; o que luta com valentia; o que erra e falha várias vezes seguidas, pois não há esforços sem erros e falhas, mas é ele quem realmente luta para fazer as coisas; é ele quem conhece os grandes entusiasmos, e a total dedicação; é ele quem dá tudo de si para uma causa digna; é ele quem na melhor das hipóteses, acaba conhecendo os triunfos de uma grande realização; e na pior delas, quando fracassado, ao menos fracassa por tentar grandeza e ousadia, de tal maneira que seu lugar nunca será junto das almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória e nem a derrota.” (Theodoro Roosevelt)

DEDICATÓRIA

**Dedico esta tese aos meus pais Vivaldo e Maria Lúcia,
pelo amor, pela dedicação e por sempre me incentivarem e acreditarem em mim...**

**Aos meus irmãos Vivaldo Júnior, William e José,
pelo afeto, amizade e estímulo**

**Ao meu noivo Eduardo...
O seu amor, carinho, compreensão e apoio
fazem parte desta conquista**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação desde o mestrado, por todos os ensinamentos, de grande valia para a minha formação científica, pelas oportunidades oferecidas, pelo incentivo sempre presente, por ouvir e respeitar minhas sugestões e pela amizade. O seu exemplo de trabalho, esforço, dedicação e otimismo, mesmo nas situações mais difíceis, me estimulam a continuar trabalhando com entusiasmo e a seguir a carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela saúde

Ao Prof. Robert A. Field, pela orientação durante a realização de estágio de doutorado sanduíche na Universidade de East Anglia (UEA), Inglaterra, pelos ensinamentos, por todo o aprendizado adquirido neste período e pelas valiosas sugestões, que muito contribuíram para a conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique T. P. Silva, pelo auxílio na parte de modelagem molecular e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Albuquerque, pela realização dos ensaios de atividade tripanocida.

Ao Prof Auro Nomizo, pela realização dos ensaios de atividade antitumoral;

À Prof. Luziane Bendhack, pela realização dos ensaios farmacológicos;

À FAPESP e à CAPES, pelo suporte financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Luís Otávio Zamonier, Cláudia Castania e Áurea Donizetti, por todo o auxílio proporcionado e pela amizade.

À técnica Virgínia Betarello, pela realização das análises de RMN.

Ao Centro Nacional de Serviços de Espectrometria de Massas (EPSRC) em Swansea (UK) e ao Dr. Lionel Hill do Instituto John Innes Centre (JIC), Inglaterra, pela realização das análises de espectrometria de massas.

Aos amigos do laboratório de química farmacêutica Denise de Oliveira, Maristela Martins, Lílian Sibelle, Peterson de Andrade e Warley Borges, pela amizade, pelo compartilhamento das alegrias e dificuldades e pela ajuda sempre presente.

A todos os demais colegas do laboratório de química farmacêutica, Michele, Vinícius, Daniel, Pedro, Flávio, Luciano e Samantha, pela aprazível convivência e pelos momentos de descontração.

Ao grupo de pesquisa do Centro de Química de Carboidratos (CCC) da Universidade de East Anglia (UEA), Marcelo, Renate, Beatrice, Serghey, Martin, Maretta, Rositsa e em especial, aos amigos italianos Antonella, Simone e Margherita, pela prestatividade e auxílio no laboratório, pela troca de experiências e de culturas de diferentes países, e pela amizade.

RESUMO

CAMPO, V.; L. **Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento de fármacos inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***. 2007. 200 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

trans-Sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariotes. *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e utiliza esta enzima para retirar este monossacarídeo de glicoconjugados do hospedeiro para sialilar moléculas aceptoras, como mucina-GPI, presentes na sua membrana plasmática. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α -2,3 com moléculas de galactose aceptoras na superfície do parasita. As moléculas de mucina sialiladas estão envolvidas no processo de aderência e subsequente penetração do parasita nas células do hospedeiro. Considerando a heterogeneidade das moléculas de mucina de *T. cruzi*, não existem compostos disponíveis que atuem como substratos glicopeptídicos sintéticos.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos químicos e químico-enzimáticos de síntese de glicopeptídeos de mucina de *T. cruzi* para investigação da natureza das interações moleculares críticas envolvidas no reconhecimento e processamento de glicosídeos contendo ácido siálico, na presença de *trans*-sialidase. O melhor entendimento destas interações conduziu ao planejamento racional de potenciais inibidores seletivos de *trans*-sialidase de *T. cruzi*.

Alguns dos principais glicopeptídeos, obtidos por metodologias de síntese em fase sólida e síntese químico-enzimática com a enzima β 1,4-galactosiltransferase (β 1,4-GalT) foram: $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **2**, $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **4** e $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **5**. Como precursores destes glicopeptídeos os blocos de construção $\beta\text{GlcNAc-FmocThrOH}$ **24**, $\alpha\text{GlcNAc-FmocThrOH}$ **25**, $\beta\text{Gal-FmocThrOH}$ **27** e $\alpha\text{LacNAc-FmocThrOH}$ **75** foram sintetizados por meio de reações de glicosilação do aminoácido treonina **18**, contendo os grupos protetores *N*-Fmoc e *O*-Bn, com os correspondentes açúcares $\alpha\text{GlcNAcCl}$ **12**, αGalBr **13** e $\alpha\text{LacN}_3\text{Cl}$ **33**, seguidas de reações de hidrogenólise (10% Pd-C/ H_2) para desproteção do grupo *O*-Bn e posterior acoplamento em cadeia peptídica rica em sequência de treonina. Os aminoácidos glicosilados $\beta\text{GlcNAc-ThrOH}$ **22** e $\alpha\text{GlcNAc-ThrOH}$ **23**, totalmente desprotegidos, foram empregados em reações enzimáticas com a enzima β 1,4-GalT, sendo obtidos os dissacarídeos glicosídicos $\beta\text{LacNAc-ThrOH}$ **53** e $\alpha\text{LacNAc-ThrOH}$ **41** (também sintetizado quimicamente). Os dissacarídeos glicosídicos **41** e **53**, os glicopeptídeos **2** e **4** e o aminoácido glicosilado $\beta\text{Gal-ThrOH}$ **28** foram submetidos aos ensaios enzimáticos com a enzima TcTS, sendo verificada a sialilação de todos os aceptores testados em rendimentos elevados, o que confirmou que estes compostos podem atuar como potenciais substratos da enzima TcTS.

Palavras-chave: 1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *trans*-Sialidase. 3. Aminoácidos glicosilados. 4. Dissacarídeos glicosídicos. 5. Glicopeptídeos

ABSTRACT

CAMPO, V.; L. **Synthesis and activity of glycopeptides of interest for drug design of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase**. 2007. 200 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Trypanosoma cruzi trans-sialidase (TcTS) belongs to the family of glycoproteins expressed on the surface of the parasite and constitutes one of the few examples of natural surface glycosyltransferases found in eucariotes. *T. cruzi* can not synthesize sialic acid itself and uses a *trans*-sialidase enzyme to scavenge this monosaccharide from host glycoconjugates to sialylate acceptors molecules, such as GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchored mucins, that are present in parasite plasma membrane. This enzyme is specific to catalise, preferentially, the transference of sialic acid to mucin glycoproteins, originating α -2,3-linkages with acceptor galactose molecules in the parasite surface. The sialylated mucin molecules are involved in the attachment and subsequent penetration of the parasite into host cells. Given the heterogeneity of *T. cruzi* mucin molecules, there are no suitable synthetic occurring sources of TcTS glycopeptide substrates.

Thus, the objective of this work was the development of chemical and chemoenzymatic methods of synthesis of *T. cruzi* mucin glycopeptides in order to investigate the nature of the molecular interactions involved in recognition and processing of containing sialic acid glycosides, in the presence of *trans*-sialidase. A better understanding of these interactions led to drug design of selective potential inhibitors for *T. cruzi* trans-sialidase.

Some of the main glycopeptides obtained by methods of solid phase and chemoenzymatic synthesis with β 1,4-galactosyltransferase (β 1,4-GalT) enzyme were: $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **2**, $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **4** and $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **5**. As precursors of these glycopeptides, the building blocks $\beta\text{GlcNAc-FmocThrOH}$ **24**, $\alpha\text{GlcNAc-FmocThrOH}$ **25**, $\beta\text{Gal-FmocThrOH}$ **27** and $\alpha\text{LacNAc-FmocThrOH}$ **75** were synthesized by glycosylation reactions of the threonine amino acid **18**, containing the protecting groups *N*-Fmoc and *O*-Bn, with the correspondent sugars $\alpha\text{GlcNAcCl}$ **12**, αGalBr **13** and $\alpha\text{LacN}_3\text{Cl}$ **33**, followed by hydrogenolysis reactions (10% Pd-C/ H_2) for deprotection of *O*-Bn group and later coupling into the peptide chain rich in threonine sequence. The glycosylated amino acids $\beta\text{GlcNAc-ThrOH}$ **22** and $\alpha\text{GlcNAc-ThrOH}$ **23**, totally deprotected, were employed in enzymatic reactions with β 1,4-GalT, being obtained the disaccharide glycosides $\beta\text{LacNAc-ThrOH}$ **53** and $\alpha\text{LacNAc-ThrOH}$ **41** (also chemically synthesized). The disaccharide glycosides **41** and **53**, the glycopeptides **2** and **4** and the glycosylated amino acid $\beta\text{Gal-ThrOH}$ **28** were submitted to enzymatic assays with TcTS enzyme, being verified the sialylation of all tested acceptors in high yields, which confirmed that these compounds can act as potential acceptors substrates for TcTS enzyme.

Keywords: 1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *trans*-Sialidase. 3. Glycosylated amino acids. 4. Disaccharide glycosides. 5. Glycopeptides

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: acetato de etila

AgOTf: triflato de prata

Ala: alanina

Aloc: *N*-aliloxycarbonil

Arg: arginina

Asp: ácido aspártico

β 1,4-GalT: β 1,4-galactosiltransferase

Boc: *terc*butóxycarbonílico

CAN: nitrato de amônio cérico

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

COSY: Homonuclear Correlation Spectroscopy

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

DIPEA: diisopropiletilamina

d: dubleto

dd: duplo dubleto

DBU: 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno

DCM: diclorometano

DMF: dimetilformamida

DMTST: dimetilmetiltiosulfoniltriflato

Dts: *N*-ditiasuccinoil

EDTA: ácido tetra-acético etilenodiamina

ESI-MS: ionização por Electrospray

Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonil

GalNAc: *N*-acetil-galactosamina

Glc: glicosamina

GlcNAc: *N*-acetilglicosamina

Gln: glutamina

Gly: glicina

Glu: ácido glutâmico

GPI: glicosilfosfatidilinositol

HOBt: 1-hidroxi-benzotriazol

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

IL-12: interleucina 12

IFN γ : interferon gama

Leu: leucina

MASP: proteínas de superfície associadas à mucina

Met: metionina

m: múltiplo

MeOH: metanol

MHz: mega-Hertz

MU- α Neu5Ac: 4-metilumbeliferil-*N*-acetil-neuramínico

Neu-5-Ac: ácido neurâmico 5-acético

NK: natural Killer

OGT: *O*- β -*N*-acetil-glicosaminiltransferase

PDB: banco de dados de proteínas

Phe: fenilalanina

Phth: *N*-phthalimida

PNP- α Neu5Ac: *p*-nitrofenil-*N*-acetil-neurâmico

Pro: prolina

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio

PyOTf: triflato de piridina

RNA Pol II: RNA polimerase II

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: singleto

SAPA: antígeno de fase aguda

Ser: serina

SL: sialillactose

TcMUC: mucina de *T. cruzi*

TCP: *N*-tetracloroftaloil

Teoc: *N*-tricloroetoxicarbonil

TFA: ácido trifluoracético

THF: tetraidrofurano

TLR: Toll-Like Receptor

TMS-Tf: trimetilsililtriflato

TMSOTf: trimetilsililoxitriplato

TNF: fator de necrose tumoral

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

TrSA: *trans*-sialidase de *Trypanosoma rangeli*

t: tripleto

Thr: treonina

Trp: triptofano

Tyr: tirosina

Val: valina

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS

1. Doadores glicosídicos

2. Aminoácidos glicosilados

3. Dissacarídeos glicosídicos

4. Glicopeptídeos

5. Diketopiperazinas glicosiladas

6. Produtos sialilados

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	iii
LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Invasão celular pelo parasita e moléculas de mucina.....	11
1.3. Ácido siálico e <i>trans</i> -sialidase.....	16
1.4. Importância biológica de carboidratos e glicoproteínas.....	27
1.5. Sinalização de proteínas	32
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1. Síntese de aminoácidos glicosilados β GlcNAc-Thr e α GlcNAc-Thr	80
4.2. Preparação do bloco de construção β Gal-ThrOH	92
4.3. Síntese dos dissacarídeos glicosídicos α LacNAc-Thr e β LacNAc-Thr.....	95
4.4. Síntese de glicopeptídeos em fase sólida	104
4.5. Síntese enzimática com β 1,4-GalT	122
4.6. Síntese de dicetopiperazinas glicosiladas.....	128
4.7. Ensaio enzimático com a enzima TcTS	132
4.8. Ensaio de atividade biológica	142
4.9. Estudos de modelagem molecular	153
5. CONCLUSÕES	166
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
7. ANEXOS	186

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

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

Parasitoses como a malária, leishmaniose e a doença de Chagas são ameaças para metade da população mundial, constituindo um dos assuntos mais importantes de saúde pública em regiões tropicais e sub-tropicais. A doença de Chagas ou tripanosomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das endemias mais graves que afetam as Américas do Sul e Central, região do México e sul dos Estados Unidos (LINARES et al., 2006; RENSLO et al., 2006). Existem cerca de 10-12 milhões de pessoas infectadas, das quais cerca de 5-6 milhões vivem no Brasil (GASCÓN et al., 2007), e 100 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquiri-la, principalmente em nosso continente (WHO 2006). Atualmente, 2 a 3 milhões de indivíduos apresentam sintomas clínicos que caracterizam o estágio crônico da doença e 45.000 morrem a cada ano (PAULINO et al., 2005; DARDONVILLE, et al., 2005)

T. cruzi é um protozoário flagelado, da família Tripanosomatidae, caracterizado pela presença de flagelo e mitocôndria modificada, rica em DNA, a qual está situada no cinetoplasto. *T. cruzi* não apresenta uma população homogênea, sendo formado por uma associação de cepas, com características biológicas, imunológicas, bioquímicas e farmacológicas distintas (COURA; DE CASTRO, 2002).

O parasita *T. cruzi* existe em 4 formas morfollogicamente e biologicamente distintas durante o seu ciclo de desenvolvimento em mamíferos e insetos (COURA; DE CASTRO, 2002), podendo ser encontrado nas formas tripomastigota (a), amastigota (b), epimastigota (c) e tripomastigota metacíclica (d) (Figura 1).

Figura 1. Diferentes formas do *Trypanosoma cruzi*: (a) Tripomastigotas sanguíneas, (b) Amastigotas, (c) Epimastigotas, (d) Tripomastigotas metacíclicas

A forma tripomastigota metacíclica, proveniente do inseto vetor, flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade diversas células para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Após invasão, o parasita se diferencia na forma amastigota, aflagelada, que se prolifera por fissão binária e, eventualmente, se rediferencia na forma tripomastigota, destruindo as células e alcançando novamente a corrente circulatória. As formas tripomastigotas podem invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas pelo inseto. Neste último caso, são convertidas à forma epimastigota não infecciosa, completando o ciclo de vida entre o parasita e o vetor (Figura 2) (URBINA et al., 2003).

A transição das formas tripomastigotas para amastigotas pode ser estimulada, extracelularmente, por simulação do ambiente de baixo pH do compartimento fagossomal/lisossomal que *T. cruzi* inicialmente encontra após sua entrada na célula. Além do mais, a transição para a forma amastigota também parece estar acompanhada por uma dramática mudança de fonte de energia para o seu metabolismo (carboidrato para lipídio), o que pode ser demonstrado pela ausência de transportadores para glicose e detecção de enzimas que oxidam ácidos graxos para fornecer acetilcoenzima-A (acetil-CoA). As enzimas do ciclo do ácido cítrico, que oxidam acetil-CoA para a formação de dióxido de carbono e água, são também abundantes nas formas amastigotas (ATWOOD et al., 2005) (Figura 3).

A transformação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas é acompanhada pela produção de elevado número de enzimas e substratos-chave, importantes para o mecanismo antioxidante de defesa do parasita, tais como as enzimas tripanotiona sintase e ferro superóxido desmutase, responsáveis pela síntese de tripanotiona e pela conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, respectivamente. Estas mudanças

são consistentes com a pré-adaptação das formas metacíclicas frente à eclosão do potencial respiratório das células fagocíticas no hospedeiro mamífero. Outras diferenças são em relação à MASP (proteínas de superfície associadas à mucina) e eEF1A (fator de alongamento eucariótico 1- α) também encontradas nas diferentes fases do ciclo de vida de *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005) (Figura 3).

Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma. cruzi*, mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (formas amastigota e tripomastigota) e inseto vetor (formas epimastigota e tripomastigota metacíclica), <http://who.ch>

Figura 3. Principais alterações bioquímicas de cada fase do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. *eEF1A: fator de alongamento eucariótico 1- α ; MASP: proteínas de superfície associadas à mucina. Fonte: ATWOOD et al., 2005

A transmissão de *T. cruzi* para humanos e outros mamíferos se dá por diferentes mecanismos (MUELAS-SERRANO, et al., 2002; TARTAROTTI et al., 2004):

a) Transmissão pelo inseto vetor (*Triatoma infestans*): ocorre através das fezes infectadas do inseto, durante o repasto sanguíneo. É considerado o principal mecanismo de transmissão, sendo responsável por cerca de 80% de toda a transmissão de *T. cruzi* para humanos;

b) Transmissão por transfusão sanguínea: considerado o segundo mais importante mecanismo de transmissão, sendo responsável por cerca de 12 a 25% de toda a transmissão;

c) Transmissão congênita: embora apresente um número menor de incidência (1 a 11%, é considerado o terceiro mais importante mecanismo de transmissão. Tais casos não podem receber um tratamento preventivo, devido à ação tóxica e teratogênica dos fármacos utilizados.

d) Transmissão por via oral: ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, tais como cana-de-açúcar, banana, milho e feijão. Na região amazônica, há relatos indicando que indivíduos infectaram-se ingerindo suco de açaí.

A doença de Chagas no homem apresenta um quadro clínico bastante variado. Após a contaminação, há uma curta fase aguda caracterizada por elevada parasitemia, porém por sintomas brandos e inespecíficos que dificultam o diagnóstico clínico. O parasita é capaz de se multiplicar no interior de vários tipos celulares do hospedeiro, como macrófagos, células

do músculo liso ou estriado, fibroblastos e até mesmo neurônios. Durante a fase aguda, pode ocorrer uma inflamação mononuclear local devido à ruptura das células parasitadas, podendo-se detectar a presença de complexos imunes no soro do paciente. A infecção prossegue, então para uma fase crônica, na qual a parasitemia é baixa e os sintomas são imprevisíveis, indo desde a ausência dos mesmos a graves complicações cardiovasculares e gastrointestinais. A patologia cardiovascular caracteriza-se por miocardite crônica que, frequentemente, leva a cardiomegalia, arritmias cardíacas e insuficiência cardíaca congestiva. No trato digestivo, pode ocorrer dilatação do esôfago e do cólon (megaesôfago e megacólon), e histologicamente, observa-se um infiltrado linfocitário tanto no coração como no trato digestivo, havendo perda de células do miocárdio e degeneração neuronal no esôfago e cólon (COURA; DE CASTRO, 2002; MUELAS-SERRANO, et al., 2002; REN et al., 2003).

1.1.2. Resposta imune

A imunidade inata é a primeira linha de defesa capaz de proteger o hospedeiro da invasão de microorganismos, limitando a infecção e desencadeando sinais necessários ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa. A produção de citocinas é uma característica essencial de defesa do hospedeiro nos primeiros estágios da doença; a resistência desenvolvida pelo hospedeiro contra o parasita é dependente da síntese de citocinas inflamatórias, especialmente IL-12, as quais desencadeiam a produção de IFN- γ por células NK ou células T, e de fator de necrose tumoral (TNF- α). Estas citocinas, por sua vez, podem ativar macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), o qual representa a principal molécula capaz de controlar a replicação parasitária intracelular (TALVANI et al., 2002).

Em células de mamíferos, a família de receptores do tipo “Toll-Like” (TLR) é um importante grupo de receptores através do qual o sistema de imunidade inata reconhece microorganismos invasores (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Os receptores TLRs são cruciais em muitos aspectos da eliminação de patógenos, incluindo recrutamento de células fagocíticas ao tecido infectado, e subsequente morte dos microorganismos invasores. TLRs expressos em macrófagos e células dendríticas (DCs) também exercem uma função na formação da imunidade adquirida. No entanto, quando ativados em excesso esses receptores podem mediar uma patologia da doença, como no caso de choque séptico induzido por infecção por bactérias Gram-negativas.

Dentre os agonistas de receptores TLRs presentes em diferentes formas do *T. cruzi* estão as moléculas de mucina ligadas à membrana parasitária por uma âncora de GPI

(glicosilfosfatidilinositol), as quais podem também ser referidas pelo termo “PAMP” (padrão molecular associado a patógenos) (GAZZINELLI; DENKERS, 2006). Estas moléculas de mucina de âncora GPI são capazes de interagir com receptores “Toll-Like” (TLR2-6) na superfície de macrófagos, desencadeando uma ativação das vias de sinalização do fator nuclear NF- κ B, que por sua vez induzem a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF- α , IFN- γ e NO, e de genes que controlam a replicação parasitária. É estabelecido que TLR2 funciona como um heterodímero com TLR1 ou TLR6, e dados indicam que o complexo de TLR2-TLR6 e o antígeno CD14, fortemente expressado em macrófagos e monócitos, estão envolvidos no reconhecimento de moléculas parasitárias (GAZZINELLI; DENKERS, 2006; ROBERT et al., 2002) (Figura 4).

Figura 4. Ativação de receptores “Toll-Like” por moléculas de mucina de âncora GPI (“PAMP”) de *T. cruzi*. Fonte: GAZZINELLI; DENKERS, 2006

As formas tripomastigota metacíclica e epimastigota também possuem mucinas do tipo GPI, mas diferentemente das anteriores, não são capazes de estimular uma resposta inflamatória. Estas observações estão, provavelmente, relacionadas a diferentes estruturas de GPI que, conseqüentemente, conduzem a respostas imunológicas distintas. A maioria dos

pacientes produz uma resposta imune significativa (predominantemente IgG e IgM) contra mucina da forma tripomastigota; os anticorpos liberados nesta fase são capazes de reconhecer a unidade dissacarídica Gal- α -(1,3)-Gal encontrada nestas moléculas de mucina (GAZZINELLI, 1997).

1.1.3. Tratamento da Doença de Chagas

Desde a descoberta da doença, há mais de 90 anos, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem se obter, entretanto, uma quimioterapia eficaz (MAYA et al., 2001). O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico Benznidazol (Bnz, *N*-benzyl-2-(2-nitroimidazole)acetamide), com o nome comercial Rochagan[®]. O fármaco Nifurtimox (Nfx, 4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dióxido), com o nome comercial Lampit[®], foi também utilizado no tratamento por muito tempo, mas teve sua produção descontinuada em 1991 devido à sua baixa eficiência e alto grau de toxicidade (Figura 5) (CERECETTO; GONZALEZ, 2002).

Figura 5. Estruturas químicas dos fármacos Benznidazol e Nifurtimox

O mecanismo de ação dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol não está completamente elucidado, mas parece envolver a redução dos derivados nitroarílicos a ânions radiculares do grupo nitro, capazes de reagir com o oxigênio para regenerar o grupo nitroarila e liberar o ânion radicalar superóxido, conforme demonstrado na Figura 6. A redução do ânion radicalar superóxido leva à formação de peróxido de hidrogênio e este sofre clivagem homolítica, gerando radical hidróxido. O ânion radicalar superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidróxido são espécies de oxigênio reativas, as quais estão envolvidas no dano de componentes críticos celulares do parasita (WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Figura 6. Formação de espécies de oxigênio reativas a partir de compostos nitroarílicos

Ambos os fármacos, empregados na fase aguda da doença, são ativos contra as formas tripomastigota e amastigota do parasita, mas a sua eficácia varia de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência de variação de cepas do parasita. O uso desses medicamentos deve ser contínuo e, freqüentemente apresentam baixa eficácia e fortes efeitos colaterais, sendo capazes de curar no mínimo 50% das infecções recentes, como demonstrado pelo desaparecimento de sintomas e diminuição da parasitemia e sorologia. Os efeitos colaterais mais freqüentes decorrentes do tratamento com Nifurtimox são anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas, tais como náusea, vômito e ocasionalmente cólica intestinal e diarreia. Algumas das reações adversas ao tratamento com Benznidazol consistem em sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupção cutânea, dores musculares, depressão de medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose (MUELAS-SERRANO, et al., 2002). Por outro lado, não existe um tratamento eficaz para a fase crônica da doença, responsável pelos danos irreversíveis causados em diversos órgãos (MAYA et al., 2001).

A utilização de agente profilático tornou-se uma solução desejável, devido à alta incidência de sangue contaminado em bancos de sangue (5 a 20%), sendo esse mecanismo considerado como o segundo mais importante meio de transmissão em áreas endêmicas (MUELAS-SERRANO, et al., 2002). O único agente quimioprofilático disponível para eliminação do parasita no sangue é violeta de genciana (cloreto de N-[4-bis-[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]N-metilamônio) (Figura 7). Em áreas urbanas, onde o contágio ocorre, principalmente, através de transfusões, o controle pode ser realizado através do exame sorológico de doadores ou simplesmente através da adição de violeta genciana, na concentração de 250µg/mL no sangue estocado, o que resulta em 100% de eliminação das formas infectantes (DARDONVILLE, et al., 2005). Porém, seu uso é limitado devido aos efeitos colaterais e pela coloração púrpura transferida à pele e às mucosas dos

pacientes que recebem transfusão de sangue, o que pode ser confundido com hipóxia naqueles que estão submetidos a processos anestésicos.

VIOLETA DE GENCIANA

Figura 7. Violeta de Genciana: fármaco quimioprolático utilizado em bancos de sangue

Os dados citados demonstram a necessidade de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mais eficazes e seguros, fundamental para o tratamento da doença de Chagas, principalmente para aplicação nos últimos estágios da doença. Adicionalmente, deve ser priorizado novo tratamento da doença na fase aguda, em substituição aos fármacos atualmente disponíveis, freqüentemente ineficazes e fracamente tolerados (LINARES et al., 2006).

1.1.4. Descoberta de novos fármacos

A descoberta de novos fármacos tem como base a investigação e elucidação de novos alvos moleculares, o que depende, em grande proporção, da interpretação de informações contidas no genoma de *T. cruzi*. O seqüenciamento do genoma do parasita tem conduzido a um maior entendimento da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasita-hospedeiro e patologia da doença (WHO, 2005).

O seqüenciamento concluído recentemente mostra que mais de 50% do genoma do *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener) é constituído por seqüências repetidas (EL-SAYED et al., 2005). Estas seqüências incluem genes para uma grande família de moléculas de superfície, incluindo *trans*-sialidases, proteases gp63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs). Na superfície celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* são expressos vários grupos de proteínas, sendo que as moléculas de mucina e a enzima *trans*-sialidase (TS) (FRASCH, 2000) fazem parte do grupo melhor caracterizado; as 223 unidades protéicas de

TS detectadas no genoma são produtos de 15 genes capazes de codificar para a enzima ativa TS. Além das famílias de TS e mucina, o genoma de *T. cruzi* contém várias outras cópias de famílias de multigenes, sendo detectada a expressão de várias proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs). A descoberta desta família de genes foi realizada como parte de um esforço de sequenciamento e anotação, predominantemente no proteoma de tripomastigotas. Assim como as proteínas de outras famílias de multigenes de *T. cruzi*, muitos membros da família MASP têm predito seqüências de sinais e sítios adicionais de âncora de glicosilfosfatidilinositol, e portanto, são consideradas como sendo expressas em superfície.

A análise do proteoma dos 4 estágios do ciclo de vida do parasita *T. cruzi*, realizada recentemente, conduziu à identificação de 5.720 peptídeos correspondentes a 1168 grupos de proteínas, contendo 2784 proteínas totais (ATWOOD et al., 2005). A vantagem de se agrupar isoformas de proteínas é particularmente importante para *T. cruzi*, pois o genoma contém múltiplas cópias diferentes de muitos genes, incluindo um elevado número de famílias de genes com centenas de membros distintos. Além do mais, a cepa de *T. cruzi* CL Brener usada para o projeto de sequenciamento é um híbrido de dois genótipos e, portanto, tem múltiplos alelos distintos para a maioria dos genes. Aproximadamente 30% (838 de 2784) das proteínas identificadas, incluindo a maior parte das proteínas previamente documentadas ou esperadas para serem produzidas em abundância, foram detectadas em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, e de um total de 2784 proteínas identificadas na análise realizada, 1008 são provenientes de genes anotados como hipotéticos, sendo que dentre estes genes hipotéticos, um grande número apresenta genes ortólogos no genoma *Leishmania major* e *T. brucei*.

A análise do proteoma de *T. cruzi* revela a existência de várias vias estágio-específicas desconhecidas que poderiam atuar como alvos para a intervenção de potenciais fármacos e, adicionalmente, a identificação de proteínas presentes em abundância nas formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* representa um recurso substancial para o desenvolvimento de fármacos e vacinas.

A identificação de processos bioquímicos únicos e preferenciais do parasita e a caracterização de antígenos de superfície têm contribuído enormemente no planejamento racional de novos fármacos. Atualmente, diversos alvos já foram identificados e têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos tripanocidas. Entre eles, destacam-se as enzimas:

Tripanotiona 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 GPI para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.

C₁₄D^{24,25}-esterol metiltransferase (STTOPANI, 1999), essencial na biossíntese de ergosterol.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (PAVÃO et al., 2002), presente na via glicolítica.

Cisteína proteases (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 topoisomerases 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.

Além das enzimas citadas, a busca de novos agentes tripanocidas de origem vegetal, tais como derivados de hidroquinonas, naftoquinonas (DE CASTRO et al., 1994), monoterpenos, sesquiterpenos (ARAYA et al., 2003), triterpenos, flavonóides, alcalóides (COURA; DE CASTRO, 2002) e lignanas (LOPES et al., 1998) é de grande importância. As características estruturais sugerem que a atividade tripanocida da maioria dos produtos naturais é devida à interferência no equilíbrio redox do parasita, agindo na cadeia respiratória ou nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo (SEPÚLVEDA-BOZA; CASSELS, 1996).

1.2. Invasão celular pelo parasita e moléculas de mucina

O parasita intracelular *T. cruzi* desenvolve uma enzima regulatória de superfície, denominada *trans*-sialidase, envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita, etapa inicial chave no processo de infecção (PREVIATO et al., 1995). Ácido siálico, presente em glicoconjugados das células do hospedeiro (COREY et al., 2002), desempenha um papel fundamental durante a invasão celular. *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e através

desta enzima o parasita torna-se capaz de transferi-lo de glicoconjugados do hospedeiro e incorporá-lo a moléculas de mucina da forma tripomastigota ligadas à membrana parasitária através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (PEREIRA et al, 2000) (Figura 8).

Figura 8. Representação das etapas de invasão da forma tripomastigota de *T. cruzi* à célula do hospedeiro; a transferência de ácido siálico do hospedeiro ao parasita é indicada por setas

Em 1975, Alves e Colli (1975) inicialmente descreveram as moléculas de mucina de *T. cruzi* (TcMUC) como glicoproteínas presentes nos diversos estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. As glicoproteínas de mucina são moléculas polianiónicas altamente glicosiladas, contendo cerca de 60% de carboidratos, e constituem uma barreira protetora na superfície parasitária (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). Essas moléculas são fundamentais para o desenvolvimento do parasita e crescimento no inseto vetor, tendo em vista que são capazes de resistir à ação de enzimas digestivas, além de estarem envolvidas no processo de reconhecimento e invasão celular.

A clonagem de um gene pequeno e incomum (TcMUC), capaz de codificar um glicopeptídeo do tipo mucina de *T. cruzi* permitiu a identificação de uma sequência de 167 aminoácidos com características de organismos desenvolvidos, contendo cinco unidades consecutivas e repetidas de 11 aminoácidos, principalmente relacionados à treonina (FRASCH et al, 1998; DI NOIA et al., 1996). As glicoproteínas de mucina são moléculas multigalactosiladas, cujas unidades de galactose encontram-se ligadas, através de unidades de

α GlcNAc, à cadeia peptídica com seqüência rica em aminoácidos de Thr e Pro, como Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Lys-Pro-Pro (Thr₈LysPro₂) (AGRELLOS, et al., 2003; PREVIATO et al., 1995). As moléculas de mucina sialiladas, insensíveis 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 (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva Thr₈LysPro₂

Figura 10. Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi*ceptoras de ácido siálico

As moléculas de mucina de *T. cruzi* assemelham-se às de mamíferos, embora as unidades oligossacarídicas estejam ligadas à cadeia peptídica pela unidade de α -*N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e não *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), como ocorre nos vertebrados (DI NOIA et al., 1996). A maior parte dos resíduos de galactose de mucina de *T. cruzi* estão presentes como unidades de β -galactopiranosose (Galp), ligadas de forma linear ou ramificada às posições 4 e 6 de GlcNAc (Figura 11), porém, em algumas cepas uma unidade de β -galactofuranose (Galf) pode também estar ligada à posição 4 de GlcNAc (SERRANO et al., 2001). Nas cepas Y e CL, com maior grau de infectividade, as unidades de galactose de mucina estão presentes somente como piranose (SALTO et al., 2000; POLLEVICK et al., 2000; GALLO-RODRIGUEZ et al., 2002), enquanto nas cepas G as moléculas de mucina contém o resíduo β -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc (Figura 12) (PREVIATO et al., 1994).

Figura 11. Moléculas de mucina de *T. cruzi*: ligação de unidades β -Galp às posições 4 e 6 de GlcNAc

Figura 12. Estruturas de oligossacarídeos *O*-ligados de moléculas de mucina de diferentes cepas de *T. cruzi*

As glicoproteínas de mucina das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* possuem resíduos terminais de α -galactose, além de β -galactose, os quais funcionam como epítomos, sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti- α -Gal. Desta forma, a sialilação das moléculas de mucina pela ação da enzima *trans*-sialidase protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente mediante à ação de anticorpos líticos anti- α -Gal e contribui, assim, pelo tropismo tecidual mostrado pelo parasita (Figura 13) (PEREIRA et al., 2000).

Figura 13. Proteção das formas tripomastigotas de *T. cruzi* contra anticorpos líticos anti- α -Gal devido ao processo de sialilação. Fonte: PEREIRA et al., 2000

1.3. Ácido siálico e *trans*-sialidase

1.3.1. Ácido siálico

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destacam-se os ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos que ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos. Estes tipos diferem entre si por variações do grau de substituição e oxidação no esqueleto carbônico e têm como molécula precursora a *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc) (ANGATA et al., 2002). Este precursor é biossintetizado a partir de UDP-*N*-acetil-D-glicosamina, uma molécula obtida em meio intracelular ou a partir da *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), com participação da enzima *N*-acetil-D-glicosamina-2-epimerase (MARU et al., 1996). O ácido siálico mais abundante existente em eucariotos é o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu-5-Ac), que foi isolado pela primeira vez por Gottschalk e colaboradores (Figura 14) (DE NINNO, 1991). Outros derivados comuns, porém encontrados em menor quantidade, são ácido *N*-glicosilneuramínico (Neu-5-Gl) e 5-hidroxineuramínico. A maioria dos glicoconjugados de superfície apresenta cadeias oligossacarídicas terminais, que conferem carga negativa. Uma grande variedade de carboidratos pode ser observada nestas superfícies devido à adição de ácido siálico; estas moléculas estão reconhecidamente envolvidas no controle das interações celulares.

Figura 14. Estruturas unidimensional e tridimensional de ácido siálico

1.3.2. *trans*-Sialidase

Apesar da semelhança estrutural com neuraminidases bacterianas, a enzima *trans*-sialidase de *T.cruzi* se comporta como uma sialiltransferase, altamente eficiente. O desenvolvimento do parasita está diretamente relacionado à atividade enzimática na forma tripomastigota, quando *trans*-sialidase possui alta atividade, enquanto na amastigota apresenta-se praticamente inativa.

trans-Sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariontes (FRASCH et al., 1994). *trans*-Sialidase não pode utilizar ácido siálico livre, apenas transfere o carboidrato do hospedeiro para o parasita no sentido de controlar o nível de infecção. Após a invasão celular, ocorre a formação de fagossomo capaz de encapsular o parasita. Porém, em alguns minutos o parasita se liberta destes mecanismos e acredita-se que a enzima *trans*-sialidase é que facilita o escape, devido ao rompimento da membrana do fagossomo. Células que contêm *trans*-sialidase provocam o aparecimento de cavidades na superfície destes fagossomos, em pH abaixo de 6, facilitando o rompimento.

A enzima *trans*-sialidase é um membro da superfamília das sialidases, sendo classificada como uma *trans*-glicosidase (BUSCHIAZZO et al., 2002). As enzimas glicosidases catalisam a hidrólise da ligação glicosídica, com ataque nucleofílico da água ao carbono anomérico do monossacarídeo doador e conseqüente deslocamento de seu grupo abandonador. No entanto, sob condições controladas também podem catalisar a formação de ligações glicosídicas, com transferência de um resíduo de açúcar (doador) para uma unidade aceptora, sendo neste caso referidas como *trans*-glicosidases. A utilização de altas concentrações de glicosídeos doadores e aceptores, bem como o aumento da temperatura e redução do tempo de reação, favorecem a reação de transglicosilação (OSBORN, 2003). Alguns exemplos de enzimas que podem atuar como *trans*-glicosidases são: α -glicosidases, representadas pelas enzimas intestinais α -amilase, sacarase e maltase (MELO; CARVALHO, 2006); β -glicanases, dentre elas xilanase e endoglucanase (KLYOSOV et al., 1996); β -galactosidase (SILIGIANI et al., 2007) e α -fucosidases (NAGAE et al., 2007).

trans-Sialidase é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico à moléculas de mucina, originando ligações α -2,3 com moléculas de β -galactose aceptoras na superfície do parasita (RIBEIRÃO et al., 1997). Apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica (BUSCHIAZZO et al., 2002) (Esquema 1).

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

Portanto, TcTS é uma *trans*-glicosidase na presença de substratos adequados de aceptores de açúcar, como β -galactose terminal de glicoconjugados. A reação de transferência catalisada por *trans*-sialidase (PARODI et al., 1992; FERRERO-GARCIA et al., 1993) é diferente daquela observada por sialiltransferases de mamíferos (EC 2.4.99.X); TcTS age com retenção de configuração do açúcar e não requer açúcares ligados a nucleotídeos (CMP-*N*-acetil-neuraminato) como doadores de monossacarídeo.

1.3.2.1. Clonagem, expressão gênica e estrutura 3D de *trans*-Sialidase

A clonagem do gene de *trans*-sialidase foi realizada por Schenkman e col. (SCHENKMAN et al., 1996). A enzima possui dois domínios distintos: um domínio catalítico-propulsor *N*-terminal (resíduos 1-371), estritamente associado, através de uma longa α hélice (resíduos 372-394), ao domínio *C*-terminal de lectina (resíduos 395-632) (BUSCHIAZZO et al., 2002). A estrutura de *trans*-sialidase de *T.cruzi* é muito semelhante às neuraminidasas bacterianas. Especificamente, há informação sobre os aminoácidos que compõem o domínio enzimático na porção *N*-terminal e o domínio antigênico, onde se observa o antígeno de fase aguda (SAPA) *C*-terminal, com 12 unidades repetidas de aminoácidos em “tandem” (DSSAHSTPSTPA), não necessário para a atividade enzimática (SCHENKMAN et al., 1994).

A estrutura de *trans*-sialidase de *T.cruzi* (TcTS) foi recentemente determinada a uma resolução de 1.6 Å (AMAYA et al., 2003) e sua estrutura cristalográfica está disponível no “PDB” (Banco de Dados de Proteínas). Através do PDB, é possível ter acesso a vários complexos cristalográficos existentes entre a enzima TcTS e diferentes inibidores. A Figura 15 mostra as estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA (2-desoxi-2,3-

dehidro-*N*-acetil-ácido neurâmico), análogo de ácido siálico, e o complexo cristalográfico, obtido do PDB (código 1 MS8), deste inibidor com a enzima TcTS.

Figura 15. Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS – DANA

A arquitetura molecular do sítio ativo de *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) possui várias características comuns a outras sialidases microbianas: uma tríade de aminoácidos Arg (Arg35, Arg245 e Arg314) que liga-se ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico, um ácido glutâmico (Glu357) que estabiliza Arg35, 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 reacionais. Também conservado em sialidases, um sítio hidrofóbico que liga-se ao grupo *N*-acetil da molécula de ácido siálico é encontrado em TcTS, e é definido pelos resíduos de cadeias laterais de Val95, Leu176, e Trp120. Desta forma, TcTS desempenha uma elevada atividade enzimática transglicosidase. As principais funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS, fundamentais para o processo de transglicosilação estão resumidas na Tabela 1, e as interações existentes entre estes aminoácidos e o inibidor DANA, análogo de ácido siálico, estão elucidadas na Figura 16.

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

Principais aminoácidos presentes no sítio catalítico de TcTS	Funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS no processo de transglicosilação
Triade 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 <i>N</i> -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 transglicosilação. 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. Interage com molécula de glicerol.

Figura 16. Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB

Com relação ao domínio de lectina da enzima TcTS, separado do sítio ativo por uma distância de aproximadamente 30Å, foi sugerido que este pode atuar favorecendo a ligação ao substrato aceptor (mucina), contribuindo para a estabilização da enzima durante a reação de transglicosilação (GASKELL et al., 1995).

1.3.2.2. Mecanismo de ação da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

A maneira pela qual a enzima TcTS transfere ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas de galactose, constituintes de glicoproteínas presentes na membrana plasmática do parasita, é mostrado esquematicamente na Figura 17.

Figura 17. Modelo de reconhecimento de mucina e sialilação por *trans*-sialidase

De acordo com Buschiazzi et al. (2002), o mecanismo reacional de transglicosilação realizado por TcTS está diretamente relacionado à flexibilidade do sítio ativo de TcTS. De acordo com estruturas cristalográficas, o grupo 3-OH da molécula aceptora de galactose (unidade que se liga ao ácido siálico) está adequadamente posicionado para interagir com o resíduo catalítico Asp59 e com o carbono anomérico do ácido siálico da molécula doadora, de modo a realizar um ataque nucleofílico (CAMPO et al., 2006). A precisa localização da molécula de galactose aceptora, posicionada paralelamente à cadeia lateral aromática de Trp312 também é crítica para a reação de transferência, vindo a explicar o motivo pelo qual mutações dos aminoácidos Trp312-Ala ou Pro283-Gln, aboliram completamente a atividade de transglicosilação de TcTS. A enzima livre, incapaz de se ligar ao substrato, é inicialmente encontrada em estado inativo, devido à ausência de ligações de hidrogênio entre os resíduos Tyr342 e Glu230. A ligação do substrato doador (sialoconjugado) estimula uma mudança conformacional do sítio ativo, desencadeando dois importantes eventos: cria condições para a ligação do açúcar aceptor (galactose), envolvendo a reorientação da cadeia lateral de Tyr 119, e ativa a enzima através de um reposicionamento de Tyr342/ Leu36. A implicação funcional

de Tyr119 é uma característica fundamental de estímulo para a ligação da enzima ao substrato acceptor. Além do mais, o mecanismo de ativação envolvendo a posição relativa de Tyr342/Glu230 dificulta a entrada de moléculas de água, evitando a hidrólise. Este evento permite que o substrato acceptor esteja adequadamente posicionado antes que o mecanismo de transglicosilação aconteça. Deste modo, o grupo 3-OH do acceptor galactose substitui a água como agente nucleofílico para o ataque ao carbono anomérico da molécula de ácido siálico.

O inibidor DANA é análogo de ácido siálico; assim sendo, sua ligação ao sítio ativo de TcTS se faz de maneira equivalente ao ácido siálico. Através da observação da Figura 18 é possível visualizar as posições de DANA e galactose, no sítio catalítico de TcTS. Nesta figura também estão elucidadas as duas conformações assumidas pelos resíduos envolvidos na ligação ao substrato (Tyr119) e ativação enzimática (Tyr342). O resíduo Tyr119 fornece uma ligação estrutural direta entre o substrato doador, DANA, e a molécula acceptora de galactose, sendo capaz de estabelecer ligação de hidrogênio com o grupo glicerol do ligante. O resíduo Tyr342, juntamente com o resíduo Glu230, estão localizados na posição inferior do sítio catalítico; ambos são responsáveis pela flexibilidade do sítio ativo e estão posicionados para estabilizar o estado de transição reacional.

Figura 18. Posições de DANA e lactose no sítio catalítico de TcTS e as duas conformações assumidas pelos resíduos envolvidos na ligação ao substrato (Tyr 119) e ativação enzimática (Tyr 342). Em transparente é mostrada a posição de Tyr 119 na enzima não ligada. Fonte: BUSCHIAZZO et al., 2002.

O mecanismo de ação de TcTS pode ser melhor elucidado com base em complexos de TcTS com diferentes substratos doadores (complexos de Michaelis) (AMAYA et al., 2004), o substrato natural $\alpha(2,3)$ -sialil-lactose (SL) e o substrato sintético ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (4MU-NANA), mostrados na Figura 19, além de complexos envolvendo o inibidor DANA, descrito anteriormente.

Figura 19. Estruturas cristalográficas dos complexos enzima-substrato **(A)**. TcTS-sialil-lactose (código PDB 1SOI). **(B)**. TcTS-MuNANA (código PDB 1SOJ)

As moléculas de sialilactose e metilumbeliferil ocupam o mesmo sítio de ligação nos complexos de Michaelis, em cada caso realizando interações do tipo empilhamento π (“stacking interactions”) com os resíduos Trp312 e Tyr119. A observação de que a molécula doadora ocupa o mesmo sítio de ligação da molécula aceptora de lactose no complexo ternário de TcTS-lactose-DANA apresentado por Buschiazzo et al. (2002) dá suporte ao mecanismo de duplo deslocamento conhecido como “ping-pong”, segundo o qual substratos doadores e aceptores devem ligar-se, separadamente, ao mesmo sítio (AMAYA et al., 2004; WATTS et al., 2003). Além do mais, elementos estruturais mostram que o resíduo de ácido siálico parece estar “fixo” em posições opostas, considerando que os grupos carboxilato e acetamido permanecem nas mesmas posições nos complexos de TcTS-sialil-lactose e TcTS-DANA (AMAYA et al., 2004). Conseqüentemente, com as duas extremidades fixas em posição determinada, o carbono anomérico C2 do ácido siálico é capaz de migrar em direção ao resíduo de Tyr342, passando, então, por diferentes conformações conforme mostrado no Esquema 2. Esta observação confirma o papel do resíduo de Tyr342 como um nucleófilo catalítico durante a reação de *trans*-sialilação.

Esquema 2. Representação do possível mecanismo envolvido na reação de *trans*-sialilação

1.3.2.3. Especificidade de substrato de *trans*-sialidase

A especificidade de substrato da enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* tem sido bastante investigada (FERRERO-GARCIA et al., 1993; SCUDDER et al., 1993). O requisito essencial para moléculas doadoras de ácido siálico é a presença da unidade sialil α -2,3-ligada a resíduos de β -galactose em glicoproteínas, glicolípídeos e oligossacarídeos. Ao contrário, moléculas contendo unidades sialil α -2,6-, α -2,8- e α -2,9-ligadas a β -galactose são doadores ineficientes (SCHENKMAN et al., 1994). A enzima TcTS não transfere ácido siálico livre, mas pode utilizar ácido siálico que esteja ligado a moléculas que não sejam carboidratos, como por exemplo, ácido 4-metilumbeliferil-*N*-acetil-neuramínico (MU- α Neu5Ac) e *p*-nitrofenil-*N*-acetil-neurâmico (PNP- α Neu5Ac). Unidades terminais de β -galactose são os aceptores ideais, sendo o ácido siálico sempre transferido para formar ligações do tipo α -2,3. Substituições, tais como adição de resíduos de fucose à unidade terminal de galactose ou a outras unidades de açúcar adjacentes, bem como a presença de resíduos terminais de α -Gal, Glc, GlcN, GalN, GlcNAc, GalNAc e Man, impedem a reação de transferência (VANDEKERCKHOVE et al., 1992). A maior parte das substituições no próprio ácido siálico apresenta pouca interferência na reação de transferência, exceto a epimerização dos grupos hidroxílicos dos carbonos C-4 e C-8, as quais transformam o dissacarídeo em um inibidor da reação (SCHENKMAN et al., 1994). Especificidades similares foram observadas para sialidasas de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rangeli* (PONTES-DE-CARVALHO et al., 1993). No entanto, *trans*-sialidasas de *T. cruzi* e *T. brucei* possuem um pH ótimo entre 6 e 7, enquanto sialidase de *T. rangeli*, como outras sialidasas bacterianas (CORFIELD, 1992), é mais ativa em pH 5. A atividade de transferência e a especificidade da enzima TcTS a distingue de outras sialiltransferases, que utilizam açúcares ligados a nucleotídeos como doadores, e sialil hidrolases (sialidasas ou neuraminidasas).

1.4. Importância biológica de carboidratos e glicoproteínas

A abundância de carboidratos na natureza e suas diversas funções nos sistemas biológicos justificam a importância dos estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas.

Os carboidratos são encontrados como monômeros ou oligômeros, ou ainda como componentes de biopolímeros e de outras substâncias encontradas naturalmente. Na células podem existir em variadas formas, como por exemplo, peptido- e proteoglicanas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, lipopolissacarídeos ou glicolipídeos (SZNAIDMAN, 1999). A maior parte dos carboidratos estão ligados a cadeias laterais de resíduos de asparagina por meio de ligações *N*-glicosídicas ou a cadeias laterais de serina ou treonina através de ligações *O*-glicosídicas. As ligações *O*-glicosídicas com os aminoácidos tirosina e hidroxilisina, bem como ligações *C*-glicosídicas com resíduos de triptofano são menos comumente encontradas.

Inúmeros processos celulares, tais como, reconhecimento e adesão celular, transporte intracelular e intercelular de produtos genéticos, controle de permeabilidade de membrana e reconhecimento molecular, estão diretamente relacionados à natureza de moléculas de carboidratos expressas em superfícies celulares. Determinantes de grupos antigênicos (ABH, etc.), antígenos associados a tumores (Le_x, Le_y, etc.), e sítios de ligação de patógenos são alguns dos relevantes glicoconjugados encontrados em células de mamíferos. A glicosilação de proteínas, tornando-as *O*-ligadas a moléculas de açúcar, facilita a comunicação celular por direcionar a expressão de moléculas de carboidratos no citosol e na superfície celular, sendo essencial para a homeostase celular, balanço hormonal e resposta imune. Anormalidades no processo de glicosilação estão associadas à determinadas doenças, tais como epítomos T e T_n relacionados à fibrose cística e câncer, e com a proteína-t na doença de Alzheimer (SCOTT et al., 2001).

As glicoproteínas ocorrem naturalmente em várias formas (glicoformas), as quais possuem a mesma estrutura peptídica, mas diferem tanto na natureza quanto no sítio de glicosilação (RADEMACHER, 1998). As funções e a versatilidade das glicoproteínas são inúmeras, considerando-se a habilidade que possuem em transmitir importantes informações, além de outras potenciais aplicações. Como por exemplo, as glicoproteínas estão envolvidas em processos fisiológicos que variam, desde a endocitose mediada por receptores, até a interação e invasão de patógenos, com conseqüente liberação de biomoduladores pelo organismo invadido (DAVIS, 2002).

Desta forma, o campo da glicobiologia tem crescido intensamente assim como o interesse pelo desenvolvimento de métodos para a síntese de glicoconjugados. Glicopeptídeos sintéticos (fragmentos de glicoproteínas) são necessários para o estudo de interações de ligação de glicoproteínas, adesão celular e especificidade de ligação a receptores. Recentes progressos nessa área têm sido marcantes; moléculas de carboidratos relativamente complexas têm sido covalentemente ligadas a aminoácidos para incorporação em seqüências de glicopeptídeos, como por exemplo, fragmentos de mucina, fragmentos de receptores de interleucina-8, haptenos de células T-helper, fragmentos de antígenos CD52, e seqüências de fibronectinas oncofetais (SCOTT et al., 2001).

A síntese de glicoconjugados e carboidratos complexos envolve, freqüentemente, a manipulação seletiva de grupos funcionais semelhantes, com emprego de estratégias de proteção/desproteção, que conduzem ao aumento do número de etapas da seqüência sintética. A síntese de oligossacarídeos requer a diferenciação de diversos grupos hidroxílicos com reatividade similar, e obtenção de produtos com régio e estereosseletividade desejadas, uma vez que a cada glicosilação é gerado um novo centro estereogênico. Por esta razão, não existe um sistema automatizado adequado para a síntese de carboidratos, como ocorre para proteínas e ácidos nucleicos (SEEBERGER, 2000).

A metodologia mais eficaz desenvolvida até o momento para a preparação de glicopeptídeos envolve a combinação da síntese de peptídeos em *fase sólida* com o possível acoplamento de blocos de construção, contendo resíduos de aminoácidos previamente ligados a unidades de açúcar, com a glicosilação enzimática. A utilização de enzimas, tais como glicosiltransferases e glicosidases, conduz à formação de ligações glicosídicas de forma estéreo e regioespecífica, sem a necessidade do emprego de grupos protetores como na síntese química tradicional (MELDAL et al., 1994; TOLBORG et al., 2002). Desta forma, torna-se possível a obtenção de oligossacarídeos ou glicoconjugados de interesse biológico, em alto rendimento (KOELLER; WONG, 2000).

1.4.1. Modelagem molecular aplicada ao estudo das interações carboidrato-proteína

As moléculas de carboidratos são mais freqüentemente e especificamente reconhecidas por proteínas denominadas lectinas, sendo que estas interações podem mediar uma resposta biológica específica, tais como interações parasita-hospedeiro, fertilização, doenças auto-imune e diferenciação celular. Desta forma, a investigação de como monossacarídeos ou oligossacarídeos são reconhecidos a nível molecular por sítios de ligação como lectinas, enzimas ou anticorpos é de fundamental relevância (POVEDA; BARBERO, 2005).

Interações de proteína-carboidrato possuem complexa termodinâmica, e, de modo geral, a posição específica de apenas alguns grupos hidroxílicos das moléculas de carboidrato determinam suas afinidades de ligação. Estas interações são relativamente fracas, na ordem de milimolar, se comparadas a determinadas interações proteína-proteína, como antígeno-proteína, que são da ordem de nanomolar (RAMKUMAR et al., 1995). Dados estruturais e termodinâmicos relativos a complexos de proteína-carboidrato são prontamente disponíveis, principalmente a partir de técnicas de espectroscopia de RMN e cristalografia de raio-X. A relativa contribuição de termos entálpicos e entrópicos para a energia livre de formação destes complexos possui grande variação dependendo do tipo de receptor bem como das ligações de diferentes ligantes ao mesmo receptor. Apesar da natureza hidrofílica dos carboidratos, a maior parte dos dados experimentais a partir de complexos de proteína-carboidrato sugerem que interações hidrofóbicas, principalmente entre faces hidrofóbicas das unidades de açúcar com resíduos aromáticos de triptofano e tirosina, são importantes, pois estabilizam estes complexos (LAEDERACH; REILLY, 2005). Outros fatores adicionais relacionados à afinidade de ligação de um determinado complexo proteína-carboidrato são a formação de ligações de hidrogênio intermediadas por moléculas de água, as quais podem estabilizar o complexo, e a inerente flexibilidade da molécula de carboidrato, o que permite sua ligação à proteína em diferentes conformações. Existem, no entanto, complexos nos quais a molécula de carboidrato pode assumir somente uma conformação mais estável, ao menos próximo do sítio de ligação (ALESHIN et al., 1996). Isto possibilita o emprego de abordagens como o *docking* molecular para o estudo das interações proteína-carboidrato.

1.4.2. *Docking* molecular

As técnicas de *docking*, desenvolvidas para encontrar a melhor orientação e conformação de um ligante no seu sítio receptor, vêm sendo há algum tempo empregadas no processo de planejamento e desenvolvimento de fármacos. A etapa de ligação entre um fármaco e o seu alvo macromolecular protéico é um processo complexo por natureza. Fatores entrópicos e entálpicos influenciam, sobremaneira, as interações formadas. A flexibilidade do ligante e da proteína, o efeito do ambiente protéico na distribuição de cargas no ligante e as interações que podem ocorrer com as moléculas de água presentes no meio são aspectos que dificultam ainda mais a descrição detalhada desse processo. A idéia geral contida nas técnicas de *docking* é a de gerar um leque de conformações do complexo ligante-proteína e ordená-las por escore com base em suas estabilidades (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

Uma das características mais valiosas de *docking* é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, como uma forma de validação do método empregado. Para realizar um teste desse nível, um ligante é extraído de seu complexo cristalográfico e submetido a simulações de *docking* com o sítio ligante da proteína. Dessa forma, os modos de ligação gerados nas simulações são comparados com os respectivos modos de ligação obtidos experimentalmente. Outra possibilidade inerente ao método é a capacidade de sua função de escore de ordenar ligantes de acordo com valores experimentais de atividade. Essa correlação é feita através dos valores de escore obtidos nas simulações e os valores experimentais de atividade, como por exemplo IC₅₀ (VERDONK et al., 2003).

De maneira geral, os *softwares* de *docking* são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de escore (VERDONK et al., 2003). O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação, e permite explorar os graus de liberdade translacional e rotacional do ligante, bem como os graus de liberdade conformacional de ambos, ligante e proteína. A função de escore é aplicada para tentar distinguir os modos de ligação mais próximos dos obtidos experimentalmente entre os demais modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, ordenar os diferentes modos de ligação apresentados. As funções de escore podem ser estabelecidas de acordo com campos de força de mecânica molecular, parâmetros empíricos de cálculos de energia livre ou até de acordo com parâmetros denominados *knowledge-based*.

Uma das aplicações dos *softwares* de *docking* ocorre em *screening* virtual de bases de dados, situação em que amplas coleções virtuais de compostos são submetidas às simulações de *docking* em um sítio ligante protéico e os respectivos compostos são ordenados de acordo com a afinidade pelo alvo macromolecular, sugerida pela função de escore (SCHNEIDER; BÖHM, 2002). A abordagem de *screening* virtual contribui bastante no processo de desenvolvimento de fármacos, pois compostos com potencial de interação com o sítio ligante estudado podem ser futuramente investigados com maior precisão, reduzindo drasticamente o tempo de identificação de protótipos quando comparada com as estratégias convencionais.

1.4.2.1. Algoritmo genético e *software* GOLD

O algoritmo genético é constituído por parâmetros de otimização que mimetizam o processo de evolução e seleção natural, onde os indivíduos representam as conformações em determinado espaço conformacional. Este algoritmo realiza uma busca paralela do espaço conformacional ao invés de ponto a ponto como realizam outros métodos. Um conjunto de conformações (cromossomos) que codificam variedades distintas de um sistema é gerado e

este conjunto se recombina, sendo selecionadas as melhores conformações. Em períodos de tempo determinados são produzidas mutações e inversões e os processos de recombinação e seleção continuam até que não exista nenhuma nova conformação de baixa energia dentro de um espaço estabelecido. Os parâmetros de algoritmo genético são especialmente efetivos em moléculas flexíveis com ligações rotacionáveis (GOLDBERG, 1989).

O algoritmo genético é provavelmente o mais aplicado ao *docking* molecular e é implementado no *software* GOLD, descrito por Jones et al. (JONES et al., 1997). Assim como outros programas de *docking*, o GOLD é constituído por três partes principais (VERDONK et al., 2003):

1. Uma função de escore denominada Goldscore para ranquear os diferentes modos de ligação, sendo esta uma função de mecânica molecular;
2. Um mecanismo para o posicionamento do ligante no sítio ativo; o GOLD utiliza um método único para isto, o qual é baseado em pontos de interação (*fitting points*); ele adiciona pontos de interação para grupos capazes de realizar ligações de hidrogênio na proteína e no ligante, e mapeia pontos do acceptor no ligante ou pontos do doador na proteína e vice-versa. Adicionalmente, o GOLD gera pontos de interação hidrofóbica na cavidade da proteína na qual grupos CH do ligante são mapeados;
3. Um algoritmo de busca para explorar os possíveis modos de ligação; GOLD utiliza o algoritmo genético no qual os seguintes parâmetros são modificados/otimizados: a) diedro das ligações rotacionais do ligante; b) geometria dos anéis do ligante; c) diedro dos grupos OH e NH_3^+ e d) mapeamento dos pontos de interação, ou seja, posição do ligante no sítio ativo.

Os parâmetros do algoritmo genético afetam o tempo da simulação de *docking* e a probabilidade de se encontrar uma orientação de mais baixa energia do ponto de vista do complexo. O número de *dockings* e o número de operações de algoritmo genético em cada um destes *dockings* são os principais parâmetros que afetam o tempo da simulação e a exatidão dos resultados.

1.5. Sinalização de proteínas

“Sinalização de Proteínas” não apresenta relação direta com a Doença de Chagas; no entanto, esta seção foi incluída e é bastante relevante, uma vez que mostra e reforça a importância de *O*-glicopeptídeos, contendo unidades de *N*-acetil-glicosamina ligada a treonina ou serina, para estudo dos processos de sinalização e transcrição celular.

A glicosilação de resíduos de serina e treonina em proteínas nucleares e citoplasmáticas por uma unidade de *N*-acetilglicosamina, via ligação β -glicosídica (*O*-GlcNAc), é uma das alterações pós-traducionais que tem merecido destaque em razão das recentes descobertas acerca de sua importância. As consequências funcionais exatas desse processo não são claras, mas investigações recentes têm sugerido diversas funções para essas reações de glicosilação (WELLS et al., 2001).

A alteração por *O*-GlcNAc já foi detectada em proteínas de diversas espécies eucarióticas e de diversos tecidos, entre elas: proteínas do citoesqueleto, proteínas do poro nuclear, proteínas associadas à cromatina, RNA polimerase II e seus fatores de transcrição, supressores tumorais, fosfatases e quinases (ZACHARA et al., 2002).

A presença de fatores de transcrição e de supressores tumorais entre as classes de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc indica seu possível papel na regulação do ciclo celular. Estudos em células embrionárias de ratos em que a adição de *O*-GlcNAc foi bloqueada revelaram que tal modificação pós-traducional é essencial para a viabilidade de células tronco; além disso, o bloqueio da remoção de *O*-GlcNAc de proteínas também é letal (RAHEEL et al., 2000).

Devido às características do processo de *O*-glicosilação, sugeriu-se que esta poderia ser análoga à fosforilação, principal alteração relacionada à transdução de sinais e regulação da função protéica. O mapeamento dos sítios modificados por *O*-GlcNAc revelou que os mesmos são similares àqueles alterados por proteínas quinases (WELLS et al., 2001). A utilização de inibidores de quinases e fosfatases também confirmou a relação entre *O*-GlcNAc e *O*-fosfato: quando células são tratadas com inibidores de fosfatases ou ativadores de quinases, ocorre uma redução dos níveis celulares de *O*-GlcNAc, sendo o contrário também válido; o tratamento de células com inibidores de quinases desencadeia um aumento dos níveis de proteínas *O*-GlcNAc modificadas.

Entre os fatores que sugerem que *O*-GlcNAc seja análoga a fosforilação na regulação celular estão: (i) a reação de adição de *O*-GlcNAc é altamente dinâmica na resposta aos eventos de sinalização celular; (ii) as modificações por *O*-GlcNAc ocorrem em sítios

protéicos similares àqueles modificados por proteínas quinases; e (iii) *O*-GlcNAc é recíproca à fosforilação em proteínas já bastante estudadas como RNA polimerase II, receptor de estrogênio e o produto do proto-oncogene c-Myc (ZACHARA et al., 2002).

Estes dados conduzem a um complexo modelo de regulação de proteínas onde suas diferentes formas modificadas podem existir e uma série de deglicosilação/fosforilação e defosforilação/glicosilação seria necessária para alterar o comportamento de uma proteína. Todos esses aspectos baseiam-se na hipótese “yin-yang”, a qual supõe a existência de uma reciprocidade entre fosforilação e *O*-glicosilação, ou seja, ambas competem pelo mesmo sítio ou região protéica e são mutuamente exclusivas (ZACHARA et al., 2002) (Figura 20). Além do mais, *O*-GlcNAc pode ser importante no reconhecimento de quinase e a fosforilação importante para a atividade de OGT (*O*- β -*N*-acetil-glicosaminiltransferase); este último mecanismo baseia-se em processos de glicosilação e fosforilação em sítios adjacentes.

Figura 20. Modelos de *O*-GlcNAc da hipótese Yin-Yang, capaz de prevenir a fosforilação de proteínas e vice-versa

Vários estudos revelaram possíveis papéis da *O*-glicosilação no controle da função protéica:

- a) Sinalização para transporte nuclear: a adição de carboidratos, inclusive GlcNAc, pode induzir o transporte de proteínas heterólogas para o núcleo, mesmo se as mesmas não possuem seqüências específicas para tal sinalização (DUVERGER et al., 1995).

- b) Interação proteína-proteína: muitas proteínas modificadas por *O*-glicosilação encontram-se relacionadas à reunião e organização do citoesqueleto e na maioria das vezes são parte de complexos multiméricos (ZACHARA et al., 2002).
- c) Regulação da degradação de proteínas: uma das maneiras pela qual uma proteína é rapidamente destinada à degradação proteossômica se dá pela fosforilação de seqüências PEST, regiões enriquecidas em resíduos de Pro (P), Glu (E), Ser (S) e Thr (T). A glicosilação dessas proteínas impede a fosforilação e assim evita que as mesmas sejam degradadas através desse mecanismo (KEARSE; HART, 1991).
- d) Regulação da atividade protéica: a *O*-glicosilação já foi detectada em todos os fatores de transcrição descritos até hoje. No caso do fator de transcrição Sp1, um dos mais estudados, observou-se uma redução de cerca de 3 vezes na ativação transcricional quando os resíduos de treonina e serina glicosilados são bloqueados (YANG et al., 2001).

Alterações na regulação da *O*-glicosilação foram recentemente relacionadas à etiologia do diabetes tipo II, câncer e doenças neurodegenerativas (ZACHARA et al., 2002). Acredita-se que a *O*-glicosilação de proteínas possa ser fundamental para a sinalização envolvida na captação de glicose pelos adipócitos e músculos e na liberação de insulina pelas células β pancreáticas. De fato, já foi relatado que a elevação dos níveis de *O*-GlcNAc em proteínas celulares leva à resistência à insulina, ocorrendo nesse caso tanto o bloqueio da ativação da quinase Akt como da transdução do sinal gerado pela insulina. A elevação dos níveis de *O*-GlcNAc encontrado em pacientes diabéticos sugere tratar-se de uma resposta adaptativa do organismo para melhor lidar com as altas concentrações de glicose, porém, se o nível de glicose não retorna ao normal, esta potencializa as ações de *O*-GlcNAc, levando à morte celular por apoptose e aos efeitos crônicos do diabetes tipo II (SLAWSON; HART, 2003).

O papel da *O*-glicosilação na doença de Alzheimer ainda não foi claramente estabelecido, mas já foi mostrado que o metabolismo glicolítico encontra-se alterado em cérebros nessa condição, estando a captação de glicose diminuída. Várias proteínas do citoesqueleto neuronal são modificadas por *O*-GlcNAc, inclusive as proteínas β -amilóide e Tau. No caso da proteína Tau, a redução dos níveis de *O*-glicosilação conduz à hiperfosforilação da mesma e conseqüente entrelaçamento de neurofilamentos, com perda da função biológica (LIU et al., 2004).

Quanto à relação entre *O*-glicosilação e câncer, estudos sobre o câncer de mama humano revelaram uma queda dos níveis de *O*-GlcNAc nas células tumorais associado ainda a um aumento significativo da atividade da enzima *O*-GlcNAcase, a qual é responsável pelo

processo de deglicosilação. Isso sugere que, conforme a célula passa de normal à maligna, a regulação da *O*-glicosilação é modificada, levando à diminuição dos níveis de *O*-GlcNAc e à multiplicação celular desordenada (SLAWSON et al., 2001). Estas pesquisas ressaltam a importância de *O*-GlcNAc e sua possível atuação no papel de sinalização de proteínas e conseqüente regulação da atividade celular.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é o desenvolvimento de estratégias de síntese de glicopeptídeos de mucina de *T. cruzi* para investigação da natureza das interações moleculares críticas envolvidas no reconhecimento e processamento de glicosídeos contendo ácido siálico, na presença de *trans*-sialidase.

2.1. Objetivos específicos

As metodologias de síntese em fase sólida e síntese químico-enzimática serão aplicadas na preparação de glicopeptídeos, tais como **1**, **2** e **3**, potenciais substratos das enzimas β -1,4-galactosiltransferase (β 1,4-GalT) e *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), e apresentados na Figura 20.

Figura 21. Glicopeptídeos complexos, potenciais substratos das enzimas β 1,4-GalT e TcTS

Os compostos **1** e **3** serão empregados na síntese químico-enzimática dos glicopeptídeos **4** e **5**, utilizando-se a enzima β -1,4-galactosiltransferase (β 1,4-GalT), capaz de transferir resíduos de galactose para unidades terminais de GlcNAc.

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **4**

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **5**

De acordo com a reatividade dos produtos galactosilados **2**, **4** e **5**, será possível investigar as taxas e posições das reações de sialilação pela enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* na presença de doadores de ácido siálico, podendo originar glicopeptídeos mais complexos, ilustrados pelos derivados $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\text{Neu5Ac}\alpha-(2-3)-\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **6** e $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\text{Neu5Ac}\alpha-(2-3)-\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **7**.

A preparação de glicopeptídeos como **6** e **7** pela utilização de *trans*-sialidase de *T. cruzi* conduzirá ao melhor entendimento da relação estrutura/função da enzima *trans*-sialidase e, a partir destas informações, será possível planejar a preparação de potenciais inibidores seletivos de TcTS.

2.2. Estudos de Modelagem Molecular

Novos derivados poderão ser sugeridos a partir de modificações químicas planejadas por técnicas de modelagem molecular. A utilização de métodos de química computacional permitirá a realização de simulações das interações de **2**, **4** e **5** com o sítio ativo de TcTS. Desta forma, será possível avaliar e buscar uma correlação com os ensaios biológicos realizados com a enzima *trans*-sialidase para a transferência de ácido siálico.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Aparelhagem analítica:

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) foram registrados a 400 MHz em espectrômetro Bruker Advance DRX 400, na Universidade de São Paulo, e em espectrômetro Varian Gemini, na Universidade de East Anglia (UEA), UK. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= singleto, d= dubleto, t= tripleto, dd= duplo dubleto, m= multipeto), a constante de acoplamento (J), dada em Hertz (Hz), e o número de hidrogênios deduzidos a partir da integral relativa. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C) foram registrados a 100MHz em espectrômetro Varian Gemini (UEA) e Bruker Advance DRX 400 (USP). Os espectros bidimensionais COSY e HSQC referentes aos compostos de maior complexidade estrutural foram registrados em espectrômetro Varian Gemini (UEA).

As análises de espectrometria de massas por ESI-MS (Ionização por Electrospray) foram realizadas em aparelhos Finningan MAT 900 XLT (Swansea-UK), Thermo Finningan DecaXP^{plus} (John Innes Centre, Norwich- UK) e Bruker Daltonics UltrOTOF-Q-ESI-TOF (USP).

As análises de rotação óptica foram realizadas a temperatura ambiente em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, utilizando lâmpada de sódio.

3.1.2. Aparelhagem laboratorial:

- Rotavapor: Büchi RE121
- Bomba de alto-vácuo: Precision Model D 150
- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Luz ultra-violeta: Spectroline CM-10
- Reostato: Powersat 3PN116C
- Ponto de fusão: Thermolyne
- Os solventes e reagentes foram convenientemente purificados de acordo com métodos padrões descritos na literatura (PERRIN, 1980).
- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ da MERCK[®].

- As Cromatografias em Coluna foram realizadas utilizando sílica gel tipo “Flash” (40-63 μm) da MERCK[®] ou em aparelho Biotage Horizon[™] com sistema de alta performance de cromatografia “Flash”.
- As purificações por Cromatografia de Exclusão de Partículas (filtração em gel) foram realizadas em coluna Toyopearl HW-40S.
- As análises e purificações por CLAE foram conduzidas em aparelho Shimadzu Shim-PaK, utilizando coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), ou aparelho Perkin-Elmer, utilizando coluna semi- preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm).

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese de aminoácidos glicosilados

3.2.1.1. Preparação de doadores glicosídicos

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glicopiranosídeo 8 (MEINJOHANN et al., 1995)

A uma solução de cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (0,5 g, 2,32 mmol) **9** e bicarbonato de sódio (0,5 g, 5,9 mmol) em água (7,35 mL), resfriada a 0 °C, foi adicionado lentamente cloroformiato de 2,2,2-tricloroetila (0,47 mL, 3,41 mmol). A mistura foi agitada em banho de gelo por 2 horas e mantida à temperatura ambiente durante 19 horas. O precipitado branco formado foi separado por filtração e lavado seqüencialmente com água e éter etílico. O produto bruto foi recristalizado em etanol, sendo obtidos 440 mg (1,23 mmol) do produto **8** puro, correspondente a um rendimento de 53 %. Rf 0,6 (DCM: MeOH 8:2 v:v), PF 187-189 °C. δ_{H} (CD₃OD, 400 MHz) 5,18 (1 H, d, J 3,5 Hz, H-1), 4,80; 4,70 (2 H, AB, J_{AB} 12,1 Hz, CH₂CCl₃ Troc), 3,82 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,76-3,66 (2 H, m, H-3, H-5), 3,62 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 3,40 (1 H, t, J 9,3 Hz, H-4). δ_{C} (CD₃OD, 100 MHz) 158,61 (CO), 103,01 (*Cipso*, CCl₃), 94,48 (C-1, CH α), 77,30 (CH₂, C-Cl₃), 74,75 (C-6), 74,41 (C-3), 74,08 (C-5), 64,47 (C-2), 59,55 (C-4).

Cloreto de 3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glicopiranosila **10**

HCl gasoso anidro foi borbulhado em cloreto de acetila (2 mL), em frasco equipado com condensador, durante 20 min. até a saturação. O composto **8** (150 mg, 17,5 mmol) foi introduzido sobre o cloreto de acetila e a mistura foi refluxada por cerca de 16 h, quando o sólido branco foi totalmente consumido, originando uma solução viscosa e âmbar. Após agitação e refluxo, a solução foi diluída em diclorometano e vertida em mistura de gelo e água. A mistura foi transferida para funil de separação e agitada. A camada orgânica foi rapidamente separada e adicionada sob uma mistura de gelo e solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura foi agitada vigorosamente para neutralização da mistura. A camada orgânica foi seca em MgSO_4 , filtrada e concentrada. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt: Hexano 7:3 v:v) e forneceu o produto puro **10** como um sólido branco (10mg, 0,02 mmol, 4,8 %), R_f 0,4 (AcOEt: Hexano 7:3 v:v). δ_H (CDCl_3 ; 400 MHz) 6,15 (1 H, d, J 3,5 Hz, H-1), 5,30 (1 H, t, J 9,6 Hz, H-3), 5,15 (1 H, t, J 9,6 Hz, H-4), 4,75; 4,60 (2 H, AB, J_{AB} 12,1 Hz, CH_2 Troc), 4,28-4,19 (3 H, m, H-5, H-6a, H-6b), 4,07 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 2,05; 2,0; 1,98 (9 H, 3s, 3x CH_3CO).

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopiranosídeo 11

Uma suspensão de 2-desoxi-2-Troc-D-glicopiranosídeo **8** (50 mg, 0,14 mmol) em anidrido acético (2,4 mL) foi tratada com iodo (24,5 mg). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo acompanhada por CCD (EtOAc: Hexano 1:1 v:v). O final da reação foi evidenciado pela formação de uma solução castanho clara. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano, tiosulfato de sódio 5% e gelo picado. A mistura foi agitada e a camada orgânica incolor foi transferida para outro funil de separação contendo solução de carbonato de sódio. A camada aquosa do primeiro funil foi extraída duas vezes com diclorometano e os extratos orgânicos foram reunidos e lavados com carbonato de sódio até a neutralização. Secagem e concentração da mistura forneceram um óleo viscoso, amarelado, cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O rendimento de **11** foi de 96% (70,8 mg, 0,13 mmol), *R_f* 0,5 (AcOEt: Hexano 1:1 v:v). δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 6,12 (1 H, d, *J* 3,5 Hz, H-1), 5,30 (1 H, d, *J* 9,3, NH), 5,23 (1 H, t, *J* 9,6 Hz, H-3), 5,13 (1 H, t, *J* 9,6 Hz, H-4), 4,77; 4,55 (2 H, AB, *J*_{AB} 12,1 Hz, CH₂ Troc), 4,21 (1 H, dd, *J*_{1,2} 3,5 Hz, *J*_{2,3} 10,0 Hz, H-6), 4,15 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 9,3 Hz, *J*_{5,6a} 3,7 Hz, *J*_{5,6b} 1,3 Hz, H-5), 4,02-3,94 (2 H, m, H-2, H-6'), 2,17-1,95 (12 H, m, 4x CH₃CO). δ_{C} (CDCl₃, 100 MHz) 170,2, 169,7, 168,3, 168,2, (4 COCH₃), 153,0 (CO), 89,4 (C-1, CH α), 73,4 (CH₂, C-Cl₃), 70,9 (C-3), 69,3 (C-4), 68,6 (C-2), 60,5 (C-6), 52,0 (C-5), 19,9; 19,7; 19,6; 19,4 (COCH₃).

Cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila **12 (HORTON, 1972)**

HCl gasoso anidro foi borbulhado em cloreto de acetila (8 mL), em frasco equipado com condensador, durante 4 h até a saturação. O reagente 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glicopiranosose (3,88g, 17,5 mmol), obtido a partir de reação de *N*-acetilação do reagente cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose **9** (5g, 23,2 mmol) foi introduzido sobre o cloreto de acetila e a mistura foi agitada e refluxada por cerca de 14 h, quando o sólido branco foi totalmente consumido, originando uma solução viscosa e âmbar. Após agitação e refluxo, a solução foi diluída em diclorometano e vertida em mistura de gelo e água. A mistura foi transferida para funil de separação e agitada. A camada orgânica foi rapidamente separada e adicionada sob uma mistura de gelo e solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura foi agitada violentamente para neutralização da mistura. A camada orgânica foi seca em MgSO_4 , filtrada e concentrada. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt: Hexano 7:3 v:v) e forneceu o produto puro **12** como um sólido branco (1,45g, 4 mmol, 41,4%), R_f 0,36 (AcOEt: Hexano 7:3 v:v), PF 118-121 °C (lit., 127-128 °C). δ_H (CDCl_3 ; 400 MHz) 6,21 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1), 5,88 (1 H, d, J 8,4 Hz, NH), 5,35 (1 H, t, J 10,0 Hz, H-3), 5,25 (1 H, t, J 10,0 Hz, H-4), 4,55 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 10,0 Hz, $J_{5,6a}$ 4,6 Hz, $J_{5,6b}$ 1,5 Hz, H-5), 4,33-4,26 (2 H, m, H-6a, H-6b), 4,14 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 10,0 Hz, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-2), 2,20-1,93 (12 H, m, 4 x CH_3CO).

Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila **13 (KARTHA et al., 1996)**

Uma solução de penta-*O*-acetil- α -D-galactopiranosose **14** (10,3g, 26,4 mmol) em ácido acético glacial (10 mL) foi resfriada em banho de gelo e tratada lentamente com solução de ácido bromídrico (25 mL, solução em 30% ácido acético m/v). A mistura foi agitada por 4 horas e armazenada na geladeira durante 12 horas, para conversão total de **13**. A mistura reacional foi diluída com diclorometano e vertida em mistura de gelo picado e água. A fase aquosa foi separada e extraída com diclorometano e os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução de bicarbonato de sódio 5%, previamente resfriado em banho de gelo, seco (sulfato de magnésio) e concentrado sob pressão reduzida. O produto **13** foi isolado como um óleo amarelo, viscoso, cristalizado na presença de éter etílico e éter de petróleo. Após purificação, o produto **13** foi obtido com 64,4% de rendimento (7,2 g, 17 mmol). Rf 0,8 (AcOEt: Hexano 1:1 v:v), PF 82-84 °C (lit., 84-85 °C). δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 6,51 (1 H, d, J 3,8 Hz, H-1), 5,38 (1 H, m, H-4), 5,25 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-3), 4,89 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,8 Hz, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-2), 4,35 (1 H, t, $J_{5,6a}$ 6,7 Hz, H-5), 4,15-3,95 (2 H, 2 dd, $J_{5,6a}$ 6,7 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz, H-6a, H-6b), 2,05; 1,94; 1,88; 1,81 (12 H, 4s, 4 x CH₃CO).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato 15 (CHENG et al., 2005)

Uma solução de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosose **16** (0,5 g; 1,4 mmol) em DCM (5,0 mL) destilado foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte (N_2). Tricloroacetnitrila (CCl_3CN) (1,4 mL; 14,4 mmol) e 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,4 mL; 2,9 mmol) foram adicionados à solução, que foi agitada por 2 horas nas condições mencionadas acima. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por coluna cromatográfica (Hexano: AcOEt 7:3 v:v). O composto **15** foi cristalizado em éter etílico: hexano sendo obtido apenas o isômero α com rendimento de 50% (0,35 g; 0,71 mmol). δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) 8,67 (1 H, s, NH), 6,61 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,57 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 3,0 Hz, $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,43 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 10,8 Hz, $J_{3,4}$ 3,0 Hz, H-3), 5,37 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 10,8 Hz, H-2), 4,44 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 1,0 Hz, $J_{5,6b}$ 6,5 Hz, $J_{5,6a}$ 12,3 Hz, H-5), 4,17 (1 H, dd, $J_{5,6b}$ 6,5 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6'), 4,09 (1 H, dd, $J_{5,6a}$ 11,3 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6), 2,17; 2,04; 2,03; 2,02 (12 H, 4s, 4 x CH_3CO).

3.2.1.2. Reações de glicosilação

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-treonina **17** (CARVALHO et al., 2003)

Uma mistura de cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila **12** (400 mg, 1,08 mmol) e éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-treonina **18** (235 mg, 0,53 mmol) em 1,2-dicloroetano (4,3 mL) foi tratada com HgBr₂ (429 mg, 1,2 mmol). A mistura foi agitada e aquecida sob refluxo a 90°C por 9 h e acompanhada por CCD (AcOEt: Hexano 7:3 v:v). A mistura âmbar obtida foi concentrada e purificada em coluna cromatográfica em sílica-gel [AcOEt: Hexano 7:3 v:v). Os produtos **15** (200 mg, 0,26 mmol, 52%) e o correspondente isômero α **19** (77 mg, 0,10 mmol, 20%) foram obtidos como sólidos brancos cristalinos. **15**: PF 173-174 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -15,6 (*c* 1,0, CHCl₃), *R_f* 0,26 (AcOEt: Hexano, 7:3 v:v); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) (ANEXO 1) 7,76 (2 H, d, *J* 7,6 Hz, CH Fmoc Ph, H-1, H-1'), 7,64 (2 H, d, *J* 7,8 Hz, CH Fmoc Ph, H-4, H-4'), 7,41-7,26 (9 H, m, Fmoc Ph, OCH₂Ph, H-2, H-2', H-3, H-3'), 5,83 (1 H, d, *J* 9,1 Hz, NH Thr), 5,54 (1 H, d, *J* 8,4 Hz, NHAc), 5,25 (1 H, t, *J*_{2,3} 10,1 Hz, H-3), 5,21; 5,14 (2 H, AB, *J*_{AB} 12,2 Hz, OCH₂Ph), 5,00 (1 H, t, *J*_{3,4} 10,1 Hz, H-4), 4,65 (1 H, d, *J*_{1,2} 8,1 Hz, H-1), 4,47-4,40 (3 H, m, CH₂ Fmoc, β CH Thr), 4,35 (1 H, dd, *J* 7,3 Hz, *J* 10,6 Hz, α CH Thr), 4,24 (1 H, t, *J* 7,3 Hz, CH Fmoc), 4,19 (1 H, dd, *J*_{5,6a} 4,3 Hz, *J*_{6a,6b} 12,3 Hz, H-6a), 4,02 (1 H, dd, *J*_{5,6b} 2,2 Hz, *J*_{6a,6b} 12,3 Hz, H-6b), 3,67 (1 H, dd, *J*_{1,2} 8,1 Hz, *J*_{2,3} 10,1 Hz, H-2), 3,51-3,47 (1 H, m, H-5), 2,03; 2,02; 1,99; 1,93 (12 H, 4s, 4x COCH₃), 1,20 (3 H, d, *J* 6,3 Hz, CH₃ Thr). δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 170,9; 170,6; 170,4; 170,0 (COCH₃), 169,4 (COCH₂Ph), 156,8 (CO Fmoc), 144,0; 141,3 (Cquat. Fmoc Ph), 135,5 (Cquat. OCH₂Ph), 128,6; 128,5; 128,3; 127,7; 127,1; 125,5; 119,9 (CH Ph), 98,5 (C-1), 74,5 (β CH Thr), 71,9; 71,7, (C-5, C-3), 68,5 (C-4), 67,3 (OCH₂Ph, CH₂ Fmoc), 61,9 (C-6), 58,7 (α CH

Thr), 55,3 (C-2), 47,3 (CH Fmoc), 23,3; 20,7; 20,5; 20,6 (COCH₃), 17,0 (CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₄₀H₄₄N₂O₁₃NH₄ [M + NH₄]⁺: 778,3187, encontrado: 778,3187.

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-L-treonina 19 (CAMPO et al., 2007)

PF. 67,9-69,5 °C, $[\alpha]_D^{25} + 30,4^\circ$ (*c* 1,0, CHCl₃), R_f0,31 (AcOEt: Hexano 7:3 v:v); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) (**ANEXO 2**) 7,77 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, CH Fmoc Ph, H-1, H-1'), 7,64 (2 H, d, *J* 6,0 Hz, CH Fmoc Ph, H-4, H-4'), 7,49-7,26 (9 H, m, Fmoc Ph, OCH₂Ph, H-2, H-2', H-3, H-3'), 5,94 (1 H, d, *J* 9,3 Hz, NHAc), 5,73 (1 H, d, *J* 9,5 Hz, NHThr), 5,20-5,14 (1 H, m, H-3), 5,19; 5,09 (2 H, AB, *J*_{AB} 12,2 Hz, OCH₂Ph), 5,08 (1 H, t, *J*_{3,4} 9,4 Hz, H-4), 4,70 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,6 Hz, H-1), 4,55-4,44 (3 H, m, CH₂ Fmoc, α CHThr), 4,31-4,07 (5 H, m, β CHThr, CHFmoc, H-2, H-6a, H-6b), 4,01-3,97 (1 H, m, H-5), 2,06; 2,04; 2,03; 1,96 (12 H, s, COCH₃), 1,28 (3 H, d, *J* 6,2 Hz, CH₃ Thr); δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 171,5; 170,9; 170,8; 170,6 (COCH₃), 169,5 (COCH₂Ph), 156,7 (CO Fmoc), 144,0; 143,8; 141,5 (Cquat. Fmoc Ph), 134,5 (Cquat. OCH₂Ph), 129,2; 129,1; 128,8; 128,0; 127,3; 125,3; 120,2 (CH Ph), 99,5 (C-1), 77,6 (β CHThr), 71,4 (C-3), 68,5; 68,4 (C-5, C-4), 68,0 (OCH₂Ph), 67,7 (CH₂ Fmoc), 62,2 (C-6), 58,7 (α CHThr), 51,8 (C-2), 47,3 (CH Fmoc), 23,3; 21,0; 20,9; 20,8 (COCH₃), 18,5 (CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₄₀H₄₄N₂O₁₃ [M+H]⁺: 761,2916, encontrado: 761,2918.

***N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-treonina 20**

Uma solução de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-treonina **17** (56 mg, 0,073 mmol), previamente lavado com solução de EDTA 0,5%, em MeOH (2,5 mL) foi tratada com AcOH glacial (0,2 mL) e Pd/C 10% (20 mg). A mistura foi agitada e mantida sob atmosfera de H₂ (~1,5 atm) por 1 h. A mistura foi filtrada em placa sinterizada contendo celite e concentrada. O produto **20** foi obtido como um sólido branco amorfo (46 mg, 0,068 mmol, 95%). $[\alpha]_D -14,4$ (*c* 1,0, em MeOH) (lit. $[\alpha]_D +14,7$); R_f 0,1 (DCM: MeOH 9,5:0,5 v:v); PF: 127-129 °C. δ_H (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz) 7,78 (2 H, d, *J* 7,3 Hz, CH Fmoc arom. H-1, H-1'), 7,65 (2 H, d, *J* 6,6 Hz, CH Fmoc arom. H-4, H-4'), 7,43-7,28 (4 H, m, Fmoc arom. H-2, H-2', H-3, H-3'), 6,12 (1 H, d, *J* 9,2 Hz, NHThr), 6,03 (1 H, d, *J* 9,2 Hz, NHAc), 5,25 (1 H, t, *J*_{2,3} 9,6 Hz, H-3), 5,00 (1 H, t, *J*_{3,4} 9,6 Hz, H-4), 4,65 (1 H, d, *J*_{1,2} 8,3 Hz, H-1), 4,47-4,35 (4 H, m, CH₂ Fmoc, 2CH Thr), 4,30 (1 H, dd, *J* 6,8 Hz, *J* 10,6 Hz, H-6a), 4,20-4,00 (2 H, m, CH Fmoc, H-6b), 3,85 (1 H, dd, *J*_{1,2} 8,1 Hz, *J*_{2,3} 10,1 Hz, H-2), 3,75 (1 H, m, H-5), 2,04; 1,98; 1,97; 1,93 (12 H, 4s, 4x COCH₃), 1,20 (3 H, d, *J* 6,3 Hz, CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₃₃H₃₉N₂O₁₃ [M+H]⁺: 671,2452, encontrado: 671,2453. δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 171,3; 170,9; 170,8; 169,3 (COCH₃), 156,8 (CO Fmoc), 143,7; 141,1 (Cquat.), 127,6; 127,0; 125,1; 119,9 (CH Ph), 99,4 (C-1), 71,7; 71,5; 70,9; 68,2; 67,3 (C-3, C-4, C-5, 2 CH Thr, CH₂ Fmoc), 62,0 (C-6), 52,3 (C-2), 47,0 (CH Fmoc), 22,9; 20,8; 20,7; 20,5 (COCH₃), 17,3 (CH₃ Thr).

***N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-L-treonina 21**

De acordo com o procedimento descrito para o composto **17**, partindo-se de 50 mg de **19** (0,065 mmol), o produto **21** foi obtido como um sólido branco amorfo (46 mg, 0,068 mmol,

95%); R_f 0,12 (DCM/ MeOH 9,5:0,5 v:v). δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 7,68 (2 H, d, J 7,3 Hz, CH Fmoc arom. H-1, H-1'), 7,55 (2 H, d, J 6,6 Hz, CH Fmoc arom. H-4, H-4'), 7,34-7,23 (4 H, m, Fmoc arom. H-2, H-2', H-3, H-3'), 6,44 (1 H, d, J 8,9 Hz, NH), 6,11 (1 H, d, J 9,7 Hz, NH), 5,09 (1 H, t, $J_{2,3}$ 10,0 Hz, H-3), 5,01 (1 H, t, $J_{3,4}$ 9,5 Hz, H-4), 4,94 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, H-1), 4,60-3,90 (9 H, m, CH₂ Fmoc, 2 CH Thr, H-6a, CH Fmoc, H-6b, H-2, H-5), 2,01; 2,00; 1,99; 1,96 (12 H, 4s, COCH₃), 1,28 (3 H, d, J 6,7 Hz, CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₃₃H₃₉N₂O₁₃ [M+H]⁺: 671,2452, encontrado: 671,2453.

2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicopiranosil)-L-treonina 22 e 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil)-L-treonina 23 (CAMPO et al., 2007)

A remoção dos grupos *N*-Fmoc dos compostos **17** e **19** (50 mg, 0,065 mmol) foi realizada empregando-se as mesmas condições de reação de hidrogenólise utilizadas para a desproteção dos respectivos grupos carboxílicos, sendo necessário, no entanto, maior tempo de reação (cerca de 8 h). Após a desproteção total dos grupos carboxílico e amino de **17** e **19**, as misturas reacionais foram filtradas em placa sinterizada contendo celite e purificadas por coluna cromatográfica em sílica-gel (DCM: MeOH 9:1 v:v). Os produtos β GlcNAc-ThrOH **24** (27 mg, 0,06 mmol) e α GlcNAc-ThrOH **25** (31,5 mg, 0,07 mmol) foram obtidos como sólidos brancos, com rendimentos de 93% e 90%, respectivamente.

Reação de desacetilação

A remoção dos grupos *O*-Ac dos compostos **24** (27 mg, 0,06 mmol) e **25** (31,5 mg, 0,07 mmol) foi realizada pela dissolução dos mesmos em MeOH (cerca de 1,5 mL) seguida de tratamento com solução de NaOMe 1 mol/L até pH básico, ou seja, até pH 10 acompanhado por papel de pH. As misturas resultantes foram mantidas sob agitação por 2 h, sendo a seguir, neutralizadas pela adição de resina Dowex 50WX8-200. A filtração e concentração das misturas reacionais forneceram os produtos **22** (17,8 mg, 0,055 mmol, 90%) e **23** (22,3 mg, 0,07 mmol, 88%), ambos com R_f 0.1 (DCM: MeOH 9:1 v:v). **22** [α]_D²⁵ + 81,1 (*c* 1,0, CH₃OH); δ_{H} (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 3**) 4,40 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,3 Hz, H-1), 4,18 (1 H, m, β CH Thr), 3,82-3,78 (1 H, m, H-6a), 3,65-3,62 (1 H, m, H-2), 3,60 (1 H, t, $J_{2,3}$ 9,8 Hz, $J_{3,4}$ 9,8 Hz,

H-3), 3,52-3,50 (1 H, m, α CH Thr), 3,44 (1 H, t, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-4), 3,37-3,30 (2 H, m, H-5, H-6b), 1,95 (3 H, s, NHAc), 1,20 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH_3 Thr); δ_{C} (CD_3OD , 100 MHz) 101,9 (C-1), 77,6 (β CHThr, α CHThr), 76,7 (C-5), 74,7 (C-3), 70,9 (C-4), 61,5 (C-6), 56,5 (C-2), 22,8 (NCOCH_3), 18,9 (CH_3 Thr). ESI-HSMS: calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323,1449, encontrado: 323,1449.

23 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 61$ (c 0,2, CH_3OH); δ_{H} (D_2O , 400 MHz) (**ANEXO 4**), 4,80 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,40 (1 H, m, β CH Thr), 3,82 (1 H, m, α CH Thr), 3,72-3,65 (2 H, m, H-2, H-6a), 3,62-3,48 (3 H, m, H-3, H-5, H-6b), 3,33 (1 H, t, $J_{3,4}$ 10,1 Hz, H-4), 1,85 (3 H, s, NHAc), 1,21 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH_3 Thr). δ_{C} (CD_3OD , 100 MHz) 99,30 (C-1), 73,24 (β CHThr), 73,04 (C-5), 70,78 (C-4), 69,04 (C-3), 61,04 (C-6), 56,83 (α CHThr), 53,04 (C-2), 21,34 (NCOCH_3), 17,34 (CH_3 Thr). ESI-HSMS: calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 345,1269, encontrado: 345,1280.

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-L-treonina **26** (KARTHA et al., 1996)

Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil **13** (490mg, 1,192 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (6,75 ml) e tratado com o aminoácido FmocThrOBn **18** (250mg, 0,57 mmol) e iodo (404 mg, 1,59 mmol). A mistura foi agitada por 22 h, e a conversão dos reagentes foi acompanhada por CCD (AcOEt : Hexano 2:3 v:v). No final da reação a mistura foi diluída com diclorometano e lavada com solução de tiosulfato de sódio 5% e água, seca a partir de MgSO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt : Hexano 2:3 v:v) e forneceu **26** como um sólido branco cristalino (128,4 mg, 0,17 mmol, 27,4%), R_f 0,4 (AcOEt : Hexano 2:3 v:v), PF: 49-51°C. δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) (**ANEXO 5**) 7,72 (2 H, d, J 7,2 Hz, CH Fmoc arom. H-1, H-1'), 7,58 (2 H, d, J 7,2 Hz, CH Fmoc arom. H-4, H-4'), 7,39-7,20 (9 H, m, CH benzil e Fmoc arom. H-2, H-2', H-3, H-3'), 5,60 (1 H, d, J 9,2 Hz, NH), 5,25 (1 H, m, H-4), 5,13; 5,10 (2 H, AB, J_{AB}

12,2 Hz, CH₂ benzil), 5,06 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-2), 4,87 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 3,6 Hz, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-3), 4,40-4,34 (2 H, m, 2 CH Thr), 4,32 (2 H, dd, J 2,8 Hz, J 7,8 Hz, CH₂ Fmoc), 4,30 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7,6 Hz, H-1), 4,17 (1 H, t, J 7,3 Hz, CH Fmoc), 4,08-3,93 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,62 (1 H, t, J 7,0 Hz, H-5), 1,99; 1,98; 1,95; 1,92 (12 H, 4s, 4x CH₃CO), 1,15 (3 H, d, J 6,3 Hz, CH₃ Thr).

***N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-treonina 27**

Uma mistura de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina **26** (50 mg, 0,0655 mmol), 2 mL de metanol e 0,1 mL de ácido acético foi tratada com 10 mg de catalisador 10% Pd-C. A mistura reacional foi mantida sob agitação a uma pressão aproximada de 1 atm de H₂ durante 1 h, e acompanhada por CCD (DCM: MeOH 9:1 v:v). A mistura obtida foi filtrada em celite e purificada em coluna cromatográfica em sílica gel (DCM: MeOH 9,5:0,5 v:v). O produto **27** foi obtido como um sólido branco (44 mg, 0,065 mmol, 100%), R_f 0,6 (DCM: MeOH 9:1 v:v), PF: 75-77°C δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,76 (2 H, d, J 7,2 Hz, CH Fmoc arom. H-1, H-1'), 7,64 (2 H, d, J 7,8 Hz, CH Fmoc arom. H-4, H-4'), 7,42-7,13 (4 H, m, CH Fmoc arom. H-2, H-2', H-3, H-3'), 5,40 (1 H, d, J 8,9 Hz, NH), 5,37 (1 H, d, J 7,9 Hz, H-4), 5,15 (1 H, t, J 10,5 Hz, H-2), 5,03 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, $J_{3,4}$ 2,9 Hz, H-3), 4,55 (1 H, d, J 8,0 Hz, H-1), 4,46-4,20 (5 H, m, CH₂ Fmoc, CH Fmoc, 2 CH Thr), 4,18-4,05 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,87 (1 H, t, J 5,6 Hz, H-5), 2,16-1,99 (12 H, m, 4x COCH₃), 1,24 (3 H, d, J 8,5 Hz, CH₃ Thr).

β -D-galactopiranosil-L-treonina 28

O composto **26** (50 mg, 0,065 mmol) foi dissolvido em MeOH (1,5 mL) e tratado com AcOH glacial (0,15 mL) e Pd-C 10% (15 mg) para a remoção dos grupos *N*-Fmoc e *O*-Bn. A mistura foi agitada e mantida sob atmosfera de H₂ (~1,5 atm) por 8 h e a seguir foi filtrada em placa sinterizada contendo celite e concentrada. Após purificação por coluna cromatográfica (DCM: MeOH 9:1 v:v) o produto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-L-treonina **29** (21 mg, 0,046 mmol) foi obtido com 71% de rendimento.

Reação de desacetilação

O composto **29** (21 mg, 0,046 mmol) foi dissolvido em MeOH (1,5 mL) e tratado com solução de NaOMe 1 mol/L em metanol até pH básico. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 2 h, sendo a seguir, neutralizada pela adição de resina Dowex 50WX8-200. A filtração e concentração da mistura reacional forneceram o produto **28** (11,4 mg, 0,04 mmol, 86%). δ_{H} (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 6**) 4,43-4,37 (2 H, m, H-1, β CH Thr), 3,92-3,78 (2 H, m, H-3, α CHThr), 3,70-3,50 (4 H, m, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 3,43 (1 H, m, H-2), 1,22 (3 H, d, *J* 6,5 Hz, CH₃ Thr).

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-serina **30 e Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-L-serina **31****

(CARVALHO et al., 2003)

Uma mistura de cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila **12** (300 mg, 0,82 mmol) e éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-serina **32** (171 mg, 0,41 mmol) em 1,2-dicloroetano (4,3 mL) foi tratada com HgBr₂ (400 mg, 0,82 mmol). A mistura foi agitada e aquecida sob refluxo a 90°C por 14 h e acompanhada por CCD (AcOEt: Hexano 7:3 v:v). A mistura âmbar obtida foi concentrada e purificada em coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt: Hexano 7:3 v:v). Os produtos **30** (122,4 mg, 0,16 mmol, 40%) e o correspondente isômero α **31** (61,2 mg, 0,081 mmol, 20%) foram obtidos como sólidos brancos amorfos.

30: $[\alpha]_D^{25}$ -4,6 (*c* 1,0, CHCl₃), *R*_f 0,25 (AcOEt: Hexano, 7:3 v:v); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,77 (2 H, d, *J* 7,8 Hz, Fmoc Ph), 7,64 (2 H, d, *J* 7,8 Hz, Fmoc Ph), 7,40-7,26 (9 H, m, Fmoc Ph, Bn.), 5,81 (1 H, d, *J* 8,7 Hz, *NH* Ser), 5,35 (1 H, d, *J* 8,4 Hz, *NHAc*), 5,25 (1 H, t, *J*_{3,4} 9,6 Hz, H-3), 5,20 (2 H, AB, *J*_{AB} 12,2 Hz, OCH₂Ph), 5,02 (1 H, t, *J*_{3,4} 10 Hz, H-4), 4,67 (1 H, d, *J*_{1,2} 8,4 Hz, H-1), 4,55-4,38 (3 H, m, CH₂ Fmoc, CH Ser), 4,28-4,19 (3 H, m, H-6a, CH Fmoc, CH_{2a} Ser), 4,08 (1 H, dd, *J*_{5,6b} 2,2 Hz, *J*_{6a,6b} 12,3 Hz, H-6b), 3,85 (1 H, dd, *J* 2,7 Hz, *J* 10,8 Hz, CH_{2b}), 3,70 (1 H, t aparente, *J*_{1,2}, *J*_{2,3} 10,0 Hz, H-2), 3,64-3,59 (1 H, m, H-5), 2,04; 2,03; 2,02; 1,82 (12 H, 4s, COCH₃). δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 170,8; 170,7; 169,5; 169,4 (COCH₃, COCH₂Ph), 156,1 (CO Fmoc), 143,7; 143,6; 141,3 (Cquat. Fmoc), 135,3 (Cquat. OCH₂Ph), 128,5; 128,4; 128,2; 127,7; 127,1; 125,1; 119,9 (Fmoc Ph, CH Ph), 100,6 (C-1), 71,9; 71,7, (C-5, C-3), 68,9; 68,3 (C-4, CH₂ Ser), 67,3 (OCH₂Ph), 66,7 (CH₂ Fmoc), 61,8 (C-6), 54,6; 54,1 (C-2, CH Ser), 47,0 (CH Fmoc), 22,8; 20,7 (COCH₃). ESI-MS: calcd. para C₃₉H₄₂N₂O₁₃NH₄ [M + NH₄]⁺: 764.3031, encontrado: 764.3025.

31: *R*_f 0,31 (AcOEt: Hexano 7:3 v:v); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,66 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, CH Fmoc Ph), 7,62 (2 H, d, *J* 6,0 Hz, CH Fmoc Ph), 7,45-7,26 (9 H, m, Fmoc Ph, OCH₂Ph), 5,95 (1 H, d, *J* 9,3 Hz, *NHAc*), 5,85 (1 H, d, *J* 9,5 Hz, *NH* Ser), 5,24-5,16 (2 H, m, AB, *J*_{AB} 12,2

Hz, OCH_2Ph , H-3), 5,08 (1 H, t, $J_{3,4}$ 9,4 Hz, H-4), 4,70 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1), 4,60 (1 H, m, CH Ser), 4,45 (2 H, m, CH_2 Fmoc), 4,30 (1 H, ddd, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, $J_{2,3}$ 9,4 Hz m, H-2), 4,25 (1 H, m, CH Fmoc), 4,20-4,06 (3 H, m, CH_{2a} Ser, H-6a, H-6b), 3,88 (2 H, m, CH_{2b} Ser), 3,84 (1 H, m, H-5), 2,06; 2,05; 2,03; 2,02 (12 H, 4 s, COCH_3). δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz) 171,5, 170,9, 170,8, 170,6 (COCH_3), 169,5 (COCH_2Ph), 156,7 (CO Fmoc), 144,0, 143,8, 141,5 (Cquat. Fmoc Ph), 134,5 (Cquat. OCH_2Ph), 129,2, 129,1, 128,8, 128,0, 127,3, 125,3, 120,2 (CH Ph), 99,5 (C-1), 71,4 (C-4), 68,5, 68,4 (C-3, C-5), 68,0 (OCH_2Ph), 67,9 (CH_{2b} Ser), 67,7 (CH_2 Fmoc), 62,3 (CH_{2a} Ser), 62,2 (C-6), 55,0 (CH Ser), 52,5 (C-2), 47,3 (CH Fmoc), 23,3-20,8 (COCH_3).

3.2.2. Síntese de dissacarídeos glicosídicos

3.2.2.1. Preparação de doadores glicosídicos

Cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranosila **33** (LEMIEUX; RATCLIFFE, 1979)

Nitrato de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glucopiranosil **34** (1,46 g, 2,2 mmol) obtido a partir da reação de azidonitração do lactal **35** foi dissolvido em acetonitrila (13,46 mL) contendo cloreto de tetraetilamônio (1,39 g). Após 4 h de agitação a 80°C, a mistura reacional foi diluída com tolueno e lavada com água, sendo após purificada por coluna cromatográfica (AcOEt: Hexano 1:1 v:v). O produto **33** foi obtido na forma cristalina em 30% de rendimento (436,42 mg, 0,46 mmol). PF 190-193 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 60,2$ (c 1,0, CHCl_3), R_f 0,36 (Hexano: AcOEt, 1:1 v:v). δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) 6,05 (1 H, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 5,46 (1 H, dd, $J_{3',4'}$ 3,4 Hz, H-4'), 5,33 (1 H, dd, $J_{1',2'}$ 7,7 Hz, $J_{2',3'}$ 10,6 Hz, H-2'), 5,08 (1 H, t, J 10,3 Hz, H-3), 4,93 (1 H, dd, $J_{2',3'}$ 10,6 Hz, $J_{3',4'}$ 3,4 Hz, H-3'), 4,47 (1 H, m, $J_{6a,6b}$ 12,1 Hz, H-6b), 4,43 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7,7 Hz, H-1'), 4,21 (1 H, m, $J_{6a',6b'}$ 11,0 Hz, H-6b'), 4,16 (1 H, m, $J_{5,6a}$ 4,0 Hz, $J_{6a,6b}$ 12,0 Hz, H-6a), 4,13 (1 H, m, $J_{6a',6b'}$ 11,0 Hz, H-6a'), 4,04 (1 H, m, J 7,3 Hz, H-5'), 3,86 (1 H, t, J 6,5 Hz, H-5), 3,79 (1 H, t, J 9,7 Hz, H-4), 3,70 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, $J_{2,3}$ 10,3 Hz, H-2), 2,09-1,91 (18 H, 6 s, 6 COCH_3); δ_{C} (CDCl_3 , 100

MHz) 169,3-167,8 (COCH₃), 99,8 (C-1'), 90,7 (C-1), 74,2 (C-4), 70,6 (C-3'), 69,9 (C-5'), 69,7 (C-3), 68,8 (C-2'), 67,9 (C-5), 65,5 (C-4'), 61,5 (C-6), 60,16 (C-6'), 59,7 (C-2). ESI-MS: calcd. para C₂₄H₃₂ClN₃O₁₅.Na⁺ [M + Na]⁺: 660,1, encontrado 660,1.

3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi-α-D-glicopiranosil tricloroacetimidato **36** (LI et al., 2003)

O composto **34** (400 mg, 0,61 mmol) foi tratado com NaNO₂ (800 mg, 11,5 mmol) e H₂O (3 mL) em 1,4-dioxano (8 mL) por 10 h a 80 °C para fornecer o hemiacetal **37** (349,4 mg, 0,56 mmol). O hemiacetal **37** foi dissolvido em DCM anidro (4 mL), e então CCl₃CN (0,35 mL) e DBU (0,7 mL) foram adicionados. A mistura reacional foi agitada por 3 h a 0 °C, concentrada, e a mistura bruta purificada por coluna cromatográfica (Hexano: AcOEt, 1:1 v:v) para fornecer o produto **29** com 30% de rendimento. R_f 0,26 (Hexano: AcOEt, 1:1 v:v). δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 8,76 (1 H, s, NH), 6,38 (1 H, J_{1,2} 3,7 Hz, H-1), 5,43 (1 H, J_{9,2} Hz, H-3), 5,29 (1 H, dd, J_{1',2'} 7,9 Hz, J_{2',3'} 10,3 Hz, H-2'), 5,0 (1 H, dd, J_{2',3'} 10,3 Hz, H-3'), 4,89 (1 H, dd, J_{4',5'} 0,9 Hz, J_{3',4'} 3,4 Hz, H-4'), 4,45 (1 H, d, J_{1',2'} 7,9 Hz, H-1'), 4,39 (1 H, dd, J 11,0 Hz, H-6a'), 4,12 (1 H, dd, J 11,0 Hz, H-6a), 4,08-3,99 (3 H, m, 5-H, H-6b, H-6b'), 3,79 (2 H, m, 4-H, H-5'), 3,55 (1 H, dd, J_{1,2} 3,7 Hz, J_{2,3} 10,5 Hz, H-2), 2,10-1,90 (18 H, 6 s, 6 COCH₃).

3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicopiranosil tioacetato **38** (MATSUOKA et al., 2003)

A mistura contendo o dissacarídeo cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi-α-D-glucopiranosila **33**, ácido tioacético (0,26 mL) e piridina (0,1 mL) foi agitada a temperatura ambiente durante 4 h, sendo a seguir concentrada e purificada por coluna cromatográfica (AcOEt: Hex 7:3 v:v). O produto **38** (30 mg, 0,043 mmol, 90%) foi obtido como um óleo amarelado. δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 5,98 (1 H, d, J 9,8

Hz, NH), 5,35 (1 H, m, H-3), 5,09 (1 H, d, $J_{1,2}$ 10,9 Hz, H-1), 4,49 (1 H, $J_{1',2'}$ 7,9 Hz, H-1'), 2,35 (3 H, s, SAc), 2,15-1,90 (18 H, 6 s, 6 COCH₃).

3.2.2.2. Reações de glicosilação

Éster benzílico de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi-α-D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetoxycarbonil)- L-treonina **39** (CAMPO et al., 2007)

A uma mistura de cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi-α-D-glucopiranosila **33** (200 mg, 0,31 mmol) e do aminoácido FmocThrOBn **18** (135,4 mg, 0,31 mmol) em 1,2-dicloroetano (2.5 mL) foi adicionado o promotor brometo de mercúrio (112 mg, 0,31 mmol), sendo a mistura reacional refluxada por 9 h, e acompanhada por CCD (Hexano: AcOEt, 3:7 v:v). A mistura âmbar obtida foi purificada por coluna cromatográfica (Hexano: AcOEt, 1:1 v:v). O glicosídeo desejado **39** (195 mg, 0,18 mmol, 60%) foi obtido como um sólido amorfo. $[\alpha]_D^{25} + 32,2$ (c 1,0, CHCl₃); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,77 (2 H, d, J 7,5 Hz, CH Fmoc Ph), 7,64 (2 H, d, J 6,0 Hz, CH Fmoc Ph), 7,49-7,26 (9H, m, Fmoc Ph, OCH₂Ph), 5,79 (1 H, d, J 9,4 Hz, NH), 5,39 (1 H, dd, $J_{3',4'}$ 3,4 Hz, $J_{4',5'}$ 0,9 Hz, H-4'), 5,37 (1 H, dd, $J_{1',2'}$ 7,8 Hz, $J_{2',3'}$ 10,4 Hz, H-2'), 5,30 (2H, AB, J_{AB} 12,2 Hz, OCH₂Ph), 5,13 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 4,96 (1 H, dd, $J_{2',3'}$ 10,7 Hz, $J_{3',4'}$ 3,4 Hz, H-3'), 4,80 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,47 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,40 (3 H, m, αCHThr, βCHThr, H-6b), 4,31 (1 H, t, J 7,3 Hz, CHFmoc), 4,26 (1 H, dd, $J_{6a',6b'}$ 11,0 Hz, $J_{5',6b'}$ 5,9 Hz, H-6b'), 4,21 (1 H, dd, $J_{6a,6b}$ 12,0 Hz, $J_{5,6a}$ 5,3 Hz, H-6a), 4,13 (1 H, $J_{6a',6b'}$ 11,0 Hz, $J_{5',6a'}$ 7,4 Hz, H-6a'), 3,99 (1 H, ddd, $J_{5,6a}$ 5,3 Hz, $J_{5,6b}$ 1,9 Hz, $J_{4,5}$ 10,0 Hz, H-5), 3,97 (2 H, m, CH₂ Fmoc), 3,85 (1 H, dd, $J_{5',6a'}$ 7,4 Hz, $J_{5',6b'}$ 6,1 Hz, H-5'), 3,66 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, $J_{4,5}$ 9,5 Hz, H-4), 3,09 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 2,16-1,96 (18 H, 6 s, 6 CH₃CO), 1,33 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH₃ Thr); δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 170,5-169,6 (COCH₃), 169,3 (COCH₂Ph), 157,1 (CO Fmoc), 144,0; 141,2 (Cquat. Fmoc Ph), 135,1 (Cquat. OCH₂Ph), 128,8; 127,9; 127,3; 125,5; 120,1 (CH Ph), 101,3 (C-1'), 99,2 (C-1), 76,6 (C-4), 71,2 (C-3'), 70,9 (C-5'), 70,1 (C-3), 69,3 (C-2'), 69,1 (C-5), 68,0 (C-4'), 66,7 (CH₂

Fmoc, OCH₂Ph), 62,1 (C-6), 61,6 (C-6'), 60,8 (αCHThr, βCHThr), 59,1 (C-2), 47,3 (CH Fmoc), 21,2-20,8 (COCH₃), 18,9 (CH₃ Thr). ESI-HSMS: calcd. para C₅₀H₅₆N₄O₂₀. NH₄⁺ [M + NH₄]⁺: 1050,3824, encontrado: 1050,3831.

Éster benzílico de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetoxicarbonil- L-treonina 40
(CAMPO et al., 2007)

O composto **39** (150 mg, 0,145 mmol) foi adicionado à mistura de THF: anidrido acético: ácido acético (7 mL) e zinco em pó (247 mg) foi adicionado. Solução saturada de CuSO₄ (0,4 mL) foi adicionada e a mistura reacional foi agitada por 30 min. a temperatura ambiente, sendo posteriormente filtrada em celite e coevaporada com tolueno. Purificação por coluna cromatográfica (Hexano: AcOEt 3:7 v:v) forneceu o produto **40** (99 mg, 0,094 mmol, 65%). $[\alpha]_D^{25} + 28,8$ (*c* 1,0, CHCl₃); δ_H (CDCl₃, 400 MHz) (ANEXO 7) 7,77 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, CH Fmoc Ph), 7,64 (2 H, d, *J* 6,0 Hz, CH Fmoc Ph), 7,49-7,26 (9H, m, Fmoc Ph, OCH₂Ph), 5,85-5,62 (2 H, 2 d, *J* 9,4 Hz, 2 NH), 5,28 (1 H, dd, *J*_{3',4'} 3,4 Hz, *J*_{4',5'} 0,8 Hz, H-4'), 5,13 (1 H, dd, *J*_{2,3} 10,5 Hz, *J*_{3,4} 8,6 Hz, H-3), 5,10 (1 H, d, *J*_{1',2'} 7,8 Hz, *J*_{2',3'} 10,4 Hz, H-2'), 5,02 (2 H, AB, *J*_{AB} 12,2 Hz, OCH₂Ph), 4,90 (1 H, dd, *J*_{2',3'} 10,4 Hz, *J*_{3',4'} 3,4 Hz, H-3'), 4,57 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,7 Hz, H-1), 4,48 (1 H, d, *J*_{1',2'} 7,8 Hz, H-1'), 4,44-4,34 (3 H, m, αCHThr, CH₂ Fmoc, H-6b), 4,22 (1 H, t, *J* 7,3 Hz, CHFmoc), 4,14-4,09 (3H, m, βCHThr, H-2, H-6a'), 4,06 (1 H, dd, *J*_{6a',6b'} 11,0 Hz, *J*_{5',6b'} 5,9 Hz, H-6b'), 4,01 (1 H, dd, *J*_{6a,6b} 11,0 Hz, *J*_{5,6a} 5,3 Hz, H-6a), 3,86 (1 H, ddd, *J*_{5,6a} 5,3 Hz, *J*_{5,6b} 1,9 Hz, *J*_{4,5} 10,0 Hz, H-5), 3,80 (1 H, dd, *J*_{5',6a'} 7,4 Hz, *J*_{5',6b'} 6,1 Hz, H-5'), 3,69 (1 H, dd, *J*_{3,4} 9,8 Hz, *J*_{4,5} 9,5 Hz, H-4), 2,15-1,93 (21 H, m, CH₃CO), 1,21 (3 H, d, *J* 6,5 Hz, CH₃ Thr); δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 170,5-169,2 (COCH₃), 169,3 (COCH₂Ph), 157,1 (CO Fmoc), 144,0; 141,2 (Cquat. Fmoc Ph), 135,1 (Cquat. OCH₂Ph), 128,8; 127,9; 127,3; 125,5; 120,1 (CH Ph), 101,3 (C-1'), 99,3 (C-1), 76,6 (C-4), 71,2 (C-3'), 70,9 (C-3), 70,1 (C-5'), 69,3 (C-2'), 69,1 (C-5), 68,0 (CH₂ Fmoc, OCH₂Ph), 66,7 (C-4'), 62,1 (C-6), 61,6 (C-6'), 60,8 (αCHThr, βCHThr), 59,1 (C-2), 47,3 (CH Fmoc), 21,2-20,8 (COCH₃), 18,9 (CH₃ Thr). ESI-HSMS: calcd. para C₅₂H₆₀N₂O₂₁.H⁺ [M + H]⁺: 1049,3761, encontrado: 1049,3768.

β -D-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil-L-treonina 41

(CAMPO et al., 2007)

Uma solução de éster benzílico de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(Fluoren-9-ilmetoxicarbonil)-L-treonina **40** (48 mg, 0,045 mmol), em MeOH (3,6 mL) foi tratada com ácido acético glacial (0,36 mL) e Pd/C 10% (51 mg) para desproteção dos grupos *O*-Bn e *N*-Fmoc. A mistura reacional foi agitada sob atmosfera de H₂ (~1,5 atm) por 8 h, sendo depois filtrada em celite, concentrada e purificada por coluna cromatográfica (DCM: MeOH 9:1 v:v). O produto obtido (43 mg, 0,058 mmol) foi dissolvido em MeOH (1,5 mL) e tratado com solução de NaOMe 1 mol/L em metanol até pH básico. A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 8 h, e após este período foi neutralizada com resina Dowex 50WX8-200. A filtração e concentração da mistura reacional forneceram o produto **41** (20 mg, 0,04 mmol, 90%). R_f 0,1 (DCM: MeOH 9:1 v:v); $[\alpha]_D^{25} +10,0$ (*c* 0.1, MeOH); δ_H (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 8**), 4,77 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,30 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,29 (1 H, m, β CHThr), 3,80-3,65 (7 H, m, H-4', H-2, H-6a, H-6b, H-3, H-3', α CHThr), 3,62-3,52 (4 H, m, H-6a', H-6b', H-4, H-5), 3,50 (1 H, m, H-5'), 3,36 (1 H, dd, $J_{1',2'}$ 7,8 Hz, $J_{2',3'}$ 10,1 Hz, H-2'), 1,87 (3 H, s, NHAc), 1,24 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH₃ Thr). δ_C (D₂O, 100 MHz) 103,7 (C-1'), 99,5 (C-1), 79,5 (C-4), 76,1 (C-5'), 75,6 (β CHThr), 73,3 (C-5), 71,92, 71,91 (C-3', C-3), 71,7 (C-2'), 70,1 (α CHThr), 69,3 (C-4'), 61,8 (C-6'), 61,7 (C-6), 53,9 (C-2), 22,9 (NCOCH₃), 18,9 (CH₃ Thr). ESI-HSMS: calcd. para C₁₈H₃₂N₂O₁₃.Na⁺ [M + Na]⁺: 507,1797, encontrado: 507,1798.

3.2.3. Síntese de glicopeptídeos em fase sólida

3.2.3.1. Sequência geral usada nas reações em fase sólida (CHAN; WHITE, 2000)

Desproteção Ortogonal do grupo N-Fmoc para posterior acoplamento:

Wang resina 100-200 mesh, previamente ligada a resíduo de N-Fmoc glicina (NovaBiochem) (Fmoc-Gly-Wang resina, 100 mg) foi intumescida com diclorometano (3ml). Após cerca de 3 h, o solvente foi removido por filtração e DMF (2 mL) foi introduzido sobre a resina. A mistura foi agitada através de borbulhamento de nitrogênio, introduzido pela parte inferior do frasco de reação; DMF foi removido por filtração e nova porção foi introduzida, agitada e o processo repetido três vezes. Após sucessivas lavagens com DMF, a resina foi tratada com solução de piperidina 20% em DMF (2 mL) para desproteção do grupo N-Fmoc, a mistura foi agitada pelo borbulhamento de N₂ por cerca de 2-3 min e o reagente removido por filtração. A operação foi repetida 3 vezes e ao final a resina foi lavada 3 vezes com DMF.

Reações de acoplamento dos resíduos de aminoácidos ou blocos de construção à resina:

Cerca de 2 equivalentes dos reagentes, N-Fmoc-aminoácido ou bloco de construção, HOBt e PyBOP, foram pesados em frasco e dissolvidos com mínima quantidade de DMF. A solução foi tratada com DIPEA e imediatamente introduzida sobre a resina, contendo o aminoácido com grupo amino livre. A mistura foi agitada através de fluxo de N₂ por 1-2 h e o término da reação foi verificado através do teste de Kaiser, usado para detectar presença de grupo amino livre. No caso de teste negativo, a mistura foi filtrada e a resina lavada 3 vezes com DMF, DCM e MeOH. Após secagem em alto vácuo, duas amostras foram retiradas para determinação da taxa de ligação do aminoácido ou bloco de construção. Valores normalmente obtidos foram em torno de 0,35 e 0,60 mmol/g, enquanto o valor fornecido pelo fabricante foi de 0,65 mmol/g. A adição do bloco de construção ao alongamento da cadeia peptídica foi realizada da mesma forma descrita para o resíduo de aminoácido, apenas modificando o tempo de acoplamento para 24 h ou 72 h.

Determinação da taxa de ligação do aminoácido à resina:

Duas amostras de resina (cerca de 1 µmol em relação ao grupo Fmoc) foram pesadas e introduzidas em duas cubetas de quartzo. Piperidina 20% em DMF (3 ml) foi introduzida em cada uma das cubetas. A mistura foi agitada com auxílio de pipeta Pasteur por cerca de 5 a 10

min. A quantidade de grupo benzofulveno liberado foi medido em espectrofotômetro a 290 nm, contra o branco de piperidina 20% DMF. A partir da média dos resultados das duas amostras foi calculada a taxa de ligação do aminoácido pela fórmula: $\text{mmol/g} = (\text{Abs amostra})/(\text{mg amostra}) \times 1,75$.

Teste de kaiser

Cerca de 2 mg de resina foram tratadas sucessivamente com duas gotas de cada um dos reagentes, ninidrina 5% em etanol, fenol 80% em etanol e cianeto de potássio em piridina (2,0 ml de solução de KCN 0,001 M em 98,0ml de piridina). A mistura foi aquecida a cerca de 120°C por 1 a 2 min. A presença de grupo amino livre ligado a resina (acoplamento incompleto), teste positivo, é indicado pelo desenvolvimento de coloração azul intensa. A ausência de grupo amino livre (acoplamento completo), teste negativo, é indicado pelo desenvolvimento de coloração castanha.

Clivagem do glicopeptídeo da resina:

Após *N*-Fmoc-desproteção do último aminoácido ou bloco de construção acoplado, a remoção do glicopeptídeo da resina foi realizada somente após sucessivas lavagens da resina com DCM e MeOH para eliminação de traços de DMF. A clivagem foi realizada na presença de solução de TFA 95% em água. A mistura foi agitada sob fluxo de N₂ por 2 h e filtrada para um frasco coletor. A operação foi repetida e as fases de TFA 95% foram concentradas em evaporador rotatório. O sólido formado nas paredes do frasco foi tratado com éter etílico, previamente resfriado a 0°C para formação de um filme cristalino na superfície do frasco.

3.2.3.2. Reação de desacetilação

As reações de desacetilação dos glicopeptídeos sintetizados foram realizadas de modo semelhante aos blocos de construção **24**, **25**, **29** e **40**, porém, para alguns compostos, houve necessidade de maior tempo de reação. Desta forma, os glicopeptídeos foram dissolvidos em MeOH (cerca de 1,5 mL) e tratados com solução de NaOMe 1 mol/L em metanol até pH básico. A mistura resultante foi mantida sob agitação por cerca de 3 h, sendo a seguir neutralizada pela adição de resina Dowex 50WX8-200, filtrada e concentrada.

3.2.3.3. Purificação dos glicopeptídeos

Os glicopeptídeos desacetilados foram purificados por CLAE (CAMPO et al., 2006), utilizando-se coluna semi- preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm)

ou CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm, Shimadzu Shim-PaK) com gradiente linear de 0-30% CH₃CN: 0,1% aq TFA e fluxo de 1,0 mL/min. A separação das misturas foi observada apenas em sistema gradiente, dificultando a detecção por Índice de Refração, mais conveniente para a análise dos produtos. Por esta razão, foi empregada apenas detecção por UV em 225 nm, relacionado à fraca absorção da ligação peptídica.

Glicopeptídeo (Ac)₃β-D-GlcNAc-(Thr)₆-GlyOH **42**

Glicopeptídeo 42 (34,5 mg, 0,034 mmol, 71%). δ_H (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 10**) 5,12 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 9,3 Hz, $J_{3,4}$ 10,0 Hz, H-3), 4,93 (1 H, t, $J_{3,4}$ 10,0 Hz, H-4), 4,80 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,6 Hz, H-1), 4,45-4,00 (12 H, m, 12 x CH Thr), 3,85-3,75 (6 H, m, H-2, H-6a, H-6b, H-5 e CH₂Gly), 1,98-1,83 (12 H, m, COCH₃), 1,10-1,00 (18 H, m, CH₃ Thr). ESI-MS: encontrado para C₄₀H₆₆N₈O₂₂ [M + H]⁺: 1011,5 (massa exata 1010,43).

Produto desacetilado 43 (8,64 mg, 0,0097 mmol, 29%). δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,64-3,70 (21 H, m, H-3, H-4, H-1, 12 x CH Thr, H-2, H-6a, H-6b, H-5 e CH₂Gly), 2,05 (3 H, m, NHAc), 1,10-1,00 (18 H, m, CH₃ Thr). CLAE: CLC-ODS (M) (15cm x 4,6 mm, Shimadzu Shim-PaK), t_R 7,5 min; ESI-MS: encontrado para C₃₄H₆₀N₈O₁₉ [M + H]⁺: 885,5 (massa exata 884,4).

Glicopeptídeo (Ac)₄β-D-Gal-(Thr)₆GlyOH **44**

Glicopeptídeo 44 (30 mg, 0,03 mmol, 60%). δ_H (D₂O, 400 MHz) 5,35 (1 H, m, H-4), 5,10 (1 H, m, H-3), 4,90-4,80 (2 H, m, H-2, H-1), 4,40-4,00 (12 H, m, α , β CH Thr), 3,90-3,80 (5 H, H-6, H-6', H-5, CH₂ Gly), 2,10; 1,98; 1,92; 1,83 (12 H, 4s, 4x CH₃CO), 1,10-1,00 (18 H, m, CH₃ Thr).

Produto desacetilado 45 (10 mg, 0,011 mmol, 28,5%). δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 4,42-3,45 (21 H, m, H-3, H-4, H-1, 12 x CH Thr, H-2, H-6, H-6', H-5 e CH_2Gly), 1,10-1,00 (18 H, m, CH_3 Thr). CLAE: CLC-ODS (M) (15cm x 4,6 mm, Shimadzu Shim-PaK), t_{R} 7,2 min.

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-[(\text{Ac})_3\beta\text{-D-GlcNAc}](\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ 46 (CAMPO et al., 2007)

Glicopeptídeo 46 (35,4 mg, 0,037 mmol, 75%). δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 4,85 (1 H, t, J 9,8 Hz, H-3), 4,75 (1 H, t, J 9,8 Hz, H-4), 4,68 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,40-4,20 (5 H, m, βCHThr), 4,10-3,95 (5 H, m, αCHThr), 3,90-3,50 (6 H, CH_2Gly , H-6a, H-6b, H-5, H-2), 2,10-1,90 (12 H, m, 4x COCH_3), 1,20-1,00 (15 H, m, 5x CH_3Thr).

Produto desacetilado 1 (4,61 mg, 0,0054 mmol, 14%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 6$ (c 0,1, MeOH), δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 4,42 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,40-4,25 (5 H, m, αCHThr), 4,20-4,00 (5 H, m, βCHThr), 3,85-3,55 (5 H, m, CH_2Gly , H-6a, H-6b, H-5), 3,50 (1 H, t, J 9,8 Hz, H-3), 3,36 (1 H, t, J 9,8 Hz, H-4), 3,25 (1 H, m, H-2), 1,87 (3 H, s, NHAc), 1,20-1,00 (15 H, m, 5x CH_3Thr). CLAE: Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm), t_{R} 13,0 min; ESI-MS: calcd. para $\text{C}_{34}\text{H}_{70}\text{N}_7\text{O}_{17}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 847,4705, encontrado: 847,4705.

Glicopeptídeo $(\text{Ac})_3\alpha\text{-D-GlcNAc}(\text{Thr})_5\text{-Thr}[(\text{Ac})_3\beta\text{-D-GlcNAc}]\text{-GlyOH}$ 47

Glicopeptídeo 47 (54,5 mg, 0,04 mmol, 63%) δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 5,27-5,20 (2 H, m, H-3, H-3'), 5,09-5,02 (2 H, m, H-4, H-4'), 4,80, 4,76 (2 H, m, H-1, H-1'), 4,59-3,96 (22 H, m,

12 x CH Thr, H-2, H-2', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-5, H-5', CH₂Gly), 2,12-1,98 (24 H, m, COCH₃), 1,25-1,10 (18 H, m, CH₃ Thr). CLAE: CLC-ODS (M) (250 mm x 4,6 mm) *t*_R 28,0 min; ESI-MS: encontrado para C₅₆H₉₃N₉O₃₀ [M + H]⁺: 1340,8 (massa exata 1339,54).

Produto desacetilado 48 (7,0 mg, 0,0065 mmol, 50%) δ_H (D₂O, 400 MHz) (ANEXO 11) 4,29-3,06 (28 H, m, H-3, H-3', H-4, H-4', H-1, H-1', 12 x CH Thr, H-2, H-2', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-5, H-5', CH₂Gly), 1,77 (6 H, m, NHAc), 1,25-1,10 (18 H, m, CH₃ Thr). CLAE: CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm) *t*_R 5,5 min. ESI-MS: encontrado para C₄₂H₇₃N₉O₂₄ [M + H]⁺: 1088,7 (massa exata 1087,48).

Glicopeptídeo (Ac)₄β-D-Gal-Thr-Thr[(Ac)₄β-D-Gal]-Thr-Thr[(Ac)₄β-D-Gal]-Thr-ThrGlyOH 49

Glicopeptídeo 49 (45,65 mg, 0,027 mmol, 42%). δ_H (D₂O, 400 MHz) (ANEXO 12) 5,40 (3 H, m, H-4), 5,17 (3 H, m, H-3), 5,00 (3 H, m, H-2), 4,90 (3 H, m, H-1), 4,63-3,80 (23 H, m, 12x CH Thr, CH₂ Gly, H-6a, H-6b, H-5), 2,17-1,90 (36 H, m, CH₃CO), 1,25-1,00 (18 H, m, CH₃ Thr). CLAE: CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), *t*_R 15,2 min. ESI-MS: encontrado para C₆₈H₁₀₁N₇O₄₁Na⁺ [M + Na]⁺: 1692,9 (massa exata 1671,0).

Produto desacetilado 50 (1,95 mg, 0,0017 mmol, 21%). δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,65-3,24 (35 H, m, H-4, H-3, H-2, H-1, 12x CH Thr, CH₂ Gly, H-6a, H-6b, H-5), 1,25-1,00 (18 H, m, CH₃ Thr). CLAE: (M) (150 mm x 4,6 mm), *t*_R 6,4 min. ESI-MS: encontrado para C₄₄H₇₇N₇O₂₉Na⁺ [M + H]⁺: 1168,4 (massa exata 1167,48).

Glicopeptídeo NH₂(Thr)₂-[(Ac)₆αLacNAc]-(Thr)₃-GlyOH 51 (CAMPO et al., 2007)

Glicopeptídeo 51 (30 mg, 0,025 mmol, 50%). $[\alpha]_D^{25} + 2,3$ (*c* 0,1, MeOH). δ_H (D₂O, 400 MHz) 5,25 (1 H, m, H-4), 5,00 (1 H, m, H-3'), 4,85 (1 H, m, H-3), 4,83 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,46 (1 H, m, H-2'), 4,20-4,10 (5 H, m, α CHThr), 4,05-3,90 (7 H, m, β CHThr, H-6a, H-6b), 3,87 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1'), 3,85-3,80 (3 H, m, H-6a', H-6b', CH₂Gly), 3,60-3,48 (3 H, m, H-5, H-5', H-2), 2,10-1,90 (21 H, m, CH₃CO), 1,20-1,00 (15 H, m, 5x CH₃Thr).

Produto desacetilado 2 (5,21 mg, 0,0055 mmol, 22%). $[\alpha]_D^{25} + 3,0$ (*c* 0.1, MeOH). δ_H (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 13**) 4,71 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,50-4,30 (2 H, m, α CHThr), 4,28 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1'), 4,20-3,95 (5 H, m, β CHThr), 3,90-3,45 (16 H, m, α CHThr, CH₂Gly, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, H-2, H-3, H-4, H-4', H-5, H-5', H-3'), 3,35 (1 H, m, H-2'), 1,85 (3 H, s, NHAc), 1,20-1,00 (15 H, m, 5x CH₃Thr). CLAE: Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) t_R 13,5 min; ESI-HRMS: calcd. para C₃₆H₆₃N₇O₂₂ [M + H]⁺: 946,4099, encontrado: 946,4103.

NH₂(Thr)₂-[(Ac)₃β-D-GlcNAc]-(Thr)₃-[(Ac)₆αLacNAc]-(Thr)₃-GlyOH 52

Glicopeptídeo 52 (22,7 mg, 0,012 mmol, 40%). δ_H (D₂O, 400 MHz) δ 5,22- 4,50 (6 H, m, H-4', H-4'', H-3', H-3'', H-1, H-1''), 4,25- 3,40 (16 H, m, β CHThr, α CHThr), 3,81 (1 H,

m, H-1'), 3,75-3,25 (14 H, m, H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-6a'', H-6b'', H-5, H-5', H-5'', H-3, H-4, H-2, H-2', H-2''), 2,10-1,85 (33 H, m, 11x CH₃CO), 1,30-1,00 (24 H, m, 8x CH₃Thr).

Produto desacetilado 3 (3,6 mg, 0,0025 mmol, 20%). δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,72 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,41 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1''), 4,41-4,00 (16 H, m, β CHThr, α CHThr), 3,81 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1'), 3,72-3,48 (11 H, m, H-5, H-5', H-5'', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-6a'', H-6b'', CH₂Gly), 3,45-3,25 (9 H, m, H-3, H-3', H-3'', H-4, H-4', H-4'', H-2, H-2', H-2''), 1,90-1,80 (6 H, 2 s, 2x NHAc), 1,30-1,00 (24 H, m, 8x CH₃Thr). CLAE: Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm), t_R 13,6 min.

3.2.4. Síntese enzimática com β 1,4-GalT

As enzimas β 1,4-galactosiltransferase bovina (EC 2.4.1.90) e fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), e o açúcar nucleotídeo UDP-galactose foram adquiridos da companhia Sigma Chemical Co.

β -D-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosil-L-treonina 53

(CAMPO et al., 2007)

À solução contendo o aminoácido glicosilado **22** (5 mg, 0,015 mmol) e o doador UDP-Gal **54** (4,96 mg, 0,008 mmol) em tampão HEPES (0,4 mL, 50 mM, pH 7,0, 100mM MnCl₂), foram adicionadas as enzimas fosfatase alcalina (1,2 mg) e β 1,4-GalT (0.5 UI) e a mistura reacional incubada a 30°C por durante 24 h. Após este período a mistura foi tratada com etanol para desnaturação da enzima, centrifugada e o sobrenadante injetado em coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel (15 x 850 mm), utilizando-se água (0,1% TFA) como fase móvel, fluxo 0,5 mL/min. O produto puro **53** foi obtido com 85% de rendimento (6,3 mg, 0,013 mmol). R_f 2,8 (CHCl₃: MeOH : H₂O 10:10:3 v:v:v); $[\alpha]_D^{25}$ - 5,0 (c 0,1, MeOH). δ_H (D₂O, 400 MHz) (**ANEXO 9**) 4,39 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7,5 Hz, H-1), 4,29 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,17 (1 H, m, β CHThr), 3,78 (1 H, d, $J_{\alpha CH, \beta CH}$ 12,1 Hz, α CH Thr) 3,77-3,74 (2 H, m, H-4', H-4), 3,70-3,62 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,60-3,50 (5H, m, H-6a', H-6b', H-5', H-3, H-2), 3,47 (1 H, dd, $J_{2',3'}$ 3,3 Hz, $J_{3',4'}$ 9,9 Hz, H-3'), 3,38-3,33 (2 H, m, H-5, H-2'), 1,87 (3 H, s, NHAc), 1,13 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH₃ Thr). δ_C (D₂O, 100 MHz) 103,7 (C-1'), 100,48 (C-1), 78,99 (C-4),

76,10 (C-5'), 75,37 (C-5), 74,50 (β CHThr), 73,27 (C-3'), 72,89 (C-3), 71,70 (C-2'), 69,27 (C-4'), 61,73 (C-6'), 60,59 (C-6), 58,97 (α CHThr), 55,59 (C-2), 22,76 (NCOCH₃), 17,87 (CH₃Thr). ESI-HSMS: calcd. para C₁₈H₃₃N₂O₁₃ [M + H]⁺: 485,1977, encontrado: 485,1977.

β -D-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosil-L-treonina 41

A síntese enzimática de **41** foi realizada de forma semelhante ao composto **53**, porém, empregando-se maior quantidade da enzima β 1,4-GalT (1,5 UI) e maior período de tempo (96 h). Partindo-se de 5 mg de α GlcNAc-ThrOH **23**, foi possível a obtenção de 3,87 mg (0,008 mmol, 57%) de **41**. R_f 2,7 (CHCl₃: MeOH : H₂O 10:10:3 v:v:v). Caracterização conforme descrito na seção 3.2.2.

NH₂(Thr)₂-(β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH 4 (CAMPO et al., 2007)

A síntese enzimática do glicopeptídeo **4** foi realizada seguindo o mesmo procedimento realizado para o composto **53**, partindo-se de 4mg (0,005 mmol) do glicopeptídeo **1**, UDP-Gal **54** (2,93 mg, 0,0048 mmol), MnCl₂ (0,150 mL), fosfatase alcalina (0,4 mg) e a enzima β 1,4-GalT (1 UI). O glicopeptídeo **4** foi obtido com 80% de rendimento (3,5 mg, 0,0037 mmol) após purificação por filtração em gel. $[\alpha]_D^{25} - 2,2$ (*c* 0,1, MeOH). δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,45-4,40 (2 H, m, H-1, H-1'), 4,38-4,21 (5 H, m, β CHThr), 4,15-3,98 (5 H, m, α CHThr), 3,85-3,31 (13 H, m, CH₂Gly, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, H-5, H-5', H-4, H-4', H-3, H-3', H-2), 3,25 (1 H, m, H-2'), 1,88 (3 H, s, NHAc), 1,20-1,00 (15 H, m, 5x CH₃Thr). ESI-HRMS: calcd. para C₃₆H₆₃N₇O₂₂ [M + H]⁺: 946,4099, encontrado: 946,4103.

NH₂(Thr)₂-(βLacNAc)-(Thr)₃-(αLacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **5**

A síntese enzimática do glicopeptídeo **5** foi realizada como descrita para o composto **4**. Partindo-se de 2mg de **3** (0,0013 mmol) foi possível a obtenção de 1mg de **5** (0,0006 mmol, 45%) após purificação por filtração em gel (Toyopearl HW-40S). Considerando a pequena quantidade obtida não foi possível a caracterização por RMN ¹H. ESI-MS: 1636,67 [M + Na]⁺.

3.2.5. Síntese de dicetopiperazinas (dipeptídeos cíclicos) glicosiladas

Éster benzílico de (2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-glicopiranosil)-L-serina-NFmoc-D-Fenilalanina **55** e Éster benzílico de (2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-glicopiranosil)-L-serina-NFmoc-D-Fenilalanina **56**

Síntese de **55**

βGlcNAc-Fmoc-L-SerOBn **30** (50 mg, 0,067 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,3 mL, 20%) para desproteção do grupo *N*-Fmoc. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 1 h e a seguir purificada por coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt:Hex 7:3 v:v; MeOH:DCM 1:9 v:v). O produto **57** foi obtido com 84,6% de rendimento (29,7 mg, 0,057 mmol). PyBOP (37,2 mg, 0,071 mmol), HOBt (9,6 mg, 0,071 mmol) e *N*-Fmoc-D-Fenilalanina (27,6 mg, 0,071 mmol) foram então

misturados a **57** (28 mg, 0,053 mmol) e então solubilizados com acetonitrila (0,8 mL), sendo a reação iniciada com adição de DIPEA (37 mg, 0,05 mL, 0,28 mmol) e mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 20 horas. Após purificação por coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt:Hex 7:3 v:v), o composto **55** foi obtido com 68,1 % de rendimento (32,5 mg, 0,036 mmol). Rf 0,37 (AcOEt:Hex 7:3 v:v). δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7,69 (2 H, d, J 7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,45-7,14 (16 H, m, CH Fmoc arom., CH Bn arom., CH Phe arom.), 5,44 (1 H, d, J 7,7 Hz NH Phe), 5,22 (1 H, t, $J_{3,4}$ 9,9 Hz, H-3), 5,10 (2 H, AB, J_{AB} 12,3 Hz, CH₂ Bn), 4,91 (1 H, t, $J_{3,4}$ 9,6 Hz, H-4), 4,62 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7,9 Hz, H-1), 4,40 (2 H, m, CH Fmoc, α -CH Phe), 4,18-3,98 (6 H, m, H-5, H-6a, H-6b, α -CH Ser, CH₂ Fmoc), 3,77 (1 H, ddl, J 9,7 Hz, J 1,5 Hz, β -CH_{2a} Ser), 3,53 (1 H, ddl, J 9,1 Hz, J 1,5 Hz, β -CH_{2b} Ser), 3,39 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, $J_{2,3}$ 10,2 Hz, H-2), 3,15 (1 H, ddl, J 13,0 Hz, J 5,3 Hz, β -CH_{2a} Phe), 2,95 (1 H, ddl, J 13,2 Hz, J 7,6 Hz, β -CH_{2b} Phe), 1,98, 1,97, 1,92, 1,81 (12 H, 4s, COCH₃).

Síntese de 56

Conforme descrito para a síntese de **55**, inicialmente foi realizada a *N*-Fmoc desproteção do bloco de construção α GlcNAc-Fmoc-L-SerOBn **31**. A partir de 61 mg (0,082 mmol) de **31**, o produto **58** foi obtido com 74,5 % de rendimento (31,9 mg, 0,061 mmol). A seguir, de acordo com o procedimento descrito para o composto **55**, partindo de 30 mg (0,057 mmol) de **58** foi possível a obtenção de 38,3 mg (0,043 mmol, 74,9 %) do produto **56**. Rf 0,36 (AcOEt:Hex 7:3 v:v). δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7,68 (2 H, d, J 7,7 Hz, CH Fmoc arom.), 7,45-7,41 (2 H, m, CH Fmoc arom.), 7,35-7,21 (14 H, m, CH Fmoc arom., CH Bn arom., CH Phe arom.), 5,84 (1 H, dl, J 8,8 Hz, NH Ser), 5,33 (1 H, d, J 7,4 Hz, NH Phe), 5,07 (2 H, s, CH₂ Bn), 5,01-4,96 (2 H, m, H-3, H-4), 4,70 (1 H, d, J 3,7 Hz, H-1), 4,44-4,34 (3 H, m, H-6a, H-6b, α -CH Phe), 4,20-3,94 (5 H, m, H-5, α -CH Ser, CH Fmoc, CH₂ Fmoc), 3,84 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,3 Hz, $J_{2,3}$ 10,2 Hz, H-2), 3,74-3,66 (1 H, m, β -CH_{2a} Ser), 3,64-3,55 (1 H, m, β -CH_{2b} Ser), 3,11-2,94 (2 H, m, β -CH₂ Phe), 1,98, 1,97, 1,93, 1,92 (12 H, 4s, COCH₃).

Ciclo (2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-serina-D-Fenilalanina **59 e Ciclo (2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-L-serina-D-Fenilalanina **60****

Síntese de **59**

O composto **55** (30 mg, 0,033 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20 %). A reação, conduzida em temperatura ambiente, foi acompanhada durante 68 horas por CCD. O solvente foi removido sob alto vácuo e o sólido bruto foi ressuspensão em diclorometano e purificado por coluna cromatográfica em sílica-gel (AcOEt:Hex 7:3 v:v; MeOH:DCM 1:9 v/v), tendo sido isolado o produto final **59** com rendimento de 42,9 % (8,1 mg, 0,014 mmol). R_f 0,13 (AcOEt:Hex 7:3 v:v). δ_H (CDCl₃, 400 MHz) (**ANEXO 14**) 7,27-7,20 (5 H, m, *CH* Phe arom.), 6,64 (1 H, d, *NH* Phe), 6,41 (1 H, d, J 9,0 Hz, *NHAc*), 5,09-4,94 (2 H, m, H-3, H-4), 4,49 (1 H, d, J 8,5 Hz, H-1), 4,30-4,27 (1 H, m, α -*CH* Phe), 4,22-3,95 (4 H, m, H-2, H-6a, H-6b, α -*CH* Ser), 3,67-3,56 (3 H, m, H-5, β -*CH*₂ Ser), 3,25 (1 H, dd, J 13,8 Hz, J 3,8 Hz, β -*CH*_{2a} Phe), 2,91 (1 H, dd, J 13,8 Hz, J 8,0 Hz, β -*CH*_{2b} Phe), 2,01, 1,98, 1,96, 1,93 (12 H, 4s, COCH₃). δ_C (CDCl₃, 75 MHz) 170,9, 169,3, 166,6 (CO Ser, CO Phe, COCH₃), 129,9, 129,0, 127,5 (*CH* arom.), 101,4 (C-1), 72,5 (C-3), 71,9 (C-5), 70,9 (α -*CH* Ser), 68,3 (C-4), 61,9 (C-6), 55,5 (β -*CH*₂ Ser), 55,0 (α -*CH* Phe), 53,8 (C-2), 40,9 (β -*CH*₂ Phe). ESI-HRMS: calculado para C₂₆H₃₃N₃O₁₁·[M + Na]⁺ 586,2013, encontrado 586,2038.

Síntese de **60**

Seguindo o procedimento utilizado para a preparação de **59**, o tratamento de **56** com solução de piperidina em DMF e agitação da mistura reacional por 41 h conduziram à obtenção do produto **60** com rendimento de 35,4 % (6,7 mg, 0,012 mmol). δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,33-7,22 (5 H, m, *CH* Phe arom.), 6,68 (1 H, d, J 9,3 Hz, *NH* Phe), 5,15-5,01 (2 H, m, H-3, H-4), 4,77 (1 H, d, J 3,7 Hz, H-1), 4,32-4,27 (2 H, m, H-2, α -*CH* Phe), 4,18-3,95 (3 H, m, H-6a, H-6b, α -*CH* Ser), 3,85-3,79 (2 H, m, β -*CH*_{2a} Ser), 3,58-3,50 (2 H, m, H-5, β -*CH*_{2b} Ser), 3,27-3,21 (1 H, m, β -*CH*_{2a} Phe), 3,05-2,99 (1 H, m, β -*CH*_{2b} Phe), 2,03, 1,96, 1,93, 1,84 (12 H, 4s, COCH₃). ESI-HRMS: calculado para C₂₆H₃₃N₃O₁₁·[M + Na]⁺ 586,2013, encontrado 586,2028.

3.2.6. Ensaios enzimáticos com a enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS)

Os ensaios enzimáticos descritos a seguir foram realizados com o lisado enzimático bruto de TcTS, obtido a partir do clone de *trans*-sialidase recombinante (pTrcTs611/2) cultivado em cultura de *E. coli* (XL1-Blue).

3.2.6.1. Expressão da enzima TcTS: Cultura de células e preparação do lisado celular (extrato bruto)

Clones individuais de TcTS (pTrcTs611/2) (BUSCHIAZZO, 1997) foram selecionados e cultivados em ágar de inclinação LB contendo ampicilina (100 µg/mL). Os clones foram então transferidos para placas de ágar LB e caldos glicerol dos clones individuais foram obtidos (20% glicerol, armazenados a -80 °C). Colônias individuais de *E. coli* (XL1-Blue) transformadas foram selecionadas e cultivadas em 20 mL de caldo LB (100 µg/mL ampicilina) em tubos Falcon de 50mL (37 °C, 200 rpm). Culturas de 800 mL (frascos cônicos de 2 L) foram então inoculadas a uma densidade óptica de 0,05-0,1 OD unidades e submetidas ao crescimento até que a densidade celular de 0,6-0,8 (OD₆₀₀) fosse alcançada. As células foram então induzidas com IPTG 1 mM (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) e mantidas em crescimento por 4 h a 30°C, 200 rpm. As células foram precipitadas por centrifugação (10,000 g por 20 min a 4 °C), e os “pellets” (macerados celulares) foram armazenados a -20°C. O “pellet” celular foi misturado em gelo e ressuspenso em 30mL de tampão fosfato (PBS). Após 30 min de incubação em gelo, a viscosidade da solução foi reduzida pela adição de DNase (20 µg/mL). As células foram então sonicadas em gelo e a suspensão foi centrifugada (10,000 g por 30 min) para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi a seguir filtrado em filtro de 0,2 µm e o lisado protéico bruto obtido foi diretamente empregado nos ensaios enzimáticos.

3.2.6.2. Reações de sialilação com a enzima TcTS

Ácido (5-Acetamido-3,5-dideoxi- α -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosilônico)-(2-3)-(β -D-galactopiranosil)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil)-L-treonina 61

(CAMPO et al., 2007)

À solução contendo o composto **41** (1,0 mg, 0,002 mmol) e o doador fetuína (25 mg) em tampão PBS (200 μ l) foram adicionados 100 μ l do lisado enzimático de TcTS, sendo a mistura reacional incubada a 30°C por 2 h. Após este período a mistura reacional foi filtrada em filtro VIVASPIN 500 (MM cut-off: 10 kDa) e o filtrado obtido injetado diretamente em coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel, empregando-se tampão NH_4HCO_3 (5mM) como fase móvel (0,5 mL/min). O produto **50** foi obtido como um sólido amorfo com 92% de rendimento (1,5 mg, 0,002 mmol). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -1,3$ (c 0,02, MeOH); δ_{H} (D_2O , 400 MHz) 4,77 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,30 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,28 (1 H, m, βCHThr), 2,60 (1H, dd, $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}'}$ 12,1 Hz, $J_{3\text{eq}'',4''}$ 4,4 Hz, H-3eq''), 1,92; 1,90 (6H, 2s, 2 x NHAc), 1,60 (1H, dd, ($J_{3\text{ax}'',4''}$ 12,0 Hz, H-3ax''), 1,24 (3H, d, J 6,5, CH_3 Thr). ESI-MS: calcd. para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_{20}\text{Na}^+ [\text{M} + \text{Na}]^+$: 798,27, encontrado: 798,27.

Ácido (5-Acetamido-3,5-dideoxi- α -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosilônico)-(2-3)-(β -D-galactopiranosil)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicopiranosil)-L-treonina 62

(CAMPO et al., 2007)

A síntese enzimática do composto **62** foi realizada seguindo o mesmo procedimento realizado para o composto **61**. Partindo-se de 1 mg (0,002 mmol) do produto **53**, o produto sialilado **62** foi obtido com 90% de rendimento (1,4 mg, 0,0018 mmol) como sólido amorfo

após purificação por filtração em gel. $[\alpha]_D^{25} -1,2$ (c 0,03, MeOH); δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,42 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,36 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,20 (1 H, m, $\beta CHThr$), 2,60 (1 H, dd, $J_{3eq'',3ax''}$ 12,1 Hz, $J_{3eq'',4''}$ 4,4 Hz, H-3eq''), 1,92, 1,90 (6H, 2s, 2 x NHAc), 1,60 (1 H, dd, $J_{3ax'',4''}$ 12,0 Hz, H-3ax''), 1,24 (3 H, d, J 6,5 Hz, CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₂₉H₄₈N₃O₂₀Na⁺ [M + Na]⁺: 798,27, encontrado: 798,27.

NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α -(2-3)- α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH 7

(CAMPO et al., 2007)

Conforme descrito para os compostos **61** e **62**, partindo-se de 1 mg do glicopeptídeo **2**, foi possível a obtenção de **7** com 85% de rendimento (1,06 mg, 0,00085 mmol). $[\alpha]_D^{25} -14$ (c 0,04, MeOH); δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,68 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 4,36 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1'), 4,40-3,80 (10 H, m, $\alpha CHThr$, $\beta CHThr$), 2,62 (1H, dd, $J_{3eq'',3ax''}$ 12,1 Hz, $J_{3eq'',4''}$ 4,4 Hz, H-3eq''), 1,92, 1,90 (6H, 2s, NHAc), 1,65 (1H, dd, ($J_{3ax'',4''}$ 12,0 Hz, H-3ax''), 1,20-1,00 (15H, m, 5 x CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₄₇H₈₀N₈O₃₀ [M + H]⁺: 1237,38, encontrado: 1237,38.

NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α -(2-3)- β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH 6

(CAMPO et al., 2007)

O glicopeptídeo **6** foi obtido de forma semelhante ao composto **7** com 82% de rendimento (0,98 mg, 0,0008 mmol) após purificação por filtração em gel. $[\alpha]_D^{25} -1,0$ (c

0,03, MeOH). δ_H (D₂O, 400 MHz) 4,42 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,35 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1'), 4,40-3,90 (10 H, m, α CHThr, β CHThr), 2,62 (1H, dd, $J_{3eq'',3ax''}$ 12,1 Hz, $J_{3eq'',4''}$ 4,4 Hz, H-3eq''), 1,93, 1,90 (6H, 2s, NHAc), 1,65 (1H, dd, ($J_{3ax'',4''}$ 12,0 Hz, H-3ax''), 1,20-1,00 (15H, m, 5 x CH₃ Thr). ESI-MS: calcd. para C₄₇H₈₀N₈O₃₀ [M + H]⁺: 1237,39, encontrado: 1237,39.

Ácido (5-Acetamido-3,5-dideoxi- α -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosilônico)-(2-3)-(β -D-galactopiranosil)-L-treonina 63

Seguindo procedimentos anteriores, o produto sialilado **63** foi obtido com rendimento de 50% (1 mg, 0,0017 mmol) a partir de 1mg (0,003 mmol) do composto **28**.

ESI-MS: 569,91 [M – 2H⁺].

3.2.7. Ensaios de atividade biológica

3.2.7.1. Ensaios de atividade tripanocida

Os ensaios de atividade tripanocida *in vitro* foram realizados sob supervisão do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, no laboratório de Parasitologia da FCFRP.

Foram utilizadas amostras sangüíneas coletadas de camundongos albinos, linhagem Swiss no 7º dia de parasitemia após a infecção com a cepa Y e 14º dia para a cepa Bolívia de *T.cruzi*. O sangue infectado foi diluído a uma concentração de 2 x 10⁶ tripomastigotas/ mL, sendo distribuídos em microplacas (96 orifícios), em triplicata. Os compostos testados foram solubilizados em água e diluídos em sangue para uma concentração final de 0,5 µg/ mL, 2,0 µg/ mL, 8,0 µg/ mL e 32 µg/ mL. As placas foram incubadas a 4°C e o número de parasitas contados após 24 horas. Como controle negativo foi utilizado DMSO, na mesma concentração utilizada na diluição dos compostos testados e, como controle positivo a violeta de genciana a 250 µg/ mL (100% de lise). A avaliação da atividade tripanocida se deu pela quantificação da porcentagem de lise parasitária (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

3.2.7.2. Ensaios de atividade antitumoral

Os ensaios antitumorais envolvendo os aminoácidos glicosilados **22** e **23** foram realizados no Laboratório de Imunologia da FCFRP, sob supervisão do Prof. Dr. Auro Nomizo, e os ensaios relacionados às dicetopiperazinas glicosiladas **59** e **60** foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da Prof. Dra Cláudia Pessoa.

3.2.7.2.1. Ensaios com os aminoácidos glicosilados 22 e 23

3.2.7.2.1.1. Linhagens tumorais

As linhagens tumorais utilizadas foram JURKAT e K562 (leucemia T humana), e B16F10 (melanoma de camundongos). As linhagens tumorais foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Estas linhagens foram mantidas em criopreservação em nitrogênio líquido a -190°C em solução de congelamento que consiste em: meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal. Para fazer os ensaios de atividade citotóxica dos compostos testados, essas células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

3.2.7.2.1.2. Meios de Cultura Celular

Para a manutenção das linhagens de tumores humanos, dissolução das amostras e realização dos ensaios de atividade antitumoral, foi utilizado o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mmol/L de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10µg/mL de gentamicina (meio RPMI completo). Este meio foi preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22µm.

3.2.7.2.1.3. Preparação das amostras para testes de atividade antitumoral:

As amostras solúveis em meio aquoso foram pesadas e dissolvidas na concentração apropriada em meio de cultura celular RPMI completo. Posteriormente foram submetidas ao misturador (VORTEX) para dissolução completa e em seguida, foram centrifugadas a 14.000 rps para a sedimentação de qualquer produto insolúvel ou precipitado. Por fim, as amostras foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm para a utilização experimental.

Como controle positivo, utilizou-se o fármaco Vincristina – Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

3.2.7.2.1.4. Ensaios de atividade citotóxica dos blocos de construção β GlcNAc-ThrOH 22 e α GlcNAc-ThrOH 23

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos **22** e **23** foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium –MTT (MOSSMAN, 1983). As células tumorais foram incubadas em placas de cultivo celular de 96 poços com os diferentes compostos ou droga controle por 24 h em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Ao findar do período de incubação, 10µL de MTT na concentração de 5mg/mL, foram adicionados aos poços de cultivo celular e mantidas por mais 3 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Após este período, foram acrescentados 50µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCL 0,01 mol/L. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a temperatura ambiente. A avaliação da atividade citotóxica dos diferentes extratos foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de 570 nm.

3.2.7.2.2. Ensaios com as dicetopiperazinas glicosiladas ciclo-(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 59 e ciclo-(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 60

3.2.7.2.2.1. Linhagens tumorais

As linhagens tumorais utilizadas, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), foram MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Essas linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.2.7.2.2.2. Ensaios de atividade citotóxica das dicetopiperazinas glicosiladas ciclo-(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 59 e ciclo-(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 60

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 h com as substâncias testadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram

adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

3.2.7.3. Ensaios farmacológicos de inibição das proteínas quinases PKG, PKA e PKC.

Os ensaios de inibição das proteínas quinases PKG, PKA e PKC foram realizados no laboratório de farmacologia da FCFRP, sob supervisão da Prof. Dra. Lusiane Maria Bendhack. Os ensaios foram realizados em preparações isoladas de aortas de ratos normotensos.

3.2.7.3.1. Ensaio de inibição da proteína quinase PKG

Inicialmente, foram montados 4 anéis de aorta, sendo dois para o composto testado e dois para o controle. A seguir, estes anéis foram acordados com Nor 10^{-7} M, e o endotélio foi testado com Ach (1µM). Posteriormente, fez-se a incubação de 2 anéis de aorta para o composto testado (10^{-4} M) durante 30 minutos, e após este período foi adicionada Phe 10^{-7} M nos 4 anéis para estimulação da resposta contrátil. Sobre a contração foi feita uma curva de relaxamento com nitroprussiato (10 nM a 6 µM). Estes ensaios foram realizados com os blocos de construção **22** e **24**.

3.2.7.3.2. Ensaio de inibição da proteína quinase PKA

Foi realizado procedimento semelhante ao descrito para a enzima PKG, diferindo somente na curva de relaxamento, a qual foi realizada com o controle forskolina. Neste ensaio foi testado somente o composto **22**.

3.2.7.3.3. Ensaio de inibição da proteína quinase PKC

O procedimento de preparação de anéis de aortas foi realizado conforme descrito no item 3.2.7.3.1. A seguir, fez-se a incubação de 2 anéis de aorta com o composto **22** (10^{-4} M), durante 30 minutos, e após este período foi adicionado Phorbol éster 1 µmol/L para estimulação da resposta contrátil. Diferentemente dos protocolos anteriores não foi realizada curva de relaxamento com fármacos controle.

3.2.8. Estudos de modelagem molecular

3.2.8.1. Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de *trans*-sialidase

Na tentativa de se construir um padrão farmacofórico comum a diferentes inibidores de TS contendo diferentes geometrias, utilizou-se o programa DS ViewerPro 5.0 (DISCOVERY STUDIO VIEWER PRO). Previamente, realizou-se uma busca no Protein Data Bank (PDB) por complexos de *trans*-sialidasas. Foram detectadas 10 estruturas (códigos PDB 1MS0, 1MS1, 1MS8, 1MZ6, 1N1T, 1N1V, 1N1Y, 1SOI, 1SOJ e 1SOK), sendo 6 complexos de TcTS e 4 complexos de *T. rangeli* (TrTS). Em sequência, utilizou-se o programa SPDB Viewer 3.7 (SPDB VIEWER) para se fazer a superposição estrutural dos complexos com respeito aos átomos de carbono-alfa, com desvios médios quadráticos (RMSD) menores do que 2.0 Å.

Cada grupo farmacofórico foi definido a partir do centróide (centro geométrico) dos átomos correspondentes das moléculas envolvidas. Essa operação foi realizada com o programa DS ViewerPro 5.0. Em torno de cada centróide foi construída uma esfera de exclusão com raio igual a 2.2 Å para doador e/ou aceptor de ligação de hidrogênio e 1.6 Å para grupo carregado negativamente.

3.2.8.2. Cálculos de campos de interação molecular

As estruturas de *trans*-sialidase de *T. cruzi* (códigos PDB 1MS1 e 1MS8), das quais se retirou os ligantes, foram inicialmente delimitadas por um grid (malha) contendo cerca de 40% de espaço vazio, e a equação de Poisson foi então resolvida numericamente utilizando um grid com espaçamento de 1 Å. Assim, um grid (centrado no oxigênio da hidroxila de Tyr342) contendo todos os resíduos do sítio ligante foi construído, cujo tamanho foi subsequentemente escalado por um fator de 2, e finalmente cada eixo foi aumentado aproximadamente 3 Å. Este procedimento permitiu a definição de um grid abrangendo resíduos conservados contendo toda a região de interesse em torno do sítio ativo. A equação de Poisson foi resolvida utilizando um grid com espaçamento de 0.5 Å, e o potencial foi previamente computado usando o grid inicial (FRADERA et al., 2002).

Com o objetivo de se quantificar a habilidade do sítio ligante de TcTS em interagir com inibidores, foram realizados cálculos de campos de interação molecular (MIFs), utilizando-se os seguintes grupos de prova: molécula de água, metila (prova hidrofóbica), oxigênio de carbonila e oxigênio de carboxila. Estes grupos de prova foram delimitados em um

espaçamento do grid de 0.5 Å, envolvendo todo o sítio ligante. Previamente aos cálculos, átomos de hidrogênio foram adicionados ao modelo usando estados de protonação padrão para os resíduos. Cargas AMBER 99 foram adicionadas aos átomos das proteínas, das quais se retirou todos os ligantes.

3.2.8.3. Estudos de simulações de *docking*

O complexo cristalográfico da enzima TcTS com lactose, selecionado do PDB (código 1MS9), foi escolhido para os cálculos de *docking* dos aceptores **41**, **53**, **2**, **4** e **28** no sítio acceptor de TcTS. Simulações de *docking* flexível foram realizadas utilizando o *software* GOLD 3.1.1 (NISSINK et al., 2002), o qual contém um algoritmo genético. Os cálculos de *docking* foram realizados no interior de uma esfera de 12 Å centralizada no átomo C-6 do resíduo de Asp59 de TcTS. Previamente aos cálculos de *docking* e após a remoção do ligante lactose bem como de moléculas de água, exceto as que estabelecem importantes interações com alguns resíduos de aminoácidos no sítio ativo acceptor, átomos de hidrogênio das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos foram adicionados e orientados utilizando o *software* DS ViewerPro 5.0 (DISCOVERY STUDIO VIEWER PRO). As dez orientações de maior escore para cada composto foram selecionadas utilizando a função de escore denominada GoldScore (NISSINK et al., 2002). Com base nesta função, o programa classifica as orientações das moléculas em ordem decrescente de afinidade (escore, *fitness*) com o sítio ligante do receptor.

3.2.8.3.1. Análise conformacional do glicopeptídeo H₂N-(Thr)₂-[LacNAc- α -Thr]-(Thr)₂-Gly-OH **2**

O glicopeptídeo modelo H₂N-(Thr)₂-[LacNAc- α -Thr]-(Thr)₂-Gly-OH **2** foi submetido a uma minimização de energia utilizando o programa SPARTAN 06 (SPARTAN' 06 full). A análise conformacional do glicopeptídeo **2** foi realizada em água empregando o método de MONTE CARLO, com modelo de mecânica molecular MMFFaq. A conformação de mais baixa energia dentre os 10.000 confôrmeros analisados foi superposta à solução de maior escore obtida nas simulações de *docking* desta molécula com TcTS.

4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos aminoácidos glicosilados β GlcNAc-Thr e α GlcNAc-Thr

Com base na estrutura das moléculas de mucina de *T. cruzi*, as quais são constituídas por unidades externas de β -galactose ligadas, através de resíduos de α GlcNAc, à cadeia peptídica rica em sequência de Thr (AGRELLOS, et al., 2003; PREVIATO, et al., 1998; TODESCHINI, et al., 2001), consideramos a síntese do bloco de construção α GlcNAc-ThrOH de fundamental importância para a preparação de glicoconjugados complexos que mimetizem essas moléculas de mucina, contribuindo para o melhor entendimento do processo de sialilação. A estrutura das glicoproteínas de mucina sugere que aminoácidos glicosilados e glicopeptídeos contendo o resíduo de α GlcNAc como uma ponte entre a unidade externa de β -Gal e o aminoácido Thr possam atuar como substratos aceptores mais eficazes se comparados àqueles contendo somente β -galactose.

No entanto, a formação estereosseletiva do isômero β GlcNAc-ThrOH também é bastante relevante e extremamente interessante, considerando sua potencial aplicação em estudos de mecanismos de transdução de sinais celulares, conforme discutido na seção 1.5 da introdução, bem como em estudos comparativos de estrutura/função da enzima *trans*-sialidase, gerando derivados que podem ser empregados na validação da ação de TcTS.

4.1.1. Reações de Glicosilação

A ligação glicosídica é formada através da substituição nucleofílica de um grupo abandonador (X) ligado à posição anomérica da molécula de açúcar por um álcool ROH, ou por um grupo OH de uma outra molécula de açúcar parcialmente protegida (Esquema 3). O composto que “fornece” a unidade glicosídica é chamado de *doador glicosídico*, e o álcool que a recebe é chamado de *aceptor glicosídico*. A reação geralmente é realizada na presença de um promotor, cuja função é favorecer a saída do grupo abandonador. Os promotores são normalmente empregados em quantidades catalíticas, embora possam ser utilizados estequiometricamente em alguns casos.

Esquema 3. Formação da ligação glicosídica

O desenvolvimento de eficientes métodos para síntese de oligossacarídeos que contenham 2-acetamido-2-desoxi-D-glicosídeos é atualmente um dos mais importantes objetivos em síntese de carboidratos (BOULLANGER, et al., 1990; BONGAT; DEMCHENKO, 2007). O maior obstáculo em sintetizar oligossacarídeos, bem como glicoconjugados contendo 2-amino-2-desoxi-D-glicosídeos, está na dificuldade de preparar açúcares com grupo 2-amino, estruturalmente diversos, que apresentem alta estereosseletividade durante reações de glicosilação (BENAKLI et al., 2001). Haletos α -glicosídicos são amplamente empregados em reações de glicosilação do tipo Koenigs-Knorr (BANOUB, 1992) como espécies doadoras de unidades glicosídicas e geração de derivados substituídos 1,2-trans-2-acetamido-2-desoxi-glicosídicos, com estereosseletividade em relação ao anômero β . Além de haletos, grupos como tricloroacetimidato, mercaptana e derivado sulfóxido podem também ser usados para funcionalização da posição anomérica e ativação da reação de glicosilação (SCHMIDT, 1986). No entanto, apesar da versatilidade da reação de Koenigs-Knorr na preparação de aminoácidos contendo o grupo β GlcNAc, existem alguns problemas que limitam o seu emprego, como a instabilidade dos haletos glicosídicos, baixos rendimentos dependendo do promotor utilizado, dificuldades de desproteção do grupo amino, toxicidade dos promotores e a necessidade de se empregar diversas etapas para obtenção dos produtos desejados (ARSEQUELL, et al., 1994).

Reações de glicosilação que envolvem a posição anomérica de 2-amino-D-glicosídeos podem gerar ligações glicosídicas tanto na posição α como β . Enquanto existem várias estratégias para síntese de 2-amino-D-glicosídeos “ β -linked,” a síntese de 2-amino-D-glicosídeos “ α -linked” limita-se quase que exclusivamente ao emprego de doador 2-azido-glicosídeo, e mais recentemente, de doador oxazolidinona (BENAKLI et al., 2001). O fator determinante para a estereosseletividade dessas reações é se o grupo ligado ao carbono 2 do anel pirano participa ou não da estabilização do carbono anomérico com a saída do grupo

abandonador. Os grupos mais usados para a síntese de derivados *O*-glicosídicos são *N*-ditiasuccinil (Dts) (MEINJOHANNNS et al., 1996), *N*-aliloxicarbonil (Aloc) (MEINJOHANNNS et al., 1995), *N*-tetracloroftaloil (TCP) (SAHA; SCHMIDT, 1997), *N,N*-diacetil, *N*-Phthalimida (Phth) (ELLERVIK; MAGNUSSON, 1996) e *N*-tricloroetoxicarbonil (Troc) (MEINJOHANNNS et al., 1995), e a influência desses grupos no controle da estereosseletividade α/β das reações de glicosilação pode ser representada pelo Esquema 4.

Esquema 4. Importância do grupo ligado ao carbono 2 na estereosseletividade da glicosilação

A estratégia de modificação molecular adotada na preparação de compostos ligados preferencialmente em posição β envolve a introdução de um grupo sacador (GS) de elétrons (CCl_3 do grupo Troc, por exemplo) suficientemente forte para diminuir a nucleofilicidade do oxigênio da carbonila, a fim de impossibilitar o ataque nucleofílico do oxigênio no carbono anomérico (pela face α), gerando o derivado oxazolina estável e não reativo. Se houver um grupo sacador (GS) deve ocorrer apenas estabilização do carbono anomérico (**A**) pela face α , favorecendo o ataque do nucleófilo pela face β (**B**).

A síntese de compostos ligados majoritariamente em posição α envolve a modificação do grupo amino em azido (**C**) ou mesmo o distanciamento da carbonila em relação ao carbono anomérico (oxazolidinona). Em ambos os casos não há participação do grupo ligado ao C-2 na estabilização do carbono anomérico; portanto, o ataque nucleofílico ocorrerá preferencialmente pela face α (**D** e **E**). No caso da oxazolidinona a formação da ligação em α é praticamente 100% (BENAKLI et al., 2001), porém sua síntese é mais complexa do que o 2-azido-glicosídeo.

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

Algumas explicações foram propostas para o efeito anomérico desde sua observação em 1955 por J. T. Edward. A explicação mais simples refere-se ao fato de que a existência de dipolos alinhados envolvendo os heteroátomos cause repulsão entre eles, no caso do substituinte estar na posição equatorial. Em contra partida, os dipolos ficam opostos no caso do substituinte estar na posição axial (não existindo repulsão intensa entre eles), representando um sistema energeticamente mais estável (Esquema 5) (CAREY, 2000; JUARISTI; CUEVAS, 1992).

Esquema 5. Representação da influência dos dipolos nas posições β e α

Uma explicação alternativa e bastante aceita é a de que exista estabilização eletrônica (hiperconjugação) entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio do anel pirano e o orbital sigma antiligante da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons estiver em posição sinperiplanar ao LUMO (Lowest unoccupied molecular orbital) da ligação axial (Esquema 6) (CAREY, 2000; JUARISTI; CUEVAS, 1992). É importante ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do

tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente.

Esquema 6. Influência dos elétrons do oxigênio no orbital antiligante da ligação axial

O alto rendimento e estereosseletividade das reações de glicosilação dependem não somente do doador glicosídico empregado, mas também de reagentes promotores da reação, tais como: trimetilsililoxitriflato (TMSOTf) (SAHA, SCHIMIDT, 1997), triflato de prata (AgOTf) (MEINJOHANN, et al., 1995; BERENGUEL, et al., 1994), dimetilmetiltiosulfonitriflato (DMTST) (SEITZ; WONG, 1997), brometo de mercúrio (HgBr₂) (CARVALHO, et al., 2003) e iodo (BERENGUEL, et al., 1994).

4.1.1.1. Síntese de β GlcNAc-FmocThrOBn a partir de doadores glicosídicos contendo grupo protetor *N*-Troc

Como citado na seção anterior, o grupo *N*-Troc apresenta algumas vantagens como grupo 2-amino protetor (MEINJOHANN, et al., 1995) : i. sua participação como grupo vizinho conduz à formação estereosseletiva de β -glicosídeos; ii. impede a formação do derivado oxazolina estável durante a reação de glicosilação; iii. pode ser removido facilmente em condições brandas; iv. pode ser convertido diretamente ao correspondente derivado *N*-acetil por tratamento com zinco em anidrido acético.

Assim sendo, tendo em vista as vantagens do grupo protetor *N*-Troc, foi investigada a síntese do bloco de construção β GlcNAc-FmocThrOBn **17** a partir do doador glicosídico cloreto de 2-*N*-tricloroetoxicarbonil-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (IMOTO, et al., 1987; PAULSEN; HELPAP, 1991) **10**, cuja síntese foi realizada em duas etapas (Esquema 7).

Esquema 7. Preparação do doador glicosídico **10** a partir de cloridrato de D-glicosamina **9**

Na primeira etapa, com a adição de TrocCl à solução do açúcar **9**, previamente neutralizado com bicarbonato de sódio, houve ataque do grupo amino à carbonila formando o composto *N*-protegido **8** (53%), e na segunda etapa, o composto **8** obtido foi tratado com cloreto de acetila previamente saturado com ácido clorídrico gasoso e anidro. A mistura reacional foi submetida à agitação e refluxo a 40°C durante cerca de 14 horas, após o qual foi evidenciada a formação do produto desejado **10** em placa cromatográfica. No entanto, a purificação do composto obtido por coluna cromatográfica foi de grande dificuldade, sendo possível a obtenção de somente 10mg (4,8%) do produto puro **10**, e as tentativas de cristalização, utilizando-se diferentes misturas de solventes, não foram satisfatórias.

Desta forma, realizou-se a reação de glicosilação do aminoácido éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-treonina (WANG, et al., 1977) **18** com o açúcar **10** na forma bruta, utilizando-se 1,2-dicloroetano como solvente e HgBr₂ como catalisador (CARVALHO, et al., 2003), considerando que sais de mercúrio são promotores potentes para ativar a saída de átomo abandonador de cloro (Esquema 8).

Esquema 8. Mecanismo de reação de glicosilação envolvendo o doador **10**, utilizando HgBr₂ como promotor

A agitação da mistura reacional sob refluxo a 90°C durante 24 horas conduziu à obtenção do bloco de construção **64** (Esquema 9), porém, a purificação do produto obtido por coluna cromatográfica (AcOEt: Hex 7:3 v:v) não possibilitou a separação adequada entre o produto formado **64** e o material de partida **10**.

Esquema 9. Reação de glicosilação para a formação do bloco de construção **64**

Devido à alta instabilidade e difícil purificação do haleto glicosídico **10**, foi realizada a investigação da preparação do doador glicosídico contendo grupo tricloroacetimidato, visto ser este grupo funcional bastante citado na literatura por sua destacada versatilidade, seletividade e obtenção de altos rendimentos (OSBORN, 2003).

Os derivados tricloroacetimidatos são preparados por funcionalização da unidade hidroxílica anomérica livre (desprotegida) utilizando-se tricloroacetetonitrila sob condições básicas (NING, et al., 2003). Dependendo da força da base utilizada na reação de tricloroacetimidação é possível obter tanto o anômero α como o anômero β do tricloroacetimidato desejado, o que é vantajoso, pois os diferentes anômeros possuem comportamentos distintos sob condições que promovem glicosilação via S_N2 . Portanto, a formação preferencial de um dos isômeros durante a reação de formação do doador glicosídico pode ser conseguida através da seleção da base mais adequada bem como da temperatura (JACOBSSON et al., 2006; OSBORN, 2003).

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 glicosídico com o grupo abandonador em posição α permitirá que a ligação glicosídica com o aceptor seja na posição β e vice-versa.

Desta forma, foi realizada a tentativa de preparação do doador glicosídico contendo grupo tricloroacetimidato em etapas (Esquema 10). Inicialmente, foi realizada a reação de per-acetilação do composto **8** na presença de anidrido acético e iodo, reagente barato e de fácil manipulação, capaz de polarizar grupos carbonílicos de anidrido acético e, conseqüentemente, promover reações de acilação; a obtenção do produto per-*O*-acetilado **11** (96%) foi confirmada pelo espectro de RMN ^1H , que apresentou sinais relativos aos grupos *OAc* em δ 2,17- δ 1,95, com valor de integral 12. As próximas etapas envolveram a desproteção (desacetilação) seletiva da hidroxila anomérica de **11** pelo emprego de acetato de hidrazina, seguida da reação de tricloroacetimidação utilizando tricloroacetetonitrila na presença de DBU. No entanto, após agitação da mistura reacional a temperatura ambiente

durante 17 horas não foi verificada a formação do produto desejado 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-*N*-Troc- α -D-glicopiranosil-tricloroacetimidato **65**, de acordo com as análises de RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 10. Método para a preparação do derivado tricloroacetimidato **65**

4.1.1.2. Síntese de β GlcNAc-FmocThrBn **17** e α GlcNAc-FmocThrOBn **19** a partir do derivado cloreto aminoglicosídico α GlcNAcCl

Tendo por base a importância biológica citada para os isômeros β GlcNAc-ThrOH e α GlcNAc-ThrOH e a dificuldade de obtenção dos doadores glicosídicos α GlcNTrocCl **10** e α GlcNTrocOCCl₃CN **65** para emprego em reações de glicosilação, foram estudadas as condições experimentais da reação de glicosilação utilizando o doador cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosídeo **12** (HORTON, 1972), na presença do promotor HgBr₂. Embora o emprego do doador **12** com o aminoácido acceptor FmocThrOBn **18**, com grupo carboxi e amino protegidos, forneça, freqüentemente, produto com alta seletividade β devido à participação do grupo vizinho na posição 2 (assistência anquimérica), foi possível a obtenção de mistura de isômeros β e α . Verificou-se que quanto maior o tempo de reação, maior é a formação do isômero α .

A reação de glicosilação do aminoácido **18** com o açúcar **12**, utilizando-se 1,2-dicloroetano como solvente e HgBr₂ como catalisador, com refluxo direto da mistura reacional durante 9 h (CARVALHO, et al., 2003; CAMPO et al., 2007), conduziu à formação de mistura α/β com rendimentos de 20% e 52% respectivamente (total 72%) (Esquema 11). Ressalta-se que os isômeros α e β puderam ser isolados mediante trabalhoso processo de purificação por coluna cromatográfica em sílica-gel, considerando a proximidade de valores de R_f (0,31 e 0,26) entre eles. A identificação dos blocos β GlcNAc-FmocThrOBn **17** e α GlcNAc-FmocThrOBn **19** foi realizada com base nas constantes de acoplamento dos hidrogênios anoméricos nos espectros de RMN ^1H , respectivamente em δ 4,60 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,1, axial) e δ 4,70 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6, equatorial).

Esquema 11. Preparação do bloco de construção GlcNAc-ThrOBn na forma de mistura anomérica α/β

4.1.1.3. Síntese de β GlcNAc-FmocThrOBn a partir do derivado sal de oxazolina

Considerando que o método de oxazolina, também conhecido como método de Jeanloz (WITTMANN; LENNARTZ, 2002), é capaz de conduzir à síntese de 1,2-*trans*-2-acetamido-2-desoxi glicosídeos e oligossacarídeos, a síntese do bloco de construção β GlcNAc-FmocThrOBn **17** a partir do derivado oxazolina também foi investigada para efeitos comparativos com a metodologia anterior. Dependendo do pH do meio reacional, esta oxazolina pode ser estável e não reativa, ou pode ser parcialmente protonada, podendo reagir com aceptores glicosídicos. Dentre os derivados oxazolíneos mais comumente empregados estão as metil oxazolinas, geradas a partir de derivado acetamido β -per-*O*-acetilado, na presença de ácidos de Lewis, como $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e TMS-triflato. A reação ocorre devido ao ataque nucleofílico do oxigênio do grupo 2-*N*-acetil ao átomo de carbono anomérico, deslocando o grupo abandonador acetato devido à participação do grupo vizinho (ARSEQUELL, 1994) (Esquema 12).

Esquema 12. Mecanismo de formação de oxazolina a partir do derivado acetamido β -per-*O*-acetilado **66**

Assim, foi realizada a tentativa de síntese do bloco de construção $\beta\text{GlcNAc-FmocThrOBn}$ **17** a partir do derivado oxazolina **67** gerado pela conversão total do material de partida 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose **66**, quando tratado com $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ em CH_2Cl_2 anidro. A seguir, o acceptor glicosídico FmocThrOBn **18** foi adicionado ao meio reacional, juntamente com quantidade catalítica de trimetilsililoxitriplatato (TMSOTf), com a finalidade de promover a ativação do derivado oxazolina e conseqüente conversão ao composto **17** (Esquema 13). No entanto, o produto desejado foi obtido em baixo rendimento, 6,9%, possivelmente devido à baixa reatividade ou decomposição de **67**. Em tentativas subseqüentes foi utilizado o promotor CuCl_2 ao invés de TMSOTf , tendo por base descrições na literatura citando este reagente como um eficaz ativador do derivado oxazolina (WITTMANN; LENNARTZ, 2002). Os rendimentos obtidos para o produto **17**, porém, continuaram baixos, em torno de 10%.

Esquema 13. Mecanismo de formação do bloco **17** a partir do derivado oxazolina **67**

4.1.1.4. Reações de desproteção dos compostos $\beta\text{GlcNAc-FmocThrOBn}$ **17** e $\alpha\text{GlcNAc-FmocThrOBn}$ **19**

A etapa final de preparação dos blocos de construção $\beta\text{GlcNAc-FmocThrOBn}$ **17** e $\alpha\text{GlcNAc-FmocThrOBn}$ **19** para posterior acoplamento em cadeia peptídica, envolveu a remoção dos grupos éster *O*-benzílicos de **17** e **19** por meio de reação de hidrogenação catalítica clássica (10% Pd-C/ H_2). Considerando a contaminação do catalisador 10% Pd-C pelo promotor HgBr_2 , existente em quantidades residuais nos materiais de partida, realizou-se a dissolução de **17** e **19** em acetato de etila seguida de lavagem com solução de EDTA 0,5%, previamente à reação de hidrogenação, com a finalidade de sequestrar íons metálicos possivelmente presentes. A seguir, a mistura reacional foi submetida à agitação a temperatura ambiente sob H_2 (~1,5 atm) durante 1 h, com cauteloso monitoramento por placa cromatográfica devido à possibilidade de remoção do grupo *N*-protetor Fmoc em períodos prolongados de reação. Desta forma, os produtos com grupos carboxílicos livres **20** e **21** foram obtidos com rendimentos de 95% (Esquemas 14 e 15).

Com a finalidade de se empregar os aminoácidos glicosilados obtidos em reações enzimáticas com a enzima $\beta 1,4\text{-GalT}$, bem como em ensaios de atividade biológica, os compostos **17** e **19** foram totalmente desprotegidos. O aumento do tempo de reação de hidrogenólise de **17** e **19** para 8 h originou os produtos **24** (93%) e **25** (90%), derivados da dupla desproteção dos grupos carboxílico e amino de **17** e **19**. A desproteção dos grupos *O*-Ac foi conduzida na presença de solução de NaOMe 1 mol/L em metanol até pH básico, seguida de neutralização com resina Dowex 50WX8-200. Desta forma, os compostos totalmente

desprotegidos **22** e **23** foram obtidos com rendimentos de 90% e 88%, respectivamente (Esquemas 14 e 15).

Esquema 14. Reações de hidrogenólise e desacetilação do bloco de construção β GlcNAc-FmocThrOBn **17**

Esquema 15. Reações de hidrogenólise e desacetilação do bloco de construção α GlcNAc-FmocThrOBn **19**

4.2. Preparação do bloco de construção β Gal-ThrOH

A síntese do aminoácido glicosilado éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-L-treonina **26** foi realizada devido à importância da preparação dos glicopeptídeos galactosilados de interesse **45** e **50**, a qual exigiu a obtenção de quantidades satisfatórias deste composto. O bloco de construção β Gal-FmocThrOBn **26** foi preparado pela reação de glicosilação entre o doador glicosídico brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosídeo **13** e o acceptor FmocThrOBn **18**, na presença do solvente acetonitrila e do promotor iodo (KARTHA; FIELD, 1997). Este promotor tem sido descrito na literatura como promotor geral de ativação de doadores glicosídicos, incluindo haletos glicosídicos, tioglicosídeos, tio-ortoésteres, sulfóxidos, selenídeos, fosfitos, imidatos e glicosídeos pentenílicos (KARTHA et al., 2001). De fato, Kharta e col. (KARTHA et al., 1996) descrevem o uso de iodo, muitas vezes em combinação com DDQ (diacetonitrila-dicloroquinona), como reagente extremamente eficiente para conversão de α -haletos em derivados substituídos 1,2-*trans*-glicosídicos, com regiosseletividade em relação ao anômero β . As condições reacionais para a obtenção de **26** envolveram a utilização de 2 eq do açúcar **13**, 1 eq do aminoácido **18** e 2 eq do catalisador iodo, sendo a mistura reacional submetida à agitação a temperatura ambiente durante cerca de 20 horas (Esquemas 16 e 17). O produto **26** foi obtido com rendimento de 27,4%, e em tentativas subseqüentes, nas quais empregou-se menor tempo de reação (6 horas), ou refluxo por 10 e 20 horas, os rendimentos não foram superiores.

Esquema 16. Reação de glicosilação para a formação do bloco de construção β Gal-FmocThrOBn **26** a partir do derivado brometo galactosídico **13**

Esquema 17. Mecanismo de reação de glicosilação na presença do promotor iodo

Como tentativa de se obter melhores rendimentos para o composto **26**, foi realizada a reação de glicosilação utilizando o doador $\beta\text{GalOCCl}_3\text{CN}$ **15** (galactose tricloroacetimidato), previamente sintetizado (CHENG, et al., 2005). Desta forma, a reação entre o doador **15** (1,5 eq) e o aminoácido (1,0 eq) **18**, utilizando-se diclorometano como solvente e TMSOTf (catalítico) como promotor, com agitação da mistura reacional durante 1 h a 0° , conduziu à formação do bloco $\beta\text{Gal-FmocThrOBn}$ **26**, sendo, no entanto, também verificada a formação de subprodutos em placa cromatográfica (Esquema 18). Após purificação por coluna cromatográfica o composto **26** foi obtido com rendimento similar ao anterior (28%), provavelmente devido a um possível excesso do promotor utilizado, o que pode ter ocasionado degradação parcial da mistura reacional.

Esquema 18. Síntese do bloco de construção **26** utilizando o doador galactose tricloroacetimidato na presença do promotor TMSOTf

4.2.1. Reações de desproteção do composto β Gal-FmocThrOBn **26**

A hidrogenólise do grupo protetor benzílico de **26**, para posterior emprego em síntese em fase sólida, foi realizada sob as mesmas condições empregadas para o composto β GlcNAc-FmocThrOBn **17**, com controle rigoroso do tempo reacional, sendo obtido o produto β Gal-FmocThrOH **27** com rendimento próximo de 100% (Esquema 19).

Como forma de explorar a real necessidade da unidade GlcNAc(β ou α) como uma ponte entre a unidade (β)Gal aceptora terminal e o aminoácido treonina, o bloco de construção β Gal-ThrOH **26** foi totalmente desprotegido, considerando a possível transferência de ácido siálico pela enzima TcTS para resíduos (β)Gal diretamente ligados ao aminoácido treonina. A reação de hidrogenólise (8 h) originou o produto **29** (71%), derivado da dupla desproteção dos grupos carboxílico e amino de **26**, e a remoção dos grupos *O*-Ac foi conduzida na presença de solução de NaOMe 1 mol/L em metanol, sendo desta forma obtido o composto **28** com 86% de rendimento (Esquema 19).

Esquema 19. Reações de hidrogenólise e desacetilação do composto **26**

4.3. Síntese dos dissacarídeos glicosídicos α LacNAc-Thr e β LacNAc-Thr

Considerando que as glicoproteínas de mucina de *T. cruzi* são moléculas altamente *O*-glicosiladas, contendo unidades de açúcar ligadas a aminoácidos de treonina, a síntese do dissacarídeo glicosídico α LacNAc-ThrOH e do correspondente isômero β é de fundamental importância para o acoplamento em cadeia peptídica rica em sequência de treonina e posterior ensaio enzimático com a enzima TcTS.

A metodologia utilizada para a preparação do isômero α é normalmente distinta do isômero β , pois se deve eliminar a participação do grupo vizinho. Desta forma, uma abordagem diferente pode ser explorada para geração de aminoácidos α -glicosilados, a qual requer o uso do derivado N₃ para substituição temporária do grupo acetamido (MEINJOHANN, et al., 1997). O tratamento de doadores de β -*N*-acetilglicosamina/lactosamina com TfN₃ (gerado pela reação entre Tf₂O e NaN₃) fornece o correspondente doador β -azidoglicosídeo, cuja reação de glicosilação com Ser ou Thr, na presença de promotores, exclui a participação do grupo azido vizinho e origina preferencialmente o anômero α .

4.3.1. Síntese de doadores glicosídicos

Como precursores dos blocos de construção α LacNAc-ThrOH e β LacNAc-ThrOH, os doadores glicosídicos cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranosila **33** e tricloroacetimidato de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galacto-piranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranosila **36** foram previamente sintetizados.

4.3.1.1. Cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranosila **33**

A síntese do composto **33** foi realizada em quatro etapas a partir do açúcar lactose **68** (Esquema 20). O tratamento de **68** com anidrido acético e HBr (45% em AcOH) forneceu o derivado acetobromo- α -D-lactose **69** em rendimento quantitativo. A eliminação redutiva de **69** com zinco e ácido acético forneceu o D-lactal **35** em 88% de rendimento, o qual foi subsequentelemente submetido à reação de azidonitração (LEMIEUX; RATCLIFFE, 1979), sendo obtido o composto **34**. Esta reação ocorre pela adição de excesso de nitrato de amônio cérico (CAN) e azida de sódio (NaN₃) ao D-galactal/D-lactal protegidos fornecendo misturas epiméricas de 2-azido-2-desoxi-1-*O*-nitropiranosídeos; no entanto, seu mecanismo de ação não está elucidado. O produto **34** foi empregado, sem purificação prévia, na síntese do açúcar α LacN₃Cl **33** pelo tratamento com cloreto de tetra-etilamônio em acetonitrila. O composto **33** foi obtido com rendimento de apenas 30% devido à presença de vários subprodutos verificados em CCD; dois desses subprodutos foram isolados e caracterizados por análise de RMN ¹H como sendo o derivado dissacarídico cloreto de manose **70** e hemiacetal **71** do composto **33** (Figura 22). A formação do derivado **70** (10%) foi possível devido à presença de subproduto da etapa anterior de azidonitração, resultante da adição de grupo azido pela face mais impedida da dupla ligação. O espectro de RMN ¹H de **70** apresentou um dubleto em δ 3,80, referente ao H-2, com $J_{2,3}$ 3,7 Hz, diferentemente do H-2 do cloreto **33** ($J_{2,3}$ 10,3 Hz). Com relação ao hemiacetal **71** (20,6%), a sua formação ocorreu possivelmente devido à existência de quantidade residual de água no solvente utilizado, sendo verificado no espectro de RMN ¹H o dubleto referente ao H-1 em δ 5,53 ($J_{1,2}$ 3,5 Hz). O doador glicosídico puro **33** foi isolado por cristalização seguida de coluna cromatográfica e caracterizado pelas análises ESI-MS e RMN ¹H. No espectro de massas foi verificado o aduto característico 660,1 [M + Na]⁺, e a análise de RMN ¹H apresentou dois dubletos em δ 6,05 ($J_{1,2}$ 3,8 Hz) e δ 4,43 ($J_{1',2'}$

7,7 Hz), correspondentes ao H-1 e H-1', respectivamente, e um multiplete em δ 2,09-1,91, referente aos grupos OAc de **33**.

Esquema 20. Síntese do doador glicosídico **33** a partir de lactose em 4 etapas

Figura 22. Subprodutos da reação para a formação do composto **33**: cloreto de manose **70** e hemiacetal **71**

4.3.1.2. Tricloroacetimidato de 3,6-di-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranosila **36**

A preparação de doadores glicosídicos contendo grupo tricloroacetimidato também foi investigada, considerando as vantagens deste grupo funcional em relação aos haletos glicosídicos, conforme citado na seção 4.1.1.1.

O composto **36** foi sintetizado em duas etapas a partir do composto **34**, intermediário da reação anterior. O tratamento de **34** com NaNO_2 e H_2O em 1,4-dioxano por 10 horas a 80°C forneceu o hemiacetal **37**, o qual foi submetido sem purificação prévia à reação com CCl_3CN e 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene (DBU) em diclorometano anidro, conduzindo à formação do α -imidato **36** (Esquema 21) (LI et al., 2003). A utilização de uma base fraca como K_2CO_3 conduz preferencialmente à formação do anômero β (produto cinético), enquanto uma base forte como DBU favorece a formação do anômero α (produto

termodinâmico) (SCHMIDT; MICHEL, 1984) (Esquema 22). O produto **36** foi obtido com rendimento de apenas 30% devido a perdas no processo de purificação, sendo confirmado pela análise de RMN ^1H , a qual apresentou um singlete característico em δ 8,65 correspondente ao imidato NH.

Esquema 21. Síntese do doador tricloroacetimidato **36** em etapas

Esquema 22. Formação do derivado tricloroacetimidato (produto cinético ou termodinâmico) em presença de base fraca ou forte.

4.3.2. Reações de Glicosilação

Com base no resultado satisfatório obtido na reação de glicosilação para a síntese dos aminoácidos glicosilados **17** e **19**, na qual empregou-se o catalisador HgBr_2 , as reações de glicosilação para a formação dos blocos de construção $\alpha\text{LacN}_3\text{-FmocThrOBn}$ **39** e o correspondente isômero $\beta\text{LacN}_3\text{-FmocThrOBn}$ **72**, envolvendo os doadores glicosídicos **33** e **36**, foram também realizadas utilizando este promotor, na presença de diferentes solventes (1,2-dicloroetano e acetonitrila). A reação entre o haleto glicosídico $\alpha\text{LacN}_3\text{Cl}$ **33** e o aminoácido FmocThrOBn **18** foi primeiramente realizada em 1,2-DCE com agitação da mistura reacional por 12 h seguida de refluxo por 9 h a 90°C (Esquemas 23 e 24) (CARVALHO, et al., 2003). Como esperado, o produto principal foi o isômero α devido à presença do grupo azido não participante em C-2 (CAMPO et al., 2007). O espectro de RMN ^1H do produto $\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN}_3(1\rightarrow\text{O})\text{-L-FmocThrOBn}$ **39**, obtido com 60% de rendimento, apresentou dois dubletos em δ 4,80 ($J_{1,2}$ 3,7 Hz) e δ 4,47 ($J_{1',2'}$ 7,8 Hz), correspondentes ao H-1 e H-1', respectivamente, vários singletos sobrepostos em δ 2,16-1,96, referentes aos grupos OAc , além de um dubleto em δ 1,33 (J 6,5 Hz), relativo a CH_3Thr . Na análise ESI-MS foi verificado o aduto característico $1050,38 [\text{M} + \text{NH}_4]^+$.

Esquema 23. Síntese do dissacarídeo glicosídico **39** a partir do haleto **33**

Esquema 24. Mecanismo da reação de glicosilação para a formação do bloco **39**

Como forma de se obter o isômero β **72** a reação de glicosilação acima citada também foi realizada na presença do solvente acetonitrila, tendo em vista que este favorece a formação preferencial do isômero β (Esquema 25). Isto pode ser atribuído à participação do solvente durante a reação; o ataque da acetonitrila ao íon oxocarbênio intermediário conduz à rápida

formação do conjugado α -nitrilium-nitrila (produto cinético) e subsequente formação do produto β (SCHIMIDT, et al., 1990; MITCHELL, et al., 2001). Devido à baixa formação do conjugado β -nitrilium-nitrila, termodinamicamente mais estável, o produto α ligado é obtido como produto minoritário da glicosilação. No entanto, não foi possível a obtenção do isômero β na presença de acetonitrila e o rendimento para o isômero α foi reduzido (10%).

Esquema 25. Mecanismo de participação do solvente acetonitrila durante a reação de glicosilação para a formação do isômero β **72**

Com o objetivo de se obter maior rendimento para o isômero α **39** e possivelmente o isômero β **72**, a reação de glicosilação utilizando o derivado tricloroacetimidato **36**, em presença do solvente acetonitrila, foi realizada considerando suas vantagens sobre os haletos glicosídicos (Esquema 26). O resultado obtido com a reação de glicosilação foi, porém,

similar ao obtido com o haleto glicosídico **33**: o isômero α foi obtido com rendimento de apenas 15%, não sendo possível a obtenção do isômero β .

Esquema 26. Síntese do dissacarídeo glicosídico **39** a partir do doador tricloroacetimidato **36**

Considerando a impossibilidade de obtenção do bloco β LacN₃-FmocThrOBn **72** nas reações supracitadas, novas rotas sintéticas utilizando o doador glicosídico β LacNAcSAc **38** (β -tioacetato-*N*-acetillactosamina), contendo o grupo participante 2-*N*-acetil, foram investigadas para a formação do produto β LacNAc-FmocThrOBn **73**. O composto **38** foi obtido a partir do tratamento do açúcar α LacN₃Cl **33** com excesso de ácido tioacético em piridina durante 4 h à temperatura ambiente (MATSUOKA et al., 2003) (Esquema 27). A obtenção do produto **38** (90%) foi comprovada pelo espectro de RMN ¹H, o qual apresentou dois dubletos em δ 5,09 ($J_{1,2}$ 10,9 Hz) e δ 4,49 ($J_{1',2'}$ 7,9 Hz), referentes aos hidrogênios H-1 e H-1', respectivamente, e um singlete característico em δ 2,35 relativo ao grupo SAc.

Esquema 27. Síntese do derivado β -tioacetato-*N*-acetillactosamina **38** a partir do doador **33**

A seguir, a reação de glicosilação do doador **38** com o aminoácido FmocThrOBn **18** foi realizada em equipamento de microondas (BIOTAGE), utilizando PyOTf (catalisador) (MOHAN et al., 2003) e 1,2-DCE (solvente) a 80°C durante 40 min (Esquema 28). No entanto, não foi verificada nenhuma conversão dos materiais de partida ao produto desejado **38**, o que sugeriu a investigação da reação de glicosilação a partir do derivado oxazolina.

Desta forma, o tratamento de **38** com BF₃.Et₂O em CH₂Cl₂ anidro, a -20°C durante 5 h conduziu à formação do derivado oxazolina **74**, o qual foi diretamente empregado na reação de glicosilação com o aminoácido **18** (Esquema 29). Desta forma, a reação foi realizada em equipamento de microondas (BIOTAGE), sob as mesmas condições descritas anteriormente, e

conforme observado para a reação de glicosilação empregando o produto **38**, não foi possível a obtenção do dissacarídeo glicosídico **73** a partir da oxazolina **74** (Esquema 29).

Esquema 28. Reação de glicosilação para a formação do produto **38**.

Esquema 29. Síntese de oxazolina **74** a partir do composto **38** e reação de glicosilação para a formação de **73**.

4.3.3. Acetilação redutiva e desproteção do dissacarídeo **39**

O grupo azido na posição C-2 do composto **39** foi simultaneamente reduzido e acetilado na presença de zinco em THF/ anidrido acético/ ácido acético, 3:2:1 (Esquema 30); quantidade catalítica de sulfato de cobre também foi adicionada à mistura reacional para ativar o átomo de zinco (WINANS et al., 1999). Após cerca de 30 min. o grupo azido de **39** foi convertido no derivado acetamido **40**, isolado em 65% de rendimento (CAMPO et al., 2007). No espectro de RMN ^1H do composto **40** foram verificados dois dubletos entre δ 5,85-5,60, referentes aos grupos NH, e o CH_3 do grupo acetamido foi observado como um singlete em δ 1,80. A análise ESI-MS apresentou o aduto 1049,37 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

A etapa final de preparação do dissacarídeo glicosídico **40** para posterior acoplamento em cadeia peptídica envolveu a remoção do grupo éster *O*-benzílico por meio de hidrogenação catalítica clássica (10% Pd-C/H₂), sendo obtido desta forma o produto **75** (90%) após 1 h de reação (Esquema 31). A completa desproteção do dissacarídeo glicosídico **40** foi necessária para a realização dos ensaios enzimáticos com a enzima TcTS. O aumento do tempo de reação de hidrogenólise do composto **40** para cerca de 10 h conduziu à remoção dos grupos éster *O*-Bn e *N*-Fmoc e conseqüente obtenção do produto **76** com 80% de rendimento. A desproteção dos grupos *O*-Ac de **76** foi realizada na presença de solução de NaOMe 1 mol/L até pH básico, seguida de neutralização com resina Dowex 50WX8-200 (Esquema 31). O composto totalmente desprotegido **41**, obtido com rendimento de 90%, foi identificado pelo espectro de RMN ¹H, o qual não apresentou os sinais relacionados aos grupos *N*-Fmoc e *O*-Bn em δ 7,78-7,20 e apenas um único singlete em δ 1,80 para o CH₃ do grupo acetamido, confirmando a remoção dos grupos *O*-Ac. No espectro ESI-MS do composto **41** observou-se o aduto característico 507,1 [M + Na]⁺.

Esquema 31. Reações de hidrogenólise e desacetilação do composto **40**

4.4. Síntese de glicopeptídeos em fase sólida

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos na preparação dos glicopeptídeos β -D-GlcNAc-(Thr)₆-GlyOH **43**, β -D-Gal-(Thr)₆-GlyOH **45**, NH₂(Thr)₂-(β GlcNAc)-(Thr)₃-GlyOH **1**, α -D-GlcNAc-(Thr)₅-Thr[β -D-GlcNAc]-GlyOH **48**, β -D-Gal-Thr-Thr[β -D-Gal]-Thr-Thr[β -D-Gal]-Thr-ThrGlyOH **50**, NH₂(Thr)₂-(α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **2** e NH₂(Thr)₂-(β GlcNAc)-(Thr)₃-(α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **3**, possíveis substratos para o estudo com as enzimas β -1,4-galactosiltransferase (β -1,4GalT) e *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS).

A síntese de peptídeos em fase sólida tem uma série de vantagens sobre os métodos em solução; (i) as reações podem ser realizadas na presença de grande excesso dos reagentes, forçando a obtenção do produto; (ii) o excesso dos reagentes e sub-produtos da reação podem ser removidos através de sucessivas lavagens da resina; (iii) as perdas do produto são mínimas porque ele permanece ligado à resina durante toda a síntese; (iv) reações que apresentam baixa quimiosseletividade podem ser melhoradas ligando determinado grupo funcional ao suporte sólido para implementar a formação do produto desejado e, (v) permite a preparação de compostos análogos em série, como em síntese combinatória (CHAN; WHITE, 2000; SEEGER; HAASE, 2000).

A escolha do suporte ou resina é fundamental; o primeiro aminoácido a ser introduzido representará, após o alongamento da cadeia peptídica, a porção C-terminal. Os aminoácidos Cys, His e Pro, nestas posições, podem sofrer enantiomerizações nas condições

experimentais, principalmente quando ligadas a resinas do tipo Wang, contendo grupo hidróxi-benzílico. Além disto, o resíduo de Pro, neste mesmo tipo de resina, pode sofrer reação de ciclização, dando origem a derivados de dicetopiperazina, na etapa de desproteção do grupo Fmoc (CHAN; WHITE, 2000).

Apesar destes problemas, a resina de Wang é um suporte padrão em síntese em fase sólida com aminoácidos *N*-Fmoc protegidos, não apenas pela sua facilidade de manipulação, mas também pela clivagem seletiva do peptídeo na presença de ácido trifluoracético (TFA). A resina de Wang é uma mistura de clorometilpoliestireno (50-100, 100-200, 200-400 mesh) com divinilbenzeno (1%), modificada com unidades de álcool hidroxibenzílico. Normalmente, é possível ligar cerca de 0,5 até 1,6 mmol de aminoácido por grama de resina, que representa alta eficiência e rendimento do produto desejado. A resina utilizada para o acoplamento de aminoácidos foi a resina Wang-FmocGly, comercializada pela NovaBiochem, com capacidade de ligação de 0,65 mmol de aminoácido por grama de resina.

O primeiro resíduo, Gly, a ser introduzido na resina, é extremamente importante; se a taxa de ligação for baixa o rendimento do peptídeo final será insignificante. Neste caso, pode também ocorrer a formação de sub-produtos, em consequência da ligação de resíduos em posições livres da resina. Desta forma, a aquisição da resina Wang-FmocGly, comercial, previamente acoplada ao resíduo de Gly, veio a evitar problemas decorrentes de um baixo resultado de acoplamento, normalmente obtido na primeira etapa.

4.4.1. Reações de Acoplamento

As reações de acoplamento foram realizadas em frasco cilíndrico, com placa sinterizada para filtração e torneira de três saídas na parte inferior para agitação da mistura reacional através do borbulhamento de N₂ (Figura 23).

Figura 23. Frasco cilíndrico utilizado para síntese em fase sólida

O acoplamento dos aminoácidos e blocos de construção, para alongamento da cadeia peptídica, foram efetuados em DMF, na presença dos reagentes de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio), HOBt (1-hidroxi-benzotriazol), usado para evitar possíveis reações de enantiomerização, e a base DIPEA (diisopropiletilamina) (CHAN; WHITE, 2000; DANIELI et al., 2001). O mecanismo da reação de acoplamento envolve inicialmente a desprotonação do ácido carboxílico, do correspondente aminoácido a ser introduzido na cadeia. O átomo de oxigênio do ácido, negativamente carregado, ataca primeiro o íon fosfônio da molécula de PyBOP, liberando o grupo hidróxi-benzotriazol e ficando na forma de éster tripirrolidinofosfônio. A esterificação do grupo carboxilato é facilitada devido à polarização da ligação fósforo-oxigênio. O caráter nucleofílico do grupo hidróxi-benzotriazol liberado força o ataque no carbono carbonílico do aminoácido, deslocando o grupo oxitripirrolidinofosfônio. O éster resultante contém o grupo abandonador necessário, que será ativado durante o ataque nucleofílico do grupo amino terminal do aminoácido ligado à resina (Esquema 32).

Esquema 32. Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo a utilização do reagente PyBOP

Os carboidratos *O*-protegidos (*O*-Ac) foram introduzidos à cadeia peptídica pela ligação dos correspondentes aminoácidos glicosilados (blocos de construção **20**, **27** e **21**) e dissacarídeo glicosídico α LacNAc-FmocThrOH **75** pré-formados. O tempo de reação de acoplamento variou de 3 h a 24 h para os aminoácidos de treonina, dependendo do acoplamento prévio envolvendo um aminoácido livre ou bloco de construção, respectivamente. O tempo de reação de acoplamento para os aminoácidos glicosilados β GlcNAc-FmocThrOH **20** e β Gal-FmocThrOH **27** foi de 24 h, e para os blocos de construção α GlcNAc-FmocThrOH **21** e α LacNAc-FmocThrOH **75** foi de 48 h e 72 h, respectivamente. Após cada acoplamento as misturas reacionais foram filtradas e a resina lavada três vezes com DMF, DCM e MeOH e seca em alto vácuo. As reações foram monitoradas a partir de amostras de resina, pelo teste de Kaiser, o qual é capaz de avaliar a existência de grupo amino livre, e em espectrofotômetro UV (290 nm), pela liberação de dibenzofulveno. O procedimento clássico de desproteção do grupo *N*-Fmoc envolve o tratamento do aminoácido ou bloco de construção com piperidina 20% em DMF. O mecanismo da clivagem é E1cb e ocorre via formação do ânion dibenzofulveno estabilizado. O grupo Fmoc é desprotonado pela base piperidina para fornecer o ânion ciclopentadienílico, o qual se rearranja para o correspondente derivado dibenzofulveno, eliminado do aminoácido. O ânion carboamida, instável, se decompõe imediatamente para fornecer dióxido de carbono e grupo amino livre. Posteriormente, a molécula de dibenzofulveno é atacada por piperidina, originando o aduto dibenzofulveno-piperidina (Esquema 33). O derivado dibenzofulveno é um composto aromático passível de ser detectado no UV, tornando possível, portanto, a monitorização mais detalhada das reações de acoplamento. Os valores de acoplamento obtidos para aminoácidos livres ou glicosilados variaram entre 0,35 e 0,60 mmol/g de resina.

Esquema 33. Procedimento clássico de desproteção de grupo *N*-Fmoc com conseqüente formação de dibenzofulveno

Após o acoplamento de todos os aminoácidos livres ou glicosilados, a resina foi tratada com TFA 95% em água, devido às propriedades “scavenger” deste solvente. Os produtos isolados foram concentrados, com auxílio de co-evaporação com tolueno para completa eliminação de TFA, e tratados com éter gelado para formação de um filme cristalino. Os glicopeptídeos sintetizados em fase sólida **42**, **44**, **46**, **47**, **49**, **51** e **52**, obtidos com rendimentos entre 40% e 75%, com relação à taxa teórica de acoplamento (0,65 mmol/g), estão apresentados na Figura 24.

Figura 24. Representação dos glicopeptídeos sintetizados em suporte sólido, contendo açúcares de β GlcNAc, α GlcNAc, β Gal e α LacNAc em posições estratégicas na cadeia peptídica para aplicação em ensaios enzimáticos

4.4.2. Síntese dos Glicopeptídeos 42, 44 e 46

O peptídeo **77**, precursor dos glicopeptídeos **42** e **44**, contendo as unidades de açúcar β GlcNAc e β Gal, respectivamente, foi inicialmente sintetizado a partir de seis reações de acoplamento do aminoácido treonina, com grupo carboxílico livre e amino *N*-protegido por grupo Fmoc, em excesso de 2 eq em relação à capacidade de acoplamento da resina (Esquema 34). O índice de incorporação de cada aminoácido, obtido com base na absorbância de dibenzofulveno liberado, foi em torno de 80%.

Esquema 34. Síntese do peptídeo **77** e precursor **78** dos glicopeptídeos de interesse **42** e **44**

Os blocos de construção β GlcNAc-FmocThrOH **20** e β Gal-FmocThrOH **27**, na proporção de 1,5 eq para 1 eq de aminoácido acoplado à resina, foram acoplados à cadeia peptídica (Esquema 35), sendo o tempo de reação de acoplamento 24 h. As taxas de acoplamento verificadas para os blocos **20** e **27** foram de 58% e 49%, respectivamente, inferiores, portanto, à média das taxas de acoplamento verificadas para os aminoácidos da cadeia peptídica (80%). Estes valores mais baixos são decorrentes do maior impedimento estérico dos blocos de construção quando comparados aos aminoácidos livres. A partir de 100 mg de resina utilizada separadamente para o acoplamento dos correspondentes blocos **20** (54 mg, 0,08 mmol) e **27** (52 mg, 0,07 mmol), foi possível a obtenção de 34,5 mg (0,034 mmol, 71%) do glicopeptídeo **42** e 30 mg (0,03 mmol, 60%) do glicopeptídeo **44**. Os glicopeptídeos **42** e **44** foram identificados pelos espectros de RMN ^1H , os quais apresentaram sinais característicos dos produtos desejados, atribuídos pela análise comparativa dos espectros de **42** e **44** (Tabela 2) com os espectros de RMN ^1H dos blocos de construção **20** e **27**, e do peptídeo **77**. A obtenção do glicopeptídeo **42** foi também confirmada pela análise ESI-MS, com aduto característico 1011,5 $[\text{M} + \text{H}]^+$, não sendo realizada, no entanto, a análise ESI-MS do glicopeptídeo **44**.

Esquema 35. Síntese dos glicopeptídeos **42** e **44** a partir do precursor **78**

A síntese do glicopeptídeo **46** foi iniciada a partir de duas reações de acoplamento do aminoácido FmocThrOH, em excesso de 2 eq em relação à capacidade de acoplamento da resina. Cerca de 100 mg de resina contendo dois resíduos de treonina acoplados foram utilizadas para o acoplamento do bloco de construção **20**, empregado na proporção de 1,5 eq para 1 eq de aminoácido acoplado à resina. Após as reações de acoplamento dos dois últimos aminoácidos ter sido realizada, o glicopeptídeo **46** formado foi tratado com solução de TFA 95% para clivagem da resina (Esquema 36). As taxas de acoplamento para os aminoácidos de treonina foram em torno de 80%, enquanto a taxa verificada para o bloco de construção **20** foi de 65%. O glicopeptídeo **46** obtido (0,037 mmol, 75%) foi identificado pelo espectro de RMN ^1H , o qual apresentou sinais característicos do produto desejado, como apresentado na Tabela 2.

Esquema 36. Síntese do glicopeptídeo **46** em fase sólida

Tabela 2- Dados dos espectros de RMN ^1H dos glicopeptídeos **42**, **44** e **46**

Glicopeptídeo 42		
Deslocamento Químico (δ)	Integral Relativa	Hidrogênios Referentes
δ 5,12, δ 4,93 e δ 4,80	1:1:1	H-3, H-4 e H-1
δ 4,45- δ 4,00	12	12 x CH Thr
δ 3,85- δ 3,75	6	H-2, H-6a, H-6b, H-5, CH ₂ Gly
δ 1,98- δ 1,83	12	CH ₃ CO
δ 1,10- δ 1,00	18	CH ₃ Thr
Glicopeptídeo 44		
Deslocamento Químico (δ)	Integral Relativa	Hidrogênios Referentes
δ 5,35-4,80	1:1:1:1	H-4, H-3, H-2, H-1
δ 4,40- δ 4,00	12	12 x CH Thr
δ 3,90- δ 3,80	5	H-6a, H-6b, H-5 e CH ₂ Gly
δ 2,10, δ 1,98, δ 1,92 e δ 1,83	12	CH ₃ CO
δ 1,10- δ 1,00	18	CH ₃ Thr
Glicopeptídeo 46		
Deslocamento Químico (δ)	Integral Relativa	Hidrogênios Referentes
δ 4,85, δ 4,75 e δ 4,68	1:1:1	H-3, H-4 e H-1
δ 4,45- δ 4,00	10	10 x CH Thr
δ 3,90- δ 3,55	6	H-2, H-6a, H-6b, H-5, CH ₂ Gly
δ 1,98, δ 1,92, δ 1,89 e δ 1,83	12	CH ₃ CO
δ 1,20- δ 1,00	15	CH ₃ Thr

4.4.3. Síntese do Glicopeptídeo 47

O glicopeptídeo **47** foi sintetizado com o objetivo de se investigar a seletividade das reações enzimáticas com β 1,4-GalT e TcTS para introdução das unidades de galactose e ácido siálico, respectivamente, nos resíduos β GlcNAc e/ ou α GlcNAc.

O procedimento para a preparação do glicopeptídeo **47** foi realizado de modo semelhante à síntese dos glicopeptídeos **42**, **44** e **46**, mas empregando o bloco de construção β GlcNAc-FmocThrOH **20** no primeiro acoplamento (Esquema 37). A taxa de ligação do bloco **20** medida pelo teste de dibenzofulveno foi cerca de 70%, no entanto, o acoplamento subsequente do aminoácido FmocThrOH foi menor (55%) nas condições anteriormente empregadas (2 eq de aminoácido e 3 h de reação), sugerindo possível impedimento estérico exercido pelo resíduo de açúcar na cadeia. Por esta razão o acoplamento foi repetido empregando 3 eq de aminoácido e manutenção da reação por aproximadamente 10 horas. Desta forma, a taxa de acoplamento foi elevada para 75% e nos experimentos que envolveram a preparação dos glicopeptídeos **49**, **51** e **52** (descritos a seguir) estas condições foram empregadas sempre que houve a necessidade de adição de aminoácido após a introdução de bloco contendo açúcar. A taxa de incorporação do bloco de construção α GlcNAc-FmocThrOH **21**, no último acoplamento realizado durante 48 h, foi reduzida (53 %) em relação ao bloco **20** e a repetição do acoplamento, antes da remoção do grupo *N*-Fmoc e clivagem da resina, não conduziu ao aumento deste valor.

O glicopeptídeo **47** foi obtido com 63% de rendimento (54,5 mg, 0,04 mmol), com base na taxa de incorporação teórica da resina, e a identificação do produto desejado foi realizada pelas análises de RMN ^1H e ESI-MS. O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos das unidades de açúcar β GlcNAc e α GlcNAc na região entre δ 5,27 e δ 4,76 (H-3, H-3', H-4, H-4', H-1 e H-1'), com valores de integrais relativas 2:2:2, e em δ 2,12- δ 1,98 (24 H, COCH₃), além do multiplete referente aos grupos CH₃ Thr da cadeia peptídica, com integral 18, na região entre δ 1,25 e δ 1,10. Na análise ESI-MS de **47** foi verificado o aduto desejado 1340,8 [M + H]⁺.

Esquema 37. Preparação do glicopeptídeo **47** em suporte sólido, empregando os blocos de construção βGlcNAc-FmocThrOH **20** e αGlcNAc-FmocThrOH **21**

4.4.4. Síntese do Glicopeptídeo **49**

Como forma de explorar a real necessidade da unidade GlcNAc(β ou α) como uma ponte entre a unidade (β)Gal aceptora terminal e a cadeia peptídica, foi preparado o glicopeptídeo poligalactosilado **49**, além do glicopeptídeo **44** citado na seção 4.4.2, considerando a possível transferência de ácido siálico pela enzima TcTS para resíduos (β)Gal diretamente ligados à cadeia peptídica. Dependendo dos resultados dos ensaios com a enzima, novos glicopeptídeos poderão ser preparados variando-se as posições relativas e número dos açúcares, bem como a extensão da cadeia peptídica.

A síntese do glicopeptídeo **49** em suporte sólido foi realizada em várias etapas, de acordo com o procedimento descrito para os glicopeptídeos anteriores (Esquema 38), sendo verificadas taxas de acoplamento em torno de 64% para os resíduos de aminoácido treonina e 49% para as unidades de βGal-FmocThrOH **27**. O glicopeptídeo **49**, obtido com rendimento de 42% (0,027 mmol), foi identificado pelas análises de RMN ¹H e ESI-MS. O espectro de

RMN ^1H de **49** apresentou sinais característicos como: quatro multipletos em δ 5,40, δ 5,17, δ 5,00 e δ 4,90, com valores de integrais relativas 3:3:3:3, relativos aos hidrogênios H-4, H-3, H-2 e H-1 das unidades de galactose, respectivamente, um multipletto entre δ 2,17 e δ 1,90, com integral 36, correspondente aos grupos *O*-Ac dos resíduos de açúcar; e um multipletto entre δ 1,25 e δ 1,00, com integral 18, relativo aos grupos CH_3 Thr. O espectro de ESI-MS do glicopeptídeo **49** apresentou o aduto 1692,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, condizente com o valor de massa do produto desejado (1671,0).

Esquema 38. Síntese do glicopeptídeo poligalactosilado **49** em várias etapas

4.4.5. Síntese dos Glicopeptídeos 51 e 52

O glicopeptídeo **51** foi sintetizado com a finalidade de ser empregado diretamente em ensaios enzimáticos com a enzima TcTS e o glicopeptídeo **52** obtido foi submetido à reação com a enzima β 1,4-GalT para a síntese do glicopeptídeo **5**, contendo as unidades α LacNAc e β LacNAc ligadas em diferentes posições da cadeia peptídica.

A síntese do glicopeptídeo **51** foi realizada de forma semelhante ao glicopeptídeo **46**, partindo-se do intermediário **79** (100 mg), contendo dois resíduos de treonina acoplados à resina FmocGlyWang (Esquema 39) (CAMPO et al., 2007). O dissacarídeo glicosídico **75** foi empregado na proporção de 2 eq para 1 eq de aminoácido acoplado à resina, sendo as taxas de acoplamento obtidas para os aminoácidos de treonina em torno de 60%, enquanto a taxa verificada para o dissacarídeo glicosídico **75** foi de 37%; este valor mais baixo é decorrente do maior impedimento estérico de **75** quando comparado a aminoácidos livres e aos blocos de construção constituídos por somente uma unidade de açúcar. O glicopeptídeo **51** obtido (0,025 mmol, 50%) foi identificado pelo espectro de RMN ^1H , o qual apresentou sinais característicos do produto desejado, como apresentado na Tabela 3.

A preparação do glicopeptídeo **52** em fase sólida, envolvendo várias etapas de síntese, está apresentada no Esquema 40. As taxas de acoplamento verificadas para os aminoácidos de treonina variaram entre 50% e 65%, e para os compostos α LacNAc-Thr e β GlcNAc-Thr

3.

Esquema 40. Procedimento de síntese do glicopeptídeo **52** em fase sólida

Tabela 3- Principais dados dos espectros de RMN ^1H dos glicopeptídeos **51** e **52**

Glicopeptídeo 51		
Deslocamento Químico (δ)	Integral Relativa	Hidrogênios Referentes
δ 5,25, δ 5,00, δ 4,85, δ 4,83	1:1:1:1	H-4, H-3', H-3 e H-1
δ 4,20- δ 3,90	12	$\alpha\text{CH Thr}$, βCHThr , H-6a, H-6b
δ 2,10- δ 1,90	21	CH_3CO
δ 1,20- δ 1,00	15	$\text{CH}_3\text{ Thr}$
Glicopeptídeo 52		
Deslocamento Químico (δ)	Integral Relativa	Hidrogênios Referentes
δ 5,22- δ 4,50	6	H-4', H-4'', H-3', H-3'', H-1, H-1''
δ 4,25- δ 3,40	16	16 x CH Thr
δ 2,10- δ 1,85	33	CH_3CO
δ 1,30- δ 1,00	24	$\text{CH}_3\text{ Thr}$

4.4.6. Reação de O-desacetilação

Após a clivagem da resina os glicopeptídeos **42**, **44**, **46**, **47**, **49**, **51** e **52** foram submetidos à reação de desacetilação para desproteção dos grupos hidroxílicos das unidades de açúcar. A reação foi efetuada com solução de NaOMe 1mol/L, em quantidade catalítica, sendo realizado o controle do pH da mistura reacional; algumas gotas da solução de base foram introduzidas até obtenção de pH em torno de 9-10. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 3 h (glicopeptídeos **42**, **44** e **46**), 8 h (glicopeptídeos **47** e **51**) ou 12 h (glicopeptídeos **49** e **52**) e no final, foi tratada com resina Dowex 50WX8-200 (Sigma) até pH neutro para troca dos íons Na^+ e H^+ e a seguir foi filtrada (Esquema 41).

Esquema 41. Exemplo de procedimento de reação de desacetilação aplicado ao glicopeptídeo **51** e demais glicopeptídeos

A seguir, os glicopeptídeos desacetilados **43**, **45**, **1**, **48**, **50**, **2** e **3**, foram purificados por CLAE (CAMPO et al., 2006), utilizando-se coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) para os glicopeptídeos **1**, **2** e **3** ou CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm, Shimadzu Shim-PaK) para os demais glicopeptídeos, com gradiente linear de 0-30% CH₃CN: 0.1% aq TFA e fluxo de 1,0 mL/min. Os glicopeptídeos **43**, **45**, **1**, **48**, **50**, **2** e **3**, obtidos com rendimentos de 29%, 28,5%, 14%, 25%, 21%, 22% e 20%, respectivamente, após purificação por CLAE, foram verificados nos correspondentes tempos de retenção (t_R) 7,5, 7,2, 13,0, 5,5, 6,4, 13,5 e 13,6 min, e comprovados pelas análises de RMN ¹H, as quais apresentaram a ausência de sinais relativos aos grupos OAc das unidades de açúcar, e ESI-MS. A Tabela 4 apresenta os resultados das análises ESI-MS correspondentes aos tempos de retenção obtidos por análise CLAE dos glicopeptídeos **43**, **1**, **48**, **50** e **2**. Os glicopeptídeos **45** e **3** foram identificados somente pelo espectro de RMN ¹H, não sendo analisados por ESI-MS.

Tabela 4. Análises ESI-MS e CLAE dos glicopeptídeos desacetilados

Glicopeptídeo	Análise ESI-MS	Análise CLAE (t_R)
43	885,5 $[M + H]^+$	7,5
1	847.47 $[M + H]^+$	13,0
48	1088,7 $[M + H]^+$	5,5
50	1168,4 $[M + H]^+$	6,4
2	946.40 $[M + H]^+$	13,5

4.5. Síntese Enzimática com β 1,4-GalT

A enzima bovina β -1,4-galactosiltransferase (β 1,4-GalT) é régio e estereosseletiva para realizar a galactosilação da posição 4-OH do resíduo de GlcNAc aceptor, originando o correspondente derivado com configuração β em alto rendimento (KOELLER; WONG, 2000; DANIELI, et al., 2001). β 1,4-GalT é uma das glicosiltransferases mais utilizadas em síntese e melhor caracterizada, incluindo estrutura cristalográfica de raio X de alta resolução. *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) foi um dos primeiros açúcares preparados pelo sistema multienzimático (Esquema 42), a partir de substratos simples e mais baratos, como glicose-6-fosfato usada para geração de glicose-1-fosfato, pela ação da enzima fosfoglicomutase (PGM), e cuja conversão em α -UDP-Glc na presença de UTP é realizada pela enzima UDP-Glc pirofosforilase. UTP é regenerado no sistema a partir de UDP e fosfoenolpiruvato pela reação catalisada por piruvato quinase (PK). A transformação de α -UDP-Glc em α -UDP-Gal é realizada pela enzima UDP-Gal-4-epimerase, que permite a inversão da configuração C-4. O produto LacNAc é finalmente obtido pela transferência do resíduo de UDP-Gal para a posição 4 de *N*-acetilglicosamina pela ação de β 1,4-GalT. As reações catalisadas por estas enzimas conduzem à liberação do correspondente nucleotídeo difosfato livre UDP, com grande capacidade de inibir a enzima galactosiltransferase e diminuir o rendimento do glicoconjugado final. Por esta razão, alguns protocolos empregam fosfatase alcalina para direcionar o equilíbrio na formação dos produtos, pela clivagem hidrolítica de UDP em uridina e fosfato.

Esquema 42. Síntese do dissacarídeo LacNAc, empregando β 1,4-GalT para formação régio e estereosseletiva da ligação glicosídica, em sistema multienzimático de reciclagem de UDP liberado na reação; sendo PGM: fosfoglucomutase, PK: piruvato quinase, GalT: galactosil-transferase.

4.5.1. Preparação de β LacNAc-O-CH(CH₃)₂ **93** como modelo enzimático e dissacarídeos glicosídicos β LacNAc-ThrOH **53** e α LacNAc-ThrOH **41** (preparado anteriormente por síntese).

A diferença de reatividade da enzima β 1,4-GalT frente à sua capacidade de transferir galactose aos aminoácidos glicosilados **22** (anômero β) e **23** (anômero α), estruturalmente mais simples, foi investigada com o objetivo de padronizar as melhores condições da reação quimio-enzimática e aplicação na obtenção dos glicopeptídeos mais complexos como **4** e **5**. O uso desta estratégia poderia fornecer o isômero β LacNAc-ThrOH **53**, não isolado nas tentativas de síntese anteriores.

A preparação enzimática de **93** como modelo foi realizada com o objetivo de verificar a atividade da enzima β 1,4-GalT e as condições de pH, tempo e temperatura mais adequados para realizar a mesma reação com os aminoácidos glicosilados **22** e **23**, e com os glicopeptídeos **43**, **1**, **48** e **3**.

A síntese de **93** foi realizada de acordo com o método modificado de Furuike e col. (FURUIKE et al., 2003), empregando-se o acceptor GlcNAc-O-CH(CH₃)₂ **94**, o doador UDP-Gal **54**, as enzimas β1,4-GalT e fosfatase alcalina, e o cofator MnCl₂ em tampão HEPES (50mM, pH 7,2, 30°C). O acompanhamento da reação em CCD foi realizado com mistura de eluentes recém preparada de CHCl₃/ MeOH/ H₂O (10:10:3 v:v:v) aplicando amostras dos materiais de partida **94** e **54** e, ainda, o possível sub-produto da reação uridina em placa de sílica-gel; os compostos foram visualizados em lâmpada de Ultravioleta e pela revelação com solução de 2% orcinol: 10% H₂SO₄ em água. A reação foi realizada com sucesso, com conversão evidente dos materiais de partida e geração de **93** em cerca de 24 h (Esquema 43).

Esquema 43. Reação modelo para formação de β-Isopropil-*N*-acetil-lactosamina **93**

Uma vez constatada a atividade da enzima β1,4-GalT a partir da reação modelo, a síntese dos dissacarídeos glicosídicos βLacNAc-Thr **53** e αLacNAc-Thr **41** foi realizada seguindo-se as mesmas condições estabelecidas para a obtenção de **93** (CAMPO et al., 2007). Os experimentos envolveram o uso de 15 μmol dos aminoácidos glicosilados **22** e **23**, 7,75 μmol do doador UDP-Gal **54**, 2 μmol de MnCl₂ (100 mM), 6,4 UI de fosfatase alcalina e 0,5 UI de β1,4-GalT, considerando uma unidade a capacidade desta última enzima de transferir 1,0 μmol de galactose, a partir de UDP-Gal, para D-glicose, por minuto no pH 8,4 a 30°C, na presença de α-lactoalbumina e por mL de mistura reacional.

Com relação à reação com o composto **22**, após 24 h de reação foi verificada a conversão total ao produto desejado **53**, porém, para o composto **23** nenhuma conversão ao produto **41** foi verificada neste período. A não conversão ao produto desejado **41** veio a comprovar a menor reatividade da enzima β1,4-GalT frente ao isômero α, o que sugeriu a necessidade de se empregar maior quantidade de enzima e maior tempo de reação para conversão do composto **23**. Desta forma, à mistura reacional previamente obtida, contendo o composto **23** e demais componentes, foram adicionados 1,5 UI de enzima β1,4-GalT, sendo a reação incubada novamente. A reação foi acompanhada por CCD a cada 24 h e somente após

aproximadamente 96 h foi verificada a conversão ao produto **41** (Esquema 44). Ao final das reações as misturas reacionais referentes aos compostos **53** e **41** foram centrifugadas e os sobrenadantes submetidos a processos de purificação.

Esquema 44. Reação de galactosilação dos aminoácidos glicosilados **22** e **23**

A purificação dos compostos **53** e **41** obtidos por galactosilação enzimática foi de grande dificuldade, sendo realizados diferentes procedimentos envolvendo a utilização de coluna de troca iônica (Hi TraTM DEAE FF, 5mL), coluna de fase reversa (C18, Phenomenex) e coluna Toyopearl HW-40S (TOSOH Corporation) de exclusão de tamanho (filtração em gel) em aparelho CLAE. A coluna de troca iônica mostrou-se eficaz para a remoção do tampão HEPES, porém, não foi capaz de separar os produtos **53** e **41** do sub-produto uridina. A coluna de fase reversa (C18) foi então utilizada, mas todas as tentativas empregando-se diferentes condições de gradiente com fase móvel acetonitrila/água (0,1% TFA) foram inadequadas para a separação dos produtos **53** e **41** do sub-produto uridina. Como última alternativa, a coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel, utilizando-se água (0,1 % TFA) como fase móvel, foi empregada, a qual possibilitou a obtenção dos produtos **53** e **41** na forma pura. A cromatografia por exclusão de partículas foi realizada em aparelho CLAE (Perkin Elmer) por 6 h, com detecção simultânea de UV (225 nm) e Índice de Refração; os produtos **53** e **41** foram detectados nos intervalos de tempo de retenção 175-190 min. e 165-175 min., respectivamente, e o sub-produto uridina no intervalo entre 290-320 min, conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25. Cromatogramas obtidos durante a filtração em gel das misturas reacionais referentes aos compostos **53** (A) e **41** (B) com detecção por Índice de Refração

Os dissacarídeos glicosídicos **53** (0,013 mmol, 85%) e **41** (0,008 mmol, 57%) obtidos foram caracterizados pelos espectros de RMN ^1H , os quais apresentaram um dubleto em δ 4,39 ($J_{1,2}$ 8,1) e 5,40 ($J_{1,2}$ 3,8), correspondente ao H-1 de **53** e **41**, respectivamente, e pela análise ESI-MS, sendo verificados os adutos característicos 485,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 507,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, correspondentes aos produtos **53** e **41**. Como esperado, o rendimento do anômero α **41** foi inferior a β **53** na síntese quimio-enzimática.

4.5.2. Síntese enzimática dos glicopeptídeos $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-\text{GlyOH}$ **4** e $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-\text{GlyOH}$ **5**

As reações enzimáticas envolvendo os glicopeptídeos **1** e **3**, contendo resíduos de β -GlcNAc, foram realizadas seguindo-se as mesmas condições empregadas para o composto **22**, porém, em menor escala: 4,8 μmol do glicopeptídeo **1** e 1,3 μmol do glicopeptídeo **3** (Esquemas 45 e 46). Com relação ao glicopeptídeo **1**, foi verificada a conversão ao produto **4** por CCD no tempo de 24 h e para o glicopeptídeo **3** foi necessário um tempo maior (48 h) para a conversão ao produto **5**. Ao final das reações as misturas reacionais referentes aos produtos da galactosilação dos compostos **1** e **3** foram centrifugadas e os sobrenadantes injetados diretamente em coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel.

O glicopeptídeo **4**, obtido após purificação por filtração em gel (3,7 μmol , 80%), foi identificado pelo espectro de RMN ^1H e pela análise ESI-MS, a qual apresentou o aduto característico 968,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Com relação ao glicopeptídeo **5**, após purificação foi possível a obtenção de apenas 1 mg do composto puro, o que tornou a identificação pelo espectro de RMN ^1H bastante difícil. No entanto, a análise ESI-MS apresentou o aduto 1636,67 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ característico do produto desejado. Ressalta-se que as quantidades obtidas para os produtos **4** e **5**, embora reduzidas, são suficientes para a realização dos ensaios enzimáticos com a enzima TcTS.

Esquema 45. Reação de galactosilação do glicopeptídeo **1** utilizando a enzima $\beta 1,4\text{-GalT}$

Esquema 46. Reação de galactosilação do glicopeptídeo **3** utilizando a enzima β 1,4-GalT

As reações de galactosilação dos glicopeptídeos **43** e **48** não foram realizadas, tendo em vista o alto custo da enzima β 1,4-GalT e do doador UDP-Gal. No entanto, os compostos **53**, **41** e **4**, resultantes da reação enzimática com β 1,4-GalT, juntamente com o glicopeptídeo **2**, citado na seção 4.4.5, foram suficientes para a realização dos ensaios com a enzima TcTS.

4.6. Síntese de dicetopiperazinas glicosiladas

Dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos existentes, comumente biossintetizados a partir de aminoácidos, por diversos organismos, inclusive mamíferos. Embora a maioria das dicetopiperazinas biologicamente ativas descritas sejam isoladas de produtos de origem natural, a relativa simplicidade estrutural do núcleo básico permite sua obtenção por métodos sintéticos, baseados principalmente na ciclização de dipeptídeos, os quais são facilmente preparados a partir de α -aminoácidos prontamente disponíveis, valendo-se de metodologia clássica (DELAForge et al., 2001).

As propriedades de dicetopiperazinas que interessam à química medicinal são resistência à proteólise, mimetismo de grupos farmacofóricos peptídicos, rigidez conformacional, grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e esqueleto básico de fácil obtenção, no qual grande diversidade estrutural pode ser introduzida em função da natureza e orientação das cadeias laterais. Tais propriedades podem atribuir características farmacodinâmicas e farmacocinéticas favoráveis a estes compostos, que por esta razão são promissores para o desenvolvimento racional de novos fármacos (Fischer, 2003; Wang et al., 2002;

HORTON et al., 2000). Dentre as principais atividades biológicas atribuídas às dicetopiperazinas estão as atividades antimicrobiana e antitumoral, comprovadas a partir de dicetopiperazinas isoladas de fontes naturais (MARTINS; CARVALHO, 2007).

Desta forma, considerando todas as propriedades supracitadas, a síntese das dicetopiperazinas glicosiladas ciclo-(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **59** e ciclo-(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **60** foi realizada em colaboração ao projeto “Síntese de dicetopiperazinas de interesse biológico” conduzido pela aluna de iniciação científica Maristela M. Braga (Proc. FAPESP 05/01482-2). A síntese dos compostos **59** e **60**, em três etapas, envolveu a utilização dos blocos de construção β GlcNAc-L-FmocSerOBn **30** e α GlcNAc-L-FmocSerOBn **31** e do aminoácido *N*-Fmoc-D-Phe **95** como precursores. Os blocos **30** e **31** foram preparados de forma semelhante à síntese dos aminoácidos glicosilados **17** e **19** (CARVALHO et al., 2003), por reação de glicosilação do açúcar α GlcNAcCl **12** com o aminoácido FmocSerOBn **32**, sendo obtidos com rendimentos de 40% e 15%, respectivamente (Esquema 47).

Esquema 47. Síntese dos blocos de construção **30** e **31** por reação de glicosilação.

Na primeira etapa da síntese de **59** e **60** foi realizada a reação de desproteção do grupo *N*-Fmoc dos blocos **30** e **31** utilizando solução de 20% piperidina em DMF, sendo obtidos os produtos **57** (85%) e **58** (74%) (Esquema 48).

Esquema 48. Desproteção de grupo *N*-Fmoc de GlcNAc-L-FmocSerOBn (β e α)

A seguir, as reações de acoplamento dos compostos **57** e **58** com o aminoácido *N*-Fmoc-D-Phe **95**, na presença dos reagentes de acoplamento PyBOP e HOBT, e da base DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) (CHAN; WHITE, 2000) em acetonitrila, conduziram à obtenção dos dipeptídeos **55** (68%) e **56** (75%) (Esquema 49).

Esquema 49. Reação de acoplamento de GlcNAc-L-SerOBn (α e β) com *N*-Fmoc-D-Phe **42**.

Os dados espectroscópicos que evidenciaram a obtenção dos dipeptídeos **55** e **56** foram os sinais característicos do grupo *N*-Fmoc e dos hidrogênios aromáticos da cadeia lateral de fenilalanina na região entre δ 7,68 e δ 7,1. Embora não tenha sido possível distinguir os sinais dos hidrogênios alquílicos de Fmoc, a integração e as análises bidimensionais indicaram sua

presença na faixa de δ 4,4 a 4,0. Os demais sinais do resíduo de fenilalanina ocorreram próximo a δ 4,4 (metínico) e na região de δ 3,15 a 2,95 (metilênicos), sendo os últimos visualizados como sinais distintos apenas no espectro do anômero β . Ainda neste isômero, foi observado o desdobramento do sinal dos metilenos benzílicos entre δ 5,15 e 5,05 como um sistema AB.

A *N*-desproteção dos dipeptídeos obtidos na presença de piperidina conduziu à formação do anel dicetopiperazínico por ciclização intramolecular, como ilustrado para o composto **55** no Esquema 50. Entretanto, este segundo passo não ocorreu facilmente, conforme verificado em CCD, justificando os longos tempos reacionais empregados, 68 horas para o isômero β e 41 horas para o isômero α . Após purificação por coluna cromatográfica (DCM: MeOH 9:1 v:v), os produtos ciclizados **59** e **60** foram obtidos com rendimentos de 43 e 35%, respectivamente.

Esquema 50. Desproteção do grupo amino de **55** e ciclização intramolecular

A ausência dos sinais dos hidrogênios aromáticos e alifáticos de Fmoc no espectro de RMN ^1H comprova a clivagem do grupo protetor da extremidade amino do dipeptídeo, mas o maior indicativo da ocorrência da ciclização é o desaparecimento do sinal característico ao redor de δ 5,1 (singlete ou sistema AB) referente aos hidrogênios metilênicos do grupo benzílico que protege a função ácida do dipeptídeo. Desta forma, pode-se propor que, segundo sugerido no Esquema 50, o mecanismo da ciclização seja o ataque intramolecular do grupamento amino livre sobre a carbonila da extremidade carboxílica deslocando o álcool benzílico como grupo abandonador.

O espectro de RMN ^1H do anômero α apresentou duplicidade de sinais, a qual pode ser resultante de isomerização de algum dos sete centros quirais presentes na molécula. Neste caso, dificilmente este fenômeno teria ocorrido em alguma posição da unidade de açúcar, pois o anômero α é termodinamicamente mais estável e as demais posições normalmente não são susceptíveis a isomerização nas condições empregadas. Justificativa mais plausível seria a inversão do centro quiral de algum dos aminoácidos, em função do caráter ácido de seus hidrogênios da posição alfa. A presença da base piperidina por longo tempo na etapa de ciclização poderia promover a isomerização. A obtenção das dicetopiperazinas glicosiladas foi, enfim, comprovada por análise ESI-MS, sendo verificado o aduto característico 586,20 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para os compostos **59** e **60**. Estes derivados glicosilados, cujas estruturas são inéditas na literatura, foram submetidos a ensaios biológicos de citotoxicidade (compostos **59** e **60**) e atividade tripanocida (composto **59**), conforme apresentado na seção 4.8.

4.7. Ensaios enzimáticos com a enzima TcTS

trans-Sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) cataliza a transferência de ácido siálico a partir de substratos doadores, tais como ácido *p*-nitrofenil-*N*-acetil-neurâmico (PNP- α Neu5Ac), ácido 4-metilumbeliferil-*N*-acetil-neuramínico (MU- α Neu5Ac) e α -2,3-sialillactose (Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)Glc) (Figura 26) para aceptores contendo unidades de β -D-galactose (SCHENKMAN et al., 1994). A atividade de transferência depende fortemente das condições de incubação, tais como, pH, temperatura e tempo. Ao contrário de sialidasas que requerem longo período de incubação e um grande excesso de substratos doadores, as reações de transglicosilação com TcTS podem ocorrer com quantidades equimolares de substratos e em menor período de tempo (SCHMIDT et al., 2000).

Figura 26. Substratos doadores de ácido siálico

4.7.2. Reações de sialilação dos compostos sintetizados

Após verificada a atividade da enzima TcTS a partir da reação modelo, as reações de sialilação dos dissacarídeos glicosídicos **41** e **53**, dos glicopeptídeos **2** e **4** e do bloco de construção **28** foram realizadas em pequena escala utilizando-se a glicoproteína fetuína como substrato doador e o lisado enzimático bruto de TcTS (CAMPO et al., 2007). Os substratos aceptores (1 eq) e doadores (3 eq) foram dissolvidos em tampão fosfato (PBS, 0,2 mol/L, pH 7,0) previamente à adição do lisado enzimático de TcTS, e as misturas reacionais foram incubadas a 25°C (Esquemas 52, 53 e 54). As reações de sialilação foram monitoradas por CCD (DCM: MeOH: H₂O 10:10:3 v:v:v) e após 2 h de reação foi verificada quase total conversão aos produtos sialilados Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc-Thr **61**, Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc-Thr **62**, NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **7**, NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **6** e Neu5Ac α (2-3)- β Gal-ThrOH **63**. O acompanhamento rigoroso dos ensaios enzimáticos por CCD permitiu observar que as reações de sialilação utilizando fetuína como substrato doador são reversíveis e atingem um equilíbrio, tendo em vista que a incubação das misturas reacionais por períodos superiores a 2 h conduziu à hidrólise dos produtos formados com conseqüente liberação de ácido siálico e recuperação dos materiais de partida.

Os produtos sialilados **61**, **62**, **7**, **6** e **63** foram isolados por filtração das misturas reacionais em filtro VIVASPIN 500 (MM cut-off: 10 kDa), com capacidade de excluir proteínas com peso molecular superior a 10 kDa, para a remoção da fetuína e *trans*-sialidase, seguida da injeção dos filtrados obtidos em coluna de filtração em gel Toyopearl HW-40S, utilizando tampão NH₄HCO₃ 5mM como fase móvel. Os produtos sialilados Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc-Thr **61** e Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc-Thr **62** foram obtidos em altos rendimentos de 92% e 90%, respectivamente, e foram caracterizados pelos espectros de ESI-MS e RMN ¹H. As análises ESI-MS de **61** e **62** apresentaram os adutos característicos 798,30 [M + Na]⁺ e os espectros de RMN ¹H os correspondentes dubletos em δ 5,40 ($J_{1,2}$ 3,8 Hz) e δ 4,42 ($J_{1,2}$ 8,1 Hz), relacionados ao H-1 de **61** e **62**, e os sinais em δ 2,60 ($J_{3eq'', 3ax''}$ 12,1 Hz, $J_{3eq'', 4''}$ 4,4 Hz), δ 1,92-1,90 e δ 1,60 ($J_{3ax'', 4''}$ 12,0 Hz), correspondentes aos hidrogênios H-3eq'', NHAc (6 H) e H-3ax''.

Com relação aos glicopeptídeos sialilados NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **7** e NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **6**, eles também foram obtidos em altos rendimentos de 85% e 82%, respectivamente, sendo suas estruturas químicas confirmadas pelas análises de ESI-MS e RMN ¹H. O aduto 1237,38 [M + H]⁺

verificado na análise de ESI-MS dos compostos **7** e **6** e os sinais característicos em δ 2,60, δ 1,93-1,90 e δ 1,60 no espectro de RMN ^1H estão em concordância com os produtos sialilados obtidos. A reação de sialilação do bloco **28** também conduziu ao produto sialilado Neu5Ac α (2-3)- β Gal-ThrOH **63**, porém, com rendimento inferior (50%) aos demais derivados sialilados devido à perda de produto no processo de purificação. O composto **63** foi caracterizado pela análise ESI-MS, que apresentou o aduto 569,91 $[\text{M} - 2\text{H}^+]$, não sendo possível sua identificação pelo espectro de RMN ^1H devido à pequena quantidade de produto obtida (1 mg).

Esquema 52. Reações de sialilação dos dissacarídeos glicosídicos **41** e **53**

Esquema 53. Reações de sialilação dos glicopeptídeos **2** e **4**

Esquema 54. Reação de sialilação do bloco de construção **28**

De acordo com os resultados dos ensaios enzimáticos com TcTS empregando os compostos **41**, **53**, **2**, **4** e **28** pode-se afirmar que esta enzima é capaz de transferir ácido siálico não somente para resíduos de galactose ligados, via ligação $\beta(1-4)$, a unidades α GlcNAc-Thr encontradas na estrutura original de mucina de *T. cruzi*, mas também para resíduos de galactose ligados ao correspondente isômero β GlcNAc-Thr. Além do mais, a obtenção do produto sialilado **63** comprovou que a ponte de GlcNAc entre o resíduo de galactose e o aminoácido treonina não é essencial para a atividade enzimática. Assim sendo, a sialilação dos aceptores **41**, **53**, **2**, **4** e **28** em rendimentos satisfatórios confirmou que estes compostos podem atuar como potenciais substratos aceptores da enzima TcTS. No entanto, não possibilitou a determinação da diferença de reatividade entre os aminoácidos glicosilados e glicopeptídeos testados, a qual poderá ser realizada somente a partir de estudos posteriores de cinética enzimática.

4.7.3. Análises de espectrometria de massas (ESI-MS) dos produtos sialilados

Nesta seção serão apresentadas as análises ESI-MS dos produtos sialilados **61**, **62**, **7** e **6** bem como o estudo de fragmentação dos mesmos por análise de MS-MS. É válido ressaltar que trabalhos relacionados à determinação do padrão de fragmentação de dissacarídeos glicosídeos e glicopeptídeos sialilados são inexistentes na literatura.

A Figura 27 apresenta os espectros de ESI-MS dos dissacarídeos glicosídicos sialilados **61** e **62**.

Figura 27. Espectros de massa (ESI-MS) dos dissacarídeos glicosídicos sialilados **61** e **62**

O estudo das fragmentações dos dissacarídeos glicosídicos sialilados **61** e **62** foi realizado a partir da análise de MS-MS destes compostos, estando os possíveis fragmentos obtidos apresentados na Figura 28 e no Esquema 55. No espectro de MS-MS (Figura 29), com padrão semelhante de fragmentação para os dois compostos, podem ser verificados os correspondentes fragmentos mostrados no Esquema 55.

Figura 28. Possíveis fragmentações para os compostos **61** e **62** no modo positivo

Esquema 55. Mecanismo das fragmentações propostas para os compostos **61** e **62** no modo positivo

Figura 29. Análise MS-MS com fragmentações dos produtos **61** e **62**

A Figura 30 apresenta os espectros ESI-MS dos glicopeptídeos sialilados **7** e **6**.

Figura 30. Espectros de massa (ESI-MS) dos glicopeptídeos sialilados **7** e **6**

Conforme descrito para os produtos sialilados **61** e **62**, o estudo das fragmentações dos glicopeptídeos sialilados **7** e **6** foi também realizado a partir da análise de MS-MS dos mesmos, estando os possíveis fragmentos obtidos apresentados na Figura 31 e no Esquema 56. No espectro de MS-MS (Figura 32), com padrão semelhante de fragmentação para os dois compostos, podem ser verificados os correspondentes fragmentos mostrados no Esquema 56.

Figura 31. Possíveis fragmentações para os compostos **32** e **33** no modo positivo

Esquema 56. Mecanismo das fragmentações propostas para os compostos **32** e **33** no modo positivo

Figura 32. Análise MS-MS com fragmentações dos produtos **32** e **33**

A Figura 33 mostra o espectro de massas do produto sialilado Neu5Ac α (2-3)- β Gal-ThrOH **63**, porém, não foi possível estabelecer um padrão de fragmentação para o composto **63** como realizado para os demais produtos sialilados.

Figura 33. Espectro de ESI-MS do produto sialilado **63**.

4.8. Ensaios de atividade biológica

Embora o objetivo principal deste trabalho tenha sido a síntese de substratos glicopeptídicos de *trans*-sialidase de *T. cruzi* para entendimento das interações moleculares críticas envolvidas no processo de sialilação, os aminoácidos glicosilados, dissacarídeos glicosídicos e dicetopiperazinas glicosiladas sintetizados foram também submetidos a ensaios biológicos relacionados às atividades tripanocida, antitumoral e de inibição das enzimas fosfoquinases PKG, PKA e PKC. O emprego destes compostos em ensaios de atividade antitumoral e de inibição das enzimas fosfoquinases é justificado pelo envolvimento de aminoácidos glicosilados e *O*-glicopeptídeos, contendo unidades de *N*-acetilglicosamina ligadas a treonina ou serina, em processos de sinalização e transcrição celular, conforme apresentado na seção 1.5 da introdução. Com relação aos ensaios de atividade tripanocida *in vitro*, os compostos sintetizados foram testados na forma de “screening”, com a finalidade de se investigar possível atividade de lise parasitária desencadeada pelos mesmos.

4.8.1. Ensaios de atividade tripanocida

T. cruzi apresenta uma ampla heterogeneidade em relação às suas propriedades biológicas, sendo classificado em diferentes cepas de acordo com a taxa de crescimento, composição antigênica, virulência, infecção, mortalidade em animais experimentais e

tropismo tissular. O quadro clínico da Doença de Chagas em seres humanos é diversificado, possivelmente como reflexo da heterogeneidade entre a cepa isolada e/ ou diferenças genéticas da resposta imune do hospedeiro (MARTINEZ-DIAZ et al., 2001).

Dentre as cepas já isoladas e caracterizadas de *T. cruzi*, duas apresentam maior relevância, a cepa Bolívia, responsável por alto índice de parasitemia, porém apresenta uma taxa moderada de morte em animais infectados, e cepa Y, que comparada com a anterior, é responsável por uma baixa taxa de parasitemia, mas apresenta alta taxa de mortalidade em animais.

Os blocos de construção **22**, **23**, **24**, **25**, **28**, **41** e **53**, bem como os precursores FmocThrOBn **18** e GlcNAcCl **12** foram empregados nos ensaios biológicos para avaliação da atividade tripanocida *in vitro*. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nestes experimentos realizados com a cepa Y de *T. cruzi*.

De acordo com a Tabela 5, o precursor GlcNAcCl **12** (80%) e o bloco de construção β Gal-ThrOH **28** (81%) apresentaram as maiores taxas de lise parasitária, 80% e 81%, respectivamente, na concentração de 32 μ g/mL, com valores correspondentes de IC₅₀ 0,036 e 0,048 mM. Com relação ao aminoácido FmocThrOBn **18** e aos aminoácidos glicosilados β GlcNAc-ThrOH **22** e α GlcNAc-ThrOH **23**, e os correspondentes derivados acetilados **24** e **25**, foi verificada maior porcentagem de lise parasitária para o isômero α **23** (48%) na concentração de 32 μ g/mL, com IC₅₀ de 0,191 mM. Os dissacarídeos glicosídicos β LacNAc-ThrOH **53** e α GlcNAc-ThrOH **41**, no entanto, não apresentaram valores significantes de IC₅₀ nesta concentração: 0,971 e 1,26 mM, respectivamente. Finalmente, a dicetopiperazina glicosilada **59** (IC₅₀ 0,258 mM) apresentou as maiores taxas de lise parasitária nas concentrações de 2,0 e 8,0 μ g/mL, com os respectivos valores de 26% e 31%; porém, não foi observado valor relativamente maior de lise na concentração de 32 μ g/mL (35%).

Tabela 5. Porcentagem de lise parasitária (forma tripomastigota) dos compostos **12**, **18**, **22**, **23**, **24**, **25**, **28**, **53**, **41** e **59** sobre a cepa Y

Composto	Concentração (µg/mL) x % de lise (± SD)				IC ₅₀ (µg/mL)/ mM
	0,5	2,0	8,0	32,0
12	18,5 ± 5,1	20,7 ± 6,4	23,7 ± 9,3	79,8 ± 4,3	13,2/ 0,036 mM
18	17,5 ± 5,5	16,8 ± 7,7	21,0 ± 1,2	31,1 ± 2,3	2,1 x 10 ³ / 4,86 mM
22	15,1 ± 1,4	18,7 ± 5,0	22,5 ± 5,9	32,6 ± 3,8	376,8/ 1,16 mM
23	22,5 ± 5,9	13,8 ± 7,3	26,3 ± 7,1	47,8 ± 5,0	61,7/ 0,191 mM
24	10,2 ± 5,3	19,9 ± 8,8	26,2 ± 2,8	27,2 ± 1,4	1,3 x 10 ³ / 2,8 mM
25	20,2 ± 5,3	19,2 ± 1,5	21,2 ± 8,9	29,6 ± 3,8	4,5 x 10 ⁴ / 100mM
28	0	4,5 ± 3,5	28,3 ± 3,6	81,3 ± 6,4	13,7/ 0,048 mM

continua

Composto	Concentração (µg/mL) x % de lise (± SD)				IC ₅₀ (µg/mL)/ mM
	0,5	2,0	8,0	32,0
53	9,4 ± 2,5	20,2 ± 4,7	21,2 ± 5,6	31,3 ± 2,8	470,8/ 0,971 mM
41	2,7 ± 1,2	16,5 ± 7,0	24,2 ± 0	25,2 ± 9,5	612,6/ 1,26 mM
59	8,7 ± 4,5	26,3 ± 6,0	31,3 ± 5,5	35,3 ± 7,1	145,8/ 0,258 mM

** controle positivo- violeta de genciana a 250 µg/mL;

*** controle negativo- sangue infectado + 5% de DMSO

4.8.2. Ensaios de atividade antitumoral

4.8.2.1. Ensaios com os aminoácidos glicosilados βGlcNAc-ThrOH **22** e αGlcNAc-ThrOH **23**

Os resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas e nucleares modificados por unidade *N*-acetilglicosamina (*O*-GlcNAc) estão diretamente envolvidos em eventos de sinalização celular e regulação de transcrição de síntese de proteínas, conforme descrito na seção 1.5. De acordo com Haltiwanger e Philipsberg (SLAWSON et al., 2001), durante a fase M da divisão celular ocorrem alterações de processos de glicosilação de proteínas específicas, sugerindo que, conforme a célula progride do estado normal para o maligno, os níveis de *O*-GlcNAc na célula são reduzidos, conduzindo ao crescimento celular desordenado. Assim, com base nestes dados da literatura, os aminoácidos glicosilados βGlcNAc-ThrOH **22** e αGlcNAc-ThrOH **23** foram empregados em ensaios de atividade antitumoral frente às células JURKAT e K562 de leucemia T humana, e B16F10 de melanoma de camundongos.

Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral realizados com os blocos de construção **22** e **23** frente às células de leucemia T humana JURKART podem ser visualizados nos Gráficos 1 e 2. Os valores de citotoxicidade obtidos para os blocos de construção **22** e **23** na concentração de 1 mg/ mL foram 100% e 71,4%, respectivamente,

enquanto o fármaco controle vincristina apresentou 100% de citotoxicidade na concentração de 0,1 mg/ mL e 21,4% na concentração de 0,01 mg/mL. O emprego de concentrações menores dos blocos **22** e **23** (0,1 a 0,001mg/mL) apresentou resultados interessantes; a utilização do bloco **22** nas concentrações de 0,01 mg/ mL a 0,001 mg/mL desencadeou efeito contrário ao esperado, ou seja, foi verificada a proliferação de células tumorais ao invés de citotoxicidade, o que pode significar que o composto **22** possui efeito imunoestimulante em concentrações abaixo de 0,1 mg/ mL. Com relação ao bloco **23**, efeitos de citotoxicidade continuaram a serem observados, ainda que em menores concentrações, sendo obtidos valores de citotoxicidade de 25% e 28,5% nas concentrações de 0,1 e 0,01 mg/mL, respectivamente, e 8,9 % na concentração de 0,001 mg/mL.

Gráfico 1. Níveis de citotoxicidade resultantes de diferentes concentrações do composto **22** frente às células JURKART de leucemia T humana

Gráfico 2. Níveis de citotoxicidade resultantes de diferentes concentrações do composto **23** frente às células JURKART de leucemia T humana

Os Gráficos 3 e 4 apresentam os resultados dos ensaios de atividade tumoral com o bloco **22** frente às células de leucemia T humana K562 e células de melanoma B16F10. O composto **22** apresentou comportamento semelhante ao verificado para as células JURKART, ou seja, na concentração de 1 mg/ mL apresentou efeito citotóxico e em menores concentrações, estimulação de crescimento celular. Os valores de citotoxicidade obtidos para as células de leucemia K562 e para as células de melanoma B16F10 na concentração de 1 mg/ mL foram, no entanto, inferiores ao valor verificado para as células JURKART: 50% para células K562 e 60% para as células B16F10. O bloco **23** ainda não foi submetido aos testes de atividade antitumoral frente às células de leucemia T humana K562 e células de melanoma B16F10, porém, deverá ser testado em breve.

Gráfico 3. Níveis de citotoxicidade resultantes de diferentes concentrações do composto **22** frente às células K562 de leucemia T humana

Gráfico 4. Níveis de citotoxicidade resultantes de diferentes concentrações do composto **22** frente às células B16F10 de melanoma de camundongos

4.8.2.2. Ensaio com as dicetopiperazinas glicosiladas ciclo-(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **59** e ciclo-(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **60**

Considerando a potencial atividade antitumoral de dicetopiperazinas isoladas de fontes naturais, conforme citado na seção 4.6, as dicetopiperazinas glicosiladas **59** e **60** foram submetidas aos ensaios de atividade citotóxica frente às linhagens tumorais MDA-MB435 (mama-humano), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano). Estes compostos foram testados na dose única de 5 μ g/mL, estando os resultados relativos aos percentuais de inibição do crescimento celular apresentados no Gráfico 5.

De acordo com o Gráfico 5, as dicetopiperazinas glicosiladas **59** e **60** demonstraram maior potencialidade citotóxica frente à linhagem HCT-8, com valores de inibição de crescimento celular de 65,7% e 41,8%, respectivamente. Com relação à linhagem SF-295, taxas de citotoxicidade não muito satisfatórias foram verificadas (30,8% e 20,6%), e para a linhagem MDA-MB435, os compostos testados **59** e **60** desencadearam um efeito contrário ao esperado, ou seja, estimulação de crescimento celular ao invés de inibição.

Gráfico 5. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos compostos **59** e **60** em três linhagens tumorais, testados na dose única de 5µg/mL

4.8.3. Ensaios de atividade inibitória das proteínas quinases PKG, PKA e PKC

Tendo por base estudos que afirmam que a ligação de *O*-GlcNAc se realiza em sítios protéicos similares àqueles modificados por proteínas quinases, conduzindo a um complexo modelo de regulação de proteínas, segundo o qual *O*-GlcNAc é capaz de inibir processos de fosforilação (ZACHARA; HART, 2002), foram realizados ensaios de atividade de inibição das proteínas quinases PKG, PKA e PKC empregando-se o bloco de construção βGlcNAc-ThrOH **22** e o seu correspondente derivado acetilado **24**, e o isômero α **23**.

Inicialmente, foi investigada a capacidade do composto **22** de modular (reduzindo ou inibindo) a atividade da proteína quinase G (PKG). Para tanto, foram realizados experimentos comparando a resposta farmacológica produzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em presença ou em ausência do composto **22**. O NPS é um doador de óxido nítrico (NO), o qual ativa a produção de GMPc (guanidina monofosfato cíclico) e a posterior ativação da PKG. Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram, no entanto, que os parâmetros farmacológicos potência (valores de pEC₅₀) e Efeito máximo (valores de Emax) obtidos em presença do composto **22** foram semelhantes aos obtidos apenas com o NPS. Estes resultados indicam que a atividade da PKG não foi modificada pelo composto **22**.

Tabela 6- Efeito relaxante do NPS em presença ou em ausência do composto **22**

	E_{max} (%)	pEC₅₀
NPS + Composto 22	100,3 ± 8,92 (n=5)	8,21 ± 0,13
NPS	102,9 ± 7,73 (n=5)	8,02 ± 0,18

Curvas concentração-efeito para NPS em presença ou em ausência do composto **22** realizadas (10 nM a 6 µM) em aortas isoladas de ratos sem endotélio vascular. Os dados representam o Efeito máximo (E_{max}) e a potência do NPS (pEC₅₀) em presença ou em ausência do composto **22**, e são expressos como sendo a média ± E. P. M (erro padrão médio)

O bloco de construção **24**, contendo os grupos hidroxílicos acetilados e portanto, menos polar, foi testado na expectativa de apresentar algum grau de inibição frente à enzima PKG, considerando sua maior capacidade de penetração celular. No entanto, os valores de pEC₅₀ e E_{max} obtidos em presença do composto **24** (Tabela 7) foram semelhantes aos obtidos apenas com o NPS. Estes resultados indicam que a atividade da PKG também não foi modificada pelo composto **24**.

Tabela 7- Efeito relaxante do NPS em presença ou em ausência do composto **24**

	E_{max} (%)	pEC₅₀
NPS + Composto 24	97,64 ± 1,97 (n=5)	7,76 ± 0,03
NPS	99,59 ± 2,23 (n=5)	7,76 ± 0,04

Curvas concentração-efeito para NPS em presença ou em ausência do composto **24** realizadas (10 nM a 6 µM) em aortas isoladas de ratos sem endotélio vascular. Os dados representam o Efeito máximo (E_{max}) e a potência do NPS (pEC₅₀) em presença ou em ausência do composto **24**, e são expressos como sendo a média ± E. P. M

A capacidade do composto **22** em exercer algum efeito modulatório sobre a proteína quinase A (PKA) também foi investigada. Para tanto, foi utilizado a forskolina, um ativador direto da enzima adenilato-ciclase, como controle. Uma vez ativada, a enzima adenilato-ciclase produz AMPc (adenosina monofosfato cíclico), o qual ativa a PKA resultando em relaxamento do músculo liso vascular. Os resultados obtidos mostram que os valores de pEC₅₀ e E_{max} verificados em presença do composto **22** foram semelhantes aos obtidos apenas com a forskolina (Tabela 8), indicando que a atividade da PKA não foi modificada pelo composto **22**.

Tabela 8- Efeito relaxante da Forscolina em presença ou em ausência do composto **22**

	E_{max} (%)	pEC₅₀
Forscolina +Composto 22	92,9 ± 3,34 (n=4)	6,91 ± 0,07
Forscolina	92,8 ± 3,40 (n=4)	6,89 ± 0,11

Curvas concentração-efeito para Forscolina em presença ou em ausência do Composto **22** realizadas (1 nM a 6 µM) em aortas isoladas de ratos sem endotélio vascular. Os dados representam o Efeito máximo (E_{max}) e a potência do NPS (pEC₅₀) em presença ou em ausência do composto **22**, e são expressos como sendo a média ± E. P. M

Finalmente, um estudo relativo à possível atividade inibitória do composto **22** sobre a proteína quinase C (PKC) foi realizado. Investigou-se a possibilidade de haver redução na resposta contrátil estimulada com o Phorbol Éster, um análogo do diacil glicerol (DAG) que estimula diretamente a PKC. Os resultados observados mostram que a contração obtida apenas com Phorbol Éster ($2,96 \pm 0,13$; n=3) é estatisticamente maior do que aquela obtida em presença do composto **22** ($2,25 \pm 0,24$; n=4; $p < 0,05$), conforme o Gráfico 6. Estes resultados indicam que o composto **22** pode ser capaz de reduzir a atividade da PKC e a conseqüente resposta contrátil estimulada com Phorbol Éster em aorta de ratos sem endotélio vascular.

Gráfico 6. Resposta contrátil estimulada com Phorbol Éster em ausência ou em presença do composto **20**. Preparações de aortas de ratos sem endotélio vascular foram estimuladas com Phorbol Éster (1 µM) em ausência ou em presença do composto **22** (100 µM). Os dados representam a média ± E. P. M. * diferença estatística entre os grupos controle (Phorbol Éster) em relação ao grupo de anéis de aorta pré incubados com o composto **22** ($p < 0,05$)

O ensaio de atividade inibitória da PKC com o correspondente isômero α **23** foi também realizado de forma a se realizar uma análise comparativa com o resultado obtido para o

composto **22**. No entanto, não foi verificada nenhuma redução na resposta contrátil estimulada com Phorbol Éster na presença do isômero α **23**.

4.9. Estudos de modelagem molecular

4.9.1. Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de *trans*-sialidase

Farmacóforo é um conjunto de características eletrônicas e estéricas comuns a alguns grupos químicos, necessárias para otimizar as interações moleculares entre um ligante e um alvo biológico específico e desencadear (ou bloquear) sua resposta biológica. O conceito de farmacóforo é baseado na premissa de que diferentes grupos químicos podem apresentar os mesmos tipos de interação com uma proteína, agrupando-se em uma mesma categoria de grupo farmacofórico. Desta forma, foi realizada a construção de um modelo farmacofórico baseado em complexos de TS com estruturas resolvidas para posterior utilização em buscas de bases de dados por novos inibidores de TcTS (Figura 34).

O método utilizado para a determinação do padrão farmacofórico de inibidores de TS, empregando o programa DS ViewerPro 5.0 (DISCOVERY STUDIO VIEWER PRO), foi adequado considerando que as estruturas dos complexos são conhecidas. Na ausência delas, métodos de percepção de farmacóforo baseados em alinhamentos dos ligantes e seus conformeros pré-calculados deveriam ser empregados.

Figura 34. Determinação de padrão farmacofórico de inibidores de *trans*-sialidases com base na superposição estrutural dos complexos envolvidos

4.9.2. Cálculos de campos de interação molecular

Os resultados obtidos pela realização de cálculos de campos de interação molecular (MIFs) estão apresentados nas Figuras 35-39.

Figura 35. Sobreposição do inibidor DANA (colorido por átomos), o qual está complexado à *trans*-sialidase de *T. cruzi* (átomos em cor amarelo), com o campo de interação molecular (MIF) devido ao grupo de prova hidrofóbico (carbono de metila, com contorno de energia em verde). O contorno de energia é representado a $-10,5$ kcal/mol

Os resultados da Figura 35 sugerem que interações hidrofóbicas favoráveis com a enzima são principalmente devidas aos resíduos Y119 e W312, distantes do sítio ligante de DANA.

Figura 36. Sobreposição do inibidor DANA (colorido por átomos), o qual está complexado à *trans*-sialidase de *T. cruzi* (átomos em cor magenta), com o campo de interação molecular (MIF) devido ao grupo de prova oxigênio de carbonila (contorno de energia em cor amarelo). O contorno de energia é representado a $-10,5$ kcal/mol

Figura 37. Sobreposição do inibidor DANA (colorido por átomos), o qual está complexado à *trans*-sialidase de *T. cruzi* (átomos em cor amarelo), com o campo de interação molecular (MIF) devido ao grupo de prova hidroxila (contorno de energia em cor azul). O contorno de energia é representado a $-10,5$ kcal/mol

Os resultados da Figura 37 sugerem que somente uma das posições encontradas para a hidroxila da extremidade da cadeia lateral de DANA é favorável, bem como uma região acima dela, na qual poderiam ser conectados grupamentos hidroxila.

1ms8

Figura 38. Sobreposição do inibidor DANA (colorido por átomos), o qual está complexado à *trans*-sialidase de *T. cruzi* (átomos em cor amarelo) com o campo de interação molecular (MIF) devido ao grupo de prova Água (contorno de energia em cor azul). O contorno de energia é representado a -10,5 Kcal/mol

Para a estrutura do complexo em questão (código PDB 1MS8), a conformação da cadeia lateral de Y119 varia em relação ao rotâmero encontrado para esse resíduo no outro complexo de TcTS-DANA com estrutura resolvida no PDB (código 1MS1). Para o complexo de código 1MS8, há uma extensão do contorno de energia referente a moléculas de água e/ou hidroxilas em direção à segunda posição observada para a hidroxila da extremidade do inibidor. No complexo 1MS1, a estrutura de DANA foi resolvida contendo ambigüidade de conformação, sugerindo duas possíveis posições para essa hidroxila.

(A)

(B)

Figura 39. Em (A), sobreposição do inibidor DANA (átomos em amarelo), o qual está complexado à *trans*-sialidase de *T. cruzi* (colorido por átomos), com o campo de interação molecular (MIF) devido ao grupo de prova oxigênio de carboxila (contorno de energia em cor rosa). Em (B), contribuição atômica para o correspondente contorno de energia. A tríade de argininas é responsável pela forte interação com o grupo de prova, representado a $-10,5$ kcal/mol

Entre todos os grupos de prova, oxigênio de carboxila foi o que apresentou interações mais fortes com o sítio ativo de TcTS. Isso pode ser visualizado pela maior região definida no espaço pelo contorno de energia devido a esse grupo de prova, comparativamente aos demais, à mesma energia ($-10,5$ kcal/mol).

Os resultados apontam que um inibidor ideal de TcTS deveria manter o carboxilato de DANA bem como a hidroxila da extremidade de sua cadeia, esta próxima à posição encontrada para tal hidroxila no complexo 1MS1. A distância e as posições relativas entre esse dois grupos funcionais deverão ser comparados ao padrão farmacofórico

preliminarmente obtido. Um cálculo mais robusto do padrão farmacofórico será realizado com o módulo DiscoTech do programa Sybyl 7.0.1, considerando-se as orientações cristalográficas dos 10 ligantes, previamente discutidos, e os resultados dos MIFs, com os quais se buscará um *consensus*. Finalmente, o padrão farmacofórico assim definido será utilizado como *constraint* para buscas em bases de dados de compostos contendo propriedades de fármacos, com o objetivo de se propor novos protótipos.

4.9.3. Estudos de simulações de *docking*

Os estudos de simulações de *docking* dos dissacarídeos glicosídicos **41** e **53**, dos glicopeptídeos **2** e **4** e do aminoácido glicosilado **28** (Figura 40) no sítio ativo da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* foram realizados com o objetivo de se determinar as principais interações envolvidas na atividade de *trans*-glicosilação pela enzima TcTS. Trata-se de um processo fundamental para o planejamento racional de possíveis inibidores desta enzima.

Figura 40. Potenciais substratos aceptores de TcTS

Cálculos preliminares de *docking* foram realizados com a molécula de lactose de forma a se reproduzir a orientação cristalográfica desta molécula no seu complexo original com TcTS (código PDB 1MS9). Subseqüentemente, procedimentos de *constrained docking* relacionados às três ligações de hidrogênio (hidroxilas 3-OH, 4-OH e 6-OH dos compostos investigados) originalmente observadas com os resíduos Asp59 e Glu362 foram realizados com o objetivo de manter a conformação esperada da molécula de lactose, utilizada como uma base de comparação neste estudo.

A Figura 41 apresenta as principais interações de lactose com o sítio aceptor de TcTS, as quais servirão de base para o entendimento dos resultados de *docking* com os compostos **41**, **53**, **2**, **4** e **28**. As interações mais importantes são representadas pelas ligações de hidrogênio dos grupos 3-OH e 4-OH de lactose com o resíduo Asp59, seguidas das interações do tipo “empilhamento π ” do anel de glicose com o resíduo Trp312, e da ligação de hidrogênio da hidroxila 6-OH de lactose com Glu362.

Figura 41. Principais interações de lactose com o sítio aceptor de TcTS

A simulação de *docking* do aminoácido glicosilado α LacNAc-Thr **41** (GoldScore 47,60) apresentou uma forte interação iônica, inexistente no complexo lactose-TcTS, entre o grupo carboxilato de **41** com os grupos guanidínicos NH_2 de Arg311 (distâncias de 3,69 e 2,83 Å), além das interações por ligação de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxílicos 3-OH e 4-OH deste aceptor com o grupo carboxilato de Asp59, caracterizadas por curtas distâncias de 2,65 e 3,07 Å, respectivamente (Figura 42-A). Após a simulação, uma superposição estrutural relativa do composto **41** com a molécula de lactose, principalmente relacionada à unidade de galactose desta estrutura, foi possível conforme representado na Figura 42-B. *Docking* do correspondente aminoácido glicosilado β LacNAc-Thr **53** (GoldScore 42,50) também apresentou uma nova e forte interação do grupo acetamido de **53** com o grupo guanidínico de Arg311 (distâncias de 2,78 Å) (Figura 43-A) assim como uma superposição adequada deste composto com lactose (Figura 43-B).

Figura 42. Simulação de *docking* do composto **41**. (A) Principais interações de **41** com o sítio aceptor de TcTS; (B) Sobreposição de **41** (átomos de carbono em cor laranja) com a molécula de lactose (átomos de carbono em cor ciano)

Figura 43. Simulação de *docking* do composto **53**. (A) Principais interações de **53** com o sítio aceptor de TcTS; (B) Sobreposição de **53** (átomos de carbono em cor magenta) com a molécula de lactose (átomos de carbono em cor ciano)

Apesar da maior complexidade estrutural se comparados aos aminoácidos glicosilados **41** e **53**, os resultados de *docking* dos glicopeptídeos **2** e **4** também estiveram em concordância com a orientação original e esperada da molécula de lactose no sítio ativo de TcTS. De acordo com a simulação de *docking* do glicopeptídeo **2** (GoldScore 38,36), o grupo hidroxílico 4-OH foi capaz de estabelecer uma interação com Arg35 (distância de 3,34 Å), e interações

adicionais por ligação de hidrogênio dos grupos acetamido e NH com Arg311 (distância de 2,42 Å) e Asn60 (distância de 3,10 Å), respectivamente, foram também observadas (Figura 44-A). Com relação ao glicopeptídeo **4**, resultados de *docking* revelaram um GoldScore de 37,44. Diferentemente de **2**, uma ligação de hidrogênio com Arg35 foi estabelecida para esta molécula via hidroxila 6-OH (distância de 3,38 Å), sendo também verificada uma interação adicional de um dos resíduos de treonina da cadeia peptídica com Ser122 (distância de 2,03) (Figura 45-A). As ligações de hidrogênio das hidroxilas 3-OH e 4-OH com Asp59 foram mantidas para ambos os compostos e conforme descrito para os aminoácidos glicosilados **41** e **53**, uma superposição estrutural relativa dos glicopeptídeos **2** e **4** com a molécula de lactose foi também verificada. (Figuras 44-B e 45-B).

Figura 44. Simulação de *docking* do composto **2**. **(A)** Principais interações de **2** com o sítio aceptor de TcTS; **(B)** Sobreposição de **2** (átomos de carbono em cor rosa) com a molécula de lactose (átomos de carbono em cor ciano)

Figura 45. Simulação de *docking* do composto **4**. **(A)** Principais interações de **4** com o sítio aceitor de TcTS; **(B)** Sobreposição de **4** (átomos de carbono em cor azul escuro) com a molécula de lactose (átomos de carbono em cor ciano)

Subseqüentemente, foi realizada a análise conformacional do glicopeptídeo $H_2N-(Thr)_2-[LacNAc-\alpha-Thr]-(Thr)_2-Gly-OH$ **2** como modelo. A conformação de mais baixa energia do glicopeptídeo **2** adotou uma estrutura enovelada (Figura 46), com dois resíduos de Thr em conformação de folha β (**Thr 4**: $\Psi = 43,9^\circ$ e $\Phi = -149,2^\circ$; **Thr 1**: $\Psi = 75,6^\circ$ e $\Phi = -77^\circ$), e outra sem estrutura secundária definida (**Thr 2**: $\Psi = -16,8^\circ$ e $\Phi = 153,9^\circ$). O segundo carbono alfa (ligado à unidade de açúcar) adotou a conformação α -hélice (**Thr 3**: $\Psi = -52,1^\circ$ e $\Phi = -150,6^\circ$). A conformação enovelada é devida, principalmente, às ligações de hidrogênio intramoleculares envolvendo a unidade de açúcar e os grupos carbonílicos da cadeia peptídica, bem como à ligação iônica entre os terminais N- e C- do glicopeptídeo **2** (Figura 46).

Comparativamente, a estrutura docada do glicopeptídeo **2** adotou uma conformação aberta (Figura 46), com três resíduos em conformação α -hélice (**Thr 2**: $\Psi = 152,3^\circ$ e $\Phi = 83^\circ$; **Thr 3**: $\Psi = 100,6^\circ$ e $\Phi = 77,9^\circ$; **Thr 4**: $\Psi = -42,1^\circ$ e $\Phi = -59,2^\circ$). O primeiro carbono alfa adotou uma conformação de folha β (**Thr 1**: $\Psi = 140,6^\circ$ e $\Phi = -140,5^\circ$).

Figura 46. Superposição da estrutura enovelada do glicopeptídeo **2** em água (átomos em cor verde) com a solução de maior escore desta molécula (átomos em cor amarelo) em duas diferentes visões

Com relação ao *docking* do aminoácido glicosilado β Gal-Thr **28** (GoldScore 40,4), a Figura 47-A apresenta as ligações de hidrogênio entre 3-OH e 4-OH de **28** com Asp59, e uma interação adicional de 6-OH com Arg35 (distância de 3,58), ausente no complexo lactose-TcTS. Na Figura 47-B pode-se observar uma superposição estrutural do núcleo de galactose de **28** com a molécula de lactose.

Ressalta-se que os glicopeptídeos **2** e **4** e o aminoácido glicosilado **28** foram capazes de estabelecer interações com os sítios aceitor e doador de TcTS, considerando que Arg35 está presente no sítio ativo doador.

Figura 47. Simulação de *docking* do composto **28**. **(A)** Principais interações de **28** com o sítio acceptor de TcTS; **(B)** Sobreposição de **28** (átomos de carbono em cor amarelo) com a molécula de lactose (átomos de carbono em cor azul)

A Figura 48 apresenta a superposição estrutural de todos os compostos, confirmando a similaridade de orientação destas estruturas com a molécula de lactose no sítio acceptor de TcTS.

Figura 48. Superposição dos compostos **41**, **53**, **2**, **4** e **28** com a molécula de lactose, representados nas correspondentes cores de átomos de carbono: **41**: cor laranja, **53**: cor magenta, **2**: cor rosa, **4**: cor azul escuro, **28**: cor amarelo, lactose: cor ciano

Os resultados de *docking* dos aceptores **41**, **53**, **2**, **4** e **28** no sítio ativo acceptor de TcTS indicam a unidade de galactose destas moléculas como um requisito essencial para a atividade de *trans*-glicosilação devido às interações por ligação de hidrogênio das hidroxilas 3-OH e 4-OH de galactose com Asp59. Esta observação pode estar relacionada à especificidade flexível de substrato de TcTS, sendo capaz de transferir ácido siálico não somente para substratos derivados de α LacNAc-Thr, presentes nas moléculas de mucina naturais, mas também para os correspondentes derivados de β LacNAc-Thr e β Gal-Thr.

Além do mais, as simulações de *docking* dos compostos **41**, **53**, **2**, **4** e **28** sugerem possíveis modificações moleculares a serem introduzidas nestas moléculas, aumentando as interações com o sítio acceptor, bem como explorando as interações com aminoácidos presentes no sítio ativo doador de TcTS. Desta forma, uma molécula capaz de interagir com ambos os sítios doador e acceptor poderia atuar como um análogo do estado de transição reacional, representando um protótipo promissor no caminho de um planejamento racional de potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T. cruzi*.

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido envolveu a preparação dos blocos de construção β GlcNAc-Thr **22**, α GlcNAc-Thr **23**, β Gal-Thr **28**, β LacNAc-Thr **53** e α LacNAc-Thr **41**, e dos glicopeptídeos β -D-GlcNAc-(Thr)₆-GlyOH **43**, β -D-Gal-(Thr)₆GlyOH **45**, NH₂(Thr)₂-(β GlcNAc)-(Thr)₃-GlyOH **1**, α -D-GlcNAc-(Thr)₅-Thr[β -D-GlcNAc]-GlyOH **48**, β -D-Gal-Thr-Thr[β -D-Gal]-Thr-Thr[β -D-Gal]-Thr-ThrGlyOH **50**, NH₂(Thr)₂-(β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **4**, NH₂(Thr)₂-(α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **2** e NH₂(Thr)₂-(β LacNAc)-(Thr)₃-(α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **5**, potenciais substratos das enzimas β 1,4-GalT e TcTS.

A reação de glicosilação empregando o doador glicosídico α GlcNAcCl **12** e o aminoácido FmocThrOBn **18**, na presença do catalisador HgBr₂, representou a melhor alternativa para a obtenção dos isômeros β GlcNAc-ThrOBn **17** e α GlcNAc-ThrOBn **19**, obtidos com rendimentos de 52% e 20%, respectivamente (total 72%). As reações de hidrogenólise para remoção dos grupos éster *O*-benzílicos e amino de **17** e **19** foram conduzidas com sucesso, sendo obtidos os produtos **24** e **25** com rendimentos em torno de 90%. A reação de desacetilação destes produtos resultou na formação dos compostos β GlcNAc-Thr **22** (90%) e α GlcNAc-Thr **23** (88%), totalmente desprotegidos.

O bloco β Gal-FmocThrOBn **26** foi obtido com rendimento de 28% por meio de reações de glicosilação dos doadores glicosídicos β GalBr **13** e β GalOCCl₃CN **15** com o aminoácido FmocThrOBn **18**, utilizando os promotores iodo e TMSOTf, respectivamente. As reações de hidrogenólise e desacetilação do produto obtido **26** conduziram à obtenção do bloco β Gal-ThrOH **28** totalmente desprotegido em alto rendimento (86%).

A abordagem envolvendo a síntese química total dos dissacarídeos glicosídicos α LacN₃-FmocThrOBn **39** e β LacN₃-FmocThrOBn **72**, para o posterior acoplamento em cadeia peptídica e ensaio enzimático com a enzima TcTS, foi satisfatória apenas para a obtenção do composto alfa **39**. As reações de glicosilação entre os doadores glicosídicos cloreto de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-azido-2-deoxi- α -D-glicopiranosila **33** e tricloroacetimidato de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galacto-piranosil)-2-azido-2-deoxi- α -D-glucopiranosila **29** com o aminoácido FmocThrOBn **18**, utilizando HgBr₂ como catalisador, forneceram o composto **39** com rendimentos de 60 e 15%, respectivamente. A acetilação redutiva do grupo azido de **39** foi realizada de forma tradicional, sendo isolado o derivado acetamido **40** (65%). A completa desproteção de **40** foi realizada por meio de reações de hidrogenólise e desacetilação, sendo obtido o produto **41**

com 70% de rendimento. O correspondente anômero beta **53** foi preparado por via químico-enzimática, empregando-se a enzima β 1,4-GalT a partir do bloco β GlcNAc-Thr **22** totalmente desprotegido. Novas metodologias para a síntese química do dissacarídeo glicosídico β LacNAc-ThrOH **73** também foram investigadas, envolvendo reações de glicosilação em microondas do doador β LacNAcSAc **38**, contendo grupo participante 2-*N*-acetil, bem como o seu correspondente derivado oxazolina **74**, com o aminoácido **18** como acceptor. No entanto, não conduziram à formação do produto **73**.

A investigação da reatividade da enzima β 1,4-GalT frente à transferência de resíduo de galactose foi realizada paralelamente com os aminoácidos glicosilados **22** e **23** para obtenção dos dissacarídeos glicosídicos β LacNAc-Thr **53** e α LacNAc-Thr **41**. A transferência total de galactose foi observada para o isômero beta em 24 h, enquanto para o alfa foram necessárias 96 h na presença de uma concentração quatro vezes maior de enzima. A interpretação destes resultados foi bastante dificultada devido aos problemas de purificação final. Após investigação de inúmeros métodos cromatográficos, o emprego da coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel foi o único procedimento que possibilitou o isolamento dos produtos **53** e **41** na forma pura com rendimentos de 85% e 57%, respectivamente.

Na etapa do trabalho referente à síntese de glicopeptídeos em fase sólida, foi possível a obtenção dos glicopeptídeos **42**, **44**, **46**, **47**, **49**, **51** e **52** com rendimentos entre 40% e 70%, sendo que os valores mais baixos foram verificados para os glicopeptídeos **49** (42%) e **52** (40%) devido à maior complexidade e dificuldade de síntese dos mesmos. Os glicopeptídeos obtidos foram então submetidos à reação de desacetilação e purificados por CLAE, utilizando coluna de fase reversa semi-preparativa, sendo obtidos os respectivos glicopeptídeos desacetilados **43**, **45**, **1**, **48**, **50**, **2** e **3** com rendimentos de 29%, 28,5%, 14%, 25%, 21%, 22% e 20%.

O uso da enzima β 1,4-GalT permitiu também a preparação dos glicopeptídeos $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **4** e $\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ **5** pela galactosilação do resíduo de β GlcNAc-Thr presente nos correspondentes glicopeptídeos preparados em síntese em fase sólida, **1** e **3**. O método de purificação mais conveniente envolveu a utilização da coluna Toyopearl HW-40S de filtração em gel.

O estudo da estereosseletividade da reação com a enzima TcTS foi inicialmente explorada com os dissacarídeos **41** e **53**, preparados por síntese total ou químico-enzimática. Os experimentos realizados empregando fetuína como substrato doador de ácido siálico demonstraram que a reação de sialilação ocorre igualmente com ambos anômeros α e β ,

fornecendo rendimentos em torno de 90% (Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc-Thr **61** 92% e Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc-Thr **62** 90%). Este resultado foi considerado inesperado, tendo em vista que a configuração da posição anomérica da unidade de açúcar GlcNAc da molécula de mucina GPI do parasita é exclusivamente alfa (PREVIATO et al., 1995), o que parecia ser um requisito essencial para captação de ácido siálico promovido pela enzima TcTS. Resultados similares de reatividade foram também obtidos nas reações empregando-se os glicopeptídeos **2** (com bloco dissacarídeo α ligado à cadeia peptídica) e **4** (com bloco dissacarídeo β ligado ao peptídeo), os quais apresentaram-se como potenciais substratos aceptores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* na presença de fetuína. Os compostos **2** e **4** forneceram os correspondentes glicopeptídeos sialilados: NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- α LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **7** (85%) e NH₂(Thr)₂-(Neu5Ac α (2-3)- β LacNAc)-(Thr)₃-GlyOH **6** (82%). Independente da presença da cadeia peptídica rica em aminoácidos de treonina, a sialilação realizada pela enzima TcTS ocorreu em ambos os isômeros, conforme análise após purificação por filtração em gel, assim como observado para os modelos **41** e **53**. A reação de sialilação também realizada com o bloco β Gal-ThrOH **28** forneceu o derivado sialilado Neu5Ac α (2-3)- β Gal-ThrOH **63** (50%), comprovando que a ponte de GlcNAc entre a unidade de galactose e o aminoácido treonina não é essencial para a atividade enzimática. Todos os resultados foram adequadamente confirmados por análises RMN de ¹H e ESI-MS.

Os aminoácidos glicosilados **22**, **23** e **28**, os dissacarídeos glicosídicos **53** e **41** e as dicetopiperazinas glicosiladas ciclo-(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **59** e ciclo-(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) **60** sintetizados foram submetidos a ensaios biológicos relacionados às atividades tripanocida, antitumoral e de inibição das enzimas fosfoquinases PKG, PKA e PKC. Em relação aos ensaios de atividade tripanocida, foram verificadas maiores taxas de lise parasitária para o açúcar GlcNAcCl **12** (80%) e para o bloco de construção β Gal-ThrOH **28** (81%), na concentração de 32 μ g/mL. Os ensaios de atividade antitumoral envolvendo os aminoácidos glicosilados β GlcNAc-ThrOH **22** e α GlcNAc-ThrOH **23** apresentaram maior citotoxicidade frente às células de leucemia T humana JURKART, com valores respectivos de 100% e 71,4% para os blocos **22** e **23**, na concentração de 1 mg/mL. Já as dicetopiperazinas glicosiladas **59** e **60** demonstraram maior potencialidade citotóxica frente à linhagem HCT-8, com valores de inibição de crescimento celular de 65,7% e 41,8%, respectivamente. Nos ensaios farmacológicos de inibição das enzimas fosfoquinases PKG, PKA e PKC, realizados com o aminoácido glicosilado **22**, foi constatada pequena redução de atividade de PKC na presença de **22**, não sendo verificada nenhuma inibição de PKG e PKA.

Os estudos de modelagem molecular realizados conduziram à obtenção de um padrão farmacofórico preliminar de inibidores de *trans*-sialidases, sendo também realizados cálculos de campos de interação molecular (MIFs) para a determinação da habilidade do sítio ligante de TcTS em interagir com inibidores. Estes resultados serão fundamentais para buscas em bases de dados de compostos contendo propriedades de fármacos, com o objetivo de se propor novos protótipos. Finalmente, estudos de simulações de *docking* dos compostos sintetizados **41**, **53**, **2**, **4** e **28** com o sítio ativo da enzima TcTS foram realizados. Uma superposição estrutural dos compostos **41**, **53**, **2**, **4** e **28** com a molécula aceptora de lactose foi verificada, sendo mantidas para todos eles as interações por ligação de hidrogênio entre as hidroxilas 3-OH e 4-OH da unidade de galactose com o aminoácido Asp59. Além do mais, interações adicionais importantes, inexistentes no complexo lactose-TcTS, foram estabelecidas entre grupos específicos destes compostos com determinados resíduos do sítio ativo de TcTS, como Arg311, Arg35, Asn60 e Ser122. Os resultados de *docking* indicaram a unidade de galactose destas moléculas como um requisito essencial para a atividade de *trans*-glicosilação, além de sugerirem possíveis modificações moleculares a serem introduzidas nestas estruturas explorando interações com os sítiosceptor e doador de TcTS.

6. Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRELOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O. A novel sialylated and galactofuranose-containing *O*-linked glycan, Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 6(Gal β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.93-96, 2003.

ALESHIN, A. E.; STOFFER, B.; FIRSOV, L. M.; SVENSSON, B.; HONZATKO, R. B. Crystallographic complexes of glucoamylase with maltooligosaccharide analogs: relationship of stereochemical distortions at the nonreducing end to the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 35, p. 8319-8328, 1996.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medical Research Reviews**, v. 215, p. 403-410, 2006.

ALVES, M. J.; COLLI, W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Partial purification by gel chromatography. **FEBS Lett.**, v. 52, p. 188-190, 1975.

AMAYA, M.,F.; BUSCHIAZZO, A.; NGUYEN, T.; ALZARI, P.,M. The High Resolution Structures of Free and Inhibitor-bound *Tripanosoma rangeli* Sialidase and its Comparison with *T.cruzi trans*-Sialidase. **J. Mol. Biol**, v. 325, p. 773-784, 2003.

AMAYA, M. F.; WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; WEHENKEL, A.; NGUYEN, T.; BUSCHIAZZO, A.; PARIS, G.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G.; ALZARI, P. M. Structural Insights into the Catalytic Mechanism of *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase. **Structure**, v. 12, p. 775-784, 2004.

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related Alpha-keto Acids: an Evolutionary Perspective. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 439-469, 2002.

ARAYA, J. E. et al. Diterpenoides from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 413-418, 2003

ARSEQUELL, G.; KRIPPNER, L.; DWEK, R. A.; WONG, S. Y. C. Building Blocks for Solid Phase Glycopeptide Synthesis: 2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glycosides of FmocSerOH and FmocThrOH. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 2383-2384, 1994.

ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, p. 473-476, 2005.

BANOUB, J. Synthesis of Oligosaccharides of 2-Amino-2-deoxy Sugars. **Chem. Rev.**, v. 92, p. 1167, 1992.

BENAKLI, K.; ZHA, C.; KERNS, R. J. Chemoenzymatic Solution- and Solid-Phase Synthesis of *O*-Glycopeptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. A General Route to *O*-LacNAc, *O*-Sialyl-LacNAc, and *O*-Sialyl-Lewis-X Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 9461-9462, 2001.

BONGAT, A. F. G.; DEMCHENKO, A. V. Recent trends in the synthesis of O-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 374-406, 2007.

BOULLANGER, P.; JOUINEAU, M.; BOUAMMALI, B.; LAFONT, D.; DESCOTES G. The use of N-alkoxycarbonyl derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucose as donors in glycosylation reactions. **Carbohydrate Research**, v. 202, p. 151-164, 1990.

BUSCHIAZZO A.; AMAYA, M. F.; CREMONA, M. L.; FRASCH, A. C.; ALZARI, P. M. The Cristal Structure and Mode of Action of *trans*-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Patogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, p. 757-768, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. C. Enzymically inactive members of the *trans*-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display [beta]-galactose binding activity. **Glycobiology**, v. 7, p. 1167-1173, 1997.

CAMPO, V. L.; SILVA, C. H. T. P.; TAFT, C. A.; CARVALHO, I. *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase: Mechanisms and synthetic application for drug design. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, 1st ed.; Taft, C. A., Ed.; Research Signpost, Trivandrum, India, 2006; 27-49.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; ALLMAN, S.; DAVIS, B. G.; FIELD, R. A. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to *Trypanosoma cruzi* mucins. **Org. Biomol. Chem.**, v. 5, p. 2645-2657, 2007.

CAMPO, V. L.; BORGES, A. D. L.; CARVALHO, I. HPLC Analysis of Glycosylated Amino Acids. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 648-654, 2006.

CAREY F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry – A: Structure and Mechanisms**. 4a. edição, Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.

CARVALHO, I.; SCHEUERL, S. L.; KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Practical synthesis of the 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-beta-D-glucosides of Fmoc-serine and Fmoc-threonine and their benzyl esters. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1039-1043, 2003.

CERECETTO H.; GONZALEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, p. 1187-1213, 2002.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 9-31, 2000.

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.

CORFIELD, T. Bacterial sialidases-Roles in pathogenicity and nutrition. **Glycobiology**, v. 2, p. 509-521, 1992.

COREY, W. T.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* Uses a 45-KDa Mucin for Adhesion to Mammalian Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 29-34, 2002.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas Disease Chemoterapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.1, p. 3-24, 2002.

DANIELI, B., FALCONE, L., MONTI, D., RIVA, S., GEBHARDT, S., ZSILAVECZ, M., S. Regioselective Enzymatic Glycosylation of Natural Polyhydroxylated Compounds: Galactosylation and Glucosylation of Protopanaxatriol Ginsenosides. **J. Org. Chem.**, v. 66, p. 262-269, 2001.

DARDONVILLE, C. Recent. advances. in. antitrypanosomal chemotherapy: patent literature. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 15, p. 1241-1257, 2005.

DAVIS, B. G. Synthesis of Glycoproteins. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 579-601, 2002.

DE CASTRO, S.; PINTO, M. C. F. R., PINTO, A. V. L. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*: establishing a structure/activity relationship. **Microbios.**, v. 78, p. 83-90, 1994.

DELAForge, M.; Bouille, G.; Jaouen, M.; Jankowski, C. K.; Lamouroux, C.; Bensoussan, C. Recognition and oxidative metabolism of cyclodipeptides by hepatic cytochrome P450. **Peptides**, v. 22, p. 557, 2001.

De Nino, M. P. The synthesis and glycosidation of *N*-acetylneuraminic acid. **Synthesis**, p. 583, 1991.

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*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 32078-32083, 1996.

DS VIEWERPRO 5.0, December 2002. San Diego: Accelrys Inc., 2002.

Duverger, E.; Pellerin-Mendes, C.; Mayer, R.; Roche, A.C.; Monsigny, M. Nuclear import of glycoconjugates from the Cytosol. **J. Cell. Sci.**, v. 108, 1849-1861, 1995.

Ellervik, U.; Magnusson, G. Glycosylation with *N*-troc-protected glycosyl donors. **Carbohydrate Research**, v. 280, p. 251-260, 1996.

El-Sayed, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

Fradera, X.; De La Cruz, X.; Silva, C.H.T.P.; Gelpi, J. L.; Luque, F. S.; Orozco, M. Ligand-induced changes in the binding sites of proteins. **Bioinformatics**, v. 18, p. 939, 2002.

Frasch, A. C. C. Probing molecular function of trypanosomal sialidases: single point mutations can change substrate specificity and increase hydrolytic activity. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 282-286, 2000.

Frasch, A. C. C., Buscaglia, C. A.; Leguizamón, M. S.; Campetella, O. The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase enhances the immune response against the enzymatic domain. **J. Infect. Disease**, v. 177, p. 431, 1998.

Ferrero-García, 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. **Eur. J. Biochem.**, v. 213, p. 765-771, 1993.

FISCHER, P. M. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. **J. Pept. Sci.**, v. 9, p. 9-35, 2003.

FURUIKE, T.; YAMADA, K.; OHTA, T.; MONDE, K.; NISHIMURA, S., I. An efficient synthesis of a biantennary sialooligosaccharide analog using a 1,6-anhydro- β -lactose derivative as a key synthetic block. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5105-5113, 2003.

GALLO-RODRIGUEZ, C.; GIL-LIBARONA M. A.; MENDOZA, V. M.; LEDERKREMER, R. M. Synthesis of β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-[β -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 4)]-D-GlcNAc, a tetrasaccharide component of mucins of *Trypanosoma cruzi*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 9373-9380, 2002.

GASCÓN, J.; ALBAJAR, P.; CANÑAS, E.; FLORES, M.; GÓMEZ, J.; HERRERA, P. R. N.; LAFUENTE, C. A.; LUCIARDI, H. L.; MONCAYO, A.; MOLINA, L.; MUÑOZ, J.; PUENTE, S.; SANZ, G.; TREVIÑO, B.; SALLES, X. S. Diagnosis, Management, and Treatment of Chronic Chagas' Heart is not Endemic. **Rev. Esp Cardiol.**, v. 60, p. 285-293, 2007.

GASKELL A.; CRENNELL, S.; TAYLOR, G. The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. **Structure**, v. 3, p. 1197-1205, 1995.

GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas Disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p.103, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptors signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews**, v. 6, p. 895-905, 2006.

GOLDBERG, D. E. **Genetic Algorithms in Search Optimization and Machine Learning**. Addison-Wesley, Reading, MA, 1989.

HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S. R.; FIELD, R. A. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase towards NeuAc- α -2,3-Gal- β -O-PNP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 141-144. 2001.

HORTON, D. A.; BOURNE, G. T.; SMYTHE, M. L. Exploring privileged structures: The combitorial synthesis of cyclic peptides. **Mol. Diversity**, v. 5, p. 289, 2000.

HORTON, D. 2-Acetamido-3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl chloride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 6, p. 282-285, 1972.

IMOTO, M; YOSHIMURA, H; SHIMAMOTO, T; SAKAGUCHI, N; KUSUMOTO, S; SHIBA, T. Total Synthesis of *Escherichia coli* Lipid A, the Endotoxically Active Principle of Cell-Surface Lipopolysaccharide. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 60, p. 2205-2214, 1987.

JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic *O*-glycosylation. **Carbohydrate Research**, v.341, p.1266-1281, 2006.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R.; Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 727-748, 1997.

JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent Studies of the Anomeric Effect. **Tetrahedron**, v.48, p.5019-5087, 1992.

KARTHA, K. P. R.; ALOUI, M.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry. 3. Efficient activation of glycosyl halides in combination with DDQ. **Tetrahedron Lett**, v. 37, p. 8807, 1996.

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.

KARTHA K. P. R., BALLELL L., BILKE J., MCNEIL M., FIELD. R. A. Iodine and its interhalogen compounds: versatile reagents in carbohydrate chemistry. XIV. Glycosylated amino acid synthesis. **J. Chem. Soc. Perkin I**, p. 770-772, 2001.

KEARSE, K.P.; HART, G.W. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 1701-1705, 1991.

KLYOSOV, A. A.; RASHKOVETSKY, L. G.; TAHIR, M. K.; KEUNG, W. M. P. Possible Role of Liver Cytosolic and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenases in Acetaldehyde Metabolism. **Biochemistry**, v. 35, p. 4445-4456, 1996.

KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COOMBS, G.H. Enzymes of parasite thiol. metabolism as drug targets. **Parasitology Today**, v. 15, p.404-409, 1999.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Synthesis of Complex Carbohydrates and Glycoconjugates: Enzyme-Based and Programmable One-Pot Strategies. **Chemical Reviews**, v.100, p.4465-4494, 2000.

LAEDERACH, A.; REILLY, P. Modeling protein recognition of carbohydrates. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 60, p. 591-597, 2005.

LEMIEUX, R. U; RATCLIFFE, M. The azidonitration of tri-*O*-acetyl-D-galactal. **Can. J. Chem.**, v. 57, p. 1244, 1979.

LI, Q.; SU, B.; LI, H.; MENG, X-B; CAI, M-S; LI, Z-J; ZHOU, R-L.; S, T-L. Synthesis and potential antimetastatic activity of monovalent and divalent β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 207-217, 2003.

LINARES, GEG.; RAVASCHINO, EL.; RODRIGUEZ, JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13 (3), 335-360, 2006.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; HART, G.W.; **Neuroscience**, v.101, p. 10804-10809, 2004.

LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs Active Against *Trypanosoma cruzi* in Vitro. **Planta Médica**, v.64, p.667-669, 1998.

MARTINEZ-DIAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Relationship between Biological Behaviour and Randomly Amplified Polymorphic DNA Profiles of *Trypanosoma cruzi* Strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 251-256, 2001.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 9923-9932.

MATSUOKA, K.; OHTAWA, T.; HINO, H.; KOYAMA, T.; ESUMI, Y.; NISHIMURA, S-I; HATANO, K.; TERUNUMA, D. Synthesis of a useful anomeric thioacetate of an *N*-Acetyllactosamine derivative and its application. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3617-3620, 2003.

MAYA, J. D.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; RODRÍGUEZ, A.; PUEBLA, P. *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of Parasite Growth and Respiration by Oxazolo(thiazolo)pyridine Derivatives and Its Relationship to Redox Potential and Lipophilicity. **Experimental Parasitology**, v.99, p. 1-6, 2001.

MEINJOHANNNS, E.; BERENGUEL, A. V.; MELDAL, M.; PAULSEN, H.; BOCK, K. Comparison of *N-DTS* and *N-Aloc* in the solid-phase syntheses of *O*-GlcNAc glycopeptide fragments of RNA-polymerase II and mammalian neurofilaments. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.1**, p. 2165-2175, 1995.

MEINJOHANNNS, E.; MELDAL, M.; BOCK, K. Efficient Synthesis of *O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-Ser/ Thr Building Blocks for SPPS of *O*-GlcNAc Glycopeptides. **Tetrahedron Lett.**, v. 36, p. 9205-9208, 1995.

MEINJOHANNNS, E.; MELDAL, M.; SCHLEYER, A.; PAULSEN, H.; BOCK, K. Efficient syntheses of core 1, core 2, core 3 and core 4 building blocks for SPS of mucin *O*-glycopeptides based on the *N*-Dts-method. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 985-993, 1996.

MEINJOHANNNS, E.; MELDAL, M.; JENSEN, T.; WERDELIN, O.; STAMPINO, L. G.; MOURITSEN, S.; BOCK, K. Versatile solid-phase thiolytic reduction of azido and *N*-Dts groups in the synthesis of haemoglobin (67-76) *O*-glycopeptides and photoaffinity labelled analogues to study glycan T-cell specificity. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 871-884, 1997.

MELDAL, M.; AUZANNEAU, F.-I.; HINDSGAUL, O.; PALCIC, M. M. A PEGA resin for use in the solid phase chemical/enzymatic synthesis of glycopeptides. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 1849-1850, 1994.

MELO; E. B.; CARVALHO, I. α e β glucosidases como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 29, p. 840-843, 2006.

MITCHELL, S. A.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-Phase Synthesis of *O*-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin. **Journal of the Organic Chemistry**, v.66, p.2327-2342, 2001.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; SENNE, A.; PORTILLO, C. F.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; BARRIO, A. G. In Vitro and in Vivo Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of a Novel Nitro-derivative. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 553-557, 2002.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

NAGAE, M.; TSUCHIYA, A.; KATAYAMA, T.; YAMAMOTO, K.; WAKATSUKI, S.; KATO, R. Structural Basis of the Catalytic Reaction Mechanism of Novel 1,2- α -L-Fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 18497-18509, 2007.

NING, J.; ZHANG, W.; YI, Y.; YANG, G.; WU, Z.; YI, J.; KONG, F. Glucan-like synthetic oligosaccharides: iterative synthesis of linear oligo- β -(1,3)-glucans and immunostimulatory effects. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 2193-2203, 2003.

NISSINK, J. W. M.; MUNG, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. Proteins: Structure, Function and Genetics. **Proteins**, v. 49, p. 457-471, 2002.

OSBORN, H. M. I. **Synthetic Methods of Carbohydrates**; 1º ed.; The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, UK, Academic Press, 2003.

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 J.**, v. 11, p. 1705, 1992.

PAULINO, M.; IRIBARNE F.; DUBIN, M.; AGUILERA-MORALES, S.; TAPIA O.; STOPPANI, AOM. The chemotherapy of Chagas' disease: An overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 499-519, 2005.

PAULSEN, H.; HELPAP, B. Synthese von teilstrukturen der N-Glycoproteine des komplexen typs. **Carbohydr. Res.**, v. 216, p. 289-313, 1991.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; 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 Å resolution, **FEBS Letters**, v. 520, p. 13-17, 2002.

PEREIRA, V. L.; SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; RODRIGUES, M. M. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1299-1307, 2000.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**, 2ª edição, Ed. Pergamon Press Ltd., EUA, 1980.

POLLEVICK, G. D.; DI NOIA, J. M.; SALTO, M. L.; LIMA, C.; LEGUIZAMON, M. S.; LEDERKREMER, R. M.; FRASCH, A. C. C. *Trypanosoma cruzi* Surface Mucins with Exposed Variant Epitopes. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 27671-27680, 2000.

PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; BIENEN, E. J.; CLARKSON, A. B. Characterization of a novel *trans*-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as a sialic acid acceptor. *Journal of Experimental Medicine*. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 465-474, 1993.

POVEDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. NMR studies of carbohydrate-protein interactions in solution. **Chemical Society Reviews**, v. 27, p. 133-143, 1998.

PREVIATO, L. M.; PREVIATO, J. O.; JONES, C.; XAVIER, M. T.; PARODI, A. J.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L. R. Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of *O*-linked sialyl-oligosaccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7241. 1995.

PREVIATO, J. O.; JONES, C.; GONCALVES, L. P. B.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L. R. AND MENDONÇA-PREVIATO, L. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **J. Biochem**, v. 301, p.151-159, 1994.

PREVIATO, J. O.; PENNAS, M. S.; AGRELLOS, O. A.; JONES, C.; OELTMANN, T.; TRAVASSOS, L. R.; PREVIATO, L. M. Biosynthesis of *O*-*N*-Acetylglucosamine-linked Glycans in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14982-14988, 1998.

RADEMACHER, T. W. Recent advances in glycoconjugate analysis and glycobiology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.9, p. 74-9, 1998.

RAHEEL SHAFI, R.; IYER, S.P.N.; ELLIES, L.G.; O'DONNELL, N.; MAREK, K.W.; CHUI, D.; HART, G.W.; MARTH, J.D. The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X

chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 5735-5739, 2000.

RAMOS, A. M.; DUSCHAK, V. G.; GEREZ DE BURGOS, N. M.; BARBOZA, M.; REMEDI, M. S.; VIDES, M. A.; CHIABRANDO, G. A. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human α -2-macroglobulin and pregnancy zone protein. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 121-130, 2002.

RAMKUMAR, R.; SUROLIA, A.; PODDER, S. K. Energetics of carbohydrate binding by a 14 kDa S-type mammalian lectin. **Biochem J.**, v. 308, p. 237-241, 1995.

REN, H.; GRADY, S.; BANGHART, M.; MOULTHROP, J.S.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; MOYNA, G. Synthesis and In Vitro Protozoocidal Activity of a Series of Benzotropolone Derivatives Incorporating Endocyclic Hydrazines. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 38, p. 949-957, 2003.

RENSLO, R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chem. Biol.**, v. 2, p. 701-710, 2006.

RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; EICHINGER, D.; RODRIGUES, M.; SCHENKMAN, S. Temperature differences for *trans*-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase. **Glycobiology**, v.7, p.1237, 1997.

ROPERT, C.; FERREIRA, L. R. P.; CAMPO, M. A. S.; TRAVASSOS, L. R., TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1015-1025, 2002.

SAHA, U. K.; SCHMIDT, R. R. Efficient synthesis of O-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl)-serine and -threonine building blocks for glycopeptide formation. **Journal Chemical Society, Perkin Trans 1**, v.1, p.1855-1860, 1997.

SALTO, M. L.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; LIMA, C.; LEDERKREMER, R. M. Separation of galbeta1 XGlcNAc and galbeta1 XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the alditols by high-pH anion-exchange chromatography and thin-layer chromatography: characterization of mucins from *Trypanosoma cruzi*. **Anal. Biochem.**, v. 279, p. 79-84, 2000.

SCHENKMAN, S.; ENIMA, C. M.; BRIONES, M. R. S.; FREITAS, L. H. G.; SCHENKMAN, R. P. F.; UEMURA, H. Organization of *trans*-Sialidase Genes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.77, p.115-125, 1996.

SCHENKMAN, S.; CHAVES, L. B.; PONTES DE CARVALHO, L.; EICHINGER, D. A Proteolytical Fragment of *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase Lacking The Carboxyl-Terminal Domain Is Active, Monomeric And Generates Antibodies That Inhibit Enzymatic Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7970, 1994.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M. E. A.; NUSSENZWEIG, V. Structural and Functional Properties of *Trypanosoma Cruzi trans*-Sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, MEA. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHMIDT, D.; SAUERBREI, B.; THIEM, J. Chemoenzymatic Synthesis of Sialyl Oligosaccharides with Sialidases Employing Transglycosylation Methodology. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 8518-8526, 2000.

SCHMIDT, R. R. New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides- Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method? **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 25, p. 212-235, 1986.

SCHMIDT, R. R.; MICHEL, J. Direct O-glycosyl trichloroacetimidate formation, nucleophilicity of the anomeric oxygen atom. **Tetrahedron Lett.**, v. 25, p. 821, 1984.

SCHMIDT, R. R.; BEHRENDT, M., TOEPFER, A. Nitriles as Solvents. in Glycosylation Reactions: Highly Selective β -Glycoside Synthesis. **Synlett**, p. 694-696, 1990.

SCHNEIDER, G.; BÖHM, H. Virtual screening and fast automated docking methods. **Drug Discovery Today**, v. 07, p. 64-70, 2002.

SCOTT, A. M.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-phase synthesis of O-linked glycopeptide analogues of enkephalin. **J. Org. Chem.**, v. 66, p. 2327-2342, 2001.

SCUDDER, P.; DOOM, J. P.; CHUENKOVA, M.; MANGER, I. D.; PEREIRA, M. E. A. Enzymatic Characterization of β -D-galactoside α 2,3-*trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 9886-9891, 1993.

SEEBERGER, P. H; HAASE, W-C. Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. **Chem. Rev.**, v. 100, p. 4389-4393, 2000.

SEITZ, O.; WONG, C-H. Chemoenzymatic Solution- and Solid-Phase Synthesis of *O*-Glycopeptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. A General Route to *O*-LacNAc, *O*-Sialyl-LacNAc, and *O*-Sialyl-Lewis-X Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.119, p.8766-8776, 1997.

SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B. K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Médica**, v. 62, p.98-105, 1996.

SERRANO, A. A; ALMEIDA, I. C.; JÚNIOR, L. H. F.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 114, p. 143-150, 2001.

SILIGIANNI, T.; AMIRIDIS, G.; VAINAS, E. Activity of glycosidases (β -N-acetyloglucosaminidase, α -mannosidase, and β -galactosidase) in the uterine luminal fluid of cows after multiple ovulation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 300-304, 2007.

SLAWSON, C.; HART, G.W. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.13, p. 631-636, 2003.

SLAWSON, C.; PIDALA, J.; POTTER, R. Decrease in *N*-acetyl- β -glucosamine Containing Proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1537, p. 147-157, 2001.

SPARTAN' 06 FULL; Tutorial and User's guide; Wave function, Inc., USA, 2006.

SPIRO, R. G. Studies on Fetuin, a Glycoprotein of Fetal Serum: Isolation, Chemical Composition, And Physicochemical Properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p.2860-9, 1960.

STEVERDING D. AND. TYLER, K. M. Novel antitrypanosomal agents. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14, p. 939-955, 2005.

STTOPANI, A. O. M. Quimioterapia de La Enfermedad de Chagas. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59 (Supl II), p.147-165, 1999.

SZNAIDMAN, M. **Bioorganic Chemistry: Carbohydrates** (Ed.: S. M. Hecht), Oxford University Press, New York, p. 1-56, 1999.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; SILVA, J. S. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4247-4253, 2002.

TARTAROTTI, E.; OLIVEIRA, M. T. V. A.; CERON, C. R.. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arq. Ciênc Saúde**, v. 11, p. 117, 2004.

TODESCHINI, A.; SILVEIRA, E. X.; JONES, C.; WAIT, R.; PREVIATO, J. O.; PREVIATO, L. M. Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of *O*-linked sialyl-oligosaccharides. **Glycobiology**, v. 11, p. 47-55, 2001.

TOLBORG, J. F.; PETERSEN, L.; JENSEN, K. J.; MAYER, C.; JAKEMAN, D. L.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. Solid-phase oligosaccharide and glycopeptide synthesis using glycosynthases. **J. Org. Chem.**, v. 67, p. 4143-4149, 2002.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A. J. In vitro and in vivo Activities of Ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 27-38, 2003.

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. **Glicobiology**, v. 2, p. 541-548, 1992.

VARGAS-BERENGUEL, A.; MELDAL, M.; PAULSEN, H.; BOCK, K. Convenient synthesis of *O*-(2-acitamido-2deoxy- β -D-glucopyranosyl)-serine and -threonine building blocks for solid-phase glycopeptide assembly. **Journal Chemical Society, Perkin Trans 1**, v.18, p.2615-2619, 1994.

VENDEVILLE, S.; BOUREL, L.; DAVIOUD-CHARVET, E.; GRELLIER, P.; DEPREZ, B.; SHERGHERAERT, C. Uromated Parallel Synthesis of a Tetrahydroisoquinoline-Based Library: Potential Prolyl Endopeptidase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p. 437-442, 1999.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 603-609, 2003.

VETERE, A.; PAOLETTI, S. Complete synthesis of 3'-sialyl-N-acetylglucosamine by regioselective transglycosylation. **FEBS Lett**, v. 399, p. 203-6, 1996.

WANG, D. X.; LIANG, M. T.; TIAN, G. J.; LIN, H.; LIU, H. Q. A facile pathway to synthesize diketopiperazine derivatives. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 865, 2002.

WANG, S.-S.; GISIN, B. F.; WINTER, D. P.; MAKOFKSKE, R.; KULESHA, I. D.; TZOUGRAKI, C.; MEIENHOFER, J. Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts. **J. Org. Chem.**, v. 42, p. 1286-1290, 1977.

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. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 7532-7533, 2003.

WELLS, L.; VOSSELLER, K.; HART, G.W. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. **Science**, v. 291, p. 2376-2378, 2001.

WINANS, K. A.; KING, D. S.; RAO, V. R.; BERTOZZI, C. R. A Chemically Synthesized Version of the Antibacterial Glycopeptide, Dipteridin, Disrupts Bacterial Membrane Integrity. **Biochemistry**, v. 38, p. 11700-11710, 1999.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5a edição, Ed Lippincott Williams & Wilkim, United States, 2002.

WITTMANN, V.; LENNARTZ, D. Copper(II)-mediated Activation of Sugar Oxazolines: Mild and Efficient Synthesis of *b*-Glycosides of *N*-Acetylglucosamine. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 1363-1367, 2002.

http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/

YANG, X.; SU, K.; ROOS, M.D.; CAHG, Q.; PATERSON, A.J.; KUDLOW, J.E. *O*-linkage of *N*-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 6611-6616, 2001.

ZACHARA, N.E.; HART, G.W. The emerging significance of *O*-GlcNAc in cellular regulation. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 431-438, 2002.

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.

7. Anexos

ANEXO 1. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-treonina **17**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,76	2	d	J 7,6	CH Fmoc Ph, H-1, H-1'
7,64	2	d	J 7,8	CH Fmoc Ph, H-4, H-4'
7,41-7,26	9	m	-	Fmoc Ph, OCH_2Ph , H-2, H-2', H-3, H-3'
5,83	1	d	J 9,1	NH Thr
5,54	1	d	J 8,4	NHAc
5,25	1	t	$J_{2,3}$ 10,1	H-3
5,21, 5,14	2	AB	J_{AB} 12,2	OCH_2Ph
5,00	1	t	$J_{3,4}$ 10,1	H-4
4,65	1	d	$J_{1,2}$ 8,1	H-1
4,47-4,40	3	m	-	CH_2 Fmoc, βCH Thr
4,35	1	dd	J 7,3, J 10,6	αCH Thr
4,24	1	t	J 7,3	CH Fmoc
4,19	1	dd	$J_{5,6a}$ 4,3, $J_{6a,6b}$ 12,3	H-6a
4,02	1	dd	$J_{5,6b}$ 2,2, $J_{6a,6b}$ 12,3	H-6b
3,67	1	dd	$J_{1,2}$ 8,1, $J_{2,3}$ 10,1	H-2
3,51-3,47	1	m	-	H-5
2,03-1,93	12	4s	-	4x COCH_3
1,20	3	d	J 6,3	CH_3 Thr

ANEXO 2. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-L-treonina **19**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,77	2	d	J 7,5	CH Fmoc Ph, H-1, H-1'
7,64	2	d	J 6,0	CH Fmoc Ph, H-4, H-4'
7,49-7,26	9	m	-	Fmoc Ph, OCH_2Ph , H-2, H-2', H-3, H-3'
5,94	1	d	J 9,3	NHAc
5,73	1	d	J 9,5	NHThr
5,20-5,14	1	m	-	H-3
5,19, 5,09	2	AB	J_{AB} 12,2	OCH_2Ph
5,08	1	t	$J_{3,4}$ 9,4	H-4
4,70	1	d	$J_{1,2}$ 3,6	H-1
4,55-4,44	3	m	-	CH_2 Fmoc, αCH Thr
4,31-4,07	5	m	-	βCHThr , CHFmoc , H-2, H-6a, H-6b
4,01-3,97	1	m	-	H-5
2,06, 2,04, 2,03, 1,96	12	4s	-	4x COCH_3
1,28	3	d	J 6,2	CH_3 Thr

ANEXO 3. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicopiranosil)-L-treonina **22**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,40	1	d	$J_{1,2}$ 8,3	H-1
4,18	1	m	-	$\beta\text{CH Thr}$
3,82-3,78	1	m	-	H-6a
3,65-3,62	1	m	-	H-2
3,60	1	t	$J_{2,3}$ 9,8	H-3
3,52-3,50	1	m	-	$\alpha\text{CH Thr}$
3,44	1	t	$J_{3,4}$ 9,8	H-4
3,37-3,30	2	m	-	H-5, H-6b
1,95	3	s	-	NHAc
1,20	3	d	J 6,5	CH_3 Thr

ANEXO 4. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) de 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil)-L-treonina **23**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,80	1	d	$J_{1,2} 3,7$	H-1
4,40	1	m	-	βCHThr
3,82	1	m	-	$\alpha\text{CH Thr}$
3,72-3,65	2	m	-	H-2, H-6a
3,62-3,48	3	m	-	H-3, H-5, H-6b
3,33	1	t	$J_{3,4} 10,1$	H-4
1,85	3	s	-	NHAc
1,21	3	d	$J 6,5$	$\text{CH}_3 \text{Thr}$

ANEXO 5. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-L-treonina **26**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,72	2	d	J 7,2	CH Fmoc Ph, H-1, H-1'
7,58	2	d	J 7,2	CH Fmoc Ph, H-4, H-4'
7,39-7,20	9	m	-	Fmoc Ph, OCH_2Ph , H-2, H-2', H-3, H-3'
5,60	1	d	J 9,2	NH Thr
5,25	1	m	-	H-4
5,13, 5,10	2	AB	J_{AB} 12,2	OCH_2Ph
5,06	1	dd	$J_{1,2}$ 8,0, $J_{2,3}$ 10,5	H-2
4,87	1	dd	$J_{3,4}$ 3,6, $J_{2,3}$ 10,5	H-3
4,40-4,34	2	m	-	2 CH Thr
4,32	2	dd	J 2,8, J 7,8	CH_2 Fmoc
4,30	1	d	$J_{1,2}$ 7,6	H-1
4,17	1	t	J 7,3	CH Fmoc
4,08-3,93	2	m	-	H-6a, H-6b
3,62	1	t	J 7,0	H-5
1,99, 1,98, 1,95, 1,92	12	4s	-	4x COCH_3
1,15	3	d	J 6,3	CH_3 Thr

ANEXO 6. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) de β -D-galactopiranosil-L-treonina **28**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,43-4,37	2	m	-	H-1, βCH Thr
3,92-3,78	2	m	-	H-3, αCH Thr
3,70-3,50	4	m	-	H-4, H-5, H-6a, H-6b
3,43	1	m	-	H-2
1,22	3	d	J 6,5	CH_3 Thr

ANEXO 7. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do Éster benzílico de 3,6-di-*O*-acetil-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil-*N*-(9-Fluorenilmetoxycarbonil-L-treonina **40**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,77	2	d	J 7,5	CH Fmoc Ph
7,64	2	d	J 6,0	CH Fmoc Ph
7,49-7,26	9	m	-	Fmoc Ph, OCH_2Ph
5,85-5,62	2	2d	J 9,4	2 NH
5,28	1	dd	$J_{3',4'} 3,4, J_{4',5'} 0,8$	H-4'
5,13	1	dd	$J_{2,3} 10,5, J_{3,4} 8,6$	H-3
5,10	1	d	$J_{1',2'} 7,8, J_{2',3'} 10,4$	H-2'
5,02	2	AB	$J_{\text{AB}} 12,2 \text{ Hz}$	OCH_2Ph
4,90	1	dd	$J_{2',3'} 10,4, J_{3',4'} 3,4$	H-3'
4,57	1	d	$J_{1,2} 3,7$	H-1
4,48	1	d	$J_{1',2'} 7,8$	H-1'
4,44-4,34	3	m	-	αCHThr , $\text{CH}_2 \text{Fmoc}$, H-6b
4,22	1	t	J 7,3 Hz	CHFmoc
4,14-4,09	3	m	-	βCHThr , H-2, H-6a'
4,06	1	dd	$J_{6a',6b'} 11,0, J_{5',6b'} 5,9$	H-6b'
4,01	1	dd	$J_{6a,6b} 11,0, J_{5,6a} 5,3$	H-6a
Continua				

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
3,86	1	ddd	$J_{5,6a} 5,3, J_{5,6b} 1,9,$ $J_{4,5} 10,0$	H-5
3,80	1	dd	$J_{5',6a'} 7,4, J_{5',6b'} 6,1$	H-5'
3,69	1	dd	$J_{3,4} 9,8, J_{4,5} 9,5$	H-4
2,15-1,93	21	m	-	CH_3CO
1,21	3	d	$J 6,5$	CH_3 Thr

ANEXO 8. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) de β -D-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosil-L-treonina **41**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,77	1	d	$J_{1,2}$ 3,7	H-1
4,30	1	d	$J_{1',2'}$ 7,8	H-1'
4,29	1	m	-	βCHThr
3,80-3,65	7	m	-	H-4', H-2, H-6a, H-6b, H-3, H-3', αCHThr
3,62-3,52	4	m	-	H-6a', H-6b', H-4, H-5
3,50	1	m	-	H-5'
3,36	1	dd	$J_{1',2'}$ 7,8, $J_{2',3'}$ 10,1	H-2'
1,87	3	s	-	NHAc
1,24	3	d	J 6,5	CH_3 Thr

ANEXO 9. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) de β -D-galactopiranosil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosil-L-treonina **53**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,39	1	d	$J_{1,2}$ 7,5	H-1
4,29	1	d	$J_{1',2'}$ 7,8	H-1'
4,17	1	m	-	βCHThr
3,78	1	d	$J_{\alpha\text{CH}, \beta\text{CH}}$ 12,1	$\alpha\text{CH Thr}$
3,77-3,74	2	m	-	H-4', H-4
3,70-3,62	2	m	-	H-6a, H-6b
3,60-3,50	5	m	-	H-6a', H-6b', H-5', H-3, H-2
3,47	1	dd	$J_{2',3'}$ 3,3, $J_{3',4'}$ 9,9	H-3'
3,38-3,33	2	m	-	H-5, H-2'
1,87	3	s	-	NHAc
1,13	3	d	J 6,5	$\text{CH}_3 \text{Thr}$

ANEXO 10. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) do glicopeptídeo $(\text{Ac})_3\beta\text{-D-GlcNAc}-(\text{Thr})_6\text{-GlyOH}$ **42**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,12	1	dd	$J_{2,3}$ 9,3, $J_{3,4}$ 10,0	H-3
4,93	1	t	$J_{3,4}$ 10,0	H-4
4,80	1	d	$J_{1,2}$ 8,6	H-1
4,45-4,00	12	m	-	12 x CH Thr
3,85-3,75	6	m	-	H-2, H-6a, H-6b, H-5 e CH_2Gly
1,98-1,83	12	m	-	COCH_3
1,10-1,00	18	m	-	6 CH_3 Thr

ANEXO 11. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) do glicopeptídeo $\alpha\text{-D-GlcNAc-(Thr)}_5\text{-Thr}[\beta\text{-D-GlcNAc}]\text{-GlyOH}$ **48**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,29-3,06	28	m	-	H-3, H-3', H-4, H-4', H-1, H-1', 12 x CH Thr, H-2, H-2', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-5, H-5', CH ₂ Gly
1,77	6	m	-	NHAc
1,25-1,10	18	m	-	6 CH ₃ Thr

ANEXO 12. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) do glicopeptídeo $(\text{Ac})_4\beta\text{-D-Gal-Thr-Thr}[(\text{Ac})_4\beta\text{-D-Gal-Thr-Thr}[(\text{Ac})_4\beta\text{-D-Gal-Thr-ThrGlyOH}] \mathbf{49}$

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,40	3	m	-	H-4
5,17	3	m	-	H-3
5,00	3	m	-	H-2
4,90	3	m	-	H-1
4,63-3,80	23	m	-	12x CH Thr, CH_2 Gly, H-6a, H-6b, H-5
2,17-1,90	36	m	-	COCH_3
1,25-1,00	18	m	-	6 CH_3 Thr

δ H (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,71	1	d	$J_{1,2}$ 3,7	H-1
4,50-4,30	2	m	-	α CHThr
4,28	1	d	$J_{1,2}$ 8,1	H-1'
4,20-3,95	5	m	-	β CHThr
3,90-3,45	16	m	-	α CHThr, CH ₂ Gly, H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b, H-2, H-3, H-4, H-4', H-5, H-5', H-3'
3,35	1	m	-	H-2'
1,85	3	s	-	NHAc
1,20-1,00	15	m	-	5 CH ₃ Thr

ANEXO 14. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de ciclo (2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- β -D-glicopiranosil)-L-serina-D-fenilalanina **59**

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,27-7,20	5	m	-	CH Phe arom
6,64	1	d	-	NH Phe
6,41	1	d	J 9,0	NHAc
5,09-4,94	2	m	-	H-3, H-4
4,49	1	d	J 8,5	H-1
4,30-4,27	1	m	-	α -CH Phe
4,22-3,95	4	m	-	H-2, H-6a, H-6b, α -CH Ser
3,67-3,56	3	m	-	H-5, β -CH ₂ Ser
3,25	1	dd	J 13,8, J 3,8	β -CH _{2a} Phe
2,91	1	dd	J 13,8, J 8,0	β -CH _{2b} Phe
2,01, 1,98, 1,96, 1,93	12	4s	-	4x COCH ₃

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento de fármacos inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Pós-graduanda: Vanessa Leiria Campo

Orientadora: Prof. Dra. Ivone Carvalho

Co-orientador: Prof. Rob A. Field

CONTEÚDO

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

1.2. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase (TcTS)

1.3. *Trypanosoma cruzi* e moléculas de mucina

2. Objetivos

3. Resultados e Discussão

2.1. Síntese química de aminoácidos glicosilados e dissacarídeos glicosídicos

2.3. Síntese de glicopeptídeos em fase sólida

2.4. Síntese enzimática com a enzima β 1,4-galactosiltransferase (β 1,4GalT)

2.5. Ensaio enzimáticos com a enzima TcTS

2.6. Estudos de modelagem molecular

2.7. Síntese de dicetopiperazinas glicosiladas e ensaios de atividade biológica

4. Conclusões

INTRODUÇÃO

DOENÇA DE CHAGAS

- **Agente etiológico:** *Trypanosoma cruzi*
- **Distribuição geográfica:** América Latina e sul dos EUA
- **Estimativa de infectados:** 10-12 milhões
- **População em risco:** 100 milhões
- **Mortes anuais:** 30 - 45 mil
- **Brasil:** 5 a 6 milhões de casos

Gascón, J. et al. *Rev. Esp Cardiol.*, **2007**, 60, 285-293.
Paulino, M. et al. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2005**, 5, 499-519.

Trypanosoma cruzi

**Tripomastigotas
sanguíneas**

**Tripomastigotas
metacíclicas**

Amastigotas

Epimastigotas

- Apresenta um ciclo de vida do tipo heteroxênico: **hospedeiro vertebrado e inseto vetor**

Triatoma infestans
(barbeiro)

Principais sintomas e manifestações clínicas da Doença de Chagas

Fase Aguda

Assintomático 50%
4 a 6 semanas

Sinal de Romaña

Miocardite Chagásica

Fase Crônica

30 - 40%: lesões irreversíveis

Assintomáticos 70%

Manifestações Digestivas

Cardiopatia Chagásica

- **Transmissão da doença:** inseto vetor (80%), transfusão sanguínea (12-25%), transmissão congênita (1-11%) e via oral (1%)

- **Tratamento:** Benznidazol (Rochagan®) e Nifurtimox (Lampit®)

BENZNIDAZOL

NIFURTIMOX

Alvos para o planejamento racional de fármacos tripanocidas

- **Tripanotiona redutase** - relacionada ao estresse oxidativo
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase** - presente na via glicolítica
- **Cisteína proteases** - relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase** - responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase** - essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- ***trans*-Sialidase** - envolvida no processo de reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.

Trypanosoma cruzi trans-Sialidase (TcTS)

- Enzima regulatória de superfície, envolvida na interação parasita-hospedeiro

Schenkman, S.; Eichinger, D. *Parasitology Today*, **1993**, 9, 218-222.

Previato, L. M. et al. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 7241.

Estrutura cristalográfica de TcTS

Domínio catalítico

Domínio de lectina

DANA - 2-desoxi-2,3-dehidro-*N*-acetil-ácido neurâmico

NANA – ácido siálico

Modelo de reconhecimento de mucina e sialilação por *trans*-Sialidase (TcTS)

***trans*-Sialidase: Propriedade principal de *trans*-glicosidase**

➤ **Transferência de ácido siálico catalisada pela enzima TcTS**

Principais interações entre *trans*-sialidase e DANA

Mecanismo de transferência de ácido siálico para molécula aceptora

Moléculas de Mucina GPI de *T.cruzi*

Oligossacarídeos O-ligados

Mucina

Agrellos, O. A.; Jones, C.; Todeschini, A. R.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato L. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2003**, 126, 93-96.

Frasch, A.C.C. *Parasitology Today*, **2000**, 16, 282-286.

Moléculas de mucina de *T.cruzi*: alta heterogeneidade

$\beta\text{-Galp}(1-4)\text{-GlcNAc}$

(A)

$\beta\text{-Galp}(1-6)$

$\beta\text{-Galp}(1-4)$

GlcNAc

(B)

$\beta\text{-Galp}(1-6)$

$\beta\text{-Galp}(1-3)$

GlcNAc

(C)

Cepas Y e CL

Cepa G

OBJETIVOS

- 1. Desenvolvimento de estratégias de síntese de glicopeptídeos de mucina de *T.cruzi* para investigação da natureza das interações moleculares críticas envolvidas no reconhecimento e processamento de glicosídeos contendo ácido siálico, na presença de *trans*-sialidase**
- 2. Planejamento racional de inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***

Síntese de glicopeptídeos complexos: métodos de síntese em fase sólida e síntese químico-enzimática

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ (1)

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ (2)

$\text{NH}_2(\text{Thr})_2-(\beta\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3-(\alpha\text{LacNAc})-(\text{Thr})_3\text{-GlyOH}$ (3)

Atividade Biológica: Investigação das taxas e posições das reações de sialilação pela enzima TcTS

- **Isômero α**

- **Isômero β**

Estudos de Modelagem Molecular

- **Determinação de padrão farmacofórico de inibidores de TcTS**
- **Realização de simulações de *docking* dos compostos sintetizados, buscando uma correlação com os ensaios biológicos**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aminoácidos glicosilados (blocos de construção)

Monossacarídeos

Dissacarídeos

Síntese de aminoácidos glicosilados

β GlcNAc-ThrOH (6)

α GlcNAc-ThrOH (7)

β Gal-ThrOH (8)

Reação de Glicosilação

Síntese do bloco de construção β GlcNAc-FmocThrOBn 9

1. Reação de glicosilação a partir do doador glicosídico contendo grupo protetor *N*-Troc

Meinjohns, E. et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **1995**, 2165-2175.

2. Reação de glicosilação a partir do derivado oxazolina

Wittmann, V.; Lennartz, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1363-1367.

Blocos de construção

β GlcNAc-FmocThrOBn 9 e α GlcNAc-FmocThrOBn 15

3. Reação de glicosilação a partir do doador glicosídico α GlcNAcCl 16

Reações de hidrogenólise e desacetilação

- Isômero β

- Isômero α

Síntese do bloco de construção β Gal-FmocThrOBn 21

- Reação de glicosilação a partir do doador α GalBr 22

Kartha K. P. R.; Field, R. A. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 11753-11766.

- Reação de glicosilação a partir do doador α GalOCCl₃CN 23

Cheng, H.; Cao, X.; Xian, M.; Fang, L.; Cai, T. B.; Ji, J. J.; Tunac, J. B.; Sun, D.; Wang, P.G. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48, 645-652.

Reações de hidrogenólise e desacetilação

Síntese de dissacarídeos glicosídicos

α LacNAc-ThrOH (26)

β LacNAc-ThrOH (27)

• Síntese do dissacarídeo doador $\alpha\text{LacN}_3\text{Cl}$ 28

Lemieux, R. U; Ratcliffe, M. *Can. J. Chem.*, **1979**, 57, 1244.

Campo, V. L.; Carvalho, I. *Química Nova*, **2007**, no prelo.

- Reação de glicosilação a partir do doador $\alpha\text{LacN}_3\text{Cl}$ 28

- Reação de acetilação redutiva

Reações de hidrogenólise e desacetilação

β LacNAc-ThrOBn (37)

- Como conseguir o isômero β ?

- A partir do doador glicosídico β LacNAcSAc 38

Matsuoka, K.; Ohtawa, T.; Hinou, H.; Koyama, T.; Esumi, Y.; Nishimura, S-I; Hatano, K.; Terunuma, D. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 3617-3620.

• A partir do derivado oxazolina **39**

Síntese em fase sólida

Resina de Wang

X= Grupo amino protetor temporário

Y= Grupo protetor de cadeia lateral permanente

A= Grupo carbóxi-ativante

PyBOP

Síntese em fase sólida → realizada em etapas (“batch-wise”),
em frasco cilíndrico, com placa sinterizada e torneira de três saídas
na parte inferior

Reagentes de acoplamento

PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfônio)

HOBt (1-hidróxi-benzotriazol)

DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina)

- Mecanismo de reação envolvendo os reagentes de acoplamento**

Principais glicopeptídeos sintetizados em fase sólida

Glicopeptídeo NH₂(Thr)₂-(αLacNAc)-(Thr)₃-GlyOH 1

Campo, V. L.; Carvalho, I.; Allman, S.; Davis, B. G.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2645-2657.

Campo, V. L.; Borges, A. D. L.; Carvalho, I. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 648-654.

Síntese enzimática com a enzima β 1,4-Galactosiltransferase (β 1,4-Gal T)

- Região e estereosseletiva para realizar a galactosilação da posição 4-OH da unidade GlcNAc aceptora

Procedimento Geral

Síntese enzimática de dissacarídeos glicosídicos

1. Material de partida
2. Mistura reacional
3. UDP-Gal

Purificação

Filtração em gel

Galactosilação de glicopeptídeos

Campo, V. L.; Carvalho, I.; Allman, S.; Davis, B. G.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2645-2657.

Campo, V. L. et al. Cure for Chagas' disease a step closer. *Chemical Science*, **2007**, 9, C67.

Reações enzimáticas com a enzima *trans*-sialidase de *T.cruzi* (TcTS)

- Doadores de ácido siálico

α -2,3-Sialyllactose

PNP- α Neu5Ac

MU- α Neu5Ac

Glicoproteína Fetuína

✓ 48,4 kDa

✓ 7% ácido siálico

Procedimento Geral

Reação acompanhada por CCD

1. Material de partida
2. Mistura reacional
3. α -2,3-Sialillactose

Ensaio enzimático com dissacarídeos glicosídicos

Purificação

1. Material de partida
2. Mistura reacional

Campo, V. L. et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2645-2657.

Campo, V. L. et al. *Chemical Science*, **2007**, 9, C67.

Ensaio enzimático com glicopeptídeos

Ensaio enzimático com aminoácido glicosilado

Estudos de Modelagem Molecular

- Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de *trans*-sialidase

➤ DS ViewerPro 5.0

Cálculos de campos de interação molecular

➤ Diferentes grupos de prova

**Grupo
hidrofóbico (CH₃)**

Grupo carboxila

Grupo hidroxila

Estudos de Simulações de *Docking*

➤ Principais interações de lactose com o sítio ativo acceptor de TcTS

➤ Docking do composto 26

➤ Docking do composto 27

➤ Docking do composto 1

➤ Docking do composto 42

➤ Docking do composto 8

➤ Sobreposição estrutural de todos os aceptores com lactose

* Resultados não publicados

Síntese de dicetopiperazinas glicosiladas

Ciclo(β GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 59

Ciclo(α GlcNAc-L-Ser-D-Phe) 60

Síntese da dicetopiperazina Ciclo(β GlcNAc-L-serina-D-Fenilalanina) 59

* Resultados não publicados

Ensaio biológicos

• Ensaio de atividade tripanocida (cepa Y)

Composto	Concentração (µg/mL) x % de lise (± SD)				IC ₅₀ (mM)
	0,5	2,0	8,0	32,0
16	18,5 ± 5,1	20,7 ± 6,4	23,7 ± 9,3	79,8 ± 4,3	0,036
7	22,5 ± 5,9	13,8 ± 7,3	26,3 ± 7,1	47,8 ± 5,0	0,191
8	0	4,5 ± 3,5	28,3 ± 3,6	81,3 ± 6,4	0,048
27	9,4 ± 2,5	20,2 ± 4,7	21,2 ± 5,6	31,3 ± 2,8	0,971
59	8,7 ± 4,5	26,3 ± 6,0	31,3 ± 5,5	35,3 ± 7,1	0,258

• Ensaios de atividade antitumoral

- **Unidade O-GlcNAc ligada a Ser/Thr** – envolvimento em eventos de sinalização e transcrição celular

Células JURKART (Leucemia T humana)

Atividade citotóxica de dicetopiperazinas glicosiladas

CONCLUSÕES

• Síntese de aminoácidos glicosilados (monossacarídeos)

- β GlcNAc-FmocThrOBn **9** e α GlcNAc-FmocThrOBn **15** $\longrightarrow$ utilização do doador glicosídico α GlcNAcCl **16** e promotor HgBr_2 conduziu à obtenção de ambos os isômeros β (52%) e α (20%)
- β Gal-FmocThrOBn **21** $\longrightarrow$ emprego dos doadores α GalBr **22** e α GalOCCl₃CN **23** conduziram à obtenção de **21** em rendimentos semelhantes (28%)

• Síntese de dissacarídeos glicosídicos

- α LacNAc-ThrOH **26** $\longrightarrow$ obtido por síntese química total (reação de glicosilação) e síntese enzimática com a enzima β 1,4-GalT
- β LacNAc-ThrOH **27** $\longrightarrow$ obtido somente por síntese enzimática com β 1,4-GalT

• Reatividade da enzima β 1,4-GalT

- Galactosilação do bloco β GlcNAc-ThrOH **6** $\longrightarrow$ 24h de reação e rendimento de 85%
- Galactosilação do bloco α GlcNAc-ThrOH **7** $\longrightarrow$ 96h de reação e rendimento de 57%

- **Síntese de glicopeptídeos**

- Obtenção por síntese em fase sólida ➡ rendimentos entre 40% e 75%
- Enzima β 1,4-GalT ➡ galactosilação de resíduos de β GlcNAc dos glicopeptídeos **42 e 45**
- Purificação por CLAE ➡ coluna C18 de fase reversa e Toyopearl HW-40S de filtração em gel

- **Ensaio enzimático com a enzima TcTS**

- Reações com os dissacarídeos glicosídicos **26 e 49** e glicopeptídeos **2 e 53** ➡ sialilação de ambos os anômeros α e β e obtenção de rendimentos entre 82% e 92%
- Compostos testados ➡ potenciais substratos da enzima TcTS

- **Estudos de modelagem molecular**

- Obtenção de padrão farmacofórico preliminar de inibidores de *trans*-sialidases
- Habilidade do sítio ligante de TcTS em interagir com inibidores ➡ MIFs
- Simulações de *docking* ➡ galactose como requisito essencial para a atividade enzimática e base para possíveis modificações moleculares

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dra. Ivone Carvalho
- Prof. Rob A. Field
- Prof. Dr. Carlos H. T. P. da Silva
- Laboratório de Química Farmacêutica - FCFRP
- Centro de Química de Carboidratos (CCC) - UEA