UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Maristela Braga Martins Teixeira Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto 2010 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Martins Teixeira, Maristela Braga Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias. Ribeirão Preto, 2010.

97 p.; 30cm.

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

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. Mucina. 2. Glicoaminoácido.. 3. Dicetopiperazina. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. *Trans*-sialidase. 6. Antígeno Tn. 7. Citotoxicidade. Maristela Braga Martins Teixeira

Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Maristela Braga Martins Teixeira **Orientadora:** Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora	
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr.	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedico

Aos meus pais Maria da Graça e José Martins, pelo afeto, amparo e incentivo, e por demonstrarem que a dedicação e a retidão são as maneiras mais nobres de alcançar o êxito;

Ao meu irmão Matheus,

pelo carinho, interesse e apoio, e por me motivar enquanto procura entender os propósitos de minhas pesquisas;

Ao meu esposo Luís Gustavo,

pelo amor, companheirismo e atenção, e por ter participado de modo paciente, mas não passivamente, ao longo deste Mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida, pelas oportunidades e por Sua presença em todos os momentos, iluminando os passos desta caminhada;

À família, por sempre me oferecer estímulo e todas as condições para aceitar os desafios, e por ser esteio nas dificuldades;

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação que embasou minha formação científica, pelos conhecimentos compartilhados, pelo constante entusiasmo e estímulo e, sobretudo, pelo respeito e pela confiança.

À pós-doutoranda Vanessa Campo, pela fundamental e experiente contribuição desde o projeto deste trabalho, com idéias, auxílio experimental em numerosas reações e análises de RMN, e pela amizade decorrente desta parceria;

À aluna de iniciação científica Mônica Biondo, pela colaboração na preparação de doadores glicosídicos e nos trabalhos com os glicoaminoácidos de treonina;

Ao Prof. Robert Field, por ceder alguns blocos de glicoaminoácidos;

Ao doutorando Peterson de Andrade, pelos ensaios com a enzima *trans*-sialidade de *T. cruzi* e pela disponibilidade em discutir química de carboidratos;

Ao Prof. Dr. Sérgio Schenkman, por ceder a enzima trans-sialidade de T. cruzi;

Aos técnicos Luís Otávio Zamoner e Cláudia Macedo, pela ajuda com as atividades rotineiras do laboratório; Virgínia Betarello e Vinícius Palaretti pelas análises de RMN realizadas com agilidade; e José Carlos Tomaz, pelas análises de HRMS.

À mestranda Zumira Carneiro e à técnica Ana Cristina Polizello, pelos ensaios de citotoxicidade em células tumorais;

Aos Profs. Drs. Carlos Curti, Marcelo Baruffi e Auro Nomizo, por cederem as linhagens de cálulas tumorais B16F10 e Jurkat;

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação Ana Lúcia Barbosa, Eleni Passos, Henrique Theodoro, Rosana Florêncio e Rossana Ribeiro, pela dedicação e solicitude no atendimento e nos serviços prestados;

Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Vanessa, Lílian, Adriane, Peterson, Flávio, Michelle, Luís Otávio, Pedro, Daniel, Valquíria e Mônica pela agradável convivência e troca de experiências;

A Andréa Figueiredo Rinhel, Beatriz Girolineto, Daiane Torres, Ester Rossi, Geicimar Gonçalves, Helena Queiroz, Juliana Ladeira, Lariani Delboni, Margherita Fais, Marina Moriya e a todos os amigos que, próximos ou distantes, acompanharam este Mestrado, pela compreensão, colaboração e pelo essencial incentivo que me impulsionou para a conclusão do trabalho. "É um espetáculo grandioso e belo ver o homem sair do seu próprio esforço, a bem dizer do nada; dissipar, por meio das luzes de sua razão, as trevas nas quais o envolveu a natureza; elevar-se acima de si mesmo; lançar-se, pelo espírito, às regiões celestes; percorrer com passos de gigante, como o sol, a vasta extensão do universo; e, o que é ainda maior e mais difícil, penetrar em si mesmo para estudar o homem e conhecer sua natureza, seus deveres e seu fim."

Jean-Jacques Rousseau

"E não vai demorar que passemos adiante, no escopo e na perspectiva de uma grande e bela ciência, a se fazer arte em defesa da vida."

Carlos Chagas

RESUMO

MARTINS TEIXEIRA, M. B. Síntese e avaliação biológica glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Mucinas são glicoproteínas altamente O-glicosiladas cuja principal característica estrutural é a presença de α-GalNAc ligado aos resíduos hidroxilados de serina e treonina. Em alterações celulares malignas, esse núcleo é exposto como um antígeno carboidrato associado a tumor (Tn) e sua alta expressão em células cancerosas faz dele um alvo para o desenvolvimento de abordagens contra o câncer. Mucinas de Trypanosoma cruzi, agente etiológico da Doença de Chagas, apresentam α-GlcNAc ligado à apoproteína, envolvido no processo de sialilação catalisado pela enzima fundamental trans-sialidase (TcTS) mediadora da invasão celular. Sendo o componente glicosídico do antígeno Tn um análogo estrutural e funcional de α-GlcNAc, pode influenciar na atividade de TcTS, alvo terapêutico para a Doenca de Chagas. Neste contexto, foram sintetizados glicopeptídeos lineares e cíclicos derivados de GalNAc mimetizando sua ocorrência em mucinas tumorais e parasitárias. Doadores e aceptores glicosídicos convenientemente protegidos foram preparados e ligados entre si com α-estereosseletividade por dois métodos de glicosilação: perclorato/carbonato de prata (promotor clássico de referência) e brometo de mercúrio (promotor pela primeira vez utilizado para doadores glicosídicos do tipo azidocloreto). Os blocos de glicoaminoácidos obtidos foram acoplados a um segundo resíduo, formando glicodipeptídeos lineares inéditos, que originaram glicodicetopiperazinas funcionalizadas com α -GalNAc, igualmente inéditas a literatura, mediante a etapa de desproteção/ciclização. Glicoaminoácidos intermediários contendo α-GalNAc foram desprotegidos e submetidos a ensaios de cinética enzimática em TcTS, apresentando expressiva inibição de 57% a 79% da atividade da enzima. Os mesmos blocos foram avaliados guanto à citotoxicidade em células tumorais, apresentando entre 73% e 79% de morte celular na linhagem Jurkat e cerca de 30% na linhagem B16F10. Os resultados ensaios biológicos sugerem que os compostos de interesse preparados podem atuar como inibidores da enzima TcTS e agentes de citotoxicidade seletiva em células tumorais.

Palavras-chave: Mucina. Glicoaminoácido. Dicetopiperazina. *Trypanosoma cruzi. Trans*-sialidase. Antígeno Tn. Citotoxicidade.

ABSTRACT

MARTINS TEIXEIRA, M. B. Synthesis and biological evaluation of glycodiketopiperazines related to mucins from tumoral and parasite cells. 2010. 97 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Mucins are heavily O-glycosylated glycoproteins which major feature being the presence of a-GalNAc bound to hydroxylated protein residues of serine and threonine. In malignant cell transformation this core is exposed as a tumor associated carbohydrate antigen (Tn), and its high-level expression in cancer cells turns it into a target for developing anticancer approaches. Mucins from *Trypanosoma cruzi*, aetiologic agent of Chagas Disease, display α-GlcNAc linking glycans to the apoprotein, involved in the sialilation process catalized by transialidase enzyme (TcTS), essential cell invasion by the parasite. Being Tn antigen an structural and functional analogue of α -GlcNAc, it may interfere on TcTS, a therapeutic target Chagas Disease. In this context, linear and cyclic glycopeptides containing GalNAc were synthesized, mimicking their natural occurrence in tumoral and parasite mucins. Glycosidic donors and acceptors, conveniently protected were prepared and bound to each other with α -stereoselectivity, though two glycosylation methods: silver perchlorate/carbonate (classical reference promoter) and mercuric bromide (first used as a promoter for azidochloride donors). Glycoaminoacids building blocks obtained were coupled to a second residue, furnishing novel linear glycopeptides, which generated glicodiketopiperazines functionalized with α -GalNAc, equally unpublished, upon deprotection/cyclization step. Intermediate a-GalNAccontaining glycoaminoacids were deprotected and subjected to kinetic enzymatic assay on TcTS, showing expressive enzyme activity inhibition from 57% to 79%. The same compounds were assessed for cytotoxicity on tumoral cells, showing from 73% to 79% of death for Jurkat cells and about 30% for B16F10 cells. Biological results sugest that the prepared compounds of interest may act as TcTS enzyme inhibitors and selective cytotoxic agents on tumoral cells.

Keyword: Mucin. Glycoaminoacid. Diketopiperazine. *Trypanosoma cruzi. Trans*sialidase. Tn Antigen. Cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac ₂ O	anidrido acético
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
AgOTf	triflato de prata
Asp	aspartato
Bn	benzil
Boc	terc-butiloxicarbonil
BSA	albumina sérica bovina
CAN	nitrato cérico de amônio
CCC	cromatografia em coluna clássica
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCI ₃	clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	metanol deuterado
D_2O	água deuterada
DCE	1,2-dicloroetano
DCM	diclorometano
DDQ	diclorodicianoquinona
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DKP	dicetopiperazina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMH	dimetilhidrazina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ESI	ionização por electrospray
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
Gal	galactose
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
Hex	hexano
HOBt	hidroxibenzotriazol
HRMS	espectrometria de massas de alta resolução
KLH	hemocianina do caramujo Megathura crenulata
LUMO	mais baixo orbital molecular desocupado
MeCN	acetonitrila
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
Mu	metil-umbeliferona
MuNANA	ácido metil-umbeliferil N-acetilneuramínico
MTT	(3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio)
NANA-α-PNP	(ácido α- <i>p</i> -nitrofenil ácido <i>N</i> -acetilneuramínico)
PE	éter de petróleo
Pfp	pentafluorofenil
PSA	antígeno prostático específico

PV	peptídeo derivado de poliovírus
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfônio
RMN	ressonância magnética nuclear
ap.	aparente
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
dt	duplo tripleto
I	largo
m	multipleto
S	singleto
t	tripleto
Ser	serina
SN ₂	substituição nucleofílica bimolecular
TACA	antígeno carboidrato associado a tumor
TBTU	tetrafluoroborato de benzotriazol-1-il-tetrametillurônio
TcMUC	mucina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcTS	trans-sialidase de Trypanosoma cruzi
ТСТ	triclorotriazina
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
TMSOTf	triflato de trimetilsilil
Tol	tolueno

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS



21*





.OtBu

0

ŃН



* compostos inéditos

SUMÁRIO

RESUMO ABSTRACT LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Oligossacarídeos, glicoconjugados e potencial terapêutico	1
1.2 Glicoproteínas e mucinas	3
1.3 Doença de Chagas e a glicobiologia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 Vacinas sintéticas de carboidratos como imunoterapia contra o câncer	10
1.5 Síntese de glicoaminoácidos, glicopeptídeos e glicodicetopiperazinas	12
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Aceptores glicosídicos	19
3.2 Doadores glicosídicos	20
3.3 Glicoaminoácidos	24
3.4 Glicopeptídeos	29
3.5 Glicodicetopiperazinas	34
3.6 Avaliação biológica	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Síntese de aceptores glicosídicos	41
4.2 Síntese de doadores glicosídicos	42
4.3 Reações de glicosilação	49
4.4 Reações de acoplamento	54
4.5 Reações de ciclização	57
4.6 Avaliação biológica	59
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	72

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Oligossacarídeos, glicoconjugados e potencial terapêutico

Carboidratos compõem uma das três principais classes de biopolímeros, ao lado de proteínas e ácidos nucléicos. Até a poucas décadas, a importância biológica de sacarídeos estava limitada as suas funções energéticas e estruturais, as quais são extensivamente compreendidas e exploradas. Contudo, a constatação recente de que glicoconjugados desempenham papel essencial como moléculas de comunicação em diversos processos celulares desencadeou crescente interesse pelas propriedades de reconhecimento envolvendo carboidratos.^{1,2}

Eventos fisiológicos e patológicos mediados por carboidratos estão relacionados a sinalização e diferenciação celular, crescimento tecidual, adesão e metástase, infecção por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. Tal diversidade de atividades sugere a utilização de carboidratos para direcionar novas estratégias terapêuticas.^{1,3} Alguns fármacos derivados de carboidratos, tanto naturais como análogos sintéticos, já foram introduzidos com sucesso no mercado, como é o caso do antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu, Roche®), do antidiabético acarbose (Glucobay, Bayer®), do antitrombótico heparina e dos antibióticos aminoglicosídeos.⁴

No entanto, os papéis biológicos mais relevantes de carboidratos são desempenhados sob a forma de glicoconjugados, estruturas nas quais as glicanas encontram-se acopladas a biomoléculas de outras naturezas, principalmente glicoproteínas, glicolipídeos e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI).^{2,4} As aplicações clínicas de neoglicoconjugados ainda são incipientes, embora existam diversos avanços experimentais para abordagens diagnósticas, preventivas e curativas, tanto na criação de agentes terapêuticos inovadores, quanto no aprimoramento das propriedades de fármacos convencionais. Métodos em desenvolvimento incluem glicosilação de vetores virais sítio-dirigidos em terapia gênica, proteção das extremidades de hormônios peptídicos com carboidratos para prolongamento da meia-vida plasmática, *microarrays* de glicanas características de patógenos para detecção de anticorpos específicos, e acoplamento de antígenos sacarídicos a proteínas carreadoras para aplicação como imunógenos em vacinas sintéticas.¹

O estudo dos aspectos estruturais e funcionais de glicoconjugados, também denominado glicômica, encontra-se em defasagem em comparação aos avanços já obtidos com genômica e proteômica. A maior limitação está relacionada à grande diversidade de estruturas compreendidas na classe de glicoconjugados, cuja microheterogeneidade deriva da ausência de controle genético direto sobre sua biossíntese e implica em grande

dificuldade de isolamento a partir de fontes naturais e sequenciamento. A obtenção sintética de oligossacarídeos e glicoconjugados tem sido beneficiada por melhoramento de protocolos em solução, novas metodologias automatizadas em fase sólida e procedimentos enzimáticos, permitindo o acesso a compostos puros em quantidades razoáveis para estudo dos processos biológicos mediados por carboidratos.^{2,4}

As propriedades únicas dos monossacarídeos conferem alto grau de complexidade às cadeias oligossacarídicas. A constituição de cada monômero varia em número de carbonos, estereoquímica de cada centro quiral, tamanho de anel, tipo de ligação glicosídica, configuração anomérica e substituintes. Mas a característica mais peculiar destes blocos de construção é sua natureza polifuncional, fornecendo diferentes posições para acoplamento do monossacarídeo adjacente, o que implica na possibilidade de ramificação da cadeia.^{5,6}

Considerando apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (Figura 1), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são teoricamente viáveis, e esse número cresce dramaticamente com a extensão da cadeia. Apesar das numerosas combinações plausíveis, determinados padrões são comumente encontrados em produtos naturais, indicando que nem todas as possibilidades desse extenso conjunto são exploradas. Devido à abrangente importância dessas estruturas conservadas, derivados sintéticos mimetizando motivos sacarídicos podem ser empregados para estudo de alvos biológicos envolvidos em condições tão diversificadas como câncer, auto-imunidade, doenças parasitárias, infecção por vírus, etc.⁶



Figura 1. Monossacarídeos mais frequentes em glicoconjugados de mamíferos e respectivas abundâncias (em porcentagem) obtidas a partir da base de dados GLYCOSCIENCES.⁶

1.2 Glicoproteínas e mucinas

Glicosilação é um dos mecanismos mais comuns de modificação pós-traducional de proteínas, os quais são fundamentais para estrutura, estabilidade e função protéicas. O elaborado trabalho bioquímico em promover estas alterações é justificado pelas vantagens decorrentes da presença de domínios sacarídicos nestes biopolímeros, como estabilização conformacional, resistência à proteólise e biosseletividade. Não ao acaso, glicoproteínas são conjugados de ampla distribuição e importantes atividades biológicas, frequentemente atribuídas às glicanas.^{1,3,7,8}

O-glicoproteínas figuram como uma das classes mais densamente glicosiladas. Apresentam oligossacarídeos covalentemente ligados a aminoácidos contendo cadeia lateral com grupo hidroxílico, como serina, treonina e mais raramente tirosina, hidroxiprolina, hidroxilisina, entre outros.² Particularmente as mucinas, *O*-glicoproteínas de peso molecular tão elevado quanto 1000 kDa, contendo até 80% da massa total em carboidratos, possuem motivos repetidos em *tandem* típicos, ricos em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), que representam sítios potenciais para abundante *O*-glicosilação. Caracteristicamente, o resíduo sacarídico diretamente acoplado aos referidos aminoácidos é *N*-acetilgalactosamina em ligação α-glicosídica (α-GalNAc), também denominado antígeno Tn quando considerado juntamente com o aminoácido (Figura 2A).^{9,10,11}

Mucinas estão presentes na superfície celular de numerosos tipos de tecidos epiteliais, a saber: vias respiratórias, sistema reprodutor, trato gastrintestinal e glândulas acessórias, onde exercem papel de proteção, hidratação e lubrificação. No entanto, suas propriedades vão muito além dessas funções primárias, dado que mucinas também estão envolvidas em processos biológicos complexos como renovação, diferenciação, sinalização e adesão celulares, fertilização, infecções e inflamação.^{3,9,11,12}

O metabolismo desregulado de mucinas está associado a processos inflamatórios e muitos tipos de câncer, de tal forma que determinadas classes são empregadas como marcadores tumorais de relevância clínica, como MUC16 para câncer pancreático, hepático e ovariano. Adicionalmente, MUC1 e MUC4 são com frequência superexpressas em carcinomas ou expressas ectopicamente em outros neoplasmas e contribuem ativamente para o fenótipo maligno por induzir transformação celular, inibir apoptose e favorecer evasão do sistema imune. A maioria das neoplasias de origem epitelial apresenta expressão desregulada e/ou padrão de glicosilação aberrante de mucinas, que se relacionam com prognóstico desfavorável.⁹

A biossíntese de mucinas é regulada por diversos fatores, porém a inserção e o elongamento das glicanas estão sujeitos sobretudo ao controle das respectivas enzimas glicosiltransferases. A iniciação das cadeias oligossacarídicas depende da atividade da

enzima UDP-GalNAc:polipeptídeo *N*-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAc-T), que reconhece as sequências de aminoácidos nas regiões repetidas em *tandem* das mucinas. A subsequente extensão da cadeia fica a cargo da ação sequencial de outras glicosiltransferases, cujas especificidade, localização, disponibilidade e atividade determinam o tipo de núcleo estrutural sacarídico formado.^{7,9} As estruturas centrais dessas cadeias respeitam padrões conservados, abrangendo oito combinações distintas já identificadas, Motivo 1 a Motivo 8 (Figura 2B). A formação de glicanas mais complexas depende do perfil de glicosilação adicional desses núcleos, que varia conforme o tecido, estágio de desenvolvimento, situação fisiológica, entre outros.^{3,10}



Figura 2. Estrutura de O-glicoproteínas. A) Antígenos carboidratos associados a tumor. B) Cadeias centrais de O-glicanas em mucinas.

Como os mecanismos biossintéticos em células malignamente transformadas são desregulados, também o processo de glicosilação de mucinas é comprometido, resultando em alta frequência de glicanas anormais, incompletas ou precocemente terminadas por sialilação. Logo, cadeias encurtadas como Tn, sialil-Tn e TF (Figura 2A) permanecem expostas em células tumorais, nas quais sua abundante expressão confere-lhes a classificação de antígenos carboidratos associados a tumor (TACA) com propriedades funcionais de adesão, invasão e metástase. Tais estruturas centrais, detectadas pela primeira vez justamente em mucinas, são usualmente encobertas por resíduos de açúcar adicionais em tecidos normais e constituem alvo seletivo promissor para investigação de *O*-glicopeptídeos no desenvolvimento de abordagens imunoterápicas contra o câncer.^{2,3,7,11}

Muitas glicoproteínas atendem à classificação de "*mucin-like*", ou moléculas tipo mucina, termos que descrevem conjugados glicoprotéicos com propriedades estruturais e funcionais semelhantes às de mucinas clássicas, das quais se distinguem essencialmente

pelo tamanho. Sua massa molecular é comparativamente reduzida, variando entre 50 e 240 kDa, ainda que a composição geral de aminoácidos e sacarídeos seja mantida. Os sítios de glicosilação são maciçamente ocupados e ocorrem em sequências ricas também em prolina em adição aos resíduos de Thr e Ser. Devido ao elevado grau de analogia entre as referidas classes de *O*-glicanas, glicoproteínas tipo mucina são rotineiramente denotadas simplesmente por mucinas.^{9,13}

Assim como mucinas de alto peso molecular, moléculas *mucin-like* também são glicoproteínas ancoradas na membrana celular que contribuem decisivamente em processos de reconhecimento e adesão. Glicoproteínas tipo mucina em leucócitos e células endoteliais promovem ligações cruzadas complementares como ligantes de selectinas, mediando a migração celular.⁹ A frequente ocorrência de mucinas de baixo peso molecular na superfície de parasitas, desde protozoários até helmintos, é fundamental para o estabelecimento de parasitismo equilibrado, uma vez que tais mucinas são responsáveis simultaneamente pela interação com o hospedeiro e pela evasão da resposta imune.^{7,12,13,14}

1.3 Doença de Chagas e a glicobiologia de Trypanosoma cruzi

Doença de Chagas é uma parasitose endêmica na América Latina e no sul dos Estados Unidos, com prevalência humana estimada em 8 a 10 milhões de infectados e quase 30 milhões de pessoas sob risco de infecção. 20 a 30% dos indivíduos chagásicos apresentam sintomas clínicos de fase crônica com morbidade associada a disfunções neurais, cardíacas e digestivas, e pelo menos 12.550 mil óbitos anuais ocorrem em decorrência da doença, resultando em grande impacto sobre a saúde pública.^{14,15,16}

Apesar da denominação "tripanossomíase americana", casos autóctones têm sido recentemente detectados em países de outros continentes, em particular Espanha, Austrália e Japão, e ainda Canadá e regiões não endêmicas dos Estados Unidos. Atribuída ao fluxo migratório em direção ao mundo desenvolvido, a expansão geográfica da doença, principalmente por transmissão transfusional, congênita ou via transplante de órgãos, motivou a Organização Mundial de Saúde a instituir em 2007 a "Rede Global pela Eliminação da Doença de Chagas", iniciativa inédita que ressaltou a necessidade por vigilância epidemiológica, combate à transmissão inclusive não vetorial e abordagens diagnósticas e terapêuticas inovadoras.^{16,17}

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, um protozoário flagelado que possui ciclo de vida heteroxênico com distintos estágios morfológicos (Figura 3A). No vetor hematófago *Triatoma infestans* são encontradas epimastigotas replicativas no intestino médio que originam tripomastigotas metacíclicas infectantes no final do tubo

digestivo. Quando depositadas sobre o hospedeiro vertebrado junto com as fezes do inseto durante o repasto sanguíneo, estas últimas formas evolutivas atingem a circulação através da solução de continuidade e invadem diversos tipos de células, onde se transformam em amastigotas. Após divisões binárias, diferenciam-se em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea mediante ruptura celular, podendo invadir outras células ou ser ingeridas por vetor triatomíneo para a continuidade do ciclo.^{12,18}



Figura 3. Características de *Trypanosoma cruzi*. A) Ciclo evolutivo esquemático ilustrando os principais estágios morfológicos do parasita. B) Mucinas parasitárias (TcMUC) representando a evolução da complexidade estrutural ao longo do ciclo. Adaptado.¹²

T. cruzi compreende um grupo variado de organismos, os quais apresentam diferentes cepas dentro de uma única espécie hospedeira. Como consequência, é observada uma grande variedade na patogenia e no desfecho clínico das infecções por este parasita. A superfície de *T. cruzi*, assim como a de muitos protozoários, é densamente recoberta por mucinas que atuam na interface entre o parasita e respectivos vetor ou hospedeiro, mediando tanto o direcionamento para invasão de células ou tecidos específicos quanto a evasão dos mecanismos de defesa. Cada estágio de evolução apresenta composição de mucinas característica, que determina distintas propriedades de adesão, proteção e imunogenicidade adaptadas ao ambiente biológico (Figura 3B).^{9,12,13,14}

Tais mucinas parasitárias (TcMUC) compõem a principal classe de glicoproteínas de superfície em *T. cruzi*, contendo cadeias peptídicas de 50 a 200 aminoácidos ancoradas por

GPI e sequências ricas em Ser e principalmente Thr como sítios aceptores para *O*glicosilação. A fração de glicanas contribui com até 60% da massa molecular desses glicoconjugados, conferindo um caráter hidrofílico e induzindo uma provável conformação estendida da proteína.^{9,12,13,14}

Característica singular das mucinas de *T. cruzi* é a ocorrência de α -*N*-acetilglicosamina (α -GlcNAc) como primeiro monossacarídeo acoplado aos aminoácidos hidroxilados do segmento protéico (Figura 5A), inserido pela enzima parasita-específica UDP-GlcNAc:polipeptídeo *N*-acetilglicosaminiltransferase (ppGlcNAc-T). Por outro lado, unidades de α -GalNAc conectam os motivos sacarídicos às mucinas de vertebrados (Figura 2B), configurando uma importante diferença estrutural a ser explorada para desenvolvimento de agentes terapêuticos. Embora cerca de 20% de *O*-GlcNAc permaneçam sem substituição, as posições *O*-4 e *O*-6 são geralmente elongadas com até 5 unidades de galactose formando glicanas com grau de ramificação, configuração anomérica e tamanho de anel variáveis de acordo com a cepa e o estágio evolutivo.^{12,13,14,19}

As mucinas de cepas Y e CL Brener apresentam oligossacarídeos contendo resíduo de β -Galp ligado a GlcNAc O-4 (Figura 4A) e as cepas G e Dm28 apresentam resíduos β -Galf nesta posição (Figura 4B). Por outro lado, as mucinas da cepa Tulahuen apresentam uma grande diversidade estrutural da biossíntese de O-glicanas, devido ao fato de expressarem duas famílias de O-oligossacarídeos resultantes da presença de resíduos de β -Galf e β -Galp ligados a GlcNAc O-4 (Figura 4C). A análise química estrutural destas espécies de oligossacarídeos e, consequentemente, as diferenças de expressão e atividade das glicosiltransferases envolvidas em seu processo de formação, podem estabelecer uma correlação entre a diversidade genética e a habilidade das cepas em apresentar grande variabilidade de virulência, levando à infecção de diferentes hospedeiros.²⁰



Figura 4. Estruturas de oligossacarídeos *O*-ligados presentes em mucinas de cepas Y e CL Brener (A), G e Dm28 (B), e Tulahuen (C), de *Trypanosoma cruzi*.

β-galactopiranosídeos são os resíduos mais comuns, e quando presentes em posição terminal são posteriormente decorados com ácido siálico no meio extracelular, pela ação da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), específica do parasita. A

enzima responsável pela sialilação é também uma glicoproteína de superfície de *T. cruzi* fixada à membrana celular por âncora de GPI e codificada por dezenas de membros de uma superfamília com mais de mil genes. Devido à inabilidade do parasita em sintetizar ácido siálico, mais especificamente o derivado ácido *N*-acetilneuramínico, TcTS transfere este monossacarídeo a partir de glicoconjugados do hospedeiro para as mucinas parasitárias com retenção da configuração α-2,3 da ligação glicosídica (Figura 5B), diferindo dos demais organismos em que a sialilação depende de ácido siálico ligado a citosina monofosfato como doador. A atividade de TcTS é crucial para a viabilidade, infectividade e propagação do parasita, uma vez que a enzima promove adesão das formas tripomastigotas circulantes às células hospedeiras, confere resistência à cascata do complemento e protege contra lise mediada por anticorpos.^{12,13,14,19,21}





Terminais não redutores α -galactosilados expressos nas mucinas de tripomastigotas sanguíneas são altamente imunogênicos para humanos e representam o alvo dos anticorpos tripanolíticos anti- α -Gal normalmente presentes no soro de pacientes chagásicos em fase aguda ou crônica, com elevada afinidade e ampla especificidade por epítopos de TcMUC.^{13,18} Embora α -galactosídeos permaneçam expostos por não serem bons aceptores de TcTS,²² a sialilação de terminais β -galactosídicos, interessantemente, confere resistência à lise por anticorpos anti- α -Gal, proteção atribuída ao efeito de repulsão de cargas que impede agregação das mucinas e colapso da membrana. Danos celulares ainda mais acentuados ocorrem na presença de anticorpos inibitórios anti-TcTS, que previnem a incorporação de ácido siálico.²³

A crescente aceitação da hipótese de persistência do parasita como patogenia primária da Doença de Chagas, em detrimento da autoimunidade,^{24,25} e a inexistência de tratamentos efetivos e seguros para todos os estágios da doença justificam a busca por estratégias inovadoras de eliminação do parasita.²⁶ Considerando as funções da sialilação em

T. cruzi para estrutura, adaptação a condições adversas, virulência e escape imunológico, é evidente a importância da *trans*-sialidase em seu ciclo de vida, que associada à presença exclusiva no parasita, faz desta enzima um alvo molecular seletivo. A descoberta de inibidores efetivos é fundamental para atender aos critérios de validação definitiva de TcTS como alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra a Doença de Chagas.^{19,21}

Embora seja peculiar de *T. cruzi* a ocorrência de α -GlcNAc no terminal redutor dos oligossacarídeos conjugados às mucinas, métodos de imunodetecção por anticorpos monoclonais demonstraram a presença de estruturas contendo α -GalNAc-O-Ser/Thr em glicoproteínas de epimastigotas cultivadas. Tanto na superfície quanto em extratos do parasita, tais glicoaminoácidos foram encontrados sob a forma sialilada (sialil-Tn) mas não isoladamente (Tn), motivando especulação acerca da existência de uma *trans*-sialidase variante capaz de transferir ácido siálico para resíduos de α -GalNAc, hipótese razoável considerando as diversas mutações que conferem especificidade mais abrangente a TcTS. Adicionalmente, atividade ppGalNAc-T foi detectada em lisados parasitários através da transferência de UDP-GalNAc para um peptídeo sintético derivado de mucinas de *T. cruzi*, enquanto sequências peptídicas de mucinas humanas foram aceptores ruins. Mais estudos são necessários para estabelecer se a incorporação de α -GalNAc é devida a uma enzima específica ou trata-se de uma reação paralela catalisada pela mesma glicosiltransferase que normalmente adiciona α -GlcNAc às mucinas parasitárias.²⁷

A expressão de mucinas com cadeias glicosídicas truncadas é amplamente distribuída em parasitas, sugerindo que não se trata de um fenômeno aberrante nesses organismos, em contraste com a natureza deletéria dessas alterações em mamíferos. Surpreendentemente, suas estruturas coincidem com as de antígenos associados a tumor como Tn e sialil-Tn, ao que se atribui a correlação negativa observada experimentalmente entre infecção por parasitas e malignidade.²⁷

Camundongos em fase aguda ou subaguda de infecção por *T. cruzi* transplantados com células de linfoma apresentaram inibição de crescimento do tumor e da ocorrência de metástases, em relação aos animais que receberam as células cancerosas sem terem sido previamente infectados pelo parasita, sugerindo que o contato anterior com *T. cruzi* tenha causado imunidade cruzada com o linfoma.²⁸ Ratos em fase crônica de infecção por *T. cruzi* tratados com dimetilhidrazina (DMH), uma substância conhecida por sua propriedade de induzir câncer de cólon, tiveram menor incidência desta neoplasia quando comparados aos animais expostos a DMH que não tiveram contato prévio do parasita.¹⁵ Presumivelmente, se parasitas e tumores compartilham antígenos semelhantes, a produção de anticorpos contra o parasita pode induzir imunidade cruzada efetiva contra as células cancerosas, fazendo desta associação um importante modelo para elucidar os mecanismos de supressão da tolerância imunológica e beneficiar as estratégias terapêuticas antitumorais.⁷

1.4 Vacinas sintéticas de carboidratos como imunoterapia contra o câncer

Por mais de um século, o emprego de técnicas de imunização tem contribuído significativamente para a saúde humana. O desenvolvimento de vacinas, ainda que bem sucedido, foi classicamente baseado em tentativas e erros, em investigações desprovidas de conhecimento molecular sobre o funcionamento do sistema imunológico. A progressiva elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune vem tornando cada vez mais importante o papel da síntese química no desenho racional e otimização de agentes para intervenção nesses processos. Vacinologia reversa designa a caracterização de epítopos reconhecidos por anticorpos neutralizantes para um determinado antígeno visando a direcionar o desenvolvimento de candidatos efetivos a vacinas. Estabelecido o alvo, estruturas menores e sinteticamente acessíveis podem ser construídas para mimetizar apenas regiões epitópicas importantes, permitindo a focalização da reação imunológica.²⁹

A seleção de antígenos de agentes infecciosos é realizada com relativa facilidade pesquisando o soro de indivíduos previamente expostos ao patógeno, já que suas estruturas são estranhas ao organismo humano e portanto imunogênicas. Vacinas sintéticas contra *Haemophilus influenzae* B e *Plasmodium falciparum* estão, respectivamente, em uso corrente ou em testes clínicos avançados. Inversamente, devido ao caráter próprio das células cancerígenas, imunoglobulinas naturais contra antígenos tumorais não são geralmente encontradas em indivíduos com câncer, dificultando a escolha de alvos para o desenvolvimento de vacinas. Dentre os antígenos tumorais já identificados, carboidratos são considerados os alvos mais apropriados e clinicamente relevantes para indução de imunidade ativa.^{30,31}

Isoladamente, carboidratos antigênicos desencadeiam resposta imune independente de células T através da ativação direta de linfócitos B, resultando na produção de anticorpos unicamente IgM com baixa afinidade. Para viabilizar sua aplicação como vacinas, haptenos sacarídicos são conjugados a proteínas ou peptídeos carreadores imunogênicos, como albumina sérica bovina (BSA), hemocianina do caranguejo *Megathura crenulata* (KLH, *"keyhole limpet hemocyanin"*) ou peptídeo derivado de poliovírus (PV), garantindo a estimulação de linfócitos T, os quais não reconhecem antígenos intactos mas são sensibilizados por fragmentos peptídicos antigênicos processados e expostos via complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Além de estimular a resposta carboidrato-específica de células T citotóxicas, esta estratégia ativa células T auxiliadoras, que liberam citocinas indutoras da troca de isotipo e da maturação de afinidade das imunoglobulinas produzidas pelas células B. Linfócitos citotóxicos e anticorpos direcionados contra antígenos tumorais sintéticos são capazes de reconhecer os correspondentes epítopos nativos em células malignas circulantes e metastáticas, promovendo a erradicação das mesmas e

protegendo contra crescimento e recorrência tumoral, o que comprova o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para o combate ao câncer.^{3,29,32,33}

Muitos antígenos glicoprotéicos e glicolipídicos associados a tumor, como Tn, sialil-Tn, TF, Lewis, KH-1, globo H e gangliosídeos, têm sido adotados como alvos para desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer, uma vez que sua ocorrência em tecidos normais é restrita.³³ Elevado nível de expressão de tais antígenos na superfície de células cancerosas correlaciona-se com prognóstico alarmante, contudo a vacinação baseada em epítopos sintéticos associados a tumor explora exatamente essa característica para dirigir o sistema imune a fim de gerar uma reação tumor-seletiva.³

O antígeno Tn, particularmente, apresenta notáveis amplitude e intensidade de expressão em carcinomas, estando associado a vários tipos de câncer como de mama, ovário, próstata, cólon, pulmão e pâncreas.³³ Além de diversas evidências pré-clínicas de efetividade,^{33,34,35} vacinas sintéticas conjugadas contendo Tn têm obtido sucesso em testes clínicos,³⁰ entre os quais se destaca um ensaio de fase I em que pacientes com câncer prostático reincidente foram imunizados com *clusters* de Tn conjugados a KLH em associação com o adjuvante imunológico QS21. Houve produção de elevados títulos de anticorpos IgM e IgG específicos e efeito antitumoral mensurável com base na diminuição do antígeno prostático específico (PSA, *prostate specific antigen*) sérico, cujos níveis se relacionam diretamente com a progressão radiográfica do tumor.³⁶

De acordo com a natureza da molécula carreadora utilizada, estratégias variadas de conjugação estão disponíveis para o antígeno Tn. Quando são empregados oligopeptídeos imunogênicos sintéticos, o bloco de glicoaminoácido pode ser diretamente incorporado ao terminal amino ao final da sequência de acoplamentos em fase sólida (Figura 6A³⁴). A conjugação com carreadores protéicos macromoleculares envolve a introdução de cadeias espaçadoras ao antígeno Tn e a derivatização de funções laterais de resíduos superficiais da proteína, predominantemente lisina (Lys), de modo a promover ligação química entre estes grupos (Figura 6B³⁵ e Figura 6C³⁷). Alternativamente, a substituição do aminoácido do antígeno Tn por resíduos hidroxilados não naturais (Figura 6D³³ e Figura 6E³¹) produz análogos com imunogenicidade e resistência à degradação in vivo potencialmente maiores e permite dispensar o uso de espaçadores conforme o grau de extensão da cadeia lateral em relação a Ser e Thr. Abordagens ainda mais elaboradas exploram a multivalência para melhorar a imunogenicidade dos conjugados através da maior semelhança com a superfície de células cancerosas, as quais tendem a expressar os antígenos tumorais em série. Dendrímeros, *clusters* triméricos de Tn ou mesmo construções monomoleculares contendo até sete antígenos tumorais distintos são os avanços mais recentes, assegurando novas perspectivas de aplicação às vacinas sintéticas.30,38



Figura 6. Ligantes para conjugação do antígeno Tn a moléculas carreadoras. A) Tn diretamente conjugado. B) Tn conjugado via triazol (ligação entre grupos –N₃ e –C=CH por "*click chemistry*"). C) Tn conjugado via *N*-benzoilsuccinamida (ligação entre grupos –SH e –NH₂). D) α-GalNAc ligado a resíduo de homoserina. E) α-GalNAc ligado a resíduo de hidroxinorleucina.

1.5 Síntese de glicoaminoácidos, glicopeptídeos e glicodicetopiperazinas

A investigação das funções biológicas desempenhadas por glicoproteínas requer quantidades suficientes de compostos puros e com estrutura exatamente definida. A disponibilidade escassa e a microheterogeneidade destes glicoconjugados em matériasprimas naturais inviabilizam sua obtenção a partir destas fontes. O processo de glicosilação *in vivo* é pós-traducional, resultando em numerosas glicoformas prontamente inacessíveis por tecnologia genética. Portanto, a ferramenta mais adequada para obtenção de quantidades razoáveis de glicopeptídeos homogêneos e bem caracterizados é a síntese orgânica.^{3,39,40,41} Tanto em solução como em fase sólida, o método mais eficiente e versátil para a preparação de *O*-glicopeptídeos, incluindo os relacionados a mucinas, emprega aminoácidos glicosilados protegidos como blocos de construção para etapas de acoplamento sucessivas. Tais blocos são obtidos pela reação direta do aminoácido *N*- e *O*-protegido com um doador glicosídico.^{3,31,40,41}

Grupos de proteção ortogonais são necessários tanto para o carboidrato quanto para o aminoácido, garantindo condições brandas de desproteção após o elongamento do glicopeptídeo. O terminal carboxílico do aminoácido é protegido por grupos como *O*-Bn ou *O*-Pfp, enquanto *N*-Fmoc é usado para proteção da função amino, sendo removido pelas bases

piperidina ou morfolina em condições controladas, uma vez que unidades sacarídicas *O*-ligadas a Ser ou Thr tendem a sofrer β-eliminação catalisada por bases. Por outro lado, a ligação *O*-glicosídica é sensível a condições ácidas e os grupos *O*- e *N*-acetil usados para a proteção do sacarídeo contribuem para a estabilização da função acetal. O emprego de outros grupos de proteção e sua manipulação conveniente permite ainda controle régio- e estéreo-seletivo.^{3,40,41}

A estereoseletividade da glicosilação é influenciada pelo substituinte da posição C-2 do doador glicosídico. Funções aciladas, como acetil ou benzoil, nesta posição induzem a participação de grupo vizinho com formação de intermediário oxazolina durante a ativação da posição anomérica e promovem glicosilação 1,2-*trans* seletiva, geralmente resultando em β -glicosídeos. Opostamente, grupos não participantes em C-2, como éter benzílico ou azida, originam o correspondente α -glicosídeo, favorecido pelo efeito anomérico.^{3,4,5}

A síntese de glicoaminoácidos do tipo mucina, particularmente α-GalNAc-Ser/Thr, é baseada na introdução de uma função nitrogenada latente na posição *C*-2, sendo que o grupo azida é preferido por ser não participante e dirigir o ataque do aceptor glicosídico resultando em configuração anomérica α, além ser facilmente convertido a acetamido após a glicosilação. A introdução da função azida é predominantemente realizada pela clássica reação de azidonitração de galactal, geralmente seguida de halogenação anomérica e glicosilação sob condições de Koenigs-Knorr.^{3,5,11,42,43} Apesar dessa estratégia implicar em rotas sintéticas extensas, outras opções disponíveis são empregadas com menor frequência, destacando-se a adição do tipo Michael a 2-nitrogalactal¹⁰ como a alternativa mais versátil e eficiente. Nas reações de glicosilação, uma variedade de grupos abandonadores anoméricos são utilizados, incluindo tricloroacatimidatos³¹, cloretos³³, brometos³⁵, tioglicosídeos⁴⁴ e pentenilglicosídeos⁴⁵ ativados por sais de prata, ácidos de Lewis ou eletrófilos *soft.*^{3,5,11,46}

Os aminoácidos glicosilados protegidos obtidos são blocos de construção para a síntese de glicopeptídeos, baseada em ciclos de desproteção de *N*-Fmoc da extremidade amino seguida do acoplamento usando excesso de glicoaminoácido ou aminoácido, cuja função carboxílica é ativada por reagentes de acoplamento, mais comumente PyBOP, DIC/HOBt e TBTU, formando de ésteres reativos. O glicopeptídeo livre, com sequência primária e posições de glicosilação definidas, é fornecido pela desproteção total da cadeia e, quando sintetizado em fase sólida, após sua clivagem da resina. Ainda que este protocolo apresente elevados rendimentos, uma fonte comum de perdas é a formação de dicetopiperazinas (DKPs) por ciclização intramolecular principalmente quando há resíduos *C*-terminais de glicina, alanina ou prolina.^{3,35,46,47}

Em certos casos, contudo, a formação de DKPs é desejável. Glicopeptídeos, assim como outros oligômeros biológicos, podem assumir diversas conformações sob a forma linear, das quais apenas uma limitada fração apresenta função biológica, o que torna a restrição conformacional útil para incrementar sua atividade, sendo a ciclização a estratégia mais

comum. Além da rigidez conformacional conferida pelo anel, peptídeos cíclicos possuem outras vantagens em relação aos análogos lineares, incluindo maior biodisponibilidade e estabilidade metabólica, mantendo as características das ligações peptídicas. São diversas as metodologias para obtenção sintética de DKPs clássicas, principalmente em fase sólida, mas como a combinação deste núcleo heterocíclico versátil com carboidratos ainda é pouco explorada, constitui uma inovação promissora para a química de glicopeptídeos,^{8,47}

Uma das metodologias sintéticas disponíveis para obtenção de dicetopiperazinas foi desenvolvida pelo próprio grupo de pesquisa em trabalhos anteriores⁴⁸ e está fundamentada no acoplamento de aminoácidos protegidos com subsequente ciclização intramolecular espontânea do dipeptídeo mediante clivagem do grupo de *N*-proteção e posterior eliminação do grupo protetor carboxílico (Esquema 1). Partindo de aminoácidos convenientemente funcionalizados, praticamente qualquer substituinte de interesse pode ser incorporado ao núcleo dicetopiperazínico, incluindo carboidratos, sendo uma versátil estratégia para carreamento e apresentação de farmacóforos para aumentar seletividade e afinidade por alvos biológicos.⁴⁸



Esquema 1. Síntese genérica de dicetopiperazinas a partir da ciclização de dipeptídeos. R' e R": substituintes.

O papel biológico abrangente e complexo de carboidratos sob a forma de glicoconjugados aponta para inúmeras possibilidades de intervenção farmacológica, ainda incompletamente aproveitada para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas. Em particular as mucinas, glicoproteínas relevantes em patologias significativas como parasitismo e câncer, representam um alvo privilegiado para descoberta de novos agentes capazes de interferir em tais processos de forma tanto preventiva quanto curativa. Neste contexto, a síntese de glicoaminoácidos e glicopeptídeos relacionados a mucinas adquire especial importância para a obtenção de análogos puros e estruturalmente definidos a fim de contribuir para a melhor compreensão dos fenômenos modulados por mucinas bem como explorar seu potencial terapêutico.

Experiência prévia na síntese de glicodicetopiperazinas⁴⁸ e simulações de *docking*⁴⁹ envolvendo o sítio ativo de TcTS conduziram ao planejamento dos compostos dicetopiperazínicos com resíduos de GalNAc **1** e **2** como potenciais inibidores desta enzima e análogos do antígeno tumoral Tn.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Desenvolver e otimizar rota sintética efetiva para a obtenção das dicetopiperazinas glicosiladas com resíduo de GalNAc **1** e **2**, como análogos do antígeno associado a tumor Tn, possivelmente inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* e agentes citotóxicos.



Testar a utilização do catalisador HgBr₂ como promotor de reações de glicosilação envolvendo doadores glicosídicos derivados de GalNAc, para preparação de blocos de glicoaminoácidos de interesse biológico.

Realizar, com os intermediários-chave e compostos finais obtidos, ensaios de inibição da enzima TcTS por métodos espectrofotométricos de cinética enzimática e ensaios de citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais e normais.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Aparelhagem analítica:

Ressonância Magnética Nuclear de ¹H: Bruker Advance DPX 300 MHZ, DRX 400 MHz e DRX500 MHz.

Espectrometria de massas de alta resolução: Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF Fluorímetro: Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader

Aparelhagem laboratorial:

Agitador magnético: Corning PC-320 Balança analítica: Sartorius BP 121S, Mettler Toledo PE 400 Bomba de alto-vácuo: Precision Model D 150 Cromatógrafo Flash: Biotage Evaporador rotatório: Büchi RE121 Luz ultravioleta: Spectroline ENF-260C

Solventes, reagentes e outros materiais

Cromatografia em camada delgada analítica (CCD): placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck[®] Cromatografia em coluna clássica (CCC): sílica gel tipo Flash 40-63 µm Merck[®] Alguns solventes e reagentes foram convenientemente purificados conforme métodos usuais, descritos na literatura.⁵⁰

3.1 Aceptores glicosídicos

Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina (3)



Solução de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina (3,27 g; 10,0 mmol) em etanol (10 mL) foi resfriada a 5 °C e lentamente neutralizada com solução aquosa de carbonato de césio (1,63 g; 5,0 mmol) sob agitação. Após concentração preliminar em evaporador rotatório, a água residual foi removida por co-evaporações com tolueno. O sólido resultante foi dissolvido em DMF (20 mL) e tratado com brometo de benzila (1,5 mL; 2,05 g; 12,0 mmol) e mantido sob agitação a temperatura ambiente por 15 h, com acompanhamento por CCD. A mistura reacional foi filtrada para remoção do subproduto brometo de césio precipitado, que foi lavado com DCM. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, dissolvido em DCM, extraído com solução saturada de bicarbonato de sódio e seco com MgSO₄. O produto foi cristalizado a partir de AcOEt e Hex (1,62 g) e o sobrenadante da cristalização foi ainda purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 0-100% (v/v) por gradiente, fr. 35-48 (1,29 g)] e recristalizado. O éster benzílico do aminoácido foi obtido como cristais brancos (2,91 g; 6,97 mmol; 70%). Rf 0,44 [AcOEt/Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 7,77 (2 H, d, J 7,6 Hz, CH Fmoc arom.), 7,60 (2 H, d, J 7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,43-7,30 (9 H, m, CH benzil arom., CH Fmoc arom.), 5,71 (1 H, d, J 7,3 Hz, NH Ser), 5,23 (2 H, s, CH₂ benzil), 4,50-4,48 (1 H, m, CH Ser), 4,43 (2 H, dd, J 2,0 Hz, J 6,7 Hz, CH₂ Fmoc), 4,22 (1 H, t, J 6,7 Hz, CH Fmoc), 4,05-3,93 (2 H, ddl, CH₂ Ser), 2,04 (1 H, sl, OH Ser). (Anexo 1)

Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-treonina (4)



Solução de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-treonina (3,50 g; 10,3 mmol) em etanol (10 mL) foi resfriada a 5 ℃ e lentamente neutralizada com solução aquosa de carbonato de césio (1,68 g; 5,1 mmol) sob agitação. Após concentração preliminar em evaporador

rotatório, a água residual foi removida por co-evaporações com tolueno. O sólido resultante foi dissolvido em DMF (25 mL) e tratado com brometo de benzila (1,8 mL; 2,59 g; 15,2 mmol) e mantido sob agitação a temperatura ambiente por 23 h, com acompanhamento por CCD. A mistura reacional foi filtrada para remoção do subproduto brometo de césio precipitado, que foi lavado com DCM. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, dissolvido em DCM, extraído com solução saturada de bicarbonato de sódio, seco com MgSO₄ e concentrado. O produto foi cristalizado a partir de AcOEt e Hex fornecendo o éster benzílico do aminoácido como cristais brancos (2,61 g; 6,05 mmol; 60%). Rf 0,56 [AcOEt/Hex 1:1 (v/v)]. δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz) 7,77 (2 H, d, *J* 7,6 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,61 (2 H, d, *J* 7,3 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,42-7,29 (9 H, m, *CH* benzil arom., *CH* Fmoc arom.), 5,58 (1 H, d, *J* 9,1 Hz, NH Thr), 5,22 (2 H, AB, *J_{AB}* 12,3 Hz *CH*₂ benzil), 4,43-4,38 (4 H, m, α-*CH* Thr, β-*CH*-Thr, *CH*₂ Fmoc), 4,23 (1 H, t, *J* 7,0 Hz, *CH* Fmoc), 1,85 (1 H, sl, *OH* Thr), 1,25 (3 H, t, *J* 6,2 Hz, *CH*₃ Thr). (Anexo 2)

3.2 Doadores glicosídicos

1,2,3,4,6-penta-O-acetil-
$$\alpha$$
-D-galactopiranose (5)

Uma suspensão de D-galactose (18,9 g; 105 mmol) em anidrido acético (90 mL) foi tratada com iodo (900 mg; 3,5 mmol) a temperatura ambiente sob agitação por 3 horas, quando CCD indicou conversão completa. A mistura reacional foi diluída com DCM, extraída com solução de tiossulfato de sódio 5% e gelo picado, solução saturada de carbonato de sódio, seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo um óleo viscoso amarelo contendo mistura de anômeros (42,18 g; > 105 mmol; rendimento quantitativo). Recristalização a partir de etanol resultou no isolamento do isômero α . Rf 0,50 [AcOEt/Hex 1:1 (v/v)]. δ_{H} (CDCl₃, 500 MHz) 6,36 (1 H, s, *H*-1), 5,48 (1 H, s, *H*-4) 5,32 (2 H, s, *H*-2, *H*-3), 4.33 (1 H, t, $J_{4,5} = J_{5,6}$ 6,7 Hz, *H*-5), 4,10, 4,06 (2 H, 2 dd, $J_{5,6a}$ 6,7 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, *H*-6a, *H*-6b), 2,14 (6 H, s, 2 CH₃CO), 2,03, 2,01, 1,99 (9 H, 3 s, 3 CH₃CO). (Anexo 3)



Solução de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranose (23,99 g; 61,5 mmol, mistura de anômeros) em ácido acético glacial (20 mL) foi resfriada em banho de gelo e tratada lentamente com solução de ácido bromídrico 33% em ácido acético (21,5 mL). Monitorada por CCD, a mistura reacional foi agitada por 4 horas a temperatura ambiente e, após armazenamento sob refrigeração por 10 h, diluída com DCM e vertida sobre gelo picado em água. A fase aquosa separada foi extraída com DCM e as frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio 5% previamente resfriada em banho de gelo, secas com MgSO₄ e concentradas sob pressão reduzida, resultando em óleo amarelado viscoso, a partir do qual o produto foi cristalizado na presença de éter etílico e éter de petróleo. Após filtração a vácuo, o brometo de galactopiranosila foi isolado como sólido branco pulverizado (19,94 g; 48,5 mmol; 79%), instável à atmosfera e à temperatura. Rf 0,61 [AcOEt/Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 6,68 (1 H, d, J_{1,2} 3,9 Hz, H-1), 5,50 (1 H, dl, J_{3,4} 3,2 Hz, J_{4,5} 1,0 Hz, H-4) 5,38 (1 H, dd, J_{3,4} 3,4 Hz, J_{2,3} 10,7 Hz, H-3), 5,03 (1 H, dd, J_{1,2} 3,9 Hz, J_{2,3} 10,7 Hz, H-2), 4,46 (1 H, t, J_{5,6} 6,5 Hz, H-5), 4,16 (1 H, dd, J_{5,6a} 6,3 Hz, J_{6a,6b} 11,4 Hz, H-6a), 4,09 (1H, dd, J_{5,6b} 6,8 Hz, J_{6a,6b} 11,4 Hz, H-6b), 2,11, 2,09, 2,08, 2,07 (12 H, 4 s, 4 CH_3CO). (Anexo 4)

3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal (7)



Ao brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila **6** (6,13 g; 14,9 mmol), foi adicionada mistura previamente preparada de acetato de sódio (10,0 g; 122 mmol) e ácido acético glacial (45 mL; 47,2 g; 786 mmol) em água (32 mL). Sob agitação vigorosa, foi adicionado sulfato de cobre II (335 mg; 2,1 mmol) seguido de zinco metálico em pó (13,2 g; 203 mmol). Após 16 horas a temperatura ambiente, CCD indicou o final da reação e a mistura reacional foi filtrada em celite e os sólidos lavados com água. O filtrado foi diluído com AOEt e lavado com soluções saturadas de bicarbonato de sódio e cloreto de sódio, seco com MgSO₄, concentrado sob pressão reduzida e purificado por CCC [sílica-gel, acetona/DCM 0-5% (v/v) por gradiente, fr. 15-21]. O produto foi isolado como um líquido viscoso incolor (2,11g g; 7,7 mmol; 52%). Rf 0,53 [acetona/DCM 5% (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 500

MHz) 6,43 (1 H, dd, $J_{1,3}$ 1,4 Hz; $J_{1,2}$ 6,3 Hz, H-1), 5,52 (1 H, m, H-4), 5,39 (1 H, m, H-3), 4,69 (1 H, dd, $J_{2,3}$ 2,5 Hz, $J_{1,2}$ 6,3 Hz, H-2), 4,29 (1 H, tl, J 6,1 Hz, H-5), 4,24 (1 H, dd, $J_{5,6a}$ 7,2 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz, H-6a), 4,18 (1 H, dd, $J_{5,6b}$ 5,3 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz, H-6b), 2,09; 2.05; 1,99 (9 H, 3 s, 3 C H_3 CO). (Anexo 5)

Cloreto de 2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopranosila (9)



Solução de 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal 7 (1,41 g; 5,19 mmol) em MeCN (22 mL) foi adicionada de azida de sódio (474 mg; 7,29 mmol) a nitrato cérico de amônio (8,57 g; 15,6 mmol), resfriada em banho de gelo seco por 30 min. e agitada a temperatura ambiente por 6 h, com acompanhamento por CCD. A mistura reacional foi diluída com éter, extraída com água, seca com MgSO₄ e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-100% (v/v) por gradiente, fr. 4-8] fornecendo o azidonitrato em mistura de anômeros α/β 1:0,6 como líquido viscoso (649 mg; 1,73 mmol; 33%). Rf 0,65 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 6,28 (J_{1,2} 3,7 Hz, H-1 α), 5,56 (J_{1.2} 8,8 Hz, H-1 β), 3,74 (m, H-2). (Anexo 6). O produto de azidonitração 8 (640 mg; 1,70 mmol) foi dissolvido em MeCN (12 mL) contendo cloreto de tetraetilamônio (846 mg; 5,10 mmol) e agitado durante durante 20 h com acompanhamento por CCD. A mistura foi diluída com tolueno, lavada com água, seca com MgSO₄, filtrada, concentrada e purificada por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 6:4 (v/v), fr. 2-4]. O azidocloreto foi obtido como um líquido viscoso de coloração levemente amarela (561 mg; 1,60 mmol; 94%). Rf 0,64 [AcOEt/Hex 6:4 (v/v)]. δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 6,12 (1 H, d, J_{1,2} 3,9 Hz, H-1), 5,41 (1 H, dl, J_{4,5} 2,3 Hz, H-4), 5,26 (1H, dd, J_{3,4} 3,1 Hz, J_{2,3} 10,8 Hz, H-3), 4,43 (1H, t, J_{5,6} 6,5Hz, H-5), 4,05-4,01 (3 H, m, H-6a, H-6b, H-2), 2,07, 1,97, 1,96 (9 H, 3 s, 3 CH₃CO). (Anexo 7)

2-acetamido-2-desoxi-1,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopranosila (10)



Cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-galactose (200 mg, 0,928 mmol) foi suspenso em Ac₂O (1,2 mL), tratado com piridina (2,0 mL) e agitado a temperatura ambiente por 21 horas, com acompanhamento por CCD. Após concentração e diluição em DCM, a mistura foi extraída com HCI (10%) e NaHCO₃ (sat.), seca com MgSO₄, concentrada e purificada por

CCC [sílica-gel, AcOEt , fr. 4-7]. O produto peracetilado foi obtido como um líquido viscoso (214 mg, 0,551 mmol, 59%). Rf 0,6 [AcOEt]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 5,63 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8,7 Hz, *H*-1), 5,35 (1 H, d, *J* 9,5 Hz, N*H*CO), 5,31 (1 H, dd, $J_{4,5}$ 0,6 Hz, $J_{3,4}$ 3,3 Hz, *H*-4), 5,02 (1 H, dd, $J_{3,4}$ 3,3 Hz, $J_{2,3}$ 11,4 Hz, *H*-3), 4,38 (1 H, dt, $J_{1,2}$ 9,2 Hz, $J_{2,3}$ 11,2 Hz, *H*-2), 4,14-4,01 (2 H, m, *H*-6a, *H*-6b), 3,95 (1 H, dt, $J_{4,5}$ 0,9 Hz, $J_{5,6}$ 6,5 Hz, *H*-5), 2,11, 2,07, 1,98, 1,96, 1,88 (15 H, 5 s, CH₃CO). (Anexo 8)

Cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopranosila (11)



Método A. Suspensão de 2-acetamido-2-desoxi-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-Dgalactopranosila (214 mg, 0,550 mmol, 1 eq.) em DCM (2,2 mL) foi adicionada de cloreto de titânio IV (80 µL, 138 mg, 0,729 mmol, 1,33 eq.) e agitada a temperatura ambiente por 24 horas, quando foi tratada com alíquota adicional de TiCl₄ (120 µL, 208 mg, 1,093 mmol, 2 eq.) e agitada por mais 3 dias, com acompanhamento por CCD. O resíduo foi suspenso em DCM, filtrado através de placa sinterizada, concentrado e purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 0-70%, por gradiente]. O composto isolado, fr. 10-12 (30 mg, Rf 0,60 em AcOEt/Hex 7:3 (v/v)], não foi identificado como o produto esperado **11** pelos dados espectroscópicos de RMN.

Método B. Cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-galactose (335 mg, 1,55 mmol, 1 eq.) foi tratado com solução de metóxido de sódio em metanol (1 M, 3,4 mL, 1 eq.) até pH 10 e agitada vigorosamente por 10 minutos. A suspensão opaca formada foi filtrada em funil de placa sinterizada, o resíduo foi lavado duas vezes com metanol e o filtrado amarelado contendo a base livre do aminoaçúcar foi concentrado, tratado com anidrido acético (185 µL, 1,94 mmol, 1,25 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 16 horas. Após remoção do solvente sob vácuo, o sólido foi tratado com cloreto de acetila (2 mL), previamente borbulhado com HCI gasoso até saturação, e mantido sob agitação e refluxo a 38 ℃ por 18 h. A mistura âmbar foi diluída em dicl orometano, vertida sobre mistura de água e gelo e a camada orgânica separada foi extraída duas vezes com mistura de solução saturada de bicarbonato de sódio e gelo, com agitação vigorosa para neutralização. A camada orgânica resultante foi seca com MgSO₄ e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-70% (v/v), por gradiente]. Os compostos majoritários isolados, fr. 10-11 (10 mg, Rf 0,50) e fr. 12-14 (38 mg, Rf 0,42) ambos em AcOEt/Hex 7:3 (v/v), não foram identificados como o produto esperado **11** pelos dados espectroscópicos de RMN.
3.3 Glicoaminoácidos

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina (12)



Método A. Sob atmosfera de argônio, éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina **3** (83 mg, 0,20 mmol, 1 eq.), Ag_2CO_3 (116 mg, 0,42 mmol, 2,1 eq.) e peneira molecular ativada (250 mg) foram agitados por duas horas a temperatura ambiente em 10 mL de mistura de tolueno:DCM secos (8,5:1,5). Em banho de gelo, foram adicionados AgClO₄ (28 mg, 0,13 mmol, 0,65 eq., em 2 mL de tolueno) e após 30 minutos a 0 °C, cloreto de 2-azido-2desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila **9** (126 mg, 0,36 mmol, 1,8 eq., em 2 mL de tolueno). Acompanhada por CCD, a reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 10 dias, com duas adições suplementares de Ag_2CO_3 e $AgClO_4$ (115 mg e 25 mg, respectivamente, em cada adição). A mistura foi diluída em 30 mL de DCM, filtrada em celite, concentrada e extraída com soluções saturadas de bicarbonato de sódio (3 x 25 mL) e água (2 x 25 mL). A camada orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada sob pressão reduzida e purificada por CCC [sílica-gel, AcOEt/Tol 0-15% (v/v) por gradiente, fr. 7-13] fornecendo o produto **12** como um sólido branco (13 mg, 0,0178 mmol, 9%).

Método B. Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina **3** (132 mg, 0,32 mmol, 1 eq.) e cloreto de 2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila **9** (204 mg, 0,58 mmol, 1,8 eq.) foram dissolvidos em 1,2-DCE (2 mL) e tratados com HgBr₂ (258, 0,716 mmol, 2,25 eq.) sob agitação. A mistura foi mantida sob refluxo a 90 $\$ e agitada por 26 horas. O sobrenadante azulado foi separado do resíduo sólido de HgBr₂, concentrado sob pressão reduzida e purificado em CCC [sílica-gel, AcOEt/Tol 0-20% (v/v) por gradiente] fornecendo anômeros isolados na proporção de 12:1 (α/β), em rendimento total de 52%.

α **12** (fr. 34-39, 112 mg, 0,153 mmol, 48%) Rf 0,32 [AcOEt/Tol 2:8 (v/v)]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7,69 (2H, d, *J* 7,4 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,55 (2 H, d, *J* 7,2 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,35-7,22 (9 H, m, *CH* Bn arom. e *CH* Fmoc arom.), 5,91 (1 H, d, *J* 8,0 Hz, N*H* Ser), 5,31 (1 H, d, *J*_{3,4} 2,6 Hz, *H*-4), 5,22 (1 H, d, *J*_{3,4} 2,7 Hz, *H*-3), 5,17 (2 H, s, *CH*₂ Bn), 4,79 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,2 Hz, *H*-1), 4,54 (1 H, m, *CH* Ser), 4.33 (2 H, d, *J* 7,1 Hz, *CH*₂ Fmoc), 4,17 (1 H, t, *J* 7,1 Hz, *CH* Fmoc), 4,09 (1 H, dd, *J* 2,6 Hz, 10,8 Hz, *H*-5), 4,02-3,85 (4 H, m, *H*-6a, *H*-6b, *CH*₂ Ser), 3,51 (1 H, dd, *J*_{1,2} 3,3 Hz, *J*_{2,3} 11,1 Hz, *H*-2), 2,07, 2,00, 1,89 (9 H, 3 s, *CH*₃CO). (Anexo 9)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-serina (13)



β **13** (fr. 40-46, 9 mg, 0,012 mmol, 4%). Rf 0,28 [AcOEt/Tol 2:8 (v/v)]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7,70 (2H, d, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,54 (2 H, m, *CH* Fmoc arom.), 7,36-7,24 (9 H, m, *CH* Bn arom. e *CH* Fmoc arom.), 5,80 (1 H, d, *J* 8,3 Hz, N*H* Ser), 5,25 (1 H, d, *J*_{3,4} 2,6 Hz, *H*-4), 5,20-5,15 (3 H, m, *H*-3, *CH*₂ Bn), 4,69 (1 H, dd, *J* 3,3 Hz, 10,9 Hz, *H*-6a), 4,56 (1 H, m, *CH* Ser), 4.41-4,23 (3 H, m, *H*-1, *CH*₂ Fmoc), 4,17 (1 H, t, *J* 7,2 Hz, *CH* Fmoc), 4,06-4,01 (2 H, m, *CH*₂ Ser), 3,86 (1 H, dd, *J* 3,2 Hz, 10,4 Hz, *H*-6b), 3,70 (1 H, m, *H*-5), 3,60 (1 H, dd, *J*_{1,2} 8,0 Hz *J*_{2,3} 10,9 Hz, *H*-2), 2,10 (3 H, s, *CH*₃CO) 2,00 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,96 (9 H, 3 s, *CH*₃CO). (Anexo 10)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-Dgalactopiranosil)-L-treonina (14)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-treonina **4** (62 mg, 0,143 mmol, 1 eq.) e cloreto de 2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila **9** (100 mg, 0,286 mmol, 2 eq.) foram dissolvidos em 1,2-DCE (1,15 mL) e tratados com HgBr₂ (115 mg, 0,319 mmol, 2,25 eq.) sob agitação. A mistura foi mantida sob refluxo a 90 °C e agitada por 24 h com acompanhamento por CCD, e a seguir concentrada sob pressão reduzida e purificada em CCC [sílica-gel, AcOEt/Tol 2:8 (v/v), fr. 9-19] fornecendo o produto **14** (56 mg, 0,075 mmol, 54%). Rf 0,31 [AcOEt/Tol 2:8 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 500 MHz) 7,70 (2H, d, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,55 (2 H, d, *J* 7,3 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,34-7,22 (9 H, m, *CH* Bn arom. e *CH* Fmoc arom.), 5,65 (1 H, d, *J* 9,3 Hz, *NH* Thr), 5,37 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,4 Hz, *H*-1), 4,40 (2 H, t, *J* 7,0 Hz, *CH*₂ Fmoc), 4,35 (1 H, dd, *J* 7,5 Hz, 10,4 Hz, *CH*α Thr), 4,27 (1 H, dd, *J* 7,3 Hz, 10,6 Hz, *CH*β Thr), 4,21-4,13 (2H, m, *CH* Fmoc, *H*-5), 4,00 (2 H, d, *J* 6,5 Hz, *H*-6a, *H*-6b), 3,52 (1 H, dd, *J*_{1,2} 3,4 Hz, *J*_{2,3} 11,1 Hz, *J*_{2,3} 11,1 Hz, *H*-2), 2,08, 2,00, 1,96 (9 H, 3 s, *CH*₃CO), 1,27 (3 H, d, *J* 6,3 Hz, *CH*₃ Thr). (Anexo 11)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina (15)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetilα-D-galactopiranosil)-L-serina **12** (92 mg, 0,126 mmol, 1 eq.), previamente extraído em AcOEt com solução aquosa de EDTA 5%, foi concentrado e dissolvido em 5 mL de mistura THF:Ac₂O:AcOH (3:2:1), seguido da adição de zinco em pó (102 mg, 1,55 mmol, 12 eq.), quantidade catalítica de CuSO₄ (100 µL de solução a 10%) e agitação por 2 h. Após filtração em celite, e concentração sob pressão reduzida com co-evaporações com tolueno, o resíduo foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 3:2 (v/v), fr. 10-15] fornecendo o produto **15** como um líquido viscoso claro (63 mg, 0,084 mmol, 67%). Rf 0,33 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 500 MHz) 7,71 (2 H, d, *J*7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,55 (2 H, d, *J*7,0 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,35-7,24 (9 H, m, *CH* Bn arom. e *CH* Fmoc arom.), 5,86 (1 H, d, *J*7,8 Hz, *NH* Ser), 5,60 (1 H, d, *J*9,1 Hz, *NH*CO), 5,24 (1 H, d, *J*_{3,4} 2,3 Hz, *H*-4), 5,13 (2 H, AB, *J_{AB}* 12,0 Hz, *CH*₂ Bn), 4,98 (1 H, dd, *J*_{2,3} 11,1 Hz, *J*_{4,5} 2,3 Hz, *H*-3), 4,70 (1 H, s ap., *H*-1), 4,53 (1 H, m, *CH* Ser), 4,46 (1 H, t ap., *J*_{2,3} 11,2 Hz, *H*-2) 4,38 (2 H, d, *J* 6,5 Hz, *CH*₂ Fmoc), 4,17 (1 H, t, *J* 6,6 Hz, *CH* Fmoc), 4,07-3,85 (5 H, m, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b, *CH*₂ Ser), 2,09 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,94, 191 (6 H, 2 s, *CH*₃CO), 1,84 (3 H, s, *CH*₃CO). (Anexo 12)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina (16)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil)-L-treonina **14** (67 mg, 0,090 mmol, 1 eq.), previamente extraído em AcOEt com solução aquosa de EDTA 5%, foi concentrado e dissolvido em 4,5 mL de mistura THF:Ac₂O:AcOH (3:2:1), seguido da adição de zinco em pó (153 mg, 2,34 mmol, 26 eq.), quantidade catalítica de CuSO₄ (100 µL de solução a 10%) e agitação por 2 h. Após filtração em celite, e concentração sob pressão reduzida com co-evaporações com tolueno, o resíduo foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 3:2 (v/v), fr. 11-14] fornecendo o produto **16** como um líquido viscoso claro (42,5 mg, 0,056 mmol, 62%). Rf 0,30 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 300 MHz) 7,71 (2 H, d, J7,5 Hz, CH Fmoc arom.), 7,57 (2 H, d, J7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,37-7,24 (9 H, m, CH Bn arom. e CH Fmoc arom.), 5,76 (1 H, d, J9,7 Hz, NH Thr), 5,62 (1 H, d, J9,4 Hz, NHCO), 5,31 (1 H, d, J_{3,4} 2,2 Hz, H-4), 5,12 (1 H, d, J11,9 Hz, CH_{2a} Bn), 5,03-4,98 (2 H, m, CH_{2b} Bn, H-3), 4,73 (1 H, d, J 3,6 Hz, H-1), 4,50-4,37 (4 H, m, CH₂ Fmoc, CHα Thr, CHβ Thr), 4,22-4,10 (3 H, m, CH Fmoc, H-5, H-2), 4,02-3,95 (2 H, m, H-6a, H-6b), 2,10 (3 H, s, CH₃CO), 1,96, 1,94, 191 (9 H, 3 s, CH₃CO), 1,23 (3 H, d, J6,4 Hz, CH₃ Thr). (Anexo 13)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-Dgalactopiranosil)-L-serina (17)



Uma mistura de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina **3** (203,4 mg; 0,49 mmol) e brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila **6** (405 mg; 0,98 mmol) em MeCN previamente seca em peneira molecular (4,8 mL), foi tratada com iodo (97 mg; 0,38 mmol) e mantida sob agitação por 14 h, monitorada por CCD. A mistura foi diluída com DCM, extraída com solução de tiossulfato de sódio 5% e água, seca com sulfato de magnésio e concentrada em evaporador rotatório. O óleo obtido foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 4:6 (v/v), fr. 17-36] fornecendo o produto **17** como um sólido branco (220 mg; 0,29 mmol, 60%). Rf 0,20 [AcOEt/Hex 2:3 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 300 MHz) 7,70 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,54 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,36-7,20 (9 H, m, *CH* Bn arom. e *CH* Fmoc arom.), 5,56 (1 H, d, *J* 8,1 Hz, *NH* Ser), 5,30 (1 H, d, *J*_{3,4} 3,4 Hz, *H*-4), 5,14 (2 H, s, *CH*₂ Bn), 5,16 (1 H, dd, *J*_{1,2} 7,8 Hz, *J*_{2,3} 3,0 Hz, *H*-2), 4,91 (1 H, dd, *J*_{2,3} 3,4 Hz, *J*_{3,4} 10,5 Hz, *H*-3), 4,47-4,30 (4 H, m, *CH* Ser, *CH*₂ Fmoc, *H*-1), 4,24 (1 H, dd, *J* 3,0 Hz, *J* 10,6 Hz, *CH*_{2a} Ser), 4,15 (1 H, t, *J* 6,7 Hz, *CH* Fmoc), 4,07-4,00 (2 H, m, *J*_{5,6} 6,4 Hz, *J*_{6a,6b} 12,6 Hz, *H*-6a, *H*-6b), 3,82 (1 H, dd, *J* 3,4 Hz, *J* 10,6 Hz, *CH*_{2b} Ser), 3,74 (1 H, t, *J*_{5,6} 6,4 Hz, *H*-5), 2,08 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,95 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,93, 1,92 (6 H, 2 s, *CH*₃CO). (Anexo 14)

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-Dgalactopiranosil)-L-treonina (18)



Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila **6** (490 mg, 1,2 mmol) foi dissolvido em MeCN previamente seca em peneira molecular (6,8 mL) e tratado com o aminoácido éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-teonina **4** (250 mg, 0,57 mmol) e iodo (404 mg, 1,59 mmol). Acompanhada por CCD, a mistura foi agitada por 22 h, quando foi diluída com DCM e lavada com solução de tiossulfato de sódio 5% e água, seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O óleo obtido foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt:Hex 2:3 (v/v)] fornecendo o produto **18** como um sólido branco cristalino (128 mg, 0,17 mmol, 27%). Rf 0,40 [AcOEt:Hex 2:3 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 300 MHz) 7,69 (2 H, d, *J* 7,3 Hz, C*H* Fmoc arom.), 7,56 (2 H, ddl, *J* 2,4 Hz, *J* 7,1 Hz, C*H* Fmoc arom.), 7,35-7,21 (9 H, m, C*H* benzil arom. e C*H* Fmoc arom.), 5,59 (1 H, d, *J* 9,3 Hz, N*H* Thr), 5,26 (1 H, d, *J*_{3,4} 3,3 Hz, *H*-4), 5,22 (2 H, s, C*H*₂ benzil), 5,07 (1 H, m, *H*-2), 4,87 (1 H, dd, *J*_{3,4} 3,5 Hz, *J*_{2,3} 10,4 Hz, *H*-3), 4,42-4,25 (5 H, m, C*H* α Thr, C*H* β Thr, C*H*₂ Fmoc, *H*-1), 4,18 (1 H, t, *J* 7,1 Hz, C*H* Fmoc), 4,08-3,93 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,62 (1 H, t, *J* 6,8 Hz, *H*-5), 2,06, 1,98, 1,95, 1,92 (12 H, 4 s, 4 C*H*₃CO), 1,15 (3 H, d, *J* 6,2 Hz, C*H*₃ Thr). (Anexo 15)

2-acetamido-2-desoxi-α-D-galactopiranosil-L-serina (19)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **15** (8,8 mg, 0,0117 mmol) foi dissolvido em MeOH (0,5 mL) e ácido acético (50 µL), tratado com Pd-C 10% (5 mg) e agitado a temperatura ambiente por 22 horas. Após filtração em celite, a mistura foi concentrada e purificada por CCC [sílica-gel, AcOEt; MeOH:DCM 2:8 (v/v), fr. 4-10, Rf 0,1 em AcOEt]. O composto isolado (5 mg, 0,0115 mmol, 98%) foi dissolvido em MeOH e tratado com NaOMe (solução 1M) até pH básico, em torno de 10. A mistura resultante foi agitada por 3 horas, neutralizada por adição de resina Dowex 50X8-200 até pH neutro, filtrada e concentrada, fornecendo o glicoaminoácido desprotegido **19** (3 mg, 0,0097 mmol, 85%). $\delta_{\rm H}$ (D₂O, 300 MHz) 4,78 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,8 Hz, *H*-1), 4,06-3,96 (3 H, m, *H*-4, *H*-3, *H*-2), 3,85-3,73 (4 H, m, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b, *CH* Ser), 3,63-3,57 (2 H, m, *CH*₂ Ser), 1,88 (3 H, s, *CH*₃CO). Anexo 16

2-acetamido-2-desoxi-α-D-galactopiranosil-L-treonina (20)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina **16** (9,8 mg, 0,013 mmol) foi dissolvido em MeOH (0,3 mL) e ácido acético (30 µL), tratado com Pd-C 10% (5 mg) e agitado a temperatura ambiente por 20 horas. Após filtração em celite, a mistura foi concentrada e purificada por CCC [sílica-gel, MeOH:DCM 1:9 (v/v), fr. 4-8, Rf 0,2 em AcOEt]. O composto isolado (2,7 mg, 0,0060 mol, 46%) foi dissolvido em MeOH e tratado com NaOMe (solução 1M) até pH básico, em torno de 10. A mistura resultante foi agitada por 3 horas, neutralizada por adição de resina Dowex 50X8-200 até pH neutro, filtrada, concentrada, fornecendo o glicoaminoácido desprotegido **20** (1,5 mg, 0,0047 mmol, 78%). $\delta_{\rm H}$ (D₂O, 500 MHz) 4,95 (1 H, m, *H*-1), 4,20-3,95 (4 H, m, *H*-4, *H*-3, *H*-2, C*H*α Thr), 3,75-3,70 (3 H, m, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 3,63-3,61 (1 H, m, C*H*β Thr), 2,04 (3 H, s, N*H*CO), 1,39 (3 H, d, *J* 6,8 Hz, C*H*₃ Thr). Anexo 17

3.4 Glicopeptídeos

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-fenilalanil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina (21)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **15** (94,6 mg, 0,127 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (1,0 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 30 minutos, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 7:3 (v/v); MeOH/DCM 2:8 (v/v), fr. 5-6], Rf 0,1 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. O composto N-desprotegido isolado (56,4 mg, 0,108 mmol, 85%) foi misturado a PyBOP (70 mg, 0,134 mmol, 1,25 eg.), N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-fenilalanina (52 mg, 0,134 mmol, 1,25 eq.) e HOBt (18 mg, 0,134 mmol, 1,25 eq.) em DMF (1,5 mL). A reação foi iniciada com adição de DIEA (50 µL, 35 mg, 0,269 mmol, 2,5 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 18 horas, acompanhada por CCD. A mistura foi concentrada sob alto vácuo, dissolvida em AcOEt, extraída com solução de NaCl saturada, seca com MgSO₄, concentrada e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-70% (v/v), por gradiente, fr. 5-10]. O produto foi obtido como um sólido branco pulverizado (63,2 mg, 0,071 mmol, 66%). Rf 0,52 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. δ_{H} (CDCl₃, 500 MHz) 7.68 (2 H, d, J7,5 Hz, CH Fmoc arom.), 7,43 (2 H, d, J7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,34-7,18 (14 H, m, CH Bn arom., CH Fmoc arom., CH Phe arom.), 5,76 (1 H, dd, J 5,6 Hz, 8,8 Hz, NH Ser), 5,38 (1 H, dd, J 3,0 Hz, 7,7 Hz, NH Phe), 5,20 (1 H, d, 2,9 Hz, H-4), 5,09 (2 H, AB, J_{AB} 11,4 Hz, CH₂ Bn), 4,93 (1 H, dd, J 2,0 Hz, 11,4 Hz, H-3), 4,68 (1 H, m, CH Ser), 4,62 (1 H, d, J₁₂ 3,4 Hz, H-1), 4,45-4,33 (3 H, m, H-2, CH₂ Fmoc), 4,20 (1 H, s ap., CH Phe), 4,10 (1 H, t, J 7,0 Hz, CH Fmoc), 3,99 (1 H, m, H-5), 3,90 (2 H, t, J 9,0 Hz, H-6a, H-6b), 3,86-3,75 (2 H, m, CH₂ Ser), 3,13-2,95 (2 H, m, CH₂ Phe), 2,04 (3 H, s, CH₃CO), 1,90, 1,86 (6 H, 2 s, CH₃CO), 1,80 (3 H, s, CH₃CO). Composto inédito. Anexo 18

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina (22)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **15** (42,6 mg, 0,057 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 1 hora, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt; MeOH/DCM 2:8 (v/v), fr. 6-10], Rf 0,1 [AcOEt]. O composto *N*-desprotegido isolado (30 mg, 0,057 mmol, quant.) foi misturado a PyBOP (37 mg, 0,0713 mmol, 1,25 eq.), *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-tercbutil)-L-aspartato (29,3 mg, 0,0713 mmol, 1,25 eq.) e HOBt (9,6 mg, 0,0713 mmol, 1,25 eq.) em DMF (1,5 mL). A reação foi iniciada com adição de DIEA (25 μ L, 18 mg, 0,1425 mmol, 2,5 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 14 horas, acompanhada por CCD. A mistura foi concentrada sob alto vácuo, dissolvida em DCM e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-70% (v/v), por gradiente, fr. 7-9]. O produto foi obtido como um sólido branco pulverizado (12,6 mg, 0,0137 mmol, 24%). Rf 0,36 [AcOEt]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 300 MHz) 7.69 (2 H, d, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,53 (2 H, d, *J* 6,9 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,36-7,24 (9 H, m, *CH* Bn arom., *CH* Fmoc arom.), 6,03-5,97 (2 H, m, *NH* Asp, *NH* Ser), 5,23 (1 H, d, *J* 2,7 Hz, *H*-4), 5,10 (2 H, s, *CH*₂ Bn), 5,01 (1 H, dd, *J*_{3,4} 3,0 Hz, *J*_{2,3} 11,2 Hz, *H*-3), 4,75 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,4 Hz, *H*-1), 4,71 (1 H, m, *CH* Ser), 4,54-4,42 (2 H, m, *CH* Asp, *H*-2), 4,35 (2 H, t, *J* 7,3 Hz, *CH*₂ Fmoc), 4,16 (1 H, t, *J* 7,0 Hz, *CH* Fmoc), 4,06-3,95 (3 H, m, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 3,85 (2 H, m, *CH*₂ Ser), 2,80 (1 H, dd, *J* 4,8 Hz, 16,8 Hz, *CH*_{2a} Asp), 2,60 (1 H, dd, *J* 5,7 Hz, 16,8 Hz, *CH*_{2b} Asp), 2,03 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,91 (3 H, s, *CH*₃CO), 1,86, 1,83 (6 H, 2 s, *CH*₃CO), 1,38 (9 H, s, *CH*₃ fbu). Composto inédito. Anexo 19

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina (23)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina **16** (53,2 mg, 0,070 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 1 hora, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt; MeOH/DCM 2:8 (v/v), fr. 5-8], Rf 0,1 [AcOEt]. O composto *N*-desprotegido isolado (26,2 mg, 0,0486 mmol, 69%) foi misturado a PyBOP (31,2 mg, 0,060 mmol, 1,25 eq.), *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-terc-butil)-L-aspartato (24,7 mg, 0,060 mmol, 1,25 eq.) e HOBt (8,10 mg, 0,060 mmol, 1,25 eq.) em DMF (1,0 mL). A reação foi iniciada com adição de DIEA (22 μL, 15 mg, 0,12 mmol, 2,5 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 15 horas, acompanhada por CCD. A mistura foi concentrada sob alto vácuo, dissolvida em DCM e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-50% (v/v), por gradiente, fr. 36-52]. O produto foi obtido como um sólido branco pulverizado (38,9 mg, 0,0417 mmol, 86%). Rf 0,42 [AcOEt]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7.69 (2 H, d, J 7,5 Hz, CH Fmoc arom.), 7,53 (2 H, t, J 6,4 Hz, CH Fmoc arom.), 7,37-7,22 (9 H, m, CH Bn arom., CH Fmoc arom.), 6,17 (1 H, dd, J 1,8 Hz, 9,5 Hz, NH Thr), 6,06 (1 H, d, J 7,5 Hz, NH Asp), 5,21 (1 H, d, J 2,3 Hz, H-4), 5,10-4,96 (3 H, m, J_{AB} 12,0 Hz, $J_{3,4}$ 2,8 Hz, $J_{2,3}$ 11,5 Hz, CH₂ Bn, H-3), 4,72 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1), 4,56-4,46 (2 H, m, CH Asp, CH α Thr), 4,44-4,37 (3 H, m, H-2, CH₂ Fmoc), 4,23 (1 H, dd, J 1,8 Hz, 6,6 Hz, CH β Thr), 4,18 (1 H, t, J 7,2 Hz, CH Fmoc), 4,09-4,02 (1 H, m, H-5), 3,92-3,89 (2 H, m, H-6a, H-6b), 2,77 (1 H, dd, J 4,7 Hz, 16,9 Hz, CH_{2a} Asp), 2,61 (1 H, dd, J 6,4 Hz, 16,9 Hz, CH_{2b} Asp), 2,06 (3 H, s, CH₃CO), 1,89, 1,88, 1,85 (9 H, 3 s, CH₃CO), 1,38 (9 H, s, CH₃ fBu), 1,17 (3 H, d, J 6,4 Hz, CH₃ Thr). Composto inédito. Anexo 20

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-glicopiranosil)-L-serina (24)



Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-Oacetil-α-D-glicopiranosil)-L-serina (54,3 mg, 0,0727 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 40 minutos, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 7:3 (v/v); MeOH/DCM 1:9 (v/v), fr. 7-11], Rf 0,1 [AcOEt]. O composto N-desprotegido isolado (31,8 mg, 0,0606 mmol, 83%) foi misturado a PyBOP (39,7 mg, 0,0763 mmol, 1,25 eg.), N-(9fluorenilmetoxicarbonil)-(O-terc-butil)-L-aspartato (31,6 mg, 0,0768, 1,25 eq.) e HOBt (10,7 mg, 0,0792 mmol, 1,25 eq.) em MeCN (1,5 mL). A reação foi iniciada com adição de DIEA (30 µL, 23,5 mg, 0,269 mmol, 3 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 14 horas, acompanhada por CCD. A mistura foi concentrada sob alto vácuo e purificada por CCC [AcOEt/Hex 0-70% (v/v), por gradiente, fr. 13-14]. O produto foi obtido como um sólido branco pulverizado (37,7 mg, 0,041 mmol, 68%). Rf 0,57 [AcOEt]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 7.69 (2 H, d, J7,4 Hz, CH Fmoc arom.), 7,53 (2 H, d, J7,5 Hz, CH Fmoc arom.), 7,35-7,21 (9 H, m, CH Bn arom., CH Fmoc arom.), 5,14-5,07 (3 H, m, CH₂ Bn, H-3), 4,94 (1 H, t, J_{3,4} 9,8 Hz, H-4), 4,73-4,68 (1 H, m, CH Ser), 4,63 (1 H, d, J_{1,2} 3,8 Hz, H-1), 4,51 (1 H, t, J 6,4 Hz, CH Asp), 4,39 (2 H, dd, J 7,3 Hz, 10,4 Hz, CH₂ Fmoc), 4,30 (1 H, d, J 7,2

Hz, *H*-2), 4,25-4,09 (3 H, m, C*H* Fmoc, *H*-6a, *H*-6b), 3,96 (1 H, dd, *J* 2,3 Hz, 12,4 Hz, C*H*₂a Ser), 3,85-3,78 (2 H, m, C*H*₂b Ser, *H*-5), 2,65 (2 H, d, *J* 6,3 Hz, C*H*₂ Asp), 1,97 (6 H, s, C*H*₃CO), 1,91 (3 H, s, C*H*₃CO), 1,84 (3 H, s, C*H*₃CO), 1,37 (9 H, s, C*H*₃ *t*Bu). Composto inédito. Anexo 21

Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-D-fenilalanil-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-treonina 25



Éster benzílico N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-Dde galactopiranosil)-L-treonina 18 (60,3 mg, 0,079 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 1 hora, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 7:3 (v/v); MeOH/DCM 2:8 (v/v), fr. 12-15], Rf 0,1 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. O composto N-desprotegido isolado (23,6 mg, 0,045 mmol, 56,7%) foi misturado a PyBOP (29,3 mg, 0,056 mmol, 1,25 eq.), N-(9fluorenilmetoxicarbonil)-D-fenilalanina (21,4 mg, 0,055 mmol, 1,25 eq.) e HOBt (7,6 mg, 0,056 mmol, 1,25 eq.) em MeCN (1,0 mL). A reação foi iniciada com adição de DIEA (20 µL, 14,5 mg, 0,113 mmol, 2,5 eq.) e permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 15 horas, acompanhada por CCD. A mistura foi concentrada sob alto vácuo, dissolvida em AcOEt, extraída com solução de NaCl saturada, seca com MgSO₄, concentrada e purificada por CCC [AcOEt/Hex 7:3 (v/v) fr. 19-22]. O produto foi obtido como um sólido branco pulverizado (20,7 mg, 0,023 mmol, 51%). Rf 0,54 [AcOEt/Hex 7:3 (v/v)]. δ_H (CDCl₃, 500 MHz) 7.68 (2 H, d, J 7,4 Hz, CH Fmoc arom.), 7,45 (2 H, dd, J 7,4 Hz, 18,7 Hz, CH Fmoc arom.), 7,34-7,19 (14 H, m, CH Bn arom., CH Fmoc arom., CH Phe arom.), 6,76 (1 H, d, J 8,6 Hz, NH Thr), 5,40 (1 H, d, J 7,0 Hz, NH Phe), 5,22 (1 H, d, 2,0 Hz, H-4), 5,07 (2 H, AB, J_{AB} 12,2 Hz, CH₂ Bn), 5,00 (1 H, dd, J 7,9 Hz, 10,6 Hz, H-2), 4,82 (1 H, dd, J 3,4 Hz, 10,6 Hz, H-3), 4,57-4,53 (2 H, m, CH Phe, CHα Thr), 4,39 (1 H, t, J 7,2 Hz, CH Fmoc), 4,29-4,24 (1 H, m, CHβ Thr), 4,22 (1 H, d, J_{1,2} 7,9 Hz, H-1), 4,14-4,03 (3 H, m,CH₂ Fmoc, H-6a), 3,95 (1 H, dd, J_{5.6} 6,7 Hz, J_{6a.6b} 11,4 Hz, H-6b), 3,59 (1 H, t, J_{5.6} 6,7 Hz, H-5), 3,16 (1 H, dd, J 6,2 Hz, 13,9 Hz, CH₂ Phe), 2,99 (1 H, dd, J 6,7 Hz, 13,8 Hz, CH₂ Phe), 1,94 (9 H, s, CH₃CO), 1,89 (3 H, s, CH₃CO), 1,00 (3 H, d, J 5,8 Hz, CH₃ Thr). Composto inédito. Anexo 22

3.5 Glicodicetopiperazinas

Ciclo(L-fenilalanil-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-∟serinil) 26



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-fenilalanil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **21** (40 mg, 0,045 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,8 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 45 horas, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo e dissolução em DCM o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt/Hex 7:3 (v/v); MeOH/DCM 1:9 (v/v), fr. 4]. O produto foi obtido como um sólido amorfo (3 mg, 0,0053 mmol, 12%). Rf 0,15 [MeOH/DCM 1:9 (v/v)]. ESI-HRMS calculado para C₂₆H₃₄N₃O₁₁ [M+H]⁺ 564,2188, encontrado 564,2232 (7,8 ppm). $\delta_{\rm H}$ (CD₃OD, 500 MHz) 7,32-7,17 (5 H, m, C*H* Phe arom.), 5,30 (1 H, d, *J*_{3,4} 2,8 Hz, *H*-4), 4,93 (1 H, dd, *J*_{3,4} 2,8 Hz, *J*_{2,3} 11,4 Hz, *H*-3), 4,56 (1 H, dd, *J*_{2,3} 11,4 Hz, *J*_{1,2} 3,6 Hz, *H*-2), 4,40-4,35 (1 H, m, C*H* Ser), 4,32 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,9 Hz, *H*-1), 4,22-4,16 (2 H, m, C*H* Phe, *H*-5), 4,04-3,88 (3 H, m, *H*-6a, *H*-6b, C*H*_{2a} Ser), 3,49 (1H, dd, *J* 3,6 Hz, 9,3 Hz, C*H*_{2b} Ser), 3,28 (1 H, dt, *J* 4,4 Hz, 13,8 Hz, C*H*_{2a} Phe), 2,96 (1 H, dd, *J* 4,7 Hz, 13,8 Hz, C*H*_{2b} Phe), 2,15-1,97 (12 H, m, C*H*₃CO). Composto inédito. Anexo 23

Ciclo((*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-Dgalactopiranosil)-L-serinil) 27



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-terc-butil)-L-aspartil-*O*-(2acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **22** (13 mg, 0,014 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 14 horas, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt; MeOH/DCM 1:9 (v/v), fr. 6-9]. O composto foi isolado como um líquido viscoso (2,6 mg, 0,0045, 32%) Rf 0,35 [DCM:MeOH 9:1 (v;v)]. δ_{H} (CDCl₃, 300 MHz) 6,95 (1 H, d, *J* 9,5 Hz, N*H*CO), 6,81-6,70 (1 H, m, N*H* Ser), 6,60 (1 H, s ap., N*H* Asp), 5,29 (1 H, d, *J*_{3,4} 3,1 Hz, *H*-4), 5,13 (1 H, dd, *J*_{3,4} 3,1 Hz, *J*_{2,3} 11,7 Hz, *H*-3), 4,87 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,6 Hz, *H*-1), 4,62-4,53 (1 H, ddd, *J*_{1,2} 3,6 Hz, *J*_{2,3} 11,4 Hz, *J* 9,7 Hz, *H*-2), 4,34-4,28 (1 H, m, C*H* Asp), 4,25-4,19 (1 H, m, C*H* Ser), 4,16-3,99 (4 H, m, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b, C*H*_{2a} Ser), 3,61 (1 H, *J* 9,3 Hz, C*H*_{2b} Ser), 2,89 (1 H, dd, *J* 3,1 Hz, 17,3 Hz, C*H*_{2a} Asp), 2,58 (1 H, dd, 9,2 Hz, 17,5 Hz, C*H*_{2b} Asp), 2,10, 2,01, 1,93, 1,85 (12 H, 4 s, C*H*₃CO), 1,39 (9 H, s, C*H*₃ *t*Bu). Composto inédito. Anexo 24

Ciclo((*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-Dgalactopiranosil)-L-treoninil) 28



Éster *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-terc-butil)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina benzílico **23** (38 mg, 0,042 mmol) foi tratado com solução de piperidina em DMF (0,5 mL, 20%) e mantido sob agitação a temperatura ambiente durante 15 horas, com acompanhamento por CCD. Após concentração sob alto vácuo, o composto foi purificado por CCC [sílica-gel, AcOEt; MeOH/DCM 1:9 (v/v), fr. 9-11]. O composto foi isolado como um líquido viscoso (10 mg, 0,0168 40%) Rf 0,3 [DCM:MeOH 9:1 (v/v)]. $\delta_{\rm H}$ (CDCl₃, 300 MHz) 7,09 (1 H, d, *J* 1,2 Hz, N*H* Thr) 6,97 (1 H, d, *J* 1,7 Hz, N*H* Asp), 6,65 (1 H, d, *J* 9,2 Hz, N*H*CO), 5,32 (1 H, dd, *J*_{4,5} 1 Hz, *J*_{3,4} 3,1 Hz, *H*-4), 5,07 (1 H, dd, *J*_{3,4} 3,1 Hz, *J*_{2,3} 11,5 Hz, *H*-3), 4,96 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,6 Hz, *H*-1), 4,48 (1 H, ddd, *J*_{1,2} 3,6 Hz, *J*_{2,3} 11,5 Hz, *J* 9,4 Hz, *H*-2), 4,29 (1 H, d ap., *J* 10,1 Hz, C*H* Asp), 4,24-4,15 (2 H, m, H-5, C*H*α Thr), 4,02 (2 H, d, *J*_{5,6} 6,5 Hz, *H*-6a, *H*-6b), 3,94 (1 H, m, C*H*β Thr), 3,00 (1 H, dd, *J* 2,7 Hz, 17,2 Hz, C*H*_{2a} Asp), 2,62 (1 H, dd, 10,1 Hz, 17,2 Hz, C*H*_{2b} Asp), 2,09, 1,98, 1,90, 1,88 (12 H, 4 s, C*H*₃CO), 1,40 (9 H, s, C*H*₃ *t*Bu), 1,35 (3 H, d, *J* 6,6 Hz, C*H*₃ Thr). Composto inédito. Anexo 25

3.6 Avaliação biológica

Inibição enzimática em TcTS

Para avaliação dos compostos sintetizados frente à enzima parasitária *trans*-sialidade de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), foi utilizado o método fluorimétrico contínuo⁵¹ baseado na clivagem do doador MuNANA, liberando o fluoróforo Mu. O método foi padronizado no laboratório através da determinação da diluição enzimática ideal para obtenção de perfil reacional hiperbólico, e da posterior confirmação experimental dos parâmetros cinéticos Km (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima) com dados da literatura, de um lote de enzima TcTS recombinante cedida pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP).

Os ensaio foram realizados em triplicata e repetidos em três dias diferentes, utilizando placas de 96 poços contendo em cada poço: tampão fosfato pH 7,4 (25 µL), enzima TcTS (25 µL de solução diluída padronizada), substrato MuNANA (25 µL de solução 0,4 mM) e o composto em análise (25 µL de solução 4,0 mM), em total de 100 µL resultando em concentração final dos compostos de 1 mM. Nos controles negativos e positivos, em substituição às soluções dos compostos, foram adicionados respectivamente tampão, e soluções 4,0 mM dos inibidores DANA e piridoxal fosfato.

As reações enzimáticas foram acompanhadas por fluorimetria em λ_{ex} . 360 nm, λ_{em} . 460 nm, a 25 °C por 10 minutos. Relacionando as uni dades de fluorescência com o tempo, foram calculadas as velocidades de reação, pela inclinação da regressão linear, e as porcentagens de inibição, pela equação % I = 100 x [1 – (V_i / V₀)], em que V_i é a velocidade da reação na presença do composto analisado ou controle positivo, e V₀ é a velocidade da reação nos controles negativos.

Citotoxicidade em linhagens de células tumorais

Linhagens tumorais de leucemia T humana Jurkat e de melanoma de camundongo B16F10 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidas em criopreservação foram descongeladas e cultivadas em meio DEMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 100 UI mL⁻¹ de penicilina G, 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg mL⁻¹ de anfotericina, a 37 °C, em ambiente contendo 5% de CO₂. Para avaliação da atividade citotóxica, $2x10^4$ células por poço foram distribuídas em placas de cultivo celular e incubadas com os compostos em análise nas concentrações de 500 µM e 50 µM, em triplicata. Para o controle negativo, as células foram incubadas apenas com o meio de cultura. Após 24 horas, foi conduzido o ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de MTT,⁵² com quantificação em λ 570 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pela equação % I = 100 x [1 - (A_i / A₀)], em que A_i é a absorvância do poço na presença do composto analisado e A₀ é a absorvância do poço dos controles negativos.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reações de glicosilação clássicas são caracterizadas pela formação de uma ligação *O*-glicosídica, quimicamente classificada como ligação (a)cetal, entre a posição anomérica de um sacarídeo e uma função hidroxílica qualquer, seja um álcool simples, uma outra molécula de açúcar ou ainda um grupo –OH presente em compostos polifuncionais mais complexos, como aminoácidos. Em uma glicosilação, é chamado doador (eletrófilo) o reagente que fornece a unidade glicosídica, enquanto o composto contendo o grupo hidroxílico ao qual se liga o açúcar é denominado aceptor (nucleófilo).

Uma vez que existe equilíbrio entre as formas hemiacetal (hidroxila anomérica livre) e acetal de uma aldose na presença de um aceptor glicosídico, essa condição não é eficiente para a glicosilação. Para favorecer a substituição nucleofílica, são empregados doadores glicosídicos com grupos abandonadores anoméricos na presença de promotores, estes utilizados em quantidades catalíticas ou estequiométricas (Esquema 2).



Esquema 2. Reação genérica de glicosilação. P: grupo de proteção; R: substituinte de natureza qualquer; X: grupo abandonador.

Os demais grupos reativos, tanto do doador como do aceptor glicosídico, devem ser devidamente protegidos de maneira a impedir reações cruzadas, conferindo regiosseletividade à glicosilação. Adicionalmente, os substituintes podem ser manipulados para influenciar a estereosseletividade da reação, controlando a configuração da ligação glicosídica formada. A síntese de glicoaminoácidos envolve, portanto, a preparação de precursores de açúcares e aminoácidos convenientemente protegidos e/ou ativados.

Foram sintetizados os aminoácidos serina e treonina *N*- e *O*-protegidos como aceptores glicosídicos e haletos de galactose e galactosamina (sob a forma de azido) como doadores glicosídicos. Para a obtenção dos blocos de glicoaminoácidos e respectivos dipeptídeos e dicetopiperazinas de interesse no presente trabalho, ou seja, estruturas relacionadas a mucinas com ênfase nos derivados α -glicosídeos, foi seguida a estratégia retrossintética ilustrada no Esquema 3A.

Embora toda a rota sintética tenha sido elaborada para favorecer seletivamente a glicosilação em configuração α , é improvável que haja estereoespecificidade para este tipo de reação, e a formação do glicosídeo β poderia ser observada, ainda que em pequena quantidade. Devido à presumível obtenção limitada do anômero equatorial por esta via,

dependendo da viabilidade de isolamento, da proporção dos anômeros, da escala e dos rendimentos obtidos nas reações de glicosilação, além de sua importância para comparações na etapa de ensaios biológicos, foi elaborarada uma rota sintética paralela, dirigida para a formação preferencial do glicosídeo β, conforme descrito no Esquema 3B.

A necessidade de rotas sintéticas distintas para a obtenção dos anômeros $\alpha \in \beta$ deve-se ao efeito de grupo vizinho. O substituinte na posição 2 pode conduzir a reação de glicosilação à formação do anômero α , quando não apresenta influência no intermediário reacional (como no caso de azido), ou do anômero β , quando interfere no mecanismo reacional (como o grupo participante acetamido).



Esquema 3. Retrossíntese simplificada para a obtenção dos compostos 1 (A) e 2 (B).

4.1 Síntese de aceptores glicosídicos

Aminoácidos comerciais *N*-protegidos por Fmoc prontamente disponíveis foram utilizados como materiais de partida. A reação de proteção da carboxila envolveu a geração *in situ* do sal carboxílico de césio e subsequente ataque nucleofílico ao brometo de benzila, resultando na formação de um éster benzílico (Esquema 4). Além de promover a proteção da carboxila terminal, o grupo Bn melhora a solubilidade do produto em solventes orgânicos e atua, nas posteriores etapas de acoplamento e ciclização da síntese em solução dos glicopeptídeos, como um análogo da resina de suporte classicamente utilizada na síntese em fase sólida.⁴⁸



Esquema 4. Reação de benzilação dos aminoácidos Fmoc-Ser e Fmoc-Thr.

A benzilação do resíduo de serina ocorreu mais rapidamente do que a reação do resíduo de treonina nas mesmas condições, julgado por CCD. No primeiro caso, o consumo quase completo do material de partida foi observado após 6 horas de reação, enquanto no segundo caso, o material de partida não foi completamente consumido até 23 horas do início da reação, mesmo após tratamento com excesso de brometo de benzila. Por ser o mecanismo da reação do tipo SN₂, estas observações podem ser atribuídas à restrição estérica imposta pelo grupo metila adicional do resíduo de treonina, refletindo possivelmente no rendimento das reações (70% para serina e 60% para treonina). O método de purificação, entretanto, pareceu ser mais determinante sobre os rendimentos, uma vez que para o bloco de serina, foi recuperado produto presente no sobrenadante da cristalização.

Independente da natureza da cadeia lateral, a característica espectroscópica mais evidente da ocorrência desta reação foi a presença do sinal relativo aos hidrogênios *O*-metilênicos do grupo benzílico, tipicamente posicionados na região de δ 5,2. Este sinal foi observado nos espectros dos dois produtos, porém com diferença de multiplicidade: em **3** ocorreu como um singleto em δ 5,23, enquanto em **4** desdobrou-se com padrão característico de sistema AB com constante de acoplamento *J*_{AB} 12,3 Hz em δ 5,22, possivelmente devido ao ambiente químico assimétrico induzido pelo centro quiral adicional no carbono β de treonina. Os sinais de hidrogênios aromáticos integrando em total de 13 (8 de Fmoc e 5 do grupo benzílico) confirmaram a incorporação do grupo de proteção pretendido.

A estrutura das cadeias laterais desses compostos determinou as demais distinções entre seus espectros. **4** apresentou dubleto correspondente ao grupo metílico em δ 1,25, e sinais dos hidrogênios α e β metínicos sobrepostos como multipleto na região de δ 4,40, enquanto **3** apresentou sinais típicos dos hidrogênios metilênicos em torno de δ 4,00. A maior blindagem da hidroxila de treonina (δ 1,85) em relação à de serina, (δ 2,04), deve-se à primeira estar ligada a carbono secundário.

4.2 Síntese de doadores glicosídicos

Embora a estereoseletividade das reações de glicosilação seja influenciada por promotores e solventes, o componente doador glicosídico, em função dos substituintes ligados ao anel, particularmente nas posições anomérica e adjacente, é determinante sobre a configuração da ligação glicosídica do produto, cujo controle é o maior desafio da química de carboidratos.⁵

O efeito anomérico é um fator estereoeletrônico que descreve a tendência do substituinte em *C*-1, adjacente ao heteroátomo do anel pirano, em preferir orientação axial em detrimento da equatorial, ainda que a última seja favorecida por seu menor impedimento estérico. Este comportamento improvável é explicado por alguns modelos, como segue.

A existência de dipolos alinhados envolvendo os átomos de oxigênio endocíclico e anomérico causa respulsão entre os mesmos quando da orientação equatorial do substituinte. Em contrapartida, um sistema energeticamente mais estável ocorre com o substituinte anomérico em posição axial, porque resulta em dipolos opostos, praticamente antiparalelos, e por consequência, menor repulsão (Esquema 5A).^{53,54}



Esquema 5. Efeito anomérico explicado pelos modelos A) eletrostático e B) interação de orbitais. R e R': H ou substituintes.

Estabilização eletrônica adicional é promovida pelo fenômeno da hiperconjugação, em que um dos pares de elétrons não compartilhados do átomo de oxigênio pirânico interage com o orbital antiligante σ^* do carbono anomérico. A sobreposição é eficiente quando os referidos orbitais estão paralelamente dispostos, o que é possível apenas para a orientação axial da ligação anomérica, cujo mais baixo orbital molecular desocupado (LUMO) possui relação sinperiplanar com um dos orbitais *n* do oxigênio (Esquema 5B).^{53,54}

Em algumas situações, entretanto, outros fatores se sobrepõem ao efeito anomérico, invertendo a tendência de formação da ligação glicosídica da orientação axial para a equatorial. É o caso de derivados 2-acilamino-2-desoxi-glicosídeos (Esquema 6), em que a participação de grupo vizinho em *C*-2 na estabilização do carbono anomérico ocupa a face α (A), dirigindo o ataque nucleofílico do aceptor glicosídico pela face β (B), ou ainda gerando o derivado oxazolina estável e não reativo (C).^{5,55}

Este é o motivo que inviabiliza a obtenção dos derivados de maior interesse neste trabalho, glicoconjugados de α -GalNAc, diretamente a partir de doadores glicosídicos contendo o grupamento 2-acetamido, obtidos em poucas e simples etapas a partir de produtos comerciais como a galactosamina. A reação de glicosilação envolvendo diretamente tais compostos forneceria predominantemente o composto β , conforme explorado no Esquema 3B.

A melhor estratégia para obtenção de conjugados α -GalNAc envolve uma modificação molecular (Esquema 6) utilizando o grupo azido (D) como função nitrogenada não participante em C-2. Sem assistência anquimérica na estabilização do carbono anomérico, a glicosilação transcorre normalmente para a formação do composto α , e o grupo acetamido pode ser posteriormente introduzido pela modificação do grupo azido com facilidade. Portanto, a abordagem mais utilizada para a preparação de 2-desoxi-2-azido-galactopiranosídeos é a reação de azidonitração de D-galactal.⁴³



Esquema 6. Efeito de grupo vizinho sobre a estereoseletividade de glicosilação de 2-desoxi-2-amino-glicosídeos. A) assistência anquimérica de grupo acilamido; B) β-glicosídeo; C) oxazolina; D) grupo azido não participante; E) α-glicosídeo. R, R' e R'': substituintes.

A rota sintética proposta para obtenção do doador glicosídico, resumida no Esquema 7, partiu do açúcar comercial D-galactose, que teve as hidroxilas protegidas por acetilação (5) e foi convertido ao brometo 6, o qual passou por eliminação redutiva originando o intermediário chave D-galactal 7. A reação de azidonitração forneceu o derivado 8, subsequentemente convertido ao cloreto de azido-galactose protegido 9.



Esquema 7. Rota sintética para obtenção do doador glicosídico 9.

Grande variedade de catalisadores está disponível para reações tradicionais de acilação,⁵⁶ ainda que alguns deles sejam empregados em quantidades demasiado elevadas para serem classificadas como catalíticas. Apesar de seu odor desagradável e alta toxicidade, piridina é o catalisador mais amplamente utilizado para acetilação de açúcares na presença de anidrido acético, pois é eficaz e também atua como solvente da reação. Outro método bastante popular emprega acetato de sódio em refluxo com anidrido acético, cujo aquecimento é potencialmente perigoso. Protocolos alternativos envolvem outros reagentes de manipulação trabalhosa, como cloreto de zinco e ácido perclórico.⁵⁷

Em estratégia introduzida por Kartha e Field em 1997, foi proposta a catálise de reações de acilação de açúcares por iodo molecular, um reagente versátil em química de carboidratos empregado para glicosilação de açúcares redutores,^{*} formação e clivagem de acetais, e adição de alcoóis a glicais.⁵⁷ Devido a suas características ácidas de Lewis, o iodo interage com centros ricos em elétrons de solventes e reagentes, causando a polarização de anidridos e promovendo eficientemente reações de acilação (Esquema 8).



Esquema 8. Mecanismo de ativação de anidrido em per-O-acilação promovida por iodo.

^{*} Recentemente, I₂ foi empregado como promotor com bons rendimentos em glicosilações para obtenção estereosseletiva de 2-azido-2-desoxi-α-D-galactopiranosil aminoácidos.⁵⁸

A per-O-acetilação do açúcar D-galactose foi realizada em anidrido acético, reagente e solvente da reação, na presença de iodo, que, além de ser utilizado em quantidade catalítica, apresenta baixo custo, simples manuseio e fácil tratamento do resíduo, com tiossulfato de sódio após a reação. O rendimento quantitativo descrito, possivelmente superestimado em função da dificuldade na remoção total do solvente do produto viscoso, refere-se à mistura de anômeros, obtida na proporção α/β 5:1, que foi diretamente utilizada na etapa seguinte da rota.

Alíquota da mistura foi recristalizada a partir de etanol⁵⁶ para fornecer o isômero α sob a forma pura para fins de caracterização espectroscópica. A estrutura foi confirmada por RMN ¹H através da presença de 5 singletos integrando para 15 hidrogênios próximos a δ 2, sinais característicos de grupos acetil, além dos 7 demais sinais correspondentes aos hidrogênios do esqueleto do açúcar.

É possível que a pequena constante de acoplamento equatorial-axial entre *H*-1 e *H*-2 não tenha sido percebida, dado que estes sinais foram observados respectivamente em δ 6,36 e δ 5,32 como singletos alargados, mesmo com a elevada radiofrequência empregada. A configuração anomérica α foi atribuída por comparação com o espectro (não representado) do isômero β comercial, analisado em condições equivalentes, em que *H*-1 ocorreu como o dubleto característico em δ 5,69 com $J_{1,2}$ diaxial de 8,3 Hz, correspondente ao acoplamento com *H*-2 em δ 5,32.

A partir da galactose protegida, a sequência sintética consagrada por Lemieux e Ratcliffe em 1979^{43} como a rota mais curta e eficiente para doadores glicosídicos nitrogenados com α -seletividade é constituída por reações bem conhecidas que serão brevemente abordadas a seguir.

O tratamento de **5** com ácido bromídrico 33% em ácido acético glacial, pelo protocolo de Fischer & Zemplen[†] (1910, citado por [55]), proporcionou substituição anomérica conduzindo à formação do respectivo brometo de galactopiranosila **6** em rendimento de 79%, em ligeiro contraste com os valores superiores a 90% da literatura,⁵⁵ devido à dificuldade em cristalizar o produto. Sua alta reatividade causou degradação ao longo da cristalização, a qual foi interrompida antes se completar. Neutralização exaustiva do ácido residual durante o *work up* deve melhorar o processo de cristalização, bem como a estabilidade do composto ao armazenamento. Aos traços de HBr remanescentes nos cristais foi atribuída a extensiva decomposição do composto a um líquido negro viscoso em poucos dias de armazenamento em refrigerador.

A estrutura de **6** foi comprovada pelo espectro de RMN ¹H, tanto pela presença de apenas 4 grupos acetil em torno de δ 2,0 (4 singletos com integral de 12 H) como pela

[†] FISCHER, E.; ZEMPLEN, G. Einige derivate der cellobiose. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 43, n. 2, p. 2536-2543, 1910.

desblindagem do sinal de *H*-1 para δ 6,68 em relação ao material de partida, indicando modificação do substituinte anomérico. A configuração α esperada foi confirmada através da constante de acoplamento $J_{1,2}$ de 3,9 Hz, compatível com a substituição 1,2-*cis*.

Na sequência, **6** foi submetido à eliminação redutiva descrita por Shafizadeh[‡] (1973, citado por [33]), empregando zinco e ácido acético para fornecer o derivado 1,2 insaturado, o galactal **7**. Embora sejam descritos valores de até 70% na literatura,⁵⁵ o rendimento de 52% obtido foi satisfatório, podendo ser ainda otimizado com a redução do tempo reacional.

Devido à dupla ligação endocíclica, a conformação do anel pirano torna-se distorcida, refletindo em peculiaridades no comportamento espectroscópico. Além da eliminação evidente do grupo 2-acetil (somente 9 hidrogênios na região característica de δ 2), o hidrogênio anomérico (vinílico) se apresentou mais blindado em δ 6,43 comparado ao precursor **6**. Sua constante de acoplamento com *H*-2, com o qual possui relação *cis* perante a insaturação, aumentou para 6,3 Hz e foi ainda observado um desdobramento do sinal em duplo dubleto em função de acoplamento, provavelmente alílico com *H*-3, da ordem de 1 Hz. Por sua vez, a constante de acoplamento $J_{2,3}$, diminuiu de aproximadamente 10,7 Hz no material de partida para cerca de 2 Hz, derivada da mudança de orientação espacial entre estes dois hidrogênios.

A reação de azidonitração foi promovida através da adição de excesso de nitrato cérico de amônio e azida de sódio ao composto **7**. Especula-se que o mecanismo anti-Markovnikov desta reação esteja baseado na adição radicalar regioespecífica do grupo azido à posição 2, seguida de oxidação formando um cabocátion em *C*-1 que sofre ataque do grupo nitrato para resultar em azidonitratos isoméricos (Esquema 9).^{5,40,43,59} A tendência da reação é fornecer estereoseletivamente o produto com o grupo azido em posição equatorial, porém a proposta mecanística também explica a formação de outras formas epiméricas de 2-azido-2-desoxi-1-*O*-nitropiranosídeos.⁶⁰



Esquema 9. Mecanismo proposto para a reação de azidonitração genérica de glucais. P: grupo de proteção.

[‡] SHAFIZADEH, F. D-Galactal from tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl bromide. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, p. 409-410, 1963.

Embora alguns protocolos descrevam o emprego direto destes epímeros na etapa seguinte, a mistura reacional bruta foi purificada antes da reação seguinte, para fins de caracterização estrutural. Ainda assim, o produto obtido **8** estava constituído de mistura dos anômeros α e β galactopiranosídicos na proporção aproximada de 1:0,6, conforme indicado por ¹H RMN, em que os sinais de *H*-1 foram observados respectivamente em δ 6,68 com $J_{1,2}$ 3,7 Hz e δ 5,56 com $J_{1,2}$ 8,8 Hz, e sinal de *H*-2 caracteristicamente blindado em δ 3,75, devido ao efeito do grupo azido introduzido nesta posição.

Sem subsequente purificação, a mistura foi tratada com cloreto de tetraetilamônio em acetonitrila para promover a substituição do nitrato anomérico pelo cloreto, tendo sido obtido o produto em ótimo rendimento de 94%. O azidocloreto **9** foi isolado exclusivamente na forma α e caracterizado por ¹H RMN, em que foram observados o dubleto característico de *H*-1 em δ 6,12 com $J_{1,2}$ 3,9 Hz, e o sinal de *H*-2 sobreposto na região de δ 4, mais blindado do que nos precursores devido à influência da função azido no ambiente químico deste hidrogênio. Este doador glicosídico foi diretamente empregado para a glicosilação de aminoácidos com vistas à obtenção dos α -glicosídeos de interesse.

Já para os β-glicosídeos, a rota sintética proposta para o preparo do doador glicosídico é mais curta e simples, com apenas duas etapas partindo do açúcar comercial cloridrato de Dgalactosamina, por qualquer das duas vias alternativas delineadas no Esquema 10.



Esquema 10. Rota sintética para obtenção do doador glicosídico 11.

Na primeira via, o aminoaçúcar foi submetido à peracetilação com anidrido acético em piridina, que tem a função de neutralizar o cloridrato para base livre e de catalisar a reação, que transcorre por meio de uma espécie intermediária reativa de *N*-acil piridínio. Consideradas as diferenças decorrentes da proporção de escala e da natureza do material de partida, a catálise por piridina para formação do composto **10** necessitou maior tempo para completar a acetilação (cerca de 20 horas) e apresentou rendimento mais modesto (aproximadamente 60%) quando comparada com a reação catalisada por iodo na síntese do composto **5**, que apresentou rendimento quantitativo em 3 horas de reação.

A confirmação da estrutura de **10** por RMN ¹H foi baseada na presença dos sinais de 15 hidrogênios, divididos em 5 singletos na região de δ 2, referentes às metilas dos grupos

acetil incorporados. O sinal de *H-1* em δ 5,63 com *J*_{1,2} 8,7 Hz indicou a configuração β anomérica do produto. O deslocamento químico de *H-2*, relativamente blindado em δ 4,38 pelo substituinte acetamido, claramente o diferencia do hidrogênio análogo no composto **5**, em δ 5,32 por ser adjacente a um grupo *O*-Ac.

A tentativa de conversão de **10** no cloreto anomérico por tratamento com cloreto de titânio (IV)⁶¹ não obteve sucesso. Julgada a partir da CCD, a formação do possível produto foi bastante lenta, requerendo introdução de quantidade adicional de TiCl₄, um reagente extremamente fumegante e corrosivo. Ao final do período reacional, houve esgotamento do solvente, formando uma mistura residual, de difícil ressuspensão e purificação, da qual foi isolado o composto principal, que não correspondeu ao produto desejado **11**.

A segunda via da proposta sintética foi testada pelo tratamento do aminoaçúcar com metóxido de sódio até neutralização do cloridrato, seguido de acetilação seletiva do amideto formado, classicamente descrita por Horton[§] (1972, citado por [62]) para glicosamina. Durante a filtração, o produto precipitado apresentou parcial dissolução e as duas tentativas de cristalização a partir de metanol e éter etílico falharam, ficando a purificação prejudicada com a possível presença de NaCl. A etapa seguinte envolveu o tratamento do composto anterior com cloreto de acetila saturado com HCl. Provavelmente devido a um pico de aquecimento logo no início da reação, a mistura reacional tornou-se enegrecida e de composição complexa, da qual não foi solado o produto esperado **11**.

Todavia, não são inusitados os resultados negativos obtidos na síntese do doador glicosídico **11**. Em reações semelhantes, utilizando ácido clorídrico em éter etílico para clorinação de galactosamina peracetilada, foi descrita a degradação do produto por rearranjo ao derivado amino livre, necessitando alteração do protocolo reacional para emprego de atomosfera inerte com argônio e *work up* com diversas coevaporações com clorofórmio.⁶³

Alternativamente, há outras metodologias descritas para obtenção de doadores glicosídicos β-dirigentes. A introdução do grupo *N*-Troc (2,2,2-tricloroetoxicarbonil) em *C*-2 seguida de halogenação anomérica, é uma opção clássica e eficiente de substituinte participante, porém não desativante para a glicosilação, porque não gera derivado oxazolínico.⁶⁴ Mais recentemente, um protocolo foi publicado descrevendo a aplicação de triclorotriazina (TCT) e DMF na presença de base, formando um aduto moderadamente reativo, para a branda formação de cloretos anoméricos a partir de hemiacetais.⁶⁵ Ainda, o próprio composto **10** pode ser diretamente empregado como doador em glicosilação promovida por BF₃ eterato, já que este reagente é capaz de ativar a posição anomérica *O*-acetilada.⁶⁶

[§] HORTON, D. 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl chloride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 282-285, 1972.

4.3 Reações de glicosilação

O primeiro método testado para glicosilação com o cloreto de azidogalactose **9** foi o consagrado protocolo de Koenigs & Knorr^{**} (1901, citado por [55, 60]), que emprega sais de prata, particularmente Ag₂CO₃ e AgClO₄ como promotores que assistem a saída do grupo abandonador de haletos anoméricos por complexação. Em mecanismo consertado viabilizado pela anomerização *in situ*, característica das reações promovidas por Ag⁺, o intermediário reacional cloreto polarizado é convertido à configuração equatorial e favorece o ataque nucleofílico do aceptor glicosídico pela face inferior do anel pirânico, também dirigido pela ausência de participação do grupo vizinho azido, resultando no glicosídeo α (Esquema 11).^{54,60}



Esquema 11. Mecanismo de glicosilação promovido por AgCO₃. P: grupo de proteção. R: substituinte qualquer.

Em geral, os protocolos empregam a combinação dos sais Ag₂CO₃ e AgClO₄ nos solventes diclorometano e/ou tolueno, sob atmosfera inerte e na presença de peneira molecular.^{33,40,67,68,69} As mesmas condições reacionais iniciais foram reproduzidas para a glicosilação de **3** com o doador **9**, mas a reação não ocorreu tão rápidamente como descrito na literatura, tendo sido adicionalmente tratada com excesso dos promotores e finalizada sem o consumo completo dos materiais de partida. O produto foi isolado e caracterizado, porém com rendimento inferior a 10%, enquanto são comumente descritos valores de cerca de 60%. Provavelmente, o baixo rendimento foi relacionado a umidade no meio reacional, proveniente da atmosfera ou presente no sal altamente higroscópico AgClO₄.

Opcionalmente, variações metodológicas utilizando outros promotores de prata estão disponíveis, principalmente com AgClO₄ ou triflato de prata na presença de bases alquil-piridínicas como dimetilaminopiridina e 2,4,6-colidina, com estereosseletividade e rendimentos satisfatórios.^{55,71,72,73,74}

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, Carvalho e cols.⁶² desenvolveram em 2003 um protocolo para β -glicosilação de aminoácidos por cloreto de GlcNAc, promovida por HgBr₂ com rendimentos de até 60%. A metodologia demonstrou versatilidade e foi recentemente explorada com êxito por Campo e cols.^{14,42} na obtenção de α -LacNAc-Thr, utilizando como doador glicosídico o correspondente azidocloreto. Assumindo a estereosseletividade deste promotor como dependente principalmente da

^{**} KOENIGS, W. KNORR, E. Ueber einige derivate des traubenzuckers und der galactose. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 34, n. 1, p. 957-981, 1901.

natureza do doador glicosídico, foi proposto o emprego de HgBr₂ para α-glicosilações envolvendo o doador azidocloreto **9**, com a motivação de estender a aplicação e a abrangência do método já desenvolvido.

Por sua eletrofilicidade, o HgBr₂ atua como ácido de Lewis para a eliminação do cloreto anomérico e consequente ativação do glicosídeo. É formado um intermediário estabilizado como íon oxocarbênio, com conformação aproximadamente planar de meia cadeira, que aceita substituição nucleofílica por qualquer das duas faces, dirigida pelo efeito anomérico e pela influência de grupos vizinhos.⁵⁴ No caso do doador azidocloreto, o ataque do aceptor se dá pela face α em função da presença do grupo azido não participante em *C*-2 (Esquema 12).



Esquema 12. Mecanismo de glicosilação promovido por brometo de mercúrio.

Assim, os aminoácidos **3** ou **4** foram tratados com excesso do açúcar **9** e de HgBr₂ em 1,2-dicloroetano sob refluxo por cerca de 1 dia (Esquema 13).^{††} Por CCD, foi observada a formação de anômeros do glicoaminoácido, com manchas claramente resolvidas apenas em fase móvel contendo solvente aromático, com Rf próximo a 0,3 em AcOET/Tol 2:8 (v/v). A separação dos isômeros foi trabalhosa, exigindo o uso de tolueno, gradiente de fase móvel muito suave e mais de uma purificação para isolamento completo dos produtos.



Esquema 13. α-glicosilação de Ser e Thr com GalN₃ promovida por brometo de mercúrio.

Para o bloco de serina, foram realizadas cromatografias sequenciais até a obtenção de ambos os anômeros α (12) e β (13), com excelente estereosseletividade 12:1, respectivamente. Mesmo considerando o bom rendimento total de 52% obtido, a pequena

^{††} Embora tenha sido testada também com irradiação por microondas⁷⁰ em detrimento do aquecimento condutivo convencional, a reação não foi satisfatória tanto em tubo aberto como em tubo selado.

fração do anômero β formada só foi suficiente para caracterização estrutural, sem disponibilidade para prosseguir com a rota sintética proposta, ou ser desprotegido para outros ensaios. Já na glicosilação com treonina, que apresentou rendimento de 54% para o anômero α (14), também houve formação do anômero β , a julgar por CCD [mancha fraca observada em Rf 0,23, AcOEt:Tol 2:8 (v/v)]. Contudo, devido à menor quantidade passível de separação, o mesmo não foi isolado e não houve estimativa da proporção de anômeros.

A caracterização espectroscópica de **12** indicou a configuração α através do dubleto de *H*-1 em δ 4,79 com constante de acoplamento 3,2 Hz, complementado pelo duplo dubleto de *H*-2 em δ 3,51 com $J_{1,2}$ 3,3 Hz e $J_{2,3}$ 11,1 Hz. O anômero de configuração equatorial **13** foi confirmado principalmente pelo sinal de *H*-2, desdobrado em duplo dubleto com $J_{1,2}$ 8,0 Hz e $J_{2,3}$ 10,9 Hz, em δ 3,60, pois o sinal de *H*-1 ficou encoberto na região de δ 4,3. Semelhantemente a **12**, o glicosídeo **14** apresentou um dubleto de *H*-1 em δ 4,83 como com $J_{1,2}$ 3,4 Hz, e um duplo dubleto *H*-2 em δ 3,52 acoplando com $J_{1,2}$ 3,4 Hz $J_{2,3}$ 11,1 Hz. A presença muito evidente de sinais característicos de ambos o açúcar (grupos acetil δ 2,0) e o aminoácidos (aromáticos e alquílicos de Fmoc e Bn respectivamente em δ 7,8-7,2 e δ 5,5-4,0, grupo metil de Thr em δ 1,3) comprovou a obtenção dos produto pelo acoplamento entre as referidas moléculas.

A utilização do brometo de mercúrio como promotor destas glicosilações não só comprovou sua aplicabilidade em termos de eficiência e estereosseletividade, como também demonstrou vantagens sobre o método tradicional com prata: rendimentos comparáveis, porém com menor tempo reacional e manipulação experimental mais simples. A despeito de que Lemieux, quando da divulgação pioneira da reação de azidonitração, já descrevera a subsequente glicosilação promovida por Hg(CN)₂,⁴³ relativamente pouco tem sido divulgado na literatura sobre a aplicação de mercúrio em glicosilações, sendo inédito o emprego de HgBr₂ para as combinações de doadores e aceptores glicosídicos aqui descritos. A introdução de uma nova opção sintética^{‡‡} para a obtenção dos blocos de α-glicoaminoácidos é, portanto, uma importante constribuição para a química de carboidratos.

Uma vez definida a configuração anomérica que conecta a unidade sacarídica aos aminoácidos, essencialmente uma reação irreversível, a interferência do substituinte da posição 2 não é mais relevante para a rota sintética. Logo, a função azido transitória dos compostos **12** e **14** foi convertida ao grupo acetamido por acetilação redutiva, através de tratamento com zinco metálico e sulfato de cobre, em mistura de anidrido acético, ácido acético e THF,^{32,41}, com rendimentos da ordem de 65%, ligeiramente inferiores aos descritos na literatura (até 80%). Conforme o Esquema 14A, foram formados os blocos de construção **15** e **16** prontamente utilizáveis na síntese dos glicopeptídeos de interesse.

^{‡‡} Uma alternativa para a conversão da função azido em acetamido é a reação de Staudinger, utilizando trifenilfosfina em THF e anidrido acético.^{5,71}. Por ser conduzida sob condições brandas, a metodologia poderia ser testada inclusive para a redução do grupo azido do composto **9**, oferecendo uma nova via de obtenção de **11**.

A confirmação das estruturas foi realizada com base na alteração dos sinais dos prótons *H*-2 dos compostos **15** e **16** que tornaram-se mais desblindados em relação aos precursores (cerca de δ 3,5) devido à mudança do substituinte em *C*-2. Para o composto **15**, o sinal de *H*-2 ocorreu em δ 4,46 como um tripleto aparente, com *J*_{2,3} 11,1 Hz, não sendo observada a constante de acoplamento *J*_{1,2}, igualmente para *H*-1, em δ 4,70, cujo sinal não se desdobrou claramente, aparentando um singleto. Para o composto **16**, *H*-1 ocorreu em δ 4,73 como um dubleto com *J*_{1,2} 3,6 Hz evidenciando a configuração alfa, mas *H*-2 ficou sobreposto na região de δ 4,15. A introdução do grupo acetamido foi ainda comprovada para os dois compostos pelo sinal de grupo acetil adicional na região de δ 2,0 completando 12 hidrogênios nas integrais.



Esquema 14. Reações de acetilação redutiva e desproteção total dos blocos glicoaminoácidos.

Pequenas quantidades dos intermediários **15** e **16** foram utilizadas para desproteção total e realização dos ensaios biológicos previstos, dado que neste ponto da rota sintética os blocos já possuem a estrutura básica do antígeno Tn. Assim, de acordo com o Esquema 14B, os referidos compostos foram separadamente submetidos a hidrogenólise com balão de H₂ catalisada por paládio-carvão, para a remoção dos grupos Fmoc e Bn. Após purificação, os blocos semi-desprotegidos foram tratados com solução de metóxido de sódio para desacetilação das hidroxilas do açúcar, completada posteriormente com a neutralização pela resina de troca iônica tipo Dowex para fornecer os blocos **19** e **20**, com rendimentos de respectivamente 83% e 35%, este mais baixo devido a perdas durante a purificação.

É importante mencionar que o mercúrio utilizado como promotor na reação de glicosilação pode ser carreado através das fases orgânicas e ficar incorporado ao produto. O mercúrio tem a propriedade de inativar o catalisador da hidrogenólise, impedindo esta reação. Portanto, é recomendável fazer uma extração com solução aquosa de EDTA sódico previamente a esta etapa, ou mesmo logo após a purificação da reação de glicosilação.⁶²

Os produtos desprotegidos **19** e **20** apresentaram espectros de ¹H RMN sem sinais dos grupos de proteção Fmoc (em torno de δ 7,8-7,3 para os hidrogênios aromáticos e δ 4,2 para os alquílicos), Bn (δ 7,3 para os aromáticos e δ 5,1 para os alquílicos) e apenas um

singleto com 3 hidrogênios em δ 2,0, referente ao grupo acetamido, comprovando a desproteção de todas as demais posições. Os outros sinais apareceram sobrepostos em multipletos, com exceção de *H*-1, que ocorreu em δ 4,78 como dubleto de *J*_{1,2} 3,8 Hz para **19**, e em δ 4,95 como multipleto para **20**.

Paralelamente, a partir da disponibilidade do doador glicosídico **6** (intermediário da rota sintética principal) recuperado da cristalização, foram conduzidas algumas reações de glicosilação para a obtenção de galactosilaminoácidos, importantes para posteriores estudos da relação estrutura atividade em comparação com os análogos *N*-acetil-galactosamínicos. A glicosilação dos aminoácidos **3** e **4** pelo brometo **6** foi realizada na presença do promotor iodo,⁷⁵ reconhecido por sua eficiência em converter α -haletos em derivados glicosídicos 1,2-*trans* substituídos, ou seja, reações com seletividade β (Esquema 15).



Esquema 15. β-galactosilação de **3** e **4** promovida por iodo.

O mecanismo geral envolve a atuação do iodo como halófilo resultando na ativação do brometo anomérico com a formação do íon iodobromônio, seguido de fragmentação e liberação da espécie oxocarbênio estabilizado e IBr. No passo seguinte, ocorre ataque nucleofílico pelo grupo hidroxílico livre do aceptor glicosídico, através de SN₂ sobre o estado de transição cíclico, devido à participação do grupo vizinho, fornecendo seletivamente o anômero β (Esquema 16).



Esquema 16. Mecanismo de glicosilação promovida por iodo.

Os aminoácidos precursores foram adequados para o emprego na reação de glicosilação, em função da resistência de Fmoc à presença de iodo, o que não ocorre com

outros grupos de *N*-proteção como Boc. O β -glicosídeo **17** foi obtido em 60% de rendimento, como o principal estereoisômero, mas o rendimento do derivado **18** foi razoavelmente inferior (27%) devido à baixa solubilidade do precursor nas condições reacionais.

A configuração anomérica não pôde ser claramente observada no espectro de ¹H RMN de **17** e **18**, porque devido ao deslocamento químico de *H*-1 nesses compostos, por volta de δ 4,4, há sobreposição com os sinais metilênicos de Fmoc, sendo indistinguíveis porque foram adquiridos em espectrômetro de resolução inferior. Mesmo sem mensurar a constante de acoplamento, o conhecimento da reação e o deslocamento químico sugerem a formação do galactosídeo β .

4.4 Reações de acoplamento

Os glicoaminoácidos anteriormente sintetizados foram utilizados como blocos de construção para a obtenção dos glicodipeptídeos lineares precursores diretos de glicodicetopiperazinas como **1** e **2**, por ciclização intramolecular. Tais precursores foram preparados pelo acoplamento dos referidos blocos com aminoácidos contendo cadeias laterais desejadas, convenientemente protegidos apenas no terminal amino ou carboxílico, para direcionar regiosseletivamente a formação da ligação peptídica sem reações cruzadas.

Logo, para serem ligados aos aminoácidos comerciais contendo *N*-Fmoc e carboxila livre, os glicoaminoácidos foram inicialmente submetidos a *N*-desproteção seletiva. Ao grupo amino assim liberado foi acoplado o segundo aminoácido, apenas *N*-protegido, contendo a cadeia lateral de interesse. Os glicoaminoácidos empregados foram os derivados de α -GalNAc (**15** e **16**, com Ser e Thr, respectivamente) e de β -Gal-Thr (**18**), além do bloco de α -GlcNAc-Ser (**29**) disponível no laboratório. Os aminoácidos utilizados foram *N*-Fmoc-Phe e *N*-Fmoc-(*O-t*Bu)-Asp (Esquema 17).



Esquema 17. Reações de N-desproteção (Fmoc) e acoplamento entre (glico)aminoácidos. R₁₋₅: substituintes.

A *N*-desproteção foi conduzida na presença de piperidina, pois em condições reacionais básicas a clivagem de Fmoc é seletiva em relação ao grupo Bn, gerando o aminoácido somente *O*-protegido.^{§§} Por ser uma etapa simples e rápida, os rendimentos foram elevados, superiores a 80%, com exceção da desproteção dos compostos **15** e **18**, cujos rendimentos foram de 69% e 57%, o que pode ser atribuído, em parte, à instabilidade dos produtos *N*-desprotegidos, razão pela qual todos foram imediatamente submetidos ao acoplamento, sem tempo hábil para caracterização por ¹H RMN.

O mecanismo da reação ocorre via abstração do hidrogênio metínico acídico de Fmoc pela base orgânica piperidina, seguida de clivagem da ligação carbamato formando CO₂ e o produto altamente conjugado benzofulveno (que favorece termodinamicamente a reação), com consequente liberação do grupamento amino (Esquema 18).



Esquema 18. Mecanismo da reação de clivagem de N-Fmoc. R: cadeia lateral do aminoácido.

Na reação de acoplamento é formada a primeira ligação peptídica entre os aminoácidos, neste caso envolvendo a função amino desprotegida dos glioaminoácidos e a função carboxílica livre dos aminoácidos complementares. A reação é iniciada pela adição de DIEA, que desempenha um papel catalítico, como aceptor e doador de prótons. Esta base orgânica abstrai o próton do ácido carboxílico livre que, sob a forma ionizada, complexa-se com o reagente de acoplamento PyBOP, e após rearranjo, forma um éster de hidroxibenzotriazol (HOBt também é adicionado ao meio reacional para evitar isomerização do centro quiral do aminoácido). Este intermediário corresponde à forma ativada do grupo carboxílico, suficientemente reativa para sofrer substituição nucleofílica pelo grupo amino livre do outro aminoácido, com o qual estabelece uma ligação do tipo amida, como descrito no mecanismo do Esquema 19.

Os rendimentos obtidos para a marioria dos glicodipeptídeos **21-25** preparados foram satisfatórios na faixa de 50% a 85%. Devido a perdas durante a etapa de purificação, o composto **22** foi o único a apresentar rendimento inferior ao esperado (24%), uma vez que acoplamentos de aminoácidos mediados por PyBOP habitualmente são reações eficientes, mesmo com a presença da unidade sacarídica no caso de glicoaminoácidos.

^{§§} Adicionalmente, a labilidade do grupo Fmoc sob condições alcalinas foi uma vantagem explorada na etapa de ciclização dos dipeptídeos em dicetopiperazinas, como será discutido posteriormente.



Esquema 19. Mecanismo de acoplamento entre aminoácidos mediado por PyBOP e catalisado por DIEA.

Todos os glicodipeptídeos **21-25** são estruturas inéditas na literatura, e por serem moléculas polifunciolanizadas, sua caracterização só foi possível com o auxílio de técnicas bidimensionais de RMN, como COSY e HMQC. Foram confirmados sinais comuns para todos os compostos na faixa de δ 2,06-1,84, com integrais de 12 hidrogênios referentes aos grupos acetil, e na região de δ 7,7-7,2, com integrais de 13 hidrogênios aromáticos para os derivados de Asp **22-24** e 18 hidrogênios aromáticos nos compostos contendo Phe **21** e **25**. O sinal dos hidrogênios metilênicos do grupo Bn foi distinguido como um singleto em δ 5,10 apenas para o composto **22**, enquanto houve sobreposição de sinais para os compostos **23** e **24**. Os sinais de C*H*₂ Bn dos compostos **21** e **25**, foram desdobrados como sistema AB com respectivos valores de *J*_{A,B} 11,4 Hz e 12,2 Hz, provavelmente devido à diferença da natureza das cadeias laterais dos aminoácidos e da radiofrequência empregada no RMN.

Dubletos de hidrogênios de amida com J_{NH} de aproximadamente 7 a 8 Hz, foram observados entre δ 6,7-5,4, sendo o hidrogênio de N*H* Ser mais blindado que o N*H* Thr, e o hidrogênio de N*H* Phe mais blindado que o N*H* Asp. Em geral, os sinais metínicos e metilênicos dos aminoácidos Ser ocorreram em δ 4,7 e δ 3,8, nesta ordem, enquanto CH_{α} , CH_{β} e CH_3 dos resíduos de Thr estiveram em δ 4,5, δ 4,2 e δ 1,1, respectivamente. Semelhantemente, os hidrogênios metínicos dos resíduos Phe (δ 4,5-4,2) e de Asp (δ 4,5) ocorreram em região de maior desblidagem em relação aos metilênicos, respectivamente em δ 3,0 e δ 2,8-2,6. Em relação aos sinais das unidades glicosídicas, foi mantida a correspondência com os precursores. *H*-1 ocorreu em δ 4,75-4,60 com $J_{1,2}$ 3,4-3,6 para os compostos **21-23** (α -GalNAc), e com valores semelhantes para **24** (α -GlcNAc), confirmando que as configurações anoméricas não foram alteradas.

4.5 Reações de ciclização

Para a obtenção dos dipeptídeos cíclicos glicosilados de interesse **1** e **2**^{***}, e outras glicodicetopiperazinas análogas, foi aplicada a metodologia sintética em solução desenvolvida em trabalhos anteriores sobre a síntese de dicetopiperazinas glicosiladas com GlcNAc⁴⁸, que envolve a *N*-desproteção do dipeptídeo linear precursor, seguida de ciclização intramolecular espontânea formando o núcleo dicetopiperazínico substituído pelas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes. O Esquema 20 descreve essas reações, que foram inicialmente conduzidas com **21**, que possui α-GalNAc-Ser acoplado ao resíduo de Phe (o mesmo descrito na publicação original), e a seguir foram extendidas aos precursores **22** e **23**, constituídos pelos resíduos de α-GalNAc-Ser e α-GalNAc-Thr acoplados a Asp.



Esquema 20. Reações de N-desproteção de Fmoc e ciclização intramolecular, com proposta mecanística.

Embora sejam utilizados nesta etapa os mesmos reagentes e condições para a clivagem do grupo Fmoc descritos nas reações de acoplamento (20% piperidina/DMF), esta reação difere da primeira porque é mantida por cerca um dia, e não apenas por uma hora. No período inicial, o processo é similar, com a saída do grupo Fmoc e liberação da função amino no terminal peptídico, evidenciados por CCD pela rápida formação de benzofulveno e consumo de material de partida glicopeptídico. No segundo e mais lento passo é proposto o mecanismo de ataque do grupamento amino liberado sobre a extremidade carboxílica, deslocando álcool benzílico como grupo abandonador e implicando na ciclização intramolecular.⁴⁸

^{***} A condução da rota sintética do Esquema 3B levando ao produto de interesse **2** foi inviabilizada pela limitação de quantidade do glicoaminoácido correspondente β-GalNAc-Ser.

Considerando a importância da nucleofilicidade do nitrogênio terminal para a eficiência da ciclização, grupos de proteção comuns como Boc e Alloc não são aplicáveis, pois requerem clivagem em meio ácido e posterior tratamento com bases orgânicas para induzir a ciclização. Diferentemente, o grupo Fmoc é vantajoso por sua labilidade sob condições básicas, o que permite realizar a desproteção do dipeptídeo e a ciclização em uma etapa única.⁴⁸ Já o grupo protetor carboxílico Bn, analogamente à resina de síntese de peptídeos em fase sólida, permanece fixo em *C*-terminal, apresentando estabilidade ao longo das etapas sintéticas da rota, mas atuando de forma importante como grupo abandonador na etapa final de ciclização para formação do anel dicetopiperazínico.

As glicodicetopiperazinas inéditas na literatura **26**, **27** e **28** foram obtidas em rendimentos moderados de 12%, 32% e 40%, satisfatórios no caso dos dois últimos compostos, considerando que a esta reação inclui em apenas uma etapa experimental dois passos reacionais, ou seja, desproteção e ciclização. O rendimento relativamente baixo dos produtos também se deve à possibilidade de formação dos dipeptídeos $N \, e \, O$ -desprotegidos, sem que ocorra a ciclização, mas os 12% observados para **26** são atribuídos a dificuldade encontrada no isolamento cromatográfico do composto, remanescendo quantidade em outras frações com misturas.

A clivagem do grupo protetor da função amino foi evidenciada pela ausência de sinais aromáticos e alquílicos de Fmoc, mas o indicativo mais forte da ocorrência de ciclização foi a ausência do sinal característico dos hidrogênios metilênicos do grupo benzílico protetor da função carboxílica, como singleto ou AB próximo a δ 5,1. Houve uma tendência de blindagem dos hidrogênios metínicos C*H* Ser e C*H*_a Thr, respectivamente em δ 4,37, δ 4,19 e δ 4,15, em relação aos precursores **26**, **27** e **28** (δ 4,68, δ 4,71 e δ 4,50), ao passo que os hidrogênios N*H* da cadeia peptídica se tornaram ligeiramente mais desblindados. Enquanto *H*-1 foi deslocado para δ 4,32 em **26** (δ 4,62 no precursor), o *H*-1 de **28** foi desblindado para δ 4,96 (δ 4,72 no precursor). As atribuições completas foram baseadas em experimentos de COSY e HMQC, e confirmaram a obtenção das glicodicetopiperazinas.

A rota sintética proposta foi efetiva para obtenção de dipeptídeos cíclicos glicosilados com α-GalNAc. Alguns dos produtos ciclizados já foram submetidos a desproteção por desacetilação e tratamento com TFA, deverão ser purificados por cromatografia a líquido de alta eficiência para posterior caracterização estrutural e avaliação de atividades biológicas.

4.5 Avaliação biológica

Nos ensaios de atividade biológica foram avaliados os compostos sintetizados **19** e **20** e alguns outros blocos de glicoaminoácidos de interesse biológico preparados pelo grupo de pesquisa em trabalhos paralelos, com as seguintes estruturas:



Inibição enzimática em TcTS

Dentre os métodos disponíveis para a determinação da atividade enzimática de TcTS, o método fluorimétrico é um dos mais sensíveis porque mede diretamente a liberação do fluoróforo metil umbeliferona (Mu) a partir da clivagem da ligação glicosídica do doador MuNANA pela ação hidrolase⁷⁶ da enzima TcTS, sendo adequado como método de *screening* para compostos que não atuam como aceptores da reação de trans-sialilação.



Esquema 21. Reação de TcTS na presença do doador MuNANA.
O Gráfico 1 ilustra com as reações dos compostos **19** e **20** o perfil observado durante os ensaios fluorimétricos com TcTS. A curva de maior inclinação é a correspondente ao controle negativo, pois na ausência de inibidores a velocidade da reação é máxima. Em diferentes graus, os compostos inibidores DANA e piridoxal fosfato reduziram a inclinação da curva, indicando proporcional inibição enzimática. Na concentração de 1 mM empregada, os compostos de α-GalNAc **19** e **20** apresentaram efeito de inibição comparável ou até maior que os controles positivos, caracterizando-os como inibidores da enzima TcTS.



Gráfico 1. Perfil fluorimétrico da reação de TcTs na presença de MuNANA em função do tempo, para os compostos DANA, piridoxal fosfato, 19 e 20.

Nestes experimentos, os valores obtidos para os inibidores controle foram equivalentes aos valores descritos na literatura para DANA (33%) e piridoxal fosfato (65%),⁷⁷ validando os resultados dos compostos em análise. O Gráfico 2 resume todos os resultados de controles e compostos em análise.

Dentre os compostos avaliados, α -GalNAc-Thr **20** foi o mais ativo (79%), seguido de α -GalNAc-Ser **19** (57%) que apresentou inibição semelhante ao controle piridoxal fosfato (62%). Os blocos de α -GlcNAc-Ser (41%) e β -GlcNAc-Ser (31%) demonstraram inibição moderada, porém ainda próxima do controle DANA (37%). Já os blocos β -Gal-Ser (10%) e α -GlcNAc-Thr (1%) apresentaram baixa inibição.

Entre os compostos com α -GalNAc, o bloco de treonina foi um pouco mais ativo que o de serina, mas entre os compostos de α -GlcNAc, o bloco de treonina apresentou efeito dramaticamente menor que o de serina. Entre os blocos β glicosídicos, o derivado contendo GlcNAc foi mais ativo que o composto com Gal.



Gráfico 2. Porcentagens de inibição de TcTS para os glicoaminoácidos avaliados, pelo método fluorimétrico contínuo.

Com os dados disponíveis, não foi possível estabelecer um tendência clara para prever ou estimar a atividade inibitória em TcTS dos glicoaminoácidos em função de sua estrutura. Possivelmente a combinação de algumas características do substrato natural α-LacNAc nas estruturas de **19** e **20**, como *O*-4 em posição axial no terminal não redutor e ligação glicosídica 1,2-cis contendo o substituinte 2-acetamido, seja favorável à atividade de inibição.

A intensa inibição evidenciada para os compostos **19** e **20** em TcTS foi ainda superior a compostos de bibliotecas descritas na literatura em ensaios de *screening* com TcTS.^{77,78} Devido aos resultados promisores dos compostos **19** e **20** como inibidores de TcTS, estes blocos deverão ser submetidos a ensaios *in vitro* de atividade tripanocida e de prevenção de invasão celular por *T cruzi*.

Citotoxicidade em linhagens de células tumorais

Foram selecionadas as linhagens tumorais Jurkat e B16F10 devido à conhecida expressão do antígeno Tn na primeira⁷⁹ e a ausência desse antígeno na segunda, a fim de avaliar se os compostos sintetizados como análogos desse antígeno apresentam influência distinta nos dois tipos celulares.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular estão apresentados no Gráfico 3 e no Gráfico 4, respectivamente para células Jurkat e B16F10, expressos em termos de porcentagem de citotoxicidade.



Gráfico 3. Porcentagens de citotoxicidade sobre células Jurkat para os glicoaminoácidos avaliados.

As células Jurkat demonstraram considerável sensibilidade aos compostos nas concentrações testadas, com citotoxicidades superiores a 30%. Conforme suposto, os glicoaminoácidos contendo as unidades de α -GalNAc **19** e **20** apresentaram elevada citotoxicidade sobre as células Jurkat na concentração de 500 µM, com respectivos valores de 79% e 73%, mesma faixa do composto β -Gal-Ser (76%). O composto α -GlcNAc-Ser (92%) foi o mais ativo do grupo e seus análogos α -GlcNAc-Thr (58%) e β -GlcNAc-Ser (37%) apresentaram citoxocicidade relativamente menor, mas ainda significativa.



Gráfico 4. Porcentagens de citotoxicidade sobre células B16F10 para os glicoaminoácidos avaliados.

Inversamente, a linhagem B16F10 apresentou resistência aos compostos testados, com todas as porcentagens de citotoxicidade abaixo de 40%, nas mesmas concentrações utilizadas para Jurkat. Não houve grandes variações entre os resultados dos diferentes compostos, e o efeito da diminuição da concentração foi mais pronunciado em B16F10 do que em Jurkat.

Como estes ensaios foram uma triagem preliminar, repetições e estudos mais detalhados serão necessários para confirmar os efeitos observados, além de experimentos com células normais relacionadas às linhagens tumorais testadas, para fins de comparação. Contudo, considerando a grande diferença do perfil de citotoxicidade dos compostos para as linhagens Jurkat e B16F10, é possível sugerir que o mecanismo de ação associado seja específico, podendo ou não estar relacionado à presença do antígeno Tn.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

As rotas sintéticas propostas forneceram com sucesso os blocos de construção intermediários e o precursor direto (somente protegido) da glicodicetopiperazina 1, embora a síntese do composto 2 não tenha sido completada por limitação da quantidade do gllicoaminoácido intermediário.

Reações de glicosilação promovidas por HgBr₂ foram testadas e comprovaram a eficiência deste catalisador para a combinação de doadores e aceptores empregada, diversificando as aplicações deste promotor. Os rendimentos obtidos foram comparáveis aos métodos de glicosilação clássicos, apresentando ainda algumas vantagens.

As reações de acoplamento de glicoaminoácidos e subsequente ciclização foram efetivas pelos protocolos propostos, gerando cinco glicodipeptídeos e três glicodicetopiperazinas (incluindo 1), todos inéditos na literatura.

Ensaios de cinética enzimática em TcTS com os intermediários **19** e **20** (derivados de α-GalNAc) indicaram elevada inibição, maior até que os inibidores conhecidos da enzima utilizados como controle. Esses resultados promissores direcionam para a continuidade do estudo desses compostos intermediários, e dos produtos finais quando obtidos, em ensaios tripanocidas.

Ensaios e citotoxicidade sobre células tumorais evidenciaram forte atividade dos compostos **19** e **20** sobre a linhagem Jurkat, que expressa o antígeno Tn, enquanto a atividade citotóxica dos compostos sobre a linhagem B16F10, que não expressa o antígeno, foi baixa. Os mecanismos responsáveis por essas diferentes respostas ficam por ser elucidados.

REFERÊNCIAS

- DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. Chemistry - A European Journal, v. 12, n. 3, p. 656-665, 2006.
- HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. Current Opinion in Biotechnology, v. 15, n. 6, p. 615-622, 2004.
- 3. BROCKE, C.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 3085-3112, 2002.
- 4. SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1046-1051, 2007.
- 5. BONGAT, A. F. G.; DEMCHENKO, A. V. Recent trends in the synthesis of O-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 3-4, p. 374-406, 2007.
- WERZ, D. B.; RANZINGER, R.; HERGET, S.; ADIBEKIAN, A.; VON DER LIETH, C.; SEEBERGER, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis. ACS Chemical Biology, v. 2, n. 10, p. 685-691, 2007.
- 7. OSINAGA, E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 269-273, 2007.
- 8. CHEN, J.; WARREN, J. D.; WU, B.; CHEN, G.; WAN, Q.; DANISHEFSKY, S. J. A route to cyclic peptides and glycopeptides by native chemical ligation using in situ derived thioesters. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 12, p. 1969-1972, 2006.
- ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer, 1765(2), p. 189-222, 2006.
- GEIGER, J.; REDDY, B. G.; WINTERFELD, G. A.; WEBER, R.; PRZYBYLSKI, M.; SCHMIDT, R. R. Glycal Glycosylation and 2-Nitroglycal Concatenation, a Powerful Combination for Mucin Core Structure Synthesis. Journal of Organic Chemistry, v. 72, n. 12, p. 4367-4377, 2007.
- WINTERFELD, G. A.; KHODAIR, A. I.; SCHMIDT, R. R. O-glycosyl amino acids by 2nitrogalactal concatenation - synthesis of a mucin-type O-glycan. European Journal of Organic Chemistry, v. 6, p. 1009-1021, 2003.
- BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. Nature Reviews, Microbiology, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2006.
- ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein superfamily of Trypanosoma cruzi: Structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143-150, 2001.

- 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. Organic & Biomolecular Chemistry, v. 5, n. 16, p. 2645-2657, 2007.
- OLIVEIRA, E. C.; LEITE, M. S. B.; MIRANDA, J. A. R.; ANDRADE, A. L. S. S.; GARCIA, S. B.; LUQUETTI, A. O.; MOREIRA, H. Chronic Trypanosoma cruzi infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. Carcinogenesis, v. 22, n. 5, p. 737-740, 2001.
- 16. Organização Mundial de Saúde. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 2005. Buenos Aires. *OMS*, **2007**.
- Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=322&sid=32>. Acesso em: 28 fev. 2008. IOC, 2008.
- ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti-αgalactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease, recognize novel Olinked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of Trypanosoma cruzi. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 3, p. 793-802, 1994.
- AGUSTI, R.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; DE LEDERKREMER, R. M. Selective sialylation of 2,3-di-O-(β-D-galactopyranosyl)-D-galactose catalyzed by Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 2, p. 541-551, 2005.
- MENDONCA-PREVIATO, L.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; AGRELLOS, O. A.; DIAS, W. B.; PREVIATO, J. O. Chemical structure of major glycoconjugates from parasites. Current Organic Chemistry, v. 12, n. 11, p. 926-939, 2008.
- NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: transsialidase as a case study for Chagas disease. Drug Discovery Today, v. 13, n. 3-4, p. 110-117, 2008.
- 22. SINGH, S.; SCIGELOVA, M.; HALLBERG, M. L.; HOWARTH, O. W.; CROUT, D. H. G.; SCHENKMAN, S. Synthesis of sialyloligosaccharides using the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi: novel branched and di-sialylated products from digalactoside acceptors. Chemical Communications, v. 12, p. 1013-1014, 2000.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; DE ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A. J.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects Trypanosoma cruzi trypomastigotes from killing by human anti-α-galactosyl antibodies. Journal of Cell Science, v. 113, n. 7, p. 1299-1307, 2000.
- 24. BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701-711, 2002..
- 25. TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. International Journal for Parasitology, v. 31, n. 5-6, p. 550-554, 2001.

- 26. BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M. F.; CREMONA, M. L.; FRASCH, A. C.; ALZARI, P. M. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 757-768, 2002.
- FREIRE, T.; ROBELLO, C.; SOULE, S.; FERREIRA, F.; OSINAGA, E. Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by Trypanosoma cruzi. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 312, n. 4, p. 1309-1316, 2003.
- MEL'NIKOV, V. G.; FIERRO, V. F. H.; DOBROVINSKAYA, O. R. Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american trypanosomiasis at different stages of experimental infection. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, v. 137, n. 5, p. 475-478, 2004.
- 29. ROBINSON, J. A. Horizons in chemical immunology approaches to synthetic vaccine design. **Chimia**, v. 61, n. 3, p. 84-92, 2007.
- 30. SLOVIN, S. F.; KEDING, S. J.; RAGUPATHI, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 418-428, 2005.
- KEDING, S. J.; ENDO, A.; DANISHEFSKY, S. J. Synthesis of non-natural glycosylamino acids containing tumor-associated carbohydrate antigens. **Tetrahedron**, v. 59, n. 35, p. 7023-7031, 2003.
- 32. MEINJOHANNS, E.; MELDAL, M.; JENSEN, T.; WERDELIN, O.; GALLI-STAMPINO, L.; MOURITSEN, S.; BOCK, K. Versatile solid-phase thiolytic reduction of azido and N-Dts groups in the synthesis of hemoglobin (67-76) O-glycopeptides and photoaffinity labeled analogs to study glycan T-cell specificity. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, n. 6, p. 871-884, 1997.
- VICHIER-GUERRE, S.; LO-MAN, R.; HUTEAU, V.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.; BAY, S. Synthesis and immunological evaluation of an antitumor neoglycopeptide vaccine bearing a novel homoserine Tn antigen. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 14, n. 13, p. 3567-3570, 2004.
- 34. LO-MAN, R.; VICHIER-GUERRE, S.; PERRAUT, R.; DERIAUD, E.; HUTEAU, V.; BENMOHAMED, L.; DIOP, O. M.; LIVINGSTON, P. O.; BAY, S.; LECLERC, C. A Fully Synthetic Therapeutic Vaccine Candidate Targeting Carcinoma-Associated Tn Carbohydrate Antigen Induces Tumor-Specific Antibodies in Nonhuman Primates. Cancer Research, v. 64, n. 14, p. 4987-4994, 2004.
- 35. KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; CHEN, X.; GLUNZ, P. W.; SAMES, D.; RAGUPATHI, G.; LIVINGSTON, P. O.; DANISHEFSKY, S. J. Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. Journal of the American Chemical Society, v. 120, n. 48, p. 12474-12485, 1998.
- SLOVIN, S. F.; RAGUPATHI, G.; MUSSELLI, C.; OLKIEWICZ, K.; VERBEL, D.; KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; SAMES, D.; DANISHEFSKY, S.; LIVINGSTON, P. O.; SCHER, H. I. Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with α-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. Journal of Clinical Oncology, v. 21, n. 23, p. 4292-4298, 2003.
- 37. WAN, Q.; CHEN, J.; CHEN, G.; DANISHEFSKY, S. J. A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 21, p. 8244-8249, 2006.

- CUNTO-AMESTY, G.; MONZAVI-KARBASSI, B.; LUO, P.; JOUSHEGHANY, F.; KIEBER-EMMONS, T. Strategies in cancer vaccines development. International Journal for Parasitology, v. 33, n. 5-6, p. 597-613, 2003.
- 39. DAVIS, B. G. Synthesis of Glycoproteins. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 579-601, 2002.
- LIU, M.; YOUNG, V. G.; LOHANI, S.; LIVE, D.; BARANY, G. Syntheses of TN building blocks N^α-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-α-Lgalactopyranosyl)-L-serine/L-threonine pentafluorophenyl esters: comparison of protocols and elucidation of side reactions. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1273-1285, 2005.
- 41. ARSEQUELL, G.; VALENCIA, G. O-Glycosyl α-amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 17, p. 2839-2876, 1997.
- 42. CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Synthesis of glycosyl-amino acids of biological interest. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1027-1033, 2008.
- 43. LEMIEUX, R. U.; RATCLIFFE, R. M. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 1244-1251, 1979.
- 44. ELOFSSON, M.; KIHLBERG, J. Synthesis of Tn and sialyl Tn building blocks for solid phase glycopeptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 41, p. 7499-502, 1995.
- SVAROVSKY, S. A.; BARCHI, J. J. Highly efficient preparation of tumor antigencontaining glycopeptide building blocks from novel pentenyl glycosides. Carbohydrate Research, v. 338, n. 19, p. 1925-1935, 2003.
- 46. DZIADEK, S.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens for the development of tumor-selective vaccines. **Chemical Record**, v. 3, n. 6, p. 308-321, 2004.
- 47. MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n. 40, p. 9923-9932, 2007.
- CAMPO, V. L.; MARTINS, M. B.; DA SILVA, C. H. T. P.; CARVALHO, I. Novel and facile solution-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines and *O*-glycosylated analogs. **Tetrahedron**, v. 65, n. 27, p. 5343-5349, 2009.
- 49. NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.
- 50. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. **Purification of laboratory chemicals**. 2nd ed. New York: Pergamon Press, 1980.
- 51. NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of trans-sialidase from Trypanosoma cruzi. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 302-304, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

- 53. JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies on the anomeric effect. **Tetrahedron**, v. 48, n. 24, p. 5019-5087, 1992.
- 54. MYDOCK, L. K.; DEMCHENKO, A. V. Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 497-510, 2010.
- 55. MITCHELL, S. A.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-Phase Synthesis of O-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 2327-2342, 2001.
- 56. WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, p. 211-215, 1963.
- 57. KARTHA, K. P.; 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.
- KARKKAINEN, T. S.; RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; MACMILLAN, D.; FIELD, R. A. lodine-mediated glycosylation en route to mucin-related glyco-aminoacids and glycopeptides. Carbohydrate Research, v. 343, n. 10-11, p. 1830-1834, 2008.
- 59. TRAHANOVSKY, W. S.; ROBBINS, M. D. Oxidation of organic compounds with cerium(IV). XIV. Formation of a α-azido-β-nitratoalkanes from olefins, sodium azide, and ceric ammonium nitrate. Journal of the American Chemical Society, v. 93, n. 20, p. 5256-5258, 1971.
- 60. BANOUB, J.; BOULLANGER, P.; LAFONT, D. Synthesis of oligosaccharides of 2-amino-2-deoxy sugars. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1167-1195, 1992.
- STOKMAIER, D.; KHOREV, O.; CUTTING, B.; BORN, R.; RICKLIN, D.;. ERNST, T. O. G.; BÖNI, F.; SCHWINGRUBER, K.; GENTNER, M.; WITTWER, M.; SPREAFICO, M.; VEDANI, A.; RABBANI, S.; SCHWARDT, O.; ERNST, B. Design, synthesis and evaluation of monovalent ligands for the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R).
 Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 17, n. 20, p. 7254-7264, 2009.
- 62. CARVALHO, I.; SCHEUERL, S. L.; RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; FIELD, R. A. Practical synthesis of the 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucosides of Fmoc-serine and Fmoc-threonine and their benzyl esters. Carbohydrate Research, v. 338, n. 10, p. 1039-1043, 2003.
- TRAAR, P.; BELAJ, F.; FRANCESCONI, K. A. Synthesis of methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno-β-D-gluco- and galacto-pyranoside: selenium metabolites in human urine. Australian Journal of Chemistry, v. 57, n. 11, p. 1051-1053, 2004.
- 64. ELLERVIK, U.; MAGNUSSON, G. Glycosylation with *N*-Troc-protected glycosyl donors. **Carbohydrate Research**, v. 280, n. 2, p. 251-260, 1996.
- 65. CHANG, C. W.; CHANG, S. S.; CHAO, C. S.; MONG, K. K. T. A mild and general method for preparation of α-glycosyl chlorides. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 31, p. 4536-4540, 2009.
- ELOFSSON, M.; WALSEB, B.; KIHLBERG, J. Building blocks for glycopeptide synthesis: glycosylation of 3-mercaptopropionic acid and Fmoc amino acids with unprotected carboxyl groups. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 51, p. 7613-7616, 1991.

- 67. WINANS, K. A.; KING, D. S.; RAO, V. R.; BERTOZZI, C.R. A chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptides, diptericin, disrupts bacterial membrane integrity. **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11700-11710, 1999.
- 68. LIEBE, B.; KUNZ, H. Solid-phase synthesis of a sialyl-Tn-glycoundecapeptide of the MUC1 repeating unit. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, n. 5, p. 1473-1482, 1997.
- KHATUNTSEVA, E. A.; TSVETKOV, Y. E.; GRACHEV, A. A.; NIFANT'EV, N. E. Synthesis of Aminoethyl Glycosides of Type 2 Chain A Tetrasaccharide and Related Trisaccharides. Russian Journal of Organic Chemistry, v. 41, n. 12, p. 1814-1823, 2005.
- 70. SEIBEL, J.; HILLRINGHAUS, L.; MORARU, R. Microwave-assisted glycosylation for the synthesis of glycopeptides. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 3, p. 507-511, 2005.
- 71. SZABO, L.; RAMZA, J.; LANGDON, C.; POLT, R. Stereoselective synthesis of Oserinyl/threoninyl-2-acetamido-2-deoxy-α- or β-glycosides. Carbohydrate Research, v. 274, p. 11-28, 1995.
- 72. LEE, B. R.; JEON, J. M.; JUNG, J. H.; JEON, H. B.; KIM, K. S. Synthesis of the tetrasaccharide repeat unit of the O-antigen polysaccharide from Escherichia coli O77 employing the 2'-carboxybenzyl glycoside. Canadian Journal of Chemistry, v. 84, n. 4, p. 506-515, 2006.
- POZSGAY, V. A Convergent Synthesis of a Hexadecasaccharide Fragment of the O-Polysaccharide of Shigella dysenteriae Type 1. Journal of the American Chemical Society, v. 117, n. 25, p. 6673-81, 1995.
- 74. NICHOLAS, G. M.; ECKMAN, L. L.; KOVAC, P.; OTERO-QUINTERO, S.; BEWLEY, C. A. Synthesis of 1-D- and 1-L-myo-inosityl 2-N-acetamido-2-deoxy-□ -D-glucopyranoside establishes substrate specificity of the Mycobacterium tuberculosis enzyme AcGI deacetylase. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 11, n. 12, p. 2641-2647, 2003.
- 75. RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; ALOUI, M.; FIELD, R. A. Iodine: a versatile reagent in carbohydrate chemistry. III. Efficient activation of glycosyl halides in combination with DDQ. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 48, p. 8807-8810, 1996.
- 76. HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S.; 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, n. 2, p. 141-144, 2001.
- 77. CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R. SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S. DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2412-2427.
- 78. NERES, J.; BONNET, P.; EDWARDS, P. N.; KOTIAN, P. L; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; BRYCE, R. A. DOUGLAS, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 2106-2119, 2007.
- 79. YAMADA, K.; WATANABE, S.; KITA, S.; KINOSHITA, M.; HAYAKAWA, T.; KAKEHI, K. Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 396, p. 161-163, 2010.

ANEXOS



Anexo 1. RMN ¹H (CDCl₃ 400 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-serina 3



Anexo 2. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-treonina 4





Anexo 4. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila 6

Anexo 5. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) 3,4,6-tri-O-acetil-D-galactal 7







Anexo 7. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Cloreto de 2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopranosila 9



Anexo 8. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 2-acetamido-2-desoxi-1,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopranosila 10



Anexo 9. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina 12



Anexo 10. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-serina 13



Anexo 11. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-azido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina 14



Anexo 12. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina 15



Anexo 13. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina 16



Anexo 14. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-serina benzílico 17

Anexo 15. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-L-treonina 18



Anexo 16. RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) 2-acetamido-2-desoxi- α -D-galactopiranosil-L-serina 19







Anexo 18. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-L-fenilalanil-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serina **21**



Anexo 19. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil))-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetilα-D-galactopiranosil)-L-serina **22**



Anexo 20. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina 23



Anexo 21. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-(*O*-*t*Bu)-L-aspartil-*O*-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-glicopiranosil)-L-serina 24



Anexo 22. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-D-fenilalanil-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treonina 25



Anexo 23. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) Ciclo(L-fenilalanil-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serinil) 26


8.0

Anexo 23. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Ciclo((O-tBu)-L-aspartil-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-serinil) 27



Anexo 23. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) Ciclo((O-tBu)-L-aspartil-O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-galactopiranosil)-L-treoninil) 28