UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Peterson de Andrade

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 08/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

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.

Peterson de Andrade.

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

183p. : il.; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. Doença de Chagas 2.*Trypanosoma cruzi* 3.*trans*-Sialidase 4. Síntese de carboidratos 5. Modelagem molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Peterson de Andrade
Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade
Orientadora: Prof. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Arlindo (*in memorian*) e Leonor por terem me dado muito mais do que oportunidade e estudo;

à minha querida esposa Lívia e filha Lavínia por serem uma bênção de Deus na minha vida;

às minhas irmãs Érika e Éllen pelo convívio e incentivo

e àqueles que realmente são meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar àquele que me deu a vida, que tem sido meu refúgio nos momentos difíceis e que tem guiado meus passos dia após dia, Jesus Cristo.

Agradeço à minha família que me ensinou a lutar e a perseverar pelos meus sonhos.

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

Agradeço ao professor doutor Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva a orientação durante desenvolvimento do trabalho de modelagem molecular.

Agradeço aos técnicos Luís Otávio Zamoner, Marcelo Rodrigues de Carvalho, Vinícius Palaretti, José Carlos Tomaz e à técnica Cláudia Castania todo apoio e disposição em ajudar ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica Lílian, Adriane, Vanessa, Valquíria, Milena, Carol, Mônica, Helen, Michele, Maristela, Samanta, Denise, Susimaire, Warley, Daniel, Pedro, Vinícius, Getúlio, Oswaldo, Flávio, Ricardo, Evandro, Jonathan, Armando e Thiago os momentos de alegria e de frustração que compartilhamos ao longo dos últimos anos, bem como a convivência extremamente agradável e muito divertida dentro e fora do laboratório.

Agradeço a CAPES e a FAPESP o financiamento, sem o qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

Se te mostrares fraco no dia da angústia, a tua força será pequena.

Provérbios 24: 10

Dá força ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor.

Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os moços certamente cairão;

Mas os que esperam no SENHOR renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.

Isaías 40: 29-31

RESUMO

DE ANDRADE, P. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 183 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das doenças tropicais mais devastadoras e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasita expressa uma enzima de superfície, *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase (TcTS), responsável pela transferência de ácidos siálicos de células do hospedeiro para moléculas de β-galactose terminais presentes em glicoproteínas de sua superfície. As moléculas de glicoproteína sialiladas estão envolvidas na adesão e subsequente penetração do parasita em células hospedeiras. Logo, TcTS desempenha papel fundamental no reconhecimento e na invasão de células do hospedeiro. Além disso, a ausência de *trans*-sialidase em seres humanos faz de TcTS um alvo potencial a ser explorado, no entanto nenhum inibidor desta enzima (em concentração nanomolar) é conhecido até o momento. Considerando a importância da unidade de galactose e da função carboxila do ácido siálico para interações no sítio activo de TcTS, focamos na síntese de derivados de galactose com ácido succínico em diferentes posições do anel de açúcar e sua avaliação biológica em TcTS. Além disso, foi proposta uma busca por novos inibidores de TcTS através de técnicas de modelagem molecular, como triagem virtual baseada no sítio ativo da enzima. β-D-galactose e β-D-galactopiranosídeo de metila, disponíveis comercialmente, foram tratados com reagentes adequados para fornecer alguns intermediários com apenas uma hidroxila livre em poucas etapas. O tratamento destes compostos com anidrido succínico em piridina levou à formação dos respectivos derivados com ácido succínico em todas as posições do anel galactosídico. Após etapa de desproteção foi obtido apenas o derivado com ácido succínico na posição 4 (**85**), que foi testado em TcTS por ensaio fluorimétrico *in vitro* para avaliação de sua atividade inibitória. Adicionalmente, **85** foi testado em ensaios *in vitro* para avaliação de sua atividade tripanocida e citotóxica. De acordo com os ensaios biológicos, o composto **85** apresentou atividade inibitória promissora (56%) na concentração de 1,0 mM. Esse resultado preliminar foi importante para mostrar que esse tipo de derivado pode atuar como inibidor de TcTS e para orientar a síntese de novos derivados de galactose. O valor da atividade tripanocida foi inferior a 40% (0,5 mM) e não foi observada citotoxicidade na concentração de 0,5 mM. Os estudos de triagem virtual realizados neste trabalho através de simulações de “docking” resultaram na seleção das 50 melhores moléculas, baseada na orientação de maior pontuação, dentre 50.000 encontradas na base de dados diverset. O próximo passo envolve novos estudos para filtrar as moléculas mais promissoras para serem testadas em TcTS.

Palavras-chave: 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. *trans*-Sialidase 3. Síntese de carboidratos 5. Modelagem molecular

ABSTRACT

DE ANDRADE, P. **Design, synthesis and biological activity evaluation of potential inhibitors of the *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase enzyme**. 2012. 183 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chagas' disease, also known as American trypanosomiasis, is one of the most devastating tropical diseases and it is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The parasite expresses a cell surface enzyme, *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase (TcTS), responsible for the transference of sialic acids from host cells to terminal β-galactose molecules present on its glycoprotein surface. The sialylated glycoprotein molecules are involved in the attachment and subsequent penetration of the parasite into host cells. As a result, TcTS plays a key role in the recognition and invasion of host cells. Moreover, the lack of *trans*-sialidase in humans makes TcTS a potential drug target to be explored, however no strong inhibitors (at nanomolar range) of this enzyme are known to date. Considering the importance of galactose unit and the carboxyl function in sialic acid for interactions in the active site of TcTS, we have focused on the synthesis of galactose derivatives containing succinic acid in different positions of the sugar ring and on their biological evaluation against TcTS. In addition, we have proposed the search for new TcTS inhibitors applying molecular modeling techniques, like virtual screening based on the enzyme´s active site. Commercially available α,β-D-galactose and methyl-β-D-galactopyranoside were treated with suitable reagents to afford some intermediates with just one free hydroxyl group in few steps. Treatment of these compounds with succinic anhydride in pyridine afforded derivatives thereof with succinic acid in all galactosidic ring positions. After deprotection step it was only obtained the derivative containing succinic acid at position 4 (**85**), which was tested in *in vitro* TcTS fluorimetric assay for evaluation of its inhibitory activity. In Addition, **85** was tested in *in vitro* assays for assessment of their trypanocidal activity and cytotoxic. According to the biological assays, compound **85** showed promising inhibitory activity (56%) at 1.0 mM concentration. This preliminary result was important both to show that this type of derivative can act as an inhibitor of TcTS and to guide the synthesis of new derivatives of galactose. The trypanocidal activity value was lower than 40% (0.5 mM) and there was no cytotoxicity at 0.5 mM concentration. The virtual screening studies performed in this work through docking simulations resulted in the selection of the 50 top-ranked molecules, based in the highest score orientation, among 50.000 found at diverset data base. The next step involves new studies to filter the most promising molecules to be tested against TcTS.

Keywords: 1. Chagas' disease 2. *Trypanosoma cruzi* 3. *trans*-Sialidase 4. Carbohydrate synthesis 5. Molecular modeling

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1 Ciclo de vida do *T. cruzi*, mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (formas amastigota e tripomastigota) e inseto vetor (formas epimastigota e tripomastigota metacíclica) 03

Figura 2 Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol 04

Figura 3 Violeta de genciana: agente quimioprofilático..... 05

Figura 4 Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido ácido *N*-acetilneuramínico 09

Figura 5 Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$ 10

Figura 6 Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi* 10

Esquema 1 Reação de transferência e hidrólise de ácido siálico pela *trans*-sialidase 11

Figura 7 Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS - DANA..... 12

Figura 8 Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB..... 13

Esquema 2 Mecanismo da reação de transglicosilação catalisada por TcTS..... 15

Figura 9 Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico..... 17

Figura 10 Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico não-baseados em carboidratos 18

Figura 11 Derivados miméticos de substratos aceptores de acido siálico 19

Figura 12 Estruturas de derivados miméticos de substratos duplos de TcTS..... 20

Figura 13 Estruturas de derivados benzotiazol miméticos de substratos duplos 21

Figura 14 Estruturas de derivados de sulfonamida e quinolinona como inibidores de TcTS 21

Figura 15 Estruturas de derivados galactosil-triazólicos como inibidores de TcTS .. 22

Figura 16 Estruturas dos derivados mais ativos nos ensaios de inibição com TcTS 22

Figura 17 Estruturas de derivados conjugados com oseltamivir e seus valores de IC_{50}..... 23

Figura 18 Estrutura do derivado sialilmimético capaz de inibir TcTS irreversivelmente..... 23

Figura 19 Estrutura de derivados sialilmiméticos e suas constantes de afinidade por TcTS 24

Figura 20 Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos testados em TcTS 24

Figura 21 Estruturas de derivados de flavonoide e antraquinona como inibidores de TcTS 25
Figura 22 Estrutura química de algumas piranoses e reatividade de suas hidroxilas 27
Esquema 3 Representação dos dipolos alinhados e opostos influenciando as posições α e β 27
Esquema 4 Influência dos elétrons do oxigênio no orbital antiligante da ligação axial 28
Figura 23 Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) com cetais e acetais ... 28
Figura 24 Efeito da ligação de hidrogênio interna em dióis de piranosídeos 29
Figura 25 Formação de estanilenos cíclicos em alguns piranosídeos 29
Figura 26 Estrutura dos compostos inicialmente propostos como inibidores miméticos de substratos duplos de TcTS 33
Figura 27 Simulação de "docking" de um derivado de lactose, sintetizado pelo grupo, com o sítio aceptor de TcTS 35
Figura 28 Simulação de "docking" de um derivado de galactose no sítio aceptor de TcTS 35
Figura 29 Comparação das distâncias intramoleculares entre serina e ácido succínico 36
Esquema 5 Proposta inicial para síntese dos compostos **46** e **47** 37
Esquema 6 Etapas da nova estratégia de síntese dos intermediários com hidroxila livre nas posições C-2 (**49**), C-3 (**55**), C-4 (**58**) e C-6 (**59**) 38
Esquema 7 Etapas da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-1 (**62**) 39
Esquema 8 Etapa da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-2 (**49**) 41
Figura 30 Produto majoritário obtido na tentativa de síntese do intermediário com hidroxila livre em C-2 42
Esquema 9 Proteção regiosseletiva da posição 6 do composto **63** fornecendo **64** 43
Esquema 10 Nova rota para síntese de outro intermediário com hidroxila livre em C-2 43
Esquema 11 Etapas da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-3 (**55**) 44
Esquema 12 Rota alternativa para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-3 (**70**) 45
Esquema 13 Síntese por etapas do composto **68** para estudo de formação de **70** 46
Esquema 14 Representação geral do rearranjo do ortoéster em ácido e desproteção da posição 3 do composto **69** 47

Esquema 15 Rota de síntese de intermediários com hidroxila livre em C-4 (**58**) ou C-6 (**59**) 48
Esquema 16 Clivagem regiosseletiva do anel benzilideno para obtenção dos intermediários **58** e **59** 49
Esquema 17 Mecanismo possível para clivagem regiosseletiva do anel benzilideno ... 51
Esquema 18 Clivagem total do anel benzilideno e formação do composto **71** 51
Esquema 19 Nova tentativa de clivagem regiosseletiva para síntese do intermediário **58** 52
Esquema 20 Síntese do intermediário com hidroxila livre em C-4 (**58**) 53
Esquema 21 Etapa alternativa para síntese do intermediário com hidroxila livre em C-4 (**72**) a partir do composto **71** 53
Esquema 22 Clivagem total do anel benzilideno e formação do composto **71** 54
Esquema 23 Tentativa de clivagem regiosseletiva para formação do composto **59** 55
Esquema 24 Rota alternativa para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-6 (**74**) 55
Esquema 25 Nova rota para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-6 (**74**) 56
Esquema 26 Representação do mecanismo de esterificação com anidrido succínico em presença de DMAP e piridina 57
Esquema 27 Etapas da síntese do derivado com ácido succínico na posição 1 (**77**) ... 58
Esquema 28 Clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise 59
Esquema 29 Etapa da síntese dos derivados com ácido succínico em todas as posições do anel β-D-galactopiranosídeo de metila 59
Esquema 30 Etapa de desproteção dos derivados com ácido succínico sintetizados .. 61
Esquema 31 Clivagem do ácido succínico na posição 2 (**79**), 3 (**80**) e 6 (**83**) por metanólise 62
Figura 31 Inibidores de TcTS escolhidos para derivação do padrão farmacofórico 69
Figura 32 Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de TcTS obtidos pelo programa Discovery Studio. Em **A** são observados os 5 inibidores sobrepostos e em **B**, apenas o farmacóforo gerado 70
Figura 33 Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de TcTS obtidos pelo web-servidor PharmaGist. Em **A** são observados os inibidores sobrepostos e em **B**, apenas o farmacóforo gerado 70

Figura 34 MIFs utilizando-se átomo de oxigênio de carboxila alquílica (em lilás, E = - 15,0 kcal/mol) e de oxigênio de carboxila arílica (em vermelho, E = - 15,0 kcal/mol) 72

Figura 35 MIFs utilizando-se grupo hidroxila alquílica (em laranja, E = - 9,0 kcal/mol), átomo de carbono sp^3 (em azul, E = - 10,0 kcal/mol) e átomo de carbono sp^2 aromático (em amarelo, E = - 3,2 kcal/mol) 73

Esquema 32 Reação de TcTS na presença do doador MuNANA, como substrato doador, e de lactose, como substrato aceptor, acompanhada em fluorímetro 74

Figura 36 Resultado gráfico do ensaio de diluição com duas amostras da enzima TcTS 75

Figura 37 Curva de Michaelis-Menten levando em consideração o ângulo de cada reta apresentada no gráfico relaciona U.F. e tempo de reação 77

Figura 38 Equação matemática de Michaelis-Menten, onde V_0 é a velocidade inicial; [S] é a concentração de substrato; V_{max} é a velocidade máxima e K_m a constante 77

Figura 39 Equação matemática de Michaelis-Menten representada na forma inversa 78

Figura 40 Duplo-recíproco da curva de Michaelis-Menten para cálculo de K_m e V_{max} 78

Figura 41 Compostos testados no ensaio de inibição de TcTS 79

Figura 42 Estrutura dos compostos utilizados como controle positivo 80

Figura 43 Resultado do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM ... 80

Figura 44 Atividade tripanocida dos derivados de ácido succínico em relação ao fármaco de referência benznidazol (Bz) 82

Figura 45 Porcentagem de morte celular causada pelos derivados de ácido succínico e benznidazol (Bz), avaliados em ensaios de cultura de células de baço de camundongos 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais aminoácidos do sítio catalítico de TcTS e suas funções 14

Tabela 2 Comparação entre deslocamentos químicos dos intermediários e seus respectivos derivados com ácido succínico..... 61

Tabela 3 Compostos selecionados da base de compostos diverset por triagem virtual baseada na estrutura de TcTS..... 63

Tabela 4 Dados espectroscópicos do composto **62** (anômero α) 122

Tabela 5 Dados espectroscópicos do composto **49** 124

Tabela 6 Dados espectroscópicos do composto **64** 126

Tabela 7 Dados espectroscópicos do composto **66** 128

Tabela 8 Dados espectroscópicos do composto **55** 130

Tabela 9 Dados espectroscópicos do composto **70** 132

Tabela 10 Dados espectroscópicos do composto **58** 134

Tabela 11 Dados espectroscópicos do composto **72** 136

Tabela 12 Dados espectroscópicos do composto **74** 138

Tabela 13 Dados espectroscópicos do composto **76** 140

Tabela 14 Dados espectroscópicos do composto **78** 148

Tabela 15 Dados espectroscópicos do composto **79** 152

Tabela 16 Dados espectroscópicos do composto **80** 156

Tabela 17 Dados espectroscópicos do composto **81** 160

Tabela 18 Dados espectroscópicos do composto **82** 164

Tabela 19 Dados espectroscópicos do composto **83** 166

Tabela 20 Dados espectroscópicos do composto **85** 180

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å: Angstron

Ac_2O: Anidrido acético

AcOEt: Acetato de Etila

Arg: Arginina

Asp: Ácido Aspártico

CCC: Cromatografia em Coluna Clássica

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCP: Cromatografia em Camada Preparativa

CFAE: Cromatografia Flash de Alta Eficiência

CYP: Citocromo

d: Dupleto

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

DBTO: Óxido de dibutilestanho

DCM: Diclorometano

dd: Duplo Dupleto

ddd: Duplo Duplo Dupleto

DIBAL-H: Hidreto de Diisobutilalumínio

DMAP: Dimetilaminopiridina

DMF: *N,N*-Dimetilformamida

2,2 DMP: 2,2 dimetoxipropano

DMTr: Dimetoxitritila

dt: Duplo Tripleto

ESI-TOF: Ionização por Eletrospray -Tempo de Voo

Et_3SiH: Trietilsilano

GalNAc: *N*-acetil-galactosamina

GlcNAc: *N*-acetil-glicosamina

Glu: Ácido Glutâmico

Gly: Glicina

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

IC_{50}: Concentração Inibitória de 50%

J: constante acoplamento

Kd: Constante de Dissociação

Ki: Constante de Inibição

Leu: Leucina

Ly: Lisina

m: Multipleto

MASPs: Proteínas de Superfície Associadas à Mucina

MHz: mega-Hertz

MIF: Campo de Interação Molecular

MIP: Metoxiisopropil

MuNANA: Ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-*N*-acetilneuramínico

Neu-5-Ac: Ácido *N*-acetilneuramínico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDB: Banco de Dados de Proteína

ppm: Partes por Milhão

Pro: Prolina

Py: Piridina

RMN ^{13}C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ^{1}H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: Simpleto

Ser: Serina

t: Tripleto

TBDMS: t-Butildimetilsilila

TBDPS: t-Butildifenilsilila

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

TFA: Ácido Trifluoroacético

THF: Tetraidrofurano

Thr: Treonina

Tr: Tritila

Trp: Triptofano

TS: *trans*-sialidase

TsCl: Cloreto de Tosila

Tyr: Tirosina

Val: Valina

v/v: Volume/Volume

δ: Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS iii

LISTA DE TABELAS vii

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS viii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Doença de Chagas 1

1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas e do parasita *Trypanosoma cruzi* 1

1.1.2 Tratamento da doença de Chagas 3

1.1.3 Alvos terapêuticos 6

1.2 *trans*-Sialidase 8

1.2.1 Invasão celular 8

1.2.2 Ácido siálico e mucinas 8

1.2.3 Atividade enzimática 11

1.2.4 Estrutura 3D de *trans*-Sialidase e mecanismo de ação 12

1.2.5 Inibidores de *trans*-Sialidase de *T. cruzi* 15

1.2.5.1 Inibidores miméticos de substrato doador 16

1.2.5.2 Inibidores miméticos de substratos aceptores 18

1.2.5.3 Inibidores miméticos de substratos duplos 20

1.2.5.4 Inibidores oriundos de produtos naturais 25

1.3 Química de Carboidratos 25

1.4 Modelagem molecular 30

2. OBJETIVOS 33

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 34

3.1 Justificativa 34

3.2 Planejamento sintético 36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

4.1 Síntese 39

4.1.1 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-1 39

4.1.2 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-2 40

4.1.3 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-3 44

4.1.4 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-4 ou C-6 48

4.1.5 Estudos envolvendo síntese de derivados com ácido succínico 57

4.2 Modelagem molecular 63

4.2.1 Triagem virtual baseada na estrutura de TcTS 63

4.2.2 Determinação do padrão farmacofórico a partir das estruturas de inibidores de *trans*-sialidase 68

4.2.3 Determinação dos sítios de interação virtual a partir da topologia do receptor (mapeamento do sítio ativo) 71

4.3 Ensaios biológicos 74

4.3.1 Padronização do método fluorimétrico contínuo 74

4.3.2 Ensaio de inibição 79

4.3.3 Ensaio de atividade tripanocida e citotóxica 81

5. CONCLUSÕES 83

6. MATERIAIS E MÉTODOS 84

6.1 Materiais 84

6.2 Métodos 85

6.2.1 Síntese 85

6.2.1.1 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-1 85

6.2.1.2 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-2 86

6.2.1.3 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-3 90

6.2.1.4 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-4 ou C-6 94

6.2.1.5 Estudos envolvendo síntese de derivados com ácido succínico 100

6.2.2 Modelagem molecular 107

6.2.2.1 Triagem virtual baseada na estrutura de TcTS 107

6.2.2.2 Determinação do padrão farmacofórico a partir das estruturas de inibidores de trans-sialidase 108

6.2.2.3 Determinação dos sítios de interação virtual a partir da topologia do receptor (mapeamento do sítio ativo) 108

6.2.3 Ensaios biológicos 109

6.2.3.1 Ensaio de inibição 109

6.2.3.2 Ensaio de atividade tripanocida e citotoxicidade 109

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

8. ANEXOS 122

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

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

Em abril de 1909, Carlos Chagas (1878-1934) comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença, caracterizada como uma expressiva endemia rural em vários países latino-americanos (FIOCRUZ, 2009; AMATO NETO; PASTERNAK, 2009). Após 100 anos desde sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um grande desafio à saúde pública na América Latina e durante décadas sua localização em áreas restritas e pobres ajudou a torná-la negligenciada e não atrativa para o desenvolvimento de fármacos (RASSI et al., 2009; THE LANCET, 2009).

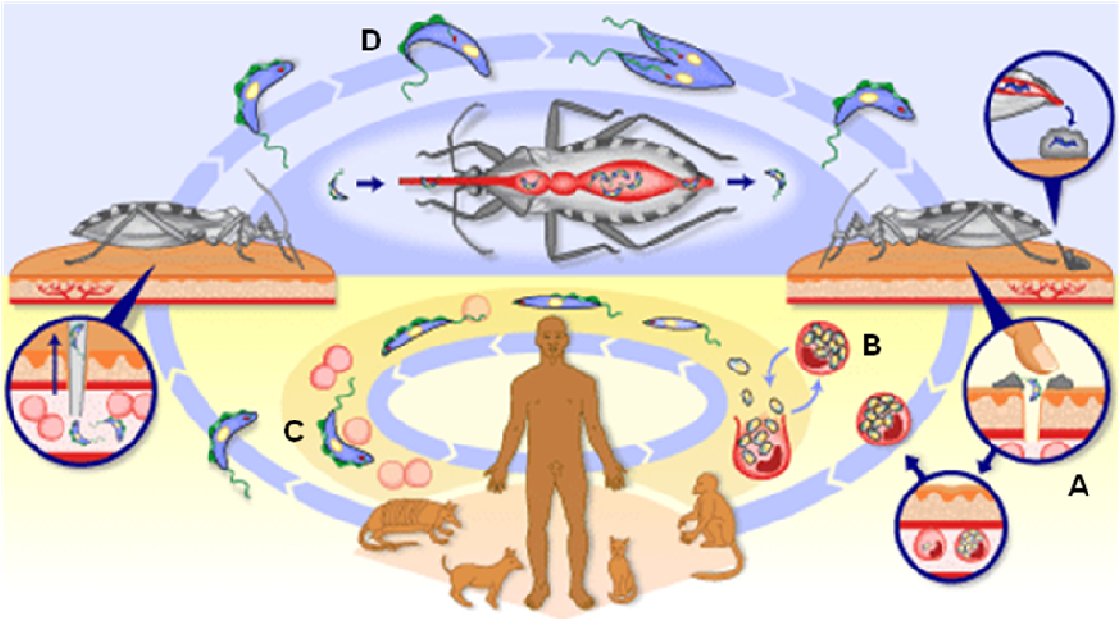
As doenças parasitárias têm sido obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres, e são frequentemente chamadas de doenças negligenciadas, uma vez que afetam populações pobres e marginalizadas e para as quais não existe tratamento satisfatório (DIAS et al., 2009; VIK, 2009). A necessidade de novas alternativas terapêuticas é evidente, mas os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de companhias farmacêuticas e de centros de pesquisas internacionais na busca de fármacos são insuficientes, por isso a doença de Chagas é uma das principais doenças negligenciadas do mundo (DIAS et al., 2009; KRAUS, 2009).

A doença de Chagas é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e esquistossomose, e seu agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011). Sua transmissão em seres humanos e em outros mamíferos ocorre, principalmente, através das fezes contaminadas do inseto vetor *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro” (REMME et al., 2006). Graças a medidas de controle sanitárias, a transmissão via *Triatoma infestans* foi interrompida no Brasil em 2006 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Atualmente, existem cerca de 10-12 milhões de pessoas infectadas, com 15.000 mortes anuais, e cerca de 30 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquiri-la, principalmente no continente sul-americano (OMS, 2010; CLAYTON, 2010). No entanto, devido ao recente fluxo de imigrantes provenientes de países endêmicos, a doença tem se tornado problema de saúde na América do Norte e em muitas partes da Europa, Ásia e Oceania, onde foi identificado número crescente de indivíduos infectados. Como resultado, tem sido reconhecido o potencial de transmissão da doença por transfusão de sangue, transplante de órgãos e via congênita nos países não endêmicos e tem havido preocupação global em identificar e prestar assistência às pessoas já infectadas (RASSI et al., 2009).

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A fase aguda pode passar despercebida como também pode se iniciar com febre, edemas localizados e generalizados, miocardite aguda etc. Já a fase crônica é caracterizada pela destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos (coração, esôfago, cólon etc) (MONCAYO, 1999; DO CAMPO, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (Figura 1), no qual o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos). O parasita tem um ciclo de vida complexo tanto no inseto como no hospedeiro mamífero, podendo ser encontrado nas formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e tripomastigota metacíclica (NEVES et al., 1995).



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

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*, mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (formas amastigota e tripomastigota) e inseto vetor (formas epimastigota e tripomastigota metacíclica).

A forma tripomastigota metacíclica (**A**), proveniente do inseto vetor, flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade diversas células para escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro. Após invasão, o parasita se diferencia na forma amastigota (**B**), aflagelada, que se prolifera por fissão binária e, eventualmente, se rediferencia na forma tripomastigota (**C**), destruindo as células e alcançando novamente a corrente circulatória. As formas tripomastigotas podem invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas por um vetor. Neste último caso, são convertidas na forma epimastigota (**D**) não infecciosa, completando o ciclo de vida entre o parasita e o vetor (BRENER et al., 1973; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

1.1.2 Tratamento da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem obter quimioterapia eficaz (MUELAS-SERRANO et al., 2002).

O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico benznidazol (Rochagan®). O fármaco nifurtimox (Lampit®), também utilizado no tratamento por muito tempo, teve sua produção descontinuada (Figura 2) (MUELAS et al., 2002; URBINA et al., 2003).

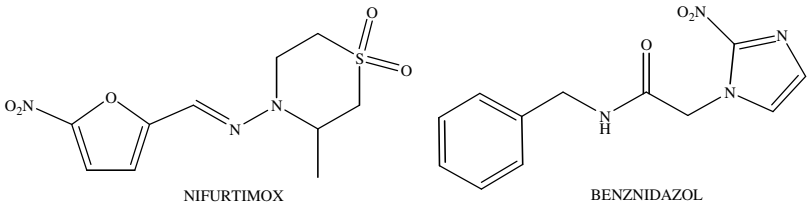


Figura 2 - Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.

Ambos os fármacos são usados na fase aguda da doença, mas suas eficácias variam de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência de variação de cepas do parasita. Ambos apresentam baixa eficácia e graves efeitos colaterais, sendo capazes de curar 60% das infecções recentes, o que pode ser observado pelo desaparecimento de sintomas e diminuição da parasitemia (DIAS; SCHOFIELD, 1999). O mecanismo de ação desses compostos está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio (ânions radicalares), envolvidas no dano de componentes críticos celulares do parasita, a partir da redução do grupo nitroarílico (WILLIANS; LEMKE, 2002).

Algumas terapias alternativas a esses dois fármacos também têm sido testadas. O alopurinol foi utilizado para tratar fase aguda e crônica de tripanossomíases americanas, em regimes que variam consideravelmente em duração e dose, sendo a eficácia variável. Leon e colaboradores investigaram o resultado do efeito do tratamento com captopril na infecção com *T. cruzi* em ratos e concluíram que a administração de captopril reduziu de forma significativa necrose cardíaca bem como fibrose. Posteriormente, Braga e colaboradores, estudando os aspectos clínicos e terapêuticos da insuficiência cardíaca em decorrência da doença de Chagas, descobriram que a dose de alguns medicamentos utilizados para tratar insuficiência cardíaca era similar para pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (TEMPONE et al., 2007).

Recentemente, os inibidores da biossíntese de ergosterol tais como cetoconazol, itraconazol e terbinafina, que são importantes no tratamento de doenças fúngicas, não foram suficientemente potentes para eliminar *T.cruzi* a partir de animais cronicamente infectados ou humanos. No entanto, na última década, novos derivados triazólicos, tais como os inibidores de esteróis C_{14}-α-demetilase (CYP51): posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute), TAK-187 (Takeda Chemical Company), e D0870 (Zeneca Farmacêutica), foram capazes de induzir cura parasitológica da doença de Chagas em modelos, tanto na fase aguda como crônica, sem efeitos colaterais tóxicos para os hospedeiros (GRAEBIN et al., 2009). É importante ressaltar que alguns desses compostos já estão em fase clínica, tais como TAK-187 (fase I completa) e posaconazol (fase II iniciada). Outros dois candidatos em avaliação clínica é o derivado azólico E12-24 (Eisai, Japão) (fase I completa) e o derivado vinil sulfona K-777 (Sandler Center for Drug Discovery, USA) (fase I em preparação), capaz de inibir a enzima cruzipaína de *T. cruzi* (CLAYTON, 2010).

A utilização de agente profilático também é uma solução desejável, devido à alta incidência de sangue contaminado em bancos de sangue (5 a 20%), sendo este mecanismo considerado como o segundo mais importante meio de transmissão em áreas endêmicas (COURA; De CASTRO, 2002). A única substância usada como agente quimioprofilático é a violeta de genciana (cloreto de N-[4-bis-[[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]N-metilamônio) (Figura 3). Entretanto, seu uso é limitado devido aos efeitos colaterais e à coloração púrpura transferida à pele e às mucosas dos pacientes que recebem transfusão de sangue (WENDEL; GONZAGA, 1993).

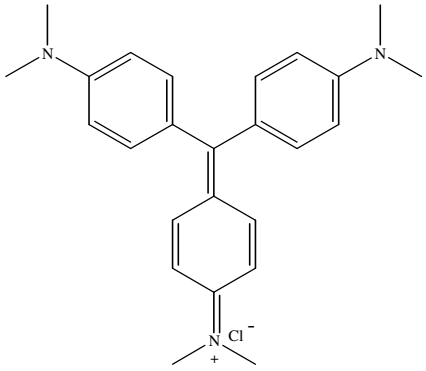


Figura 3 - Violeta de genciana: agente quimioprofilático.

1.1.3 Alvos terapêuticos

Os fatores atuais mais importantes na descoberta de novos fármacos envolvem o isolamento, identificação, e caracterização de novos compostos bem como de suas propriedades moleculares e cinéticas. A validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades farmacológicas e toxicológicas de possíveis inibidores para o tratamento da doença de Chagas (GUHL; LAZDINS-HELDS, 2007).

A descoberta de novos alvos depende, em grande parte, da interpretação de informações contidas no genoma do *T. cruzi*. O sequenciamento e entendimento do genoma do parasita devem conduzir ao conhecimento aprofundado da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasita-hospedeiro e patologia da doença (COURA; De CASTRO, 2002).

O sequenciamento concluído recentemente mostra que mais da metade do genoma do *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener) é constituído por sequências repetidas. Estas sequências incluem genes para uma grande família de moléculas de superfície, incluindo *trans*-sialidases, proteases gp 63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs). Na superfície celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* são expressos vários grupos de proteínas, sendo que as moléculas de mucina e a enzima *trans*-sialidase (TS) fazem parte do grupo melhor caracterizado; as 223 unidades proteicas detectadas no genoma da TS são compostas de 15 genes capazes de codificar a enzima ativa (EL-SAYED, 2005).

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

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

- **Tripanotiona redutase** (KRAUTH-SIEGEL; COOMBS, 1999), relacionada ao estresse oxidativo.
- ***trans*-Sialidase** (PREVIATO et al., 1995; HARRISON et al., 2001), envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- **$C_{14}D^{24,25}$-esterol metiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na biossíntese de ergosterol.
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase** (PAVÃO et al., 2002), presente na via glicolítica.
- **Cisteína proteases (Cruzipaína)** (RAMOS et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase** (ZUCCOTTO et al., 1999), responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina.
- **Prolil endopeptidase** (VENDEVILLE et al., 1999), envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- **DNA topoisomerases I e II** (MUELAS-SERRANO et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), enzimas essenciais que catalisam alterações topológicas na molécula de DNA. Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo do DNA, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação.

- **Farnesilpirofosfato sintase** (MUELAS-SERRANO et al., 2002), envolvida na biossíntese de uma variedade de esteroides e poliisoprenoides a partir de farnesilpirofosfato.

1.2 *trans*-Sialidase

1.2.1 Invasão celular

O parasita intracelular *T. cruzi* desenvolve uma enzima regulatória de superfície, denominada *trans*-sialidase, envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita; etapa inicial no processo de infecção (PREVIATO et al., 1995). *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico, presente em glicoconjugados das células do hospedeiro, e através dessa enzima o parasita torna-se capaz de transferi-lo e incorporá-lo a moléculas de mucina, que estão ligadas à membrana parasitária através de âncora GPI (COREY et al., 2002; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

As glicoproteínas de mucina das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* possuem unidades terminais de α-galactose e β-galactose que funcionam como epítopos; sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti-α-galactose (anti-α-gal). Dessa forma, a sialilação das moléculas de mucina pela ação da enzima *trans*-sialidase protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação de anticorpos líticos anti-α-gal e contribui, assim, para o tropismo tecidual exibido pelo parasita (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

1.2.2 Ácido siálico e mucinas

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destacam-se os ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos que ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos (ANGATA et al., 2002). O ácido siálico mais abundante

existente em eucariontes é o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu-5-Ac), que foi isolado pela primeira vez por Gottschalk e colaboradores (Figura 4) (DE NINNO, 1991).

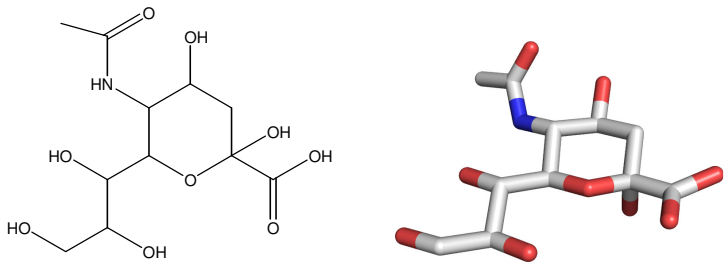


Figura 4 - Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido *N*-acetilneuramínico.

As glicoproteínas de mucina são moléculas polianiônicas altamente glicosiladas, contendo cerca de 60% de carboidratos, e constituem uma barreira protetora na superfície parasitária (ACOSTA-SERRANO et al., 2001).

As glicoproteínas de mucina são moléculas multigalactosiladas, cujas unidades de galactose encontram-se ligadas, através de unidades de α-*N*-acetil-glicosamina (αGlcNAc), à cadeia peptídica com sequência rica em aminoácidos de Thr e Pro, como Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Ly-Pro-Pro ($Thr_8LysPro_2$) (Figuras 5 e 6). As moléculas de mucina sialiladas, insensíveis à ação de proteases presentes na membrana plasmática de *T. cruzi,* estão envolvidas no processo de aderência e subsequente penetração do parasita nas células do hospedeiro (AGRELLOS et al., 2003; PREVIATO et al., 1995).

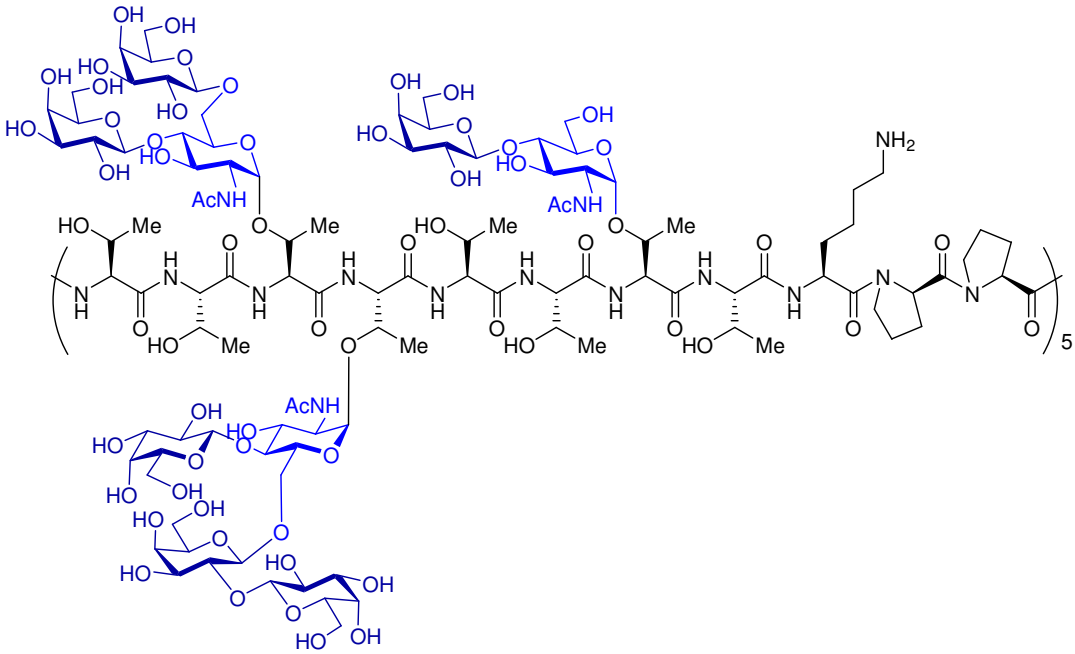


Figura 5 - Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$.

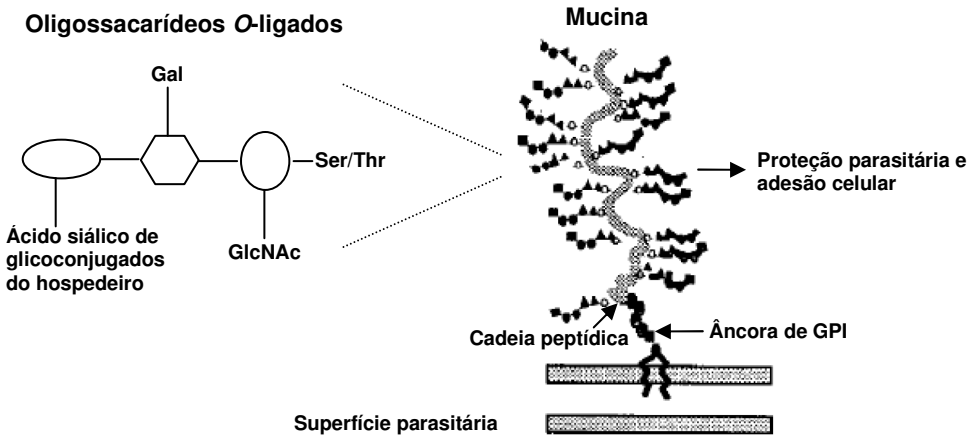


Figura 6 - Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi*.

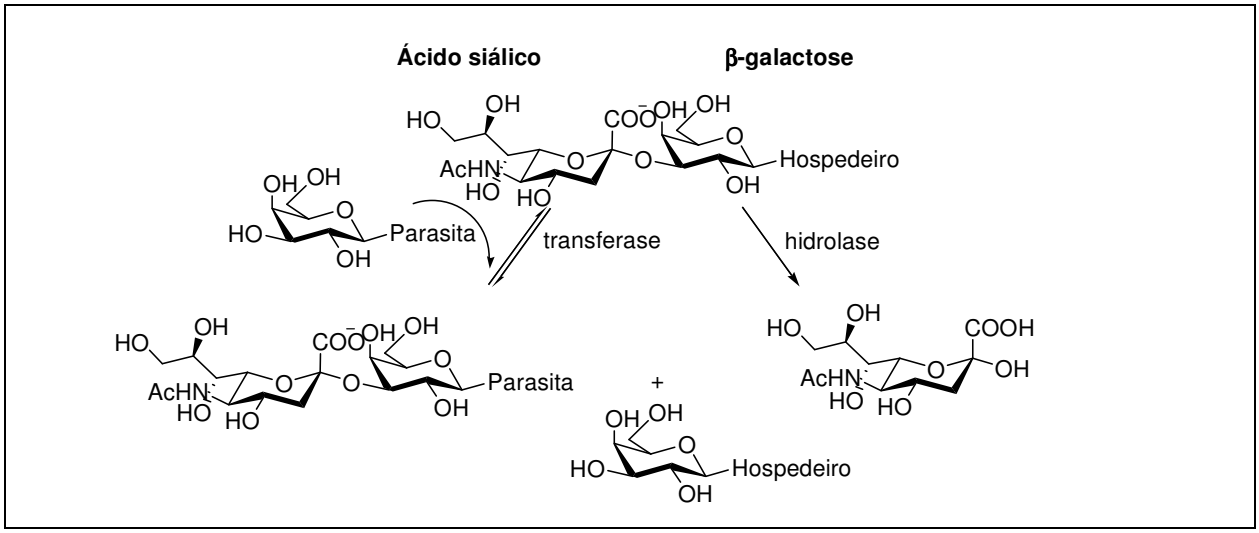
As moléculas de mucina de *T. cruzi* assemelham-se às de mamíferos, embora as unidades oligossacarídicas estejam ligadas à cadeia peptídica pela unidade de α-*N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) e não *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), como ocorre nos vertebrados (DI NOIA et al., 1996).

1.2.3 Atividade enzimática

A enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariontes. A enzima não pode utilizar ácido siálico livre, apenas transfere-o do hospedeiro para o parasita no sentido de controlar o nível de infecção (FRASCH et al., 1998).

trans-Sialidase tem duas atividades: uma hidrolase e outra transferase. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α-2,3 com unidades de β-galactose aceptoras na superfície do parasita (RIBEIRÃO et al., 1997).

Apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica (BUSCHIAZZO et al., 2002). Portanto, TcTS é uma sialiltransferase *in vivo* e *in vitro* na presença de substratos adequados de aceptores de açúcar, como β-galactose terminal de glicoconjugados (Esquema 1) (PARODI et al., 1992).



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

1.2.4 Estrutura 3D de *trans*-Sialidase e mecanismo de ação

A clonagem do gene de *trans*-sialidase foi realizada por Schenkman e colaboradores (EGIMA et al., 1996). A enzima possui dois domínios distintos: um domínio catalítico-propulsor *N*-terminal (resíduos 1-371) estritamente associado, através de uma longa α hélice (resíduos 372-394), ao domínio *C*-terminal de lectina (resíduos 395-632) (BUSCHIAZZO et al., 2002). A estrutura de *trans*-sialidase de *T. cruzi* foi determinada a uma resolução de 1.6 Å e sua estrutura cristalográfica está disponível no PDB ("Protein Data Bank") (AMAYA et al., 2003).

Através do PDB, é possível ter acesso a vários complexos cristalográficos existentes entre a enzima TcTS e diferentes inibidores. A Figura 7 mostra a estrutura unidimensional e tridimensional do inibidor DANA (ácido 2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil neuramínico), análogo de ácido siálico, e o complexo cristalográfico (código PDB: 1MS8), deste inibidor com a enzima TcTS.

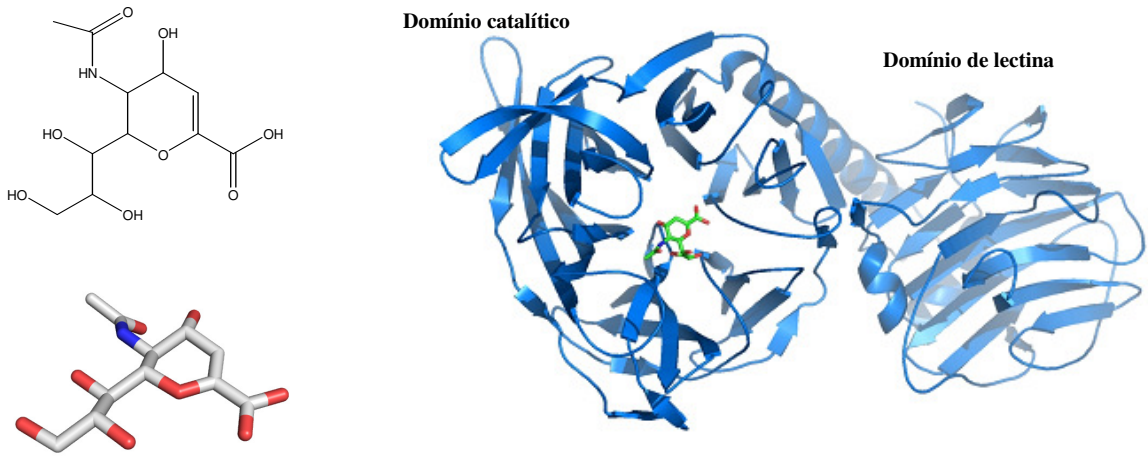


Figura 7 - Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS – DANA.

A arquitetura molecular do sítio ativo de TcTS possui várias características comuns a outras sialidases microbianas: uma tríade de aminoácidos Arg (Arg35, Arg245 e Arg314) que se liga ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico, um ácido

glutâmico (Glu357) que estabiliza Arg35, um resíduo de ácido aspártico (Asp59), essencial para a atividade catalítica, e dois resíduos (Tyr342 e Glu230) na porção inferior do sítio ativo, os quais estão adequadamente posicionados para estabilizar os estados de transição reacionais (Figura 8).

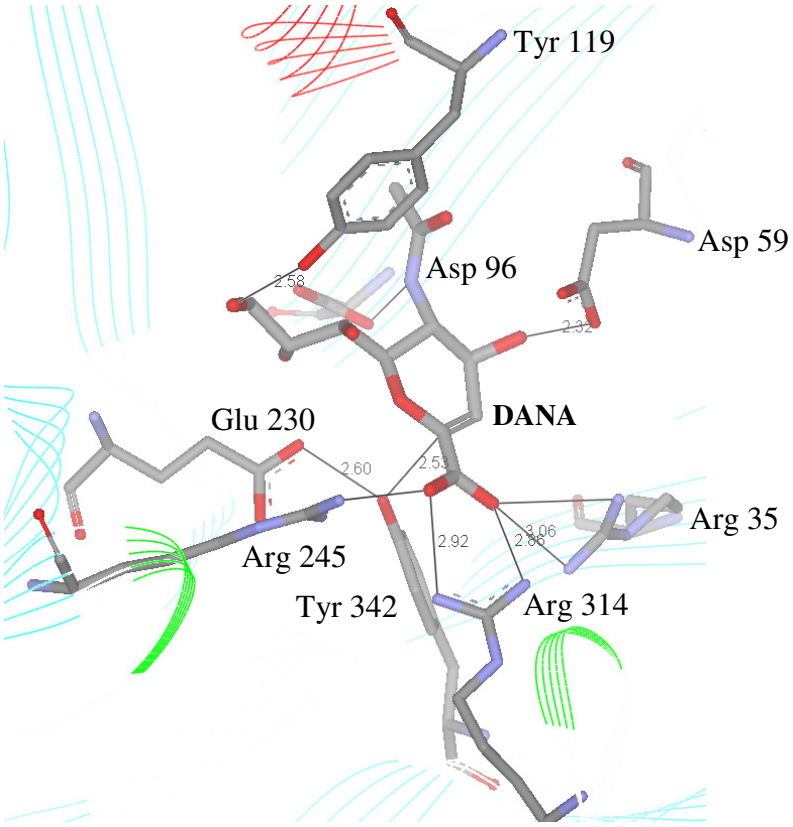


Figura 8 - Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB.

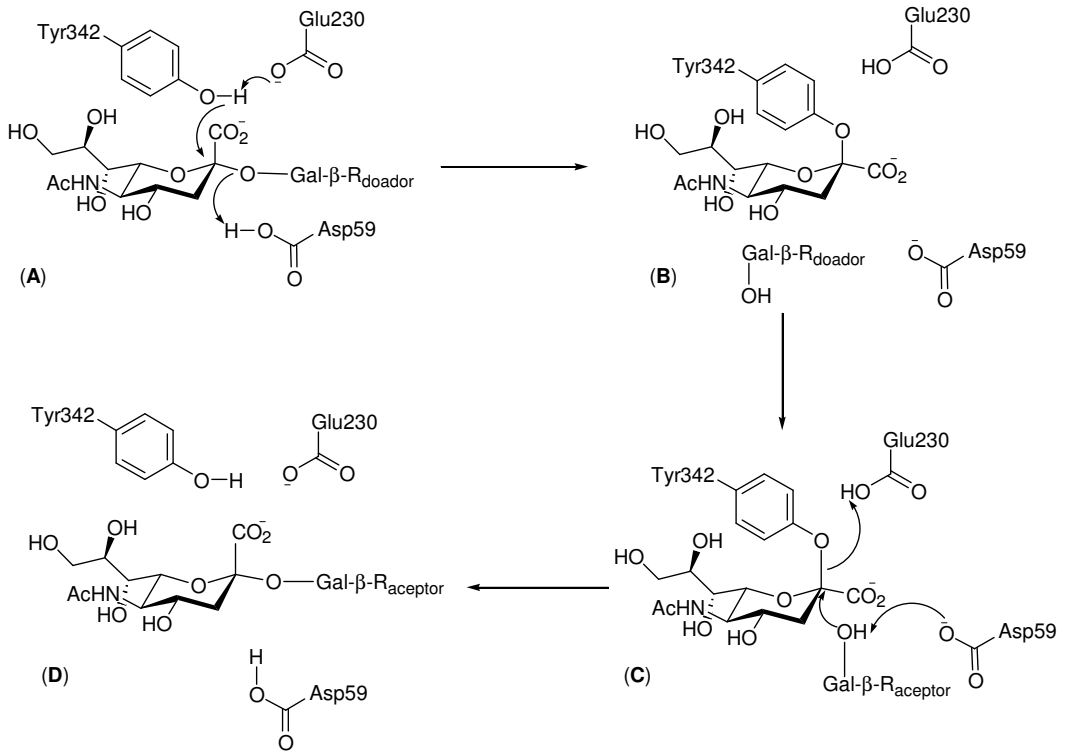
As principais funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS, fundamentais para o processo de *trans*-glicosilação estão resumidas na tabela 1.

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

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

A enzima TcTS catalisa a reação de *trans*-glicosilação por meio de um mecanismo conhecido como duplo-deslocamento (“ping pong”), tendo em vista que a ligação de lactose (substrato aceptor contendo galactose) ao sítio ativo enzimático ocorre somente após a entrada da molécula de ácido siálico (substrato doador) (Esquema 2). Após ligação do

substrato doador de ácido siálico, o grupo hidroxílico de Tyr342, com assistência de Glu230 atuando como base, realiza ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**A**), com deslocamento do grupo abandonador protonado e formação do intermediário TcTS-sialosídeo (**B**). Posteriormente, o grupo hidroxila 3-OH da molécula aceptora de lactose, na presença do resíduo Asp59 como base, realiza um segundo ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**C**), resultando em retenção de configuração da molécula de acido siálico (**D**) (NERES et al., 2008).



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

1.2.5 Inibidores de *trans*-Sialidase de *T. cruzi*

Atualmente, abordagens no planejamento de fármacos em relação a vários alvos bioquímicos de *T. cruzi* têm sido revistas. Apesar da importância de TcTS para patogênese da doença de Chagas e seu surgimento como um alvo potencial, sua inibição sempre foi desafiadora por não haver inibidores potentes nem específicos relatados e, portanto, este alvo não havia sido devidamente validado (NERES et al., 2008; NERES et al., 2009).

Contudo, através de uma abordagem diferente, Buschiazzo e colaboradores reportaram a descoberta do inibidor mais pontente de TcTS até o momento. De acordo com o trabalho, o anticorpo monoclonal de camundongo 13G9 foi capaz de inibir a sialilação da superfície do parasita e a invasão celular, pois apresenta alta afinidade (subnanomolar) e especifidade pela enzima. Adicionalmente, com a determinação da estrutura cristalográfica do complexo TcTS-anticorpo 13G9 (código do PDB 3OPZ) foi possível observar que a cadeia leve do anticorpo bloqueia a mobilidade do resíduo de Tyr119, o que impede a entrada de substratos sialilados no sítio catalítico para que ocorra *trans*-glicosilação. Esses resultados contribuíram não apenas para reforçar a relevância biológica da enzima *trans*-sialidase, como também para validá-la como alvo no processo de descoberta de novos fármacos (BUSCHIAZZO et al., 2012).

Considerando a estrutura cristalográfica de TcTS, a maioria de seus inibidores foi classificada de acordo com a região do sítio ativo onde se ligam, ou seja, sítio de ligação de ácido siálico (doador) e sítio de ligação de β-galactose (aceptor) (GIORGI et al., 2010). Sendo assim, os inibidores de TcTS podem ser agrupados em três grandes categorias: i) miméticos de substrato doador (acido siálico), que se ligam na região do substrato doador, ii) miméticos de substratos aceptores (lactose e galactose), que se ligam na região do substrato aceptor e iii) miméticos de substratos duplos, que se ligam em ambas as regiões do sítio ativo (NERES et al., 2009).

1.2.5.1 Inibidores miméticos de substrato doador

Parte das estratégias aplicadas ao desenvolvimento racional de inibidores de neuraminidase de influenza (sialidase) foi utilizada durante a busca de inibidores de *trans*-sialidase, em virtude da similaridade dos sítios ativos e mecanismo catalítico dessas enzimas. Dentre as estratégias para concepção de novos inibidores específicos de TcTS, houve predominância significativa no uso de bioisosterismo como método de modificação molecular na estrutura de ácido siálico (Figura 9) (MOREIRA et al., 2009).

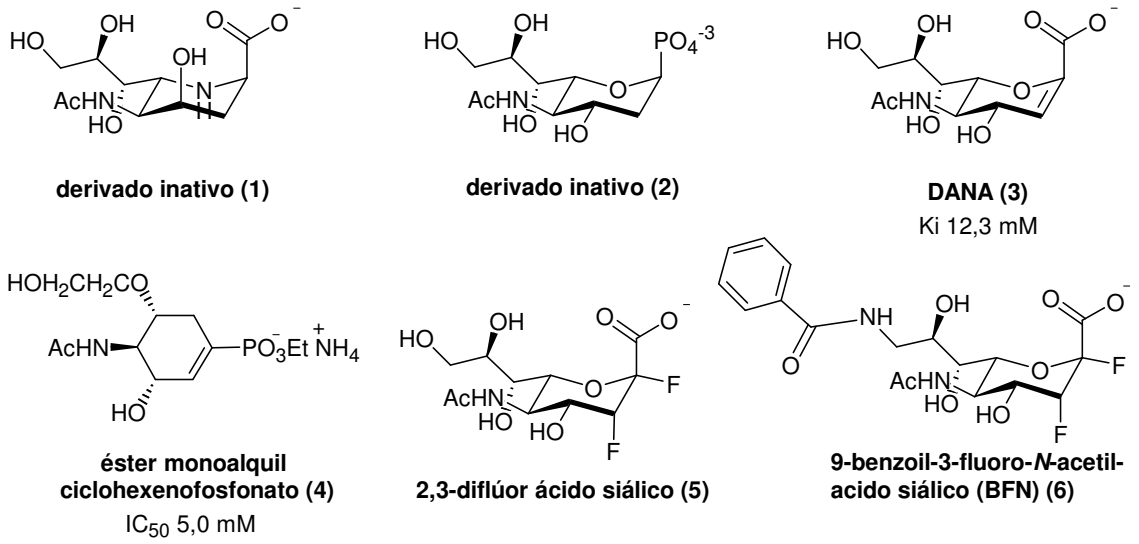


Figura 9 - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico.

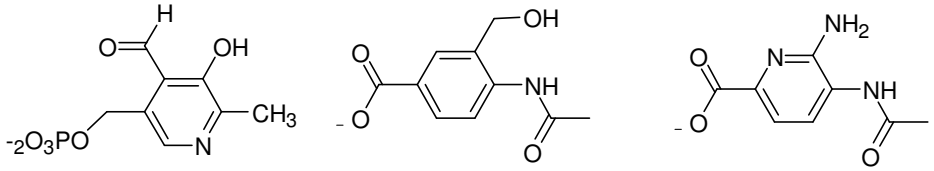
Num primeiro momento, o átomo de oxigênio do anel da estrutura de ácido siálico foi substituído por um átomo de nitrogênio e o grupo carboxila foi substituído por grupo fosfato, porém essas modificações resultaram em moléculas inativas (**1** e **2**) frente TcTS. Posteriormente, foi considerada a estrutura do estado de transição de reações de ácido siálico, o que levou à síntese do derivado **3** (DANA) (Ki 12,3 mM) através de restrição conformacional do anel e manutenção do farmacóforo básico (MOREIRA et al., 2009).

Apesar de ser potente inibidor de neuraminidase de influenza, DANA apresentou fraca inibição de TcTS mesmo apresentando interações favoráveis no sítio ativo. Este resultado mostra que diferenças entre alguns aminoácidos fundamentais no sítio ativo (responsáveis pela diferente atividade de TcTS) são também responsáveis pela baixa inibição observada para a molécula de DANA (BUSCHIAZZO et al., 2002; PARIS et al., 2005).

Uma abordagem também importante foi substituir o anel do ácido siálico por cicloexeno com simultânea mudança do grupo carboxila por fosfato. O resultado dessas modificações levou à síntese do composto **4** (IC_{50} 5,0 mM), que apresentou melhor atividade que DANA. No entanto, esse resultado não foi considerado satisfatório (STREICHER; BUSSE, 2006). Igualmente, a estratégia de fluoração do ácido siálico descrita por Buchini e

colaboradores levou à síntese de derivados de ácido siálico 2,3 difluorados (**5** e **6**), que inibiram a enzima TcTS de forma tempo-dependente e para completa inativação houve necessidade de concentrações muito elevadas dos inibidores (20,0 mM) (WATTS et al., 2003; BUCHINI et al., 2008).

Na busca por inibidores potentes, Ferrero-Garcia e colaboradores investigaram estruturas não-baseadas em carboidratos (Figura 10). Como resultado desse trabalho, foi descoberta atividade inibitória do composto **7** (piridoxal 5'-fosfato) (Ki 7,3 mM) (FERRERO-GARCIA et al., 1993). Posteriormente, Neres e colaboradores sintetizaram os derivados de ácido benzoico **8** (IC_{50} 0,54 mM) e de piridina **9** (IC_{50} 0,44 mM), que apresentaram atividade inibitória moderada. Adicionalmente, estudos de modelagem molecular foram conduzidos para ajudar na compreensão da relação estrutura-atividade (REA) desses compostos (NERES et al., 2007).



piridoxal fosfato (7) Ki 7,3 mM | **derivado de ácido benzoico (8)** IC_{50} 0,54 mM | **derivado de piridina (9)** IC_{50} 0,44 mM

Figura 10 - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico não-baseados em carboidratos.

1.2.5.2 Inibidores miméticos de substratos aceptores

Alguns compostos foram planejados para ocupar exclusivamente o sítio aceptor de ácido siálico. Lactitol **10** (Figura 11) foi o melhor análogo de lactose descoberto até o momento para inibir a reação de transferência para substratos como lactose / *N*-acetillactosamina, com IC_{50} de 0,21 mM, sendo também verificado que este composto reduziu infecção em células de mamíferos em cerca de 20-27%. No entanto, este composto não inibe a atividade catalítica enzimática de TcTS, atuando somente como um aceptor

preferencial de ácido siálico se comparado com outros substratos convencionais (AGUSTI et al., 2004).

Oligossacarídeos de alditóis, tais como tetra- e pentassacarídeo alditóis, contendo uma unidade externa de galactofuranose **11** (Figura 11) foram também sintetizados por Agusti e colaboradores como potenciais substratos para a transferência de ácido siálico, inibindo a transferência de ácido siálico para o substrato aceptor *N*-acetillactosamina com valores de IC_{50} entre 0,6 e 4,0 mM (AGUSTI et al., 2007).

Tendo em vista que compostos ativos tais como lactitol apresentaram baixa meia-vida plasmática devido à elevada excreção renal ou inativação por enzimas plasmáticas, foi realizada conjugação de derivados de lactose com polietileno glicol (PEG) visando ao aumento da biodisponibilidade. Dessa forma, o composto **12** apresentou a maior taxa de inibição de transferência (82%), com IC_{50} de 0,34 mM, enquanto os derivados **13** e **14** apresentaram somente 21% (IC_{50} 2,7 mM) e 3,5% (IC_{50} 4,52 mM) de inibição, respectivamente (Figura 11) (GIORGI et al., 2010).

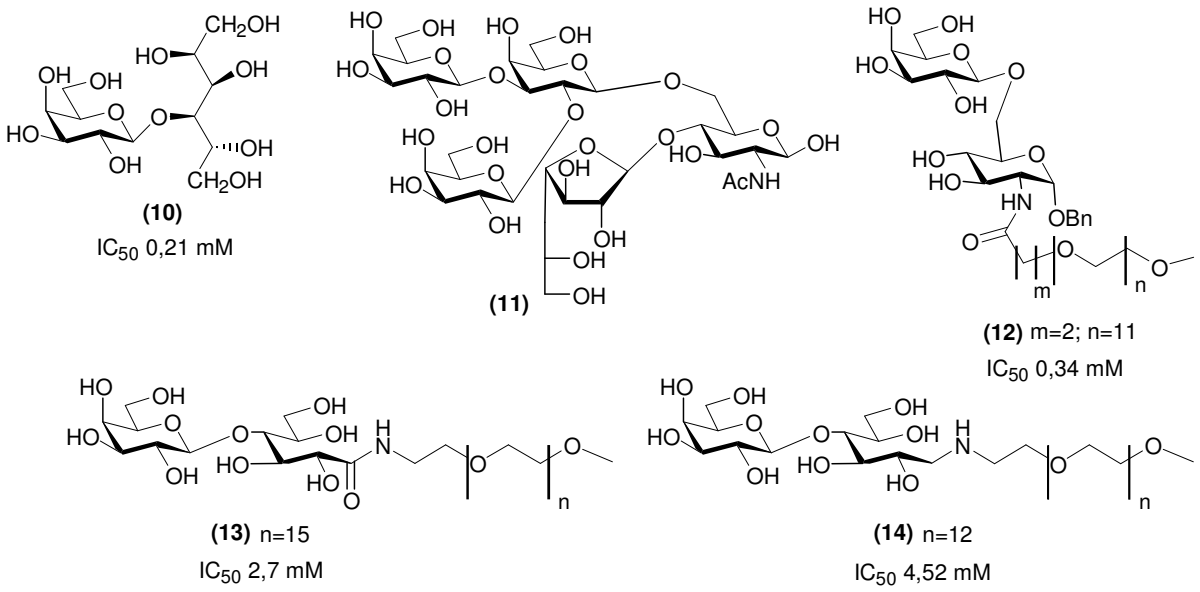


Figura 11 - Derivados miméticos de substratos aceptores de acido siálico.

1.2.5.3 Inibidores miméticos de substratos duplos

Dentre os inibidores planejados para ocupar a região do doador e do aceptor no sítio ativo, estão os derivados fosforilados de galactose **15** (IC_{50} 3,0 mM) e **16** (IC_{50} 1,5 mM) e o derivado de glangliosídeo **17**, tido como um dos mais potentes inibidores por apresentar valores de IC_{50} na ordem de 100 µM (Figura 12) (BUSSE et al., 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 1992). Considerando este último resultado, a literatura tem sugerido que a melhor estratégia para inibir a enzima deva envolver estruturas que ocupem tanto o sítio ativo doador quanto o sítio ativo aceptor, representando inibidores de substratos duplos (NERES et al., 2009).

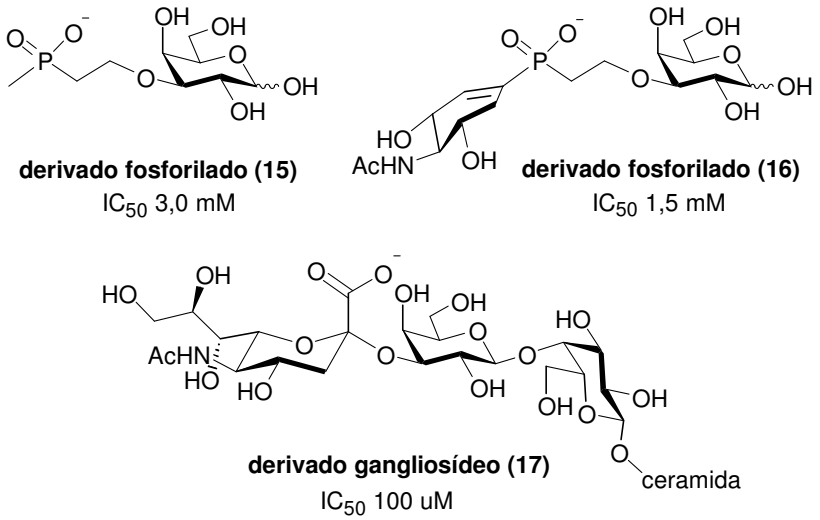
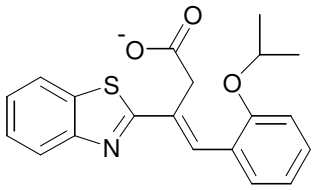


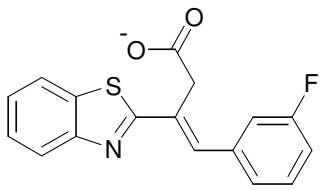
Figura 12 - Estruturas de derivados miméticos de substratos duplos de TcTS.

Dessa forma, Neres e colaboradores reportaram a descoberta de inibidores mais ativos de TcTS a partir de triagem virtual de bibliotecas de compostos comercialmente disponíveis, considerando a efetividade das interações desses compostos no sítio ativo de TcTS, por estudos de modelagem molecular, como critério para aquisição dos mesmos. Dentre 23 compostos selecionados e testados, quatro apresentaram inibição acima de 50%, sendo as maiores atividades atribuídas aos derivados benzotiazol **18** (IC_{50} 0,15 mM) e **19** (IC_{50} 0,12 mM) (Figura 13) (NERES et al., 2009).



(18)

IC_{50} 0,15 mM

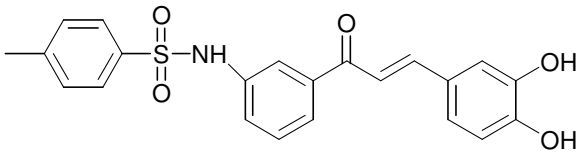


(19)

IC_{50} 0,12 mM

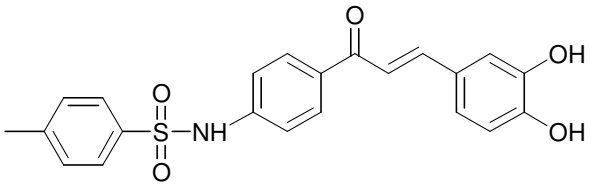
Figura 13 - Estruturas de derivados benzotiazol miméticos de substratos duplos.

Visando também à descoberta de inibidores de substratos duplos através de síntese, vários autores descreveram trabalhos relevantes nesse processo. Uma série de sulfonamidas contendo chalconas hidroxiladas e derivados de quinolinona foram recentemente descritas por Kim e colaboradores como potentes inibidores de TcTS (KIM et al., 2009). É importante ressaltar que a síntese dos compostos **20** (IC_{50} 2,5 µM), **21** (IC_{50} 0,9 µM) e **22** (IC_{50} 0,6 µM) (Figura 14) representou grande avanço na busca de potentes inibidores de TcTS, uma vez que a enzima foi inibida em concentração submicromolar. Recentemente, estudos de modelagem molecular do derivado quinolinona **22** demonstraram interações relevantes do grupo sulfona com a tríade de arginina e dos anéis aromáticos com Tyr119 e Trp312, ou seja, o derivado **22** ocupa as duas regiões do sítio ativo (LIMA et al., 2012).



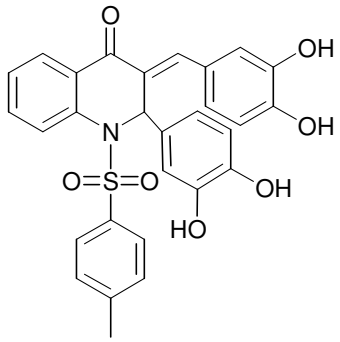
derivado de sulfonamida (20)

IC_{50} 2,5 uM



derivado de sulfonamida (21)

IC_{50} 0,9 uM

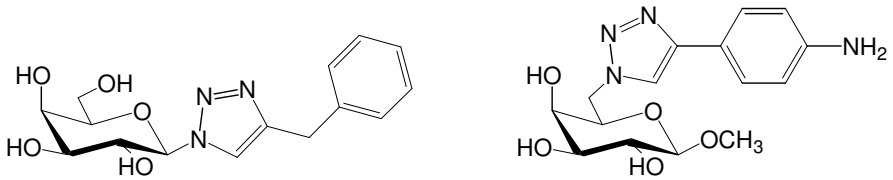


derivado de quinolinona (22)

IC_{50} 0,6 uM

Figura 14 - Estruturas de derivados de sulfonamida e quinolinona como inibidores de TcTS.

Alguns autores investigaram a síntese e avaliação biológica de bibliotecas de galatosilmiméticos. Nesse sentido, Carvalho e colaboradores relataram estudos de uma biblioteca com 46 derivados galactosil triazólicos substituídos na posição C-1 ou C-6 do açúcar. Apesar dos derivados apresentarem grande diversidade estrutural, as melhores inibições na concentração de 1,0 mM foram observadas apenas para os derivados **23** (37%) e **24** (34%) (Figura 15) (CARVALHO et al., 2010a).

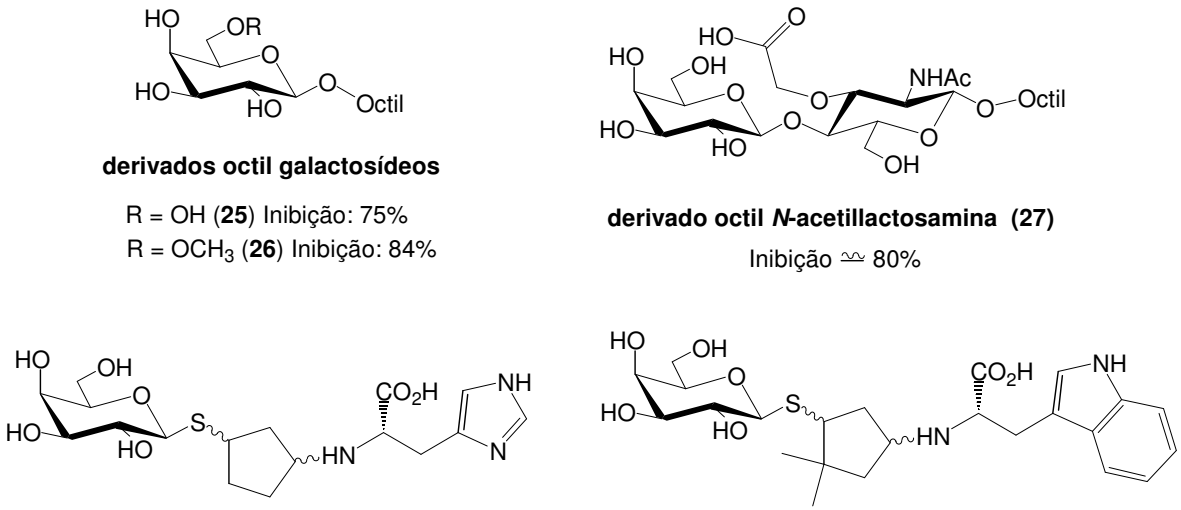


(23)
Inibição: 37%

(24)
Inibição: 34%

Figura 15 - Estruturas de derivados galactosil triazólicos como inibidores de TcTS.

Harrison e colaboradores também descreveram a síntese e avaliação biológica de bibliotecas. Os melhores derivados octil galactosídeos (**25** e **26**) e octil *N*-acetillactosamina (**27**) apresentaram inibição próxima de 80%, porém os melhores derivados tiogalactosídeos (**28** e **29**) apresentaram inibição próxima de 60% (Figura 16) (HARRISON et al, 2011).



derivados octil galactosídeos

R = OH (**25**) Inibição: 75%
R = OCH_3 (**26**) Inibição: 84%

derivado octil *N*-acetillactosamina (27)
Inibição ≃ 80%

derivado tiogalactosídeo (28)
Inibição ≃ 60%

derivado tiogalactosídeo (29)
Inibição ≃ 60%

Figura 16 - Estruturas dos derivados mais ativos nos ensaios de inibição com TcTS.

Uma abordagem interessante descrita por Giorgi e colaboradores, foi a conjugação covalente de oseltamivir com derivados de galactose (Figura 17). No entanto, os valores de IC_{50} dos melhores compostos (**30** a **33**) não foram muito expressivos (IC_{50} 2,16 mM a 4,26 mM), indicando que a conjugação com oseltamivir não afeta a interação do aceptor com a região de ligação do açúcar (GIORGI et al., 2011).

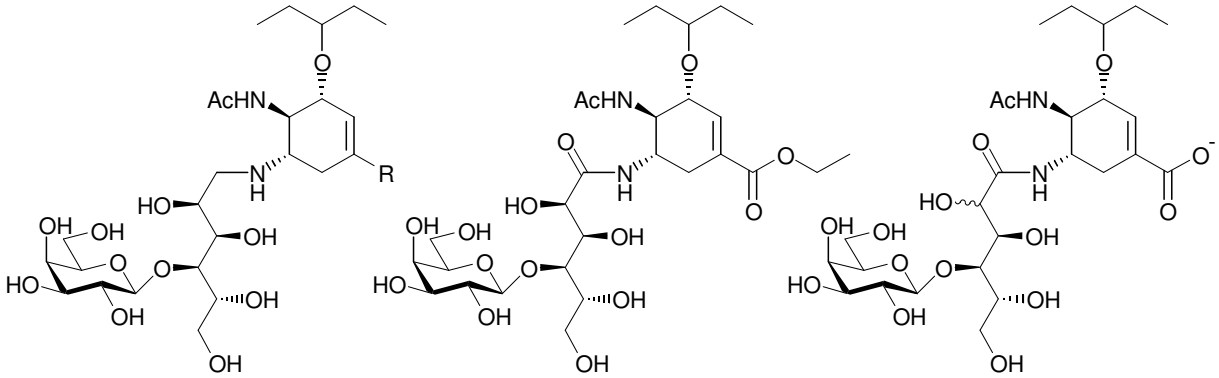
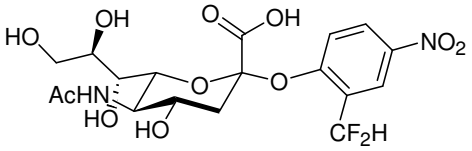


Figura 17 - Estruturas de derivados conjugados com oseltamivir e seus valores de IC_{50}.

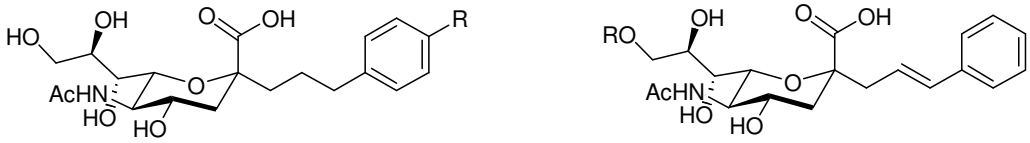
Por outro lado, alguns autores investigaram a síntese e avaliação biológica de sialilmiméticos. Nesse sentido, Carvalho e colaboradores mostraram que o ácido 2-difluorometil-4-nitrofenil-3,5-dideoxi-D-glicero-D-α-galacto-2-nonulopiranosídeo (NeuNAcFNP) (**34**) inibiu a enzima de forma irreversível (Figura 18). Adicionalmente, o composto **34** foi capaz de reduzir invasão celular parcialmente, o que evidenciou de forma direta que TcTS está envolvida na invasão de células hospedeiras (CARVALHO et al., 2010b).



NeuNAcFNP (34)
I_{50} 0,57 mM

Figura 18 - Estrutura do derivado sialilmimético capaz de inibir TcTS irreversivelmente.

Considerando a importância de ligantes aromáticos que pudessem ser introduzidos na molécula de ácido siálico para alcançar a região de ligação do sítio aceptor, Meike e colaboradores sintetizaram vários *C*-sialosídeos (**35** a **38**) e determinaram suas constantes de afinidade (Figura 19) (MEINKE et al, 2011). As constantes foram obtidas por ressonância plasmônica de superfície (SPR) e o derivado com maior afinidade foi **35** (Kd 0,16 mM).

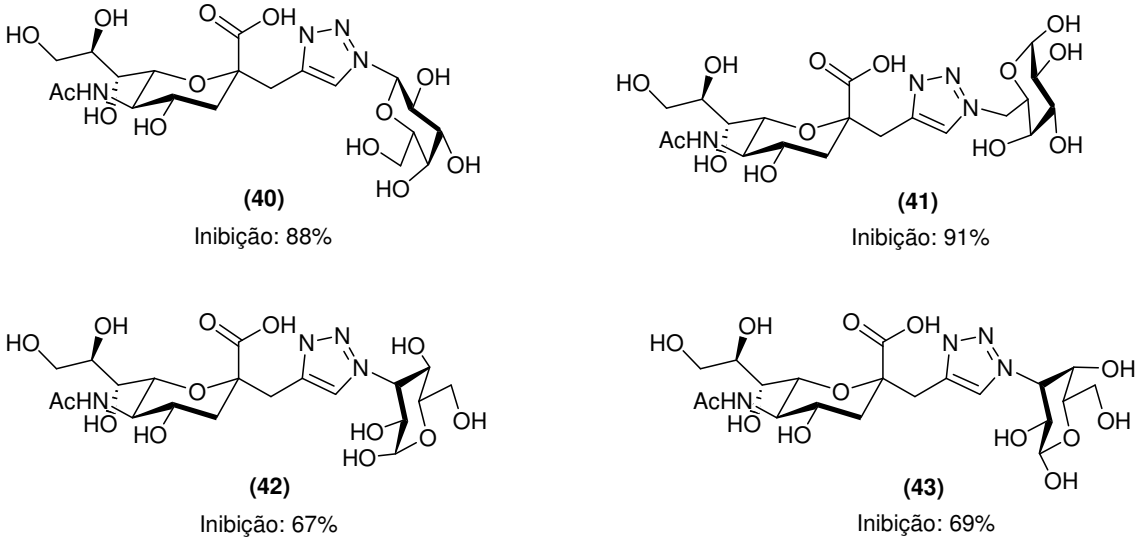


R = H (**35**) Kd 0,16 mM
R = NH_2 (**36**) Kd 0,35 mM
R = NHAc (**37**) Kd 3,9 mM

R = H (**38**) Kd 3,6 mM
R = $CH_2C_6H_5$ (**39**) Kd 2,0 mM

Figura 19 - Estrutura de derivados sialilmiméticos e suas constantes de afinidade por TcTS.

Recentemente, Campo e colaboradores descreveram a síntese de alguns neoglicoconjugados sialilmiméticos (Figura 20). Através de "click chemistry" (cicloadição 1,3-dipolar) esses derivados 1,2,3 triazólicos contendo galactose (**40** e **41**), glicose (**42**) e gulose (**43**) foram testados na concentração de 1,0 mM e apresentaram atividade inibitória entre 67% a 91%. Estudos de modelagem molecular também foram realizados a fim de verificar as principais interações desses compostos no sítio ativo de TcTS (CAMPO et al., 2012).



(40)
Inibição: 88%

(41)
Inibição: 91%

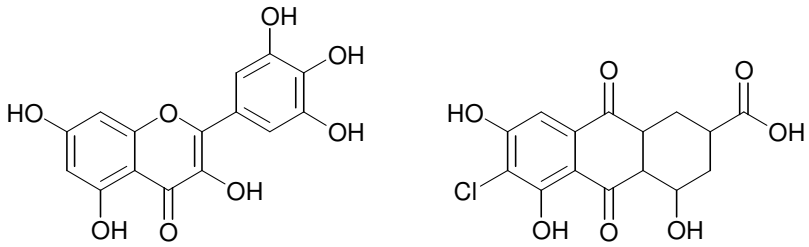
(42)
Inibição: 67%

(43)
Inibição: 69%

Figura 20 - Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos testados em TcTS.

1.2.5.4 Inibidores oriundos de produtos naturais

Considerando a grande diversidade química de produtos naturais, Arioka e colaboradores identificaram derivados de flavonoide e antraquinona com potente atividade inibitória de TcTS (ARIOKA et al., 2010). A partir de triagem biológica de uma biblioteca contendo 2283 produtos naturais, os compostos mais ativos foram **44** (IC_{50} 17,0 µM) e **45** (IC_{50} 0,58 µM) (Figura 21). É importante destacar que o derivado **45** não demonstrou atividade inibitória frente à neuraminidase humana, tornando-o seletivo para TcTS (ARIOKA et al., 2010).



(44) IC_{50} 17,0 uM

(45) IC_{50} 0,58 uM

Figura 21 - Estruturas de derivados de flavonoide e antraquinona como inibidores de TcTS.

1.3 Química de carboidratos

Os carboidratos constituem a classe de moléculas mais abundante, diversa e complexa da natureza e podem ser encontrados nos sistemas biológicos como monossacarídeos, oligossacarídeos e glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos etc). Essas características, bem como suas diversas funções nos organismos vivos, justificam a importância de estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas. (NICOLAOU; MITCHELL, 2001; WERZ; SEEBERGER, 2005).

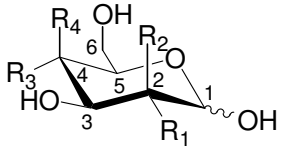
Com relação à química, a síntese de oligossacarídeos apresenta dois pontos cruciais: i) a obtenção de produtos com estereosseletividade desejada durante reações de glicosilação envolvendo a posição anomérica (C-1) e ii) a diferenciação dos grupos

hidroxílicos, que possuem reatividade similar (SEEBERGER; HAASE, 2000). Por essa razão, a síntese de carboidratos exige o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas das hidroxilas, ocasionando aumento do número de etapas da rota sintética (LINDBERG et al., 2002; JIN et al., 2008).

Por outro lado, a utilização de enzimas (glicosiltransferases, glicosidases, lipases etc) é uma alternativa à síntese tradicional de carboidratos, pois reduz ou elimina o emprego de grupos protetores e conduz à formação de ligações glicosídicas de forma estéreo e regioespecífica. Sendo assim, mediante abordagem quimioenzimática é possível obter oligossacarídeos e glicoconjugados com menor número de etapas e maior rendimento (SADDAM, et al., 2009; TOLBORG et al., 2002).

A escolha do grupo protetor e as condições reacionais para introduzi-lo ou removê-lo são fundamentais durante o planejamento sintético, uma vez que as reações devem ser químio, régio ou estereosseletivas. As classes de grupos protetores mais comuns em carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres (benzila, tritila e allila) e éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila - TBDPS) (PEI et al., 2007).

Além disso, a reatividade das hidroxilas do açúcar deve ser levada em consideração (Figura 22). As duas hidroxilas mais reativas nas piranoses são a primária e a anomérica, porém não existe uma regra geral para discriminar a reatividade das outras hidroxilas secundárias, uma vez que dependem da configuração em que estão no anel (axial ou equatorial) e também dos reagentes e condições reacionais. Contudo, sabe-se que as hidroxilas em equatiorial são estericamente mais acessíveis em relação às axiais e por isso tendem a reagir mais rapidamente (FERRIER; COLLINS, 1996; PÉTURSSON, 1997).



R_1= H, R_2=OH, R_3=OH, R_4=H manose

R_1= OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=H glicose

R_1= OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH galactose

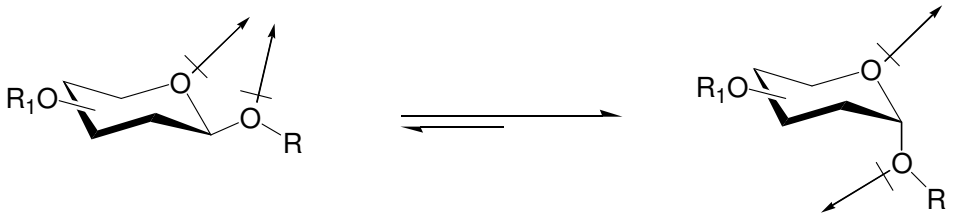
hidroxila primária, hidroxila anomérica, demais hidroxilas secundárias

← aumento da reatividade

Figura 22 - Estrutura química de algumas piranoses e reatividade de suas hidroxilas.

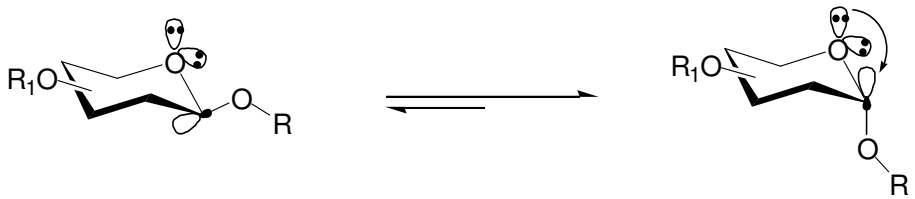
De maneira geral, os grupos protetores mais volumosos (TBDPS, TBDMS, tritila, tosila etc) protegem de forma regiosseletiva a hidroxila primária, que é mais reativa que as secundárias, e também podem ser removidos de forma seletiva (FERRIER; COLLINS, 1996; PÉTURSSON, 1997).

Em relação à hidroxila anomérica é importante destacar o conceito do efeito anomérico, que pode ser entendido como um efeito estereoeletrônico que descreve a tendência de um substituinte, adjacente ao heteroátomo do anel tetraidropirano, preferir orientação axial ao invés da equatorial. Quando o substituinte está na posição equatorial, ocorre alinhamento dos vetores de momento de dipolo causando repulsão entre os oxigênios. Por outro lado, quando o substituinte está na posição axial os vetores de momento de dipolo ficam opostos, representando um sistema energeticamente favorecido por não haver repulsão (Esquema 3) (JUARISTI; CUEVAS, 1992; DA SILVA, 2011).



Esquema 3 - Representação dos dipolos alinhados e opostos nas posições β e α, respectivamente.

Uma explicação alternativa e bastante aceita é a existência de estabilização eletrônica (hiperconjugação) entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio do anel e o orbital sigma antiligande da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons está em posição antiperiplanar ao LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) da ligação axial (Esquema 4). É importante ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente. (CAREY; SUNDBERG, 2000; DA SILVA, 2011).



Esquema 4 - Influência dos elétrons do oxigênio no orbital antiligante da ligação axial.

Em relação às hidroxilas secundárias de piranosídeos, uma estratégia muito aplicada é a proteção com acetais. Uma propriedade importante desses grupos protetores é a formação de anéis de 5 membros (isopropilideno) ou 6 membros (benzilideno) na presença de hidroxilas vicinais (Figura 23). Dessa forma, as hidroxilas das posições 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) são protegidas de forma simultânea, seletiva e com alto rendimento (PÉTURSSON, 1997).

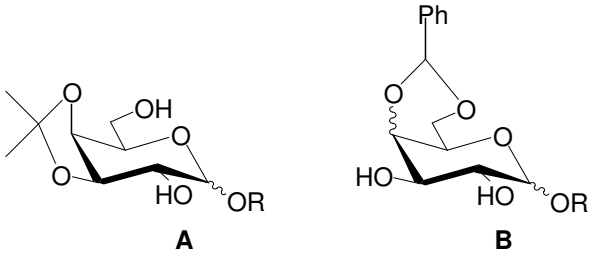


Figura 23 - Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) com cetais e acetais.

No caso da estrutura **A**, a diferença de reatividade entre a hidroxila primária (C-6) e secundária (C-2) fica evidenciada, o que facilita a proteção de uma em detrimento da outra. Em **B**, a diferença de reatividade pode ser atribuída à existência de ligações de hidrogênio

internas (LHI), que alteram bastante sua acidez (Figura 24). Como Ha está envolvido na LHI, este se torna menos ácido que Hb, logo Hb pode ser desprotonado primeiro por uma base. Uma vez desprotonada a hidroxila em C-3, a LHI diminuirá ainda mais a acidez do hidrogênio Ha, o que amplifica a discriminação das duas hidroxilas, levando a um alto nível de regiosseletividade (WANG et al., 2004).

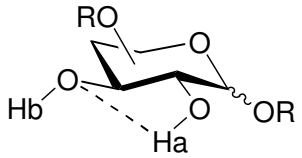


Figura 24 - Efeito da ligação de hidrogênio interna em dióis de piranosídeos.

Outra estratégia para diferenciar reatividade de hidroxilas secundárias em piranosídeos é a utilização de óxido de dibutilestanho (DBTO). Reagente muito usado em química de carboidratos, o DBTO forma derivados estanilenos cíclicos nas posições 2,3 (**C**, **D**), 3,4 (**E**) e 4,6 (**F**) (Figura 25) que aumentam a nucleofilicidade de um dos átomos de oxigênio envolvidos resultando em reações de alquilação, acilação e sulfonação regiosseletivas. Contudo, sabe-se que fatores como quantidade de DBTO, natureza do grupo protetor, presença de nucleófilo, polaridade do solvente e posição da hidroxila no anel influenciam no resultado final dessas reações (FERRIER; COLLINS, 1996; GRINDLEY, 1998; DONG et al., 2007).

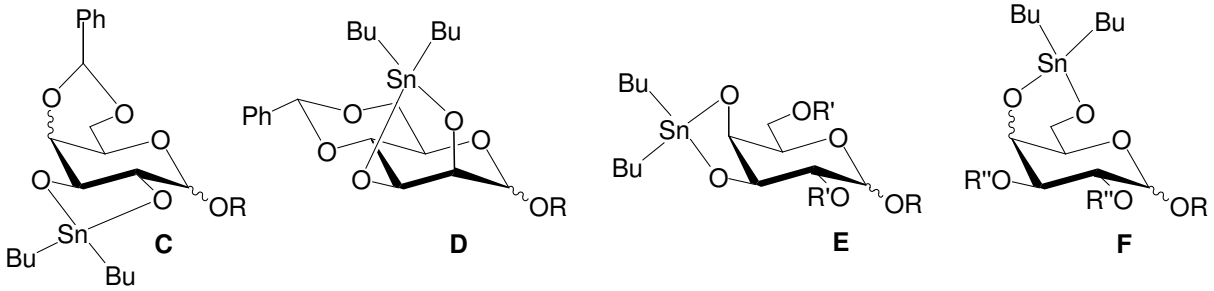


Figura 25 - Formação de estanilenos cíclicos em alguns piranosídeos.

Como citado anteriormente, o maior desafio na síntese de carboidratos não está relacionado apenas ao controle estereosseletivo de reações de glicosilação na posição anomérica, mas também à obtenção estratégica de unidades monossacarídicas com uma posição livre (grupo hidroxila) em relação às demais posições protegidas (WANG et al., 2007). Contudo, diante da imensa variedade de grupos protetores utilizados em química orgânica e dos diversos tipos de monossacarídeos, seria praticamente impossível abranger todos os casos descritos na literatura. Adicionalmente, existem vários métodos, condições e reagentes que são específicos para determinar seletividade de hidroxilas de muitos monossacarídeos.

1.4 Modelagem molecular

Desde a concepção de um alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, processo que pode levar em média 11 anos ou mais, o uso de ferramentas computacionais, como bioinformática e química computacional (genericamente citada como modelagem molecular), tem se tornado indispensável no planejamento racional de novos fármacos. Com alguns casos de sucesso envolvendo o emprego de métodos computacionais, de acordo com Manuel Peitsch, da Novartis Institutes for BioMedical Research, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é totalmente dependente de métodos computacionais (MARSHALL, 2004; PEITSCH, 2004).

O planejamento racional de fármacos consiste no uso de um conjunto de ferramentas que auxiliam em decisões racionais durante as etapas do processo de descoberta (ZOETE et al., 2009). O planejamento baseado na estrutura e no mecanismo de ação é o método mais eficiente e menos dispendioso para o desenvolvimento de novos fármacos; capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “lead compounds”), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e efeitos colaterais) e elaboração de compostos candidatos a testes clínicos (MARSHALL, 2004).

Este método é baseado na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA) associados a diferentes doenças. A informação estrutural do biorreceptor (e ligantes) permite a descoberta e o planejamento de síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem se tornar fármacos e ser introduzidos na terapêutica (MARSHALL, 2004).

Dentre as ferramentas utilizadas no planejamento racional, destaca-se o "docking" molecular. Através desse método, são investigadas possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um biorreceptor, ou simplesmente entre duas moléculas, tal como é o caso da interação entre proteína-proteína ou proteína-DNA, caracterizando o "docking" macromolecular. O "docking" molecular proporciona conhecimento básico das interações que ocorrem entre o ligante e seu receptor, demonstrando uma estimativa de afinidade importante para posterior otimização do ligante (ZOETE et al., 2009).

Os métodos de "docking", em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligação de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações de um ligante, segundo uma lista de "score" de energia. Dessa forma, a ideia geral contida nas técnicas de "docking" é a de gerar um leque de conformações do complexo ligante-proteína e ordená-las por "score" com base em suas estabilidades (ALONSO et al., 2006).

As versões dos programas de maior sucesso em "docking", FlexE (SYBYL USER GUIDE, 2005), GOLD (PFEIFFER-MAREK et al., 2003) e GLIDE (FRIESNER et al., 2004; HALGREN et al., 2004), consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. A partir desse método, é possível selecionar por triagem virtual compostos de bases de dados contendo tipicamente milhares de estruturas, eliminando compostos não promissores antes que eles sejam sintetizados.

A triagem virtual é utilizada para a seleção de novos protótipos, e a literatura tem reportado diversos casos de sucesso com o uso desse método, tal como a descoberta de

isoflavonoides como inibidores não-esteroidais da 5α-redutase, utilizando "constraint" farmacofórica (BRENK et al., 2003; CHEN et al., 2001). O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se definem os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. Dessa forma, a análise por métodos computacionais dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão (MARSHALL, 2004).

Um diferente e robusto método de planejamento racional de fármacos, agora direcionado à otimização "in silico" de protótipos, consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas, as quais se aproximam uma da outra gerando os campos de interação molecular ("Molecular Interaction Field" - MIF). Os MIFs descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo químico de prova que se move confinado ao interior de um "grid" 3D, o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo molecular (o sítio ligante). As diferentes provas que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura (INSIGHT II USER GUIDE, 2005).

Em relação ao processo de descoberta de novos fármacos, já é possível estimar propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e propriedades "drug-like" ou "lead-like" de diferentes compostos, selecionando, durante as diversas etapas da modelagem, somente aqueles com potencial de serem fármacos. Assim, propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditas a partir de triagem em bancos de dados contendo informações específicas, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos (TESTA et al., 2005). Dentre os programas mais utilizados para esses fins, destacam-se o Meteor (predições de metabolismo) e Derek (predições de toxicidade).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto envolvem:

i) síntese de potenciais inibidores miméticos de substratos duplos da enzima *trans*-sialidase (Figura 26) preparados a partir da introdução de moléculas, com função carboxila, ligadas na posição C-3 de uma unidade de β-D-galactopiranosídeo de metila.

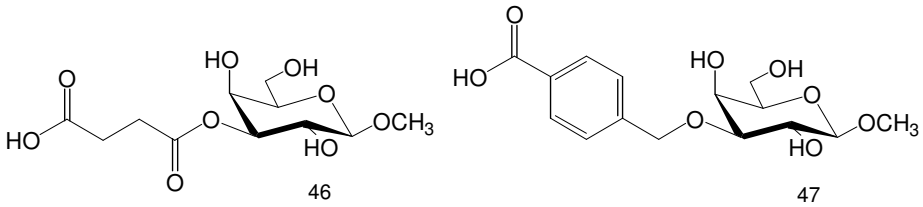


Figura 26 - Estrutura dos compostos inicialmente propostos como inibidores miméticos de substratos duplos de TcTS.

ii) busca de inibidores de TcTS a partir de triagem virtual, baseada na estrutura da enzima, em diferentes bases de compostos com propriedades de fármacos.

iii) ensaio de inibição da enzima *trans*-sialidase com os compostos sintetizados **46** e **47** e com as moléculas mais promissoras das triagens virtuais.

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Justificativa

A síntese de substratos glicopeptídicos e de aminoácidos glicosilados para estudo da relação estrutura - função de *trans*-sialidase foi realizada em trabalho de mestrado e doutorado desenvolvidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP por Vanessa Leiria Campo; processos FAPESP nº 02/03419-8, 04/03414-1 e 01/11943-6 (pesquisa); e na Universidade de East Anglia (UEA – Inglaterra), durante a realização de estágio de doutorado sanduíche (processo CAPES BEX1906/05-4) de Vanessa Leiria Campo e pós-doutorado (processo FAPESP nº 00/06522-9) de Ivone Carvalho.

Os estudos de simulações de "docking" de alguns compostos sintetizados pelo grupo foram realizados no sítio aceptor de TcTS, considerando que tais compostos são aceptores de ácido siálico e, portanto, mimetizam a molécula de lactose. A Figura 27 mostra o resultado da simulação de "docking" realizada com um dos compostos. A análise deste "docking" permitiu observar a manutenção das ligações de hidrogênio das hidroxilas em C-3 e C-4 deste composto com o resíduo de Asp 59 (2,29 e 3,03 Å), além de uma interação adicional entre o grupo acetamido e o resíduo de Arg 311 (2,78 Å). O que é desejável para se obter a mesma orientação do substrato natural lactose dentro do sítio.

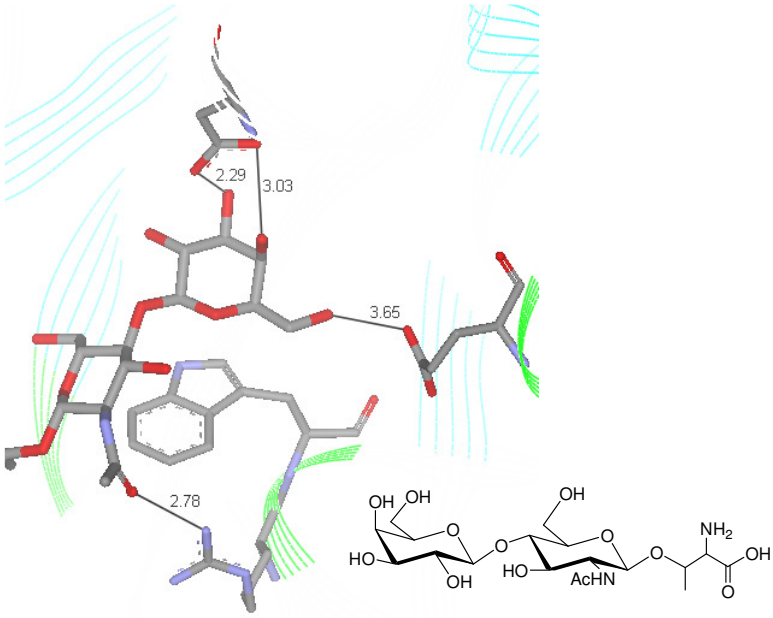


Figura 27 - Simulação de "docking" de um derivado de lactose, sintetizado pelo grupo, com o sítio aceptor de TcTS.

Com base nas análises das interações com o sítio ativo de TcTS do substrato lactose (código PDB: 1MS9), do inibidor DANA (código PDB: 1MS8) e nos resultados das simulações de "docking" dos compostos já sintetizados e ainda não sintetizados, foi possível sugerir inicialmente quais as possíveis modificações estruturais destes substratos galactosídicos levariam à obtenção de potenciais inibidores de TcTS, como mostra o exemplo da Figura 28.

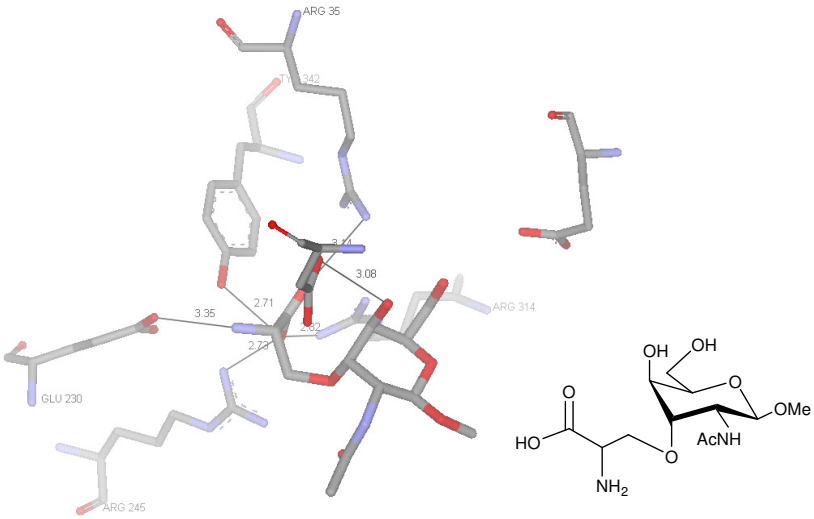


Figura 28 - Simulação de "docking" de um derivado de galactose no sítio aceptor de TcTS.

A análise das simulações de “docking” mostrou que a ligação do aminoácido serina na posição 3 mantém a ligação de hidrogênio da hidroxila em C-4 com Asp 59 e conduz a interações com a tríade de argininas (Arg 35, Arg 245 e Arg 314) e com os resíduos Tyr 342 e Glu 230. Desta forma, este composto foi capaz de realizar interações tanto no sítio aceptor (carboidrato) como também no sítio doador (aminoácido) de TcTS.

De uma maneira geral, os resultados preliminares de modelagem molecular apontam para propostas que envolvam a presença de uma molécula adequada na posição C-3 de uma unidade de carboidrato conduzindo à formação de um substrato duplo, capaz de mimetizar um produto final da reação de sialilação por TcTS. Sendo assim, a região do sítio catalítico reservada ao ácido siálico deverá ser ocupada por uma molécula mais simples que o ácido siálico, mas que contenha função carboxila em sua estrutura (aminoácido, ácido succínico, ácido benzoico etc), enquanto que a região do sítio catalítico reservada ao aceptor deverá ser ocupada pela unidade galactosídica.

3.2 Planejamento sintético

No sentido de evitar algumas etapas de proteção e desproteção necessárias ao se trabalhar com aminoácidos, bem como de facilitar a síntese entre a unidade galactosídica e o ligante com função carboxila, a molécula priorizada neste trabalho foi o ácido succínico. Adicionalmente, é válido ressaltar que a distância intramolecular do ácido succínico (5,64 Å) é próxima à distância encontrada na serina (4,94 Å) (Figura 29).

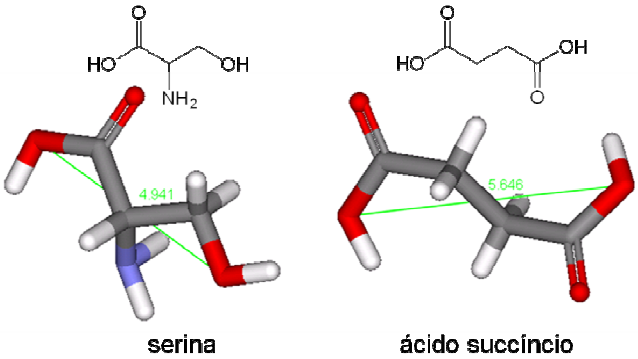
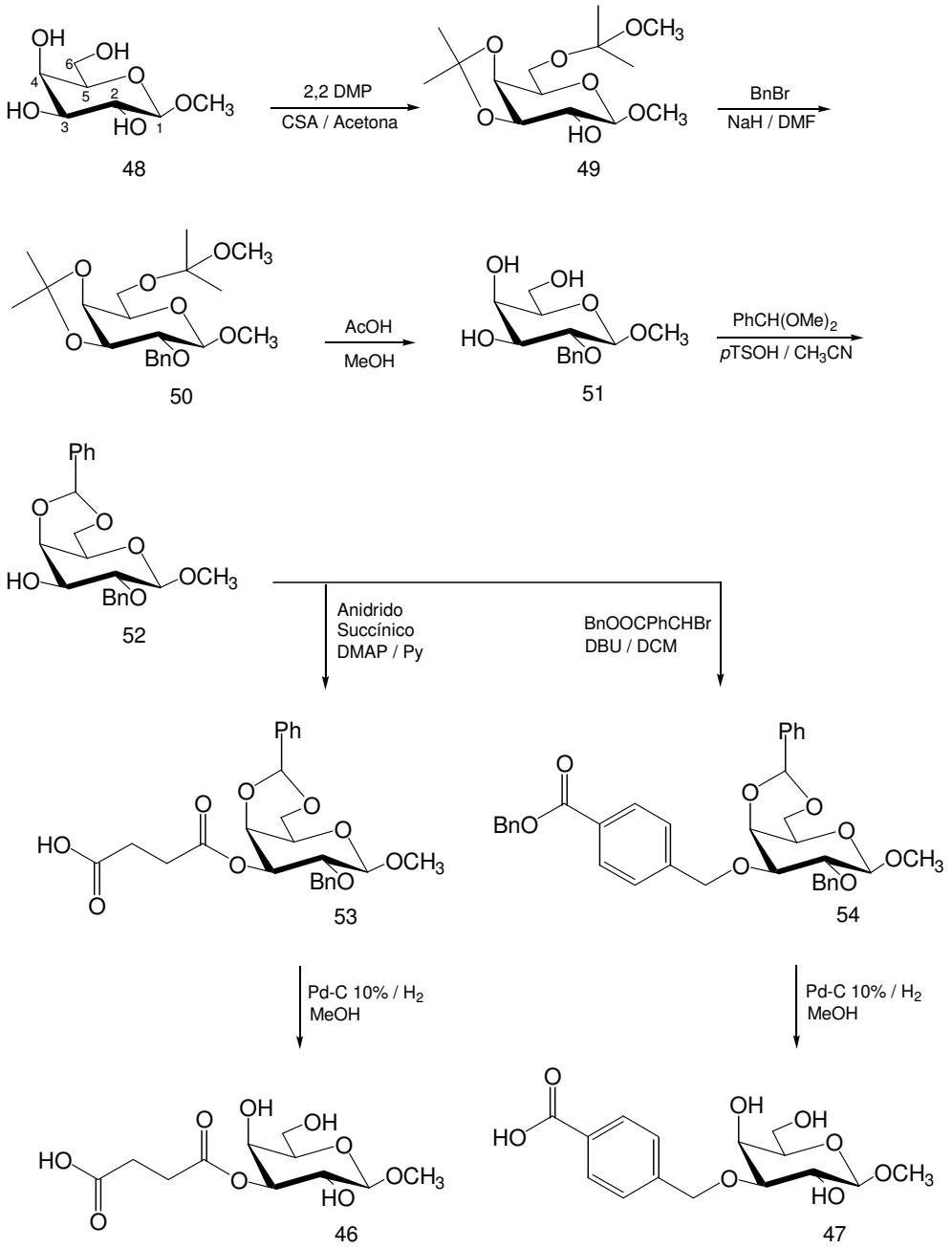


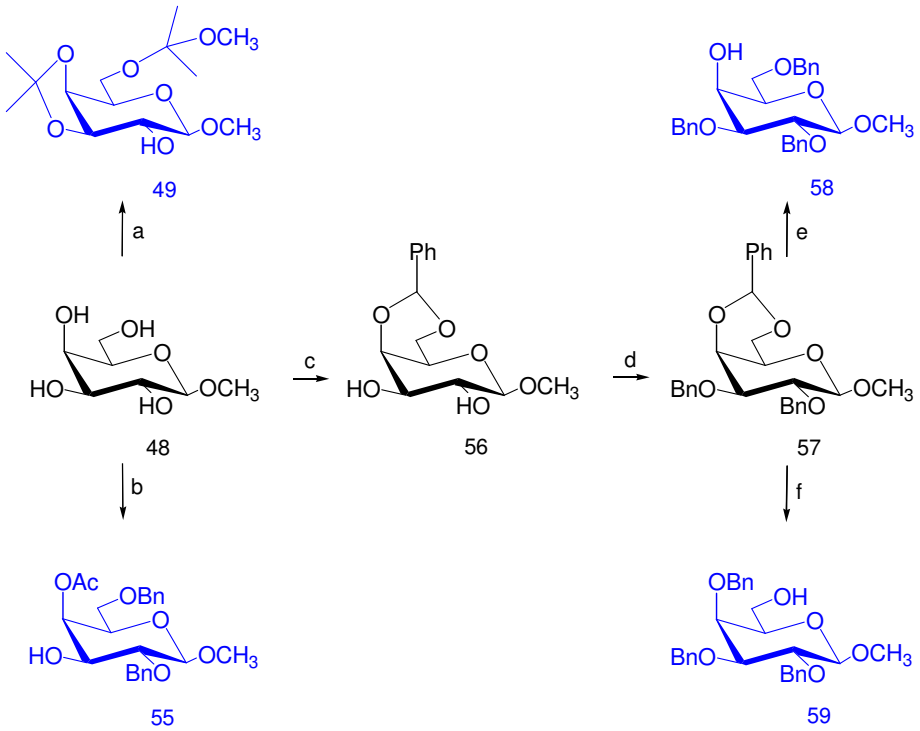
Figura 29 - Comparação das distâncias intramoleculares entre serina e ácido succínico.

A fim de alcançar os objetivos iniciais deste projeto, foi planejada uma rota sintética a partir do açúcar comercial β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**) que permitisse funcionalização apenas da hidroxila em C-3 do anel através da introdução das moléculas propostas inicialmente (ácido succínico e benzoico). No entanto, a necessidade de empregar algumas etapas de proteção e desproteção seletivas não resultou em uma rota curta (Esquema 5).



Esquema 5 - Proposta inicial para síntese dos compostos **46** e **47**.

Por outro lado, a continuação da pesquisa bibliográfica foi de fundamental importância para expansão dos objetivos iniciais, isto é, das moléculas a serem sintetizadas e da rota através da qual as mesmas poderiam ser obtidas. Ao considerar rotas sintéticas mais curtas (Esquema 6), todas as hidroxilas do açúcar β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**) poderiam ser exploradas individualmente com a introdução de ácido succínico para fins comparativos de atividade biológica.



a) 2,2 DMP, *p*-TSOH b) i) trietil ortoacetato, *p*-TSOH, CH_3CN ii) BnBr, NaH iii) 1,0 M HCl
c) $Bn(OCH_3)_2$, I_2, CH_3CN d) BnBr, NaH, DMF e) $NaBH_3CN$, TFA, THF, 0 °C
f) $LiAlH_4$, $AlCl_3$, DCM, Et_2O, 50 °C.

Esquema 6 - Etapas da nova estratégia de síntese dos intermediários com hidroxila livre nas posições C-2 (**49**), C-3 (**55**), C-4 (**58**) e C-6 (**59**).

Dessa forma, a avaliação da atividade biológica de derivados de β-D-galactopiranosídeo de metila contendo ligantes em cada uma das posições poderia permitir o estabelecimento da relação entre três fatores: i) posição do ligante no açúcar, ii) natureza do ligante e iii) nível de inibição da enzima *trans*-sialidase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

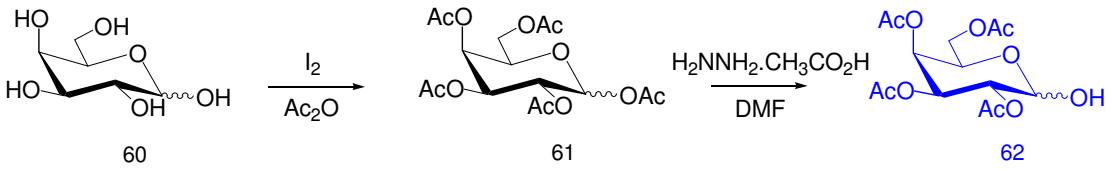
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão deste trabalho foi dividida em três partes principais: na primeira parte é descrita a síntese de compostos obtidos pela funcionalização regiosseletiva de diferentes posições do anel a fim de obter hidroxilas livres e também devidamente funcionalizados para obtenção dos respectivos derivados com ácido succínico. A segunda parte está relacionada aos estudos de modelagem molecular, que envolveram mapeamento do sítio ativo, derivação do padrão farmacofórico dos inibidores mais ativos descritos na literatura e triagem virtual baseada na estrutura de TcTS. Finalmente, a terceira parte deste trabalho diz respeito ao ensaio de inibição de TcTS e ao ensaio de atividade tripanocida e citotóxico.

4.1 Síntese

4.1.1 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-1

Com objetivo de explorar a posição anomérica, foi proposta uma rota sintética com duas etapas a partir do açúcar comercial D-galactose (**60**) (Esquema 7), pois o açúcar comercial β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**) apresenta essa posição protegida.



Esquema 7 - Etapas da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-1 (**62**).

A rota foi iniciada com per-*O*-acetilação do material de partida **60** em anidrido acético (solvente e reagente) e iodo para obtenção de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D-

galactopiranose (**61**) com rendimento de 96% (dentro do esperado) (KARTHA; FIELD, 1997). O procedimento adotado levou à formação do composto **61** como mistura de anômeros (proporção α/β 5:1), pois no espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais correspondentes a H-1 do anômero α ($J_{1,2}$ 1,7 Hz) e a H-1 do anômero β ($J_{1,2}$ 8,3 Hz). Adicionalmente, foram observados os sinais característicos dos hidrogênios dos grupos acetila (cinco simpletos na região de 2 ppm).

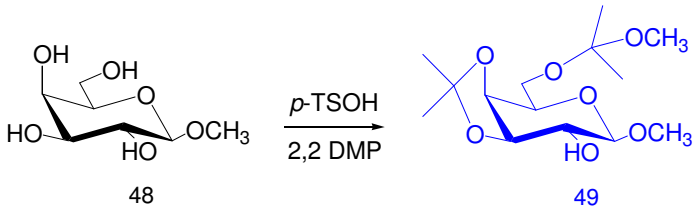
O composto **61** foi tratado com hidrazina acética em DMF com objetivo de remover seletivamente o grupo acetila da posição anomérica para obtenção de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranose (**62**) com rendimento de 70%. O rendimento dessa etapa foi considerado satisfatório tendo em vista os resultados apresentados na literatura (80%) (REN et al., 2001).

O procedimento adotado levou à formação do composto **62** como mistura de anômeros (proporção α/β 3:1), uma vez que no espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais correspondentes a H-1 (tripleto em 5,53 ppm) do anômero α ($J_{1,2}$ 3,5 Hz) e a H-1 (dupleto em 3,66 ppm) do anômero β ($J_{1,2}$ 9,1 Hz). Também foram observados sinais característicos dos hidrogênios dos grupos acetila (quatro simpletos na região de 2 ppm). Adicionalmente, o espectro na região do infravermelho (Anexo 1) apresentou uma banda característica de grupo hidroxila em 3485 cm^{-1}. Portanto, o intermediário com hidroxila livre em C-1 (**62**) foi obtido com bom rendimento global (77%) e sem problemas de síntese e purificação.

4.1.2 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-2

Com objetivo de explorar a posição 2, foi proposta uma rota com apenas uma etapa (Esquema 8). De acordo com a literatura (BARILI et al., 1986), a proteção seletiva e temporária da função álcool com acetona ou seus derivados, através da formação de anéis isopropilideno e 1,3-dioxano, é um procedimento bem estabelecido em síntese orgânica, em

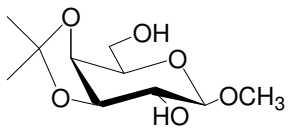
particular em química de carboidratos. Apesar da reação ser muito seletiva devido ao impedimento estérico em torno da posição 2 (causado pelo grupo ligado na posição anomérica), alguns subprodutos estruturalmente diferentes podem ser formados a partir de um único açúcar, dependendo do reagente e das condições de reação (BARILI et al., 1986; BARILI et al., 1992).



Esquema 8 - Etapa da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-2 (**49**).

Sendo assim, a síntese foi realizada através da eterificação do material de partida comercial **48** com 2,2 dimetoxipropano (solvente e reagente) e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico para obtenção de 3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(1-metoxi-1-metiletil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**49**) com rendimento de 40%. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 2) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metílicos do anel isopropilideno (simpletos em 1,52 e 1,34 ppm), bem como dos hidrogênios metoxílicos (simpleto em 3,24 ppm) e metílicos (simpletos em 1,37 e 1,36 ppm) do grupo metoxiisopropil (MIP).

Apesar do intermediário desejado **49** ter sido sintetizado, este resultado não foi considerado satisfatório, pois o rendimento apresentado na literatura foi de 84% (BARILI et al., 1990). O baixo rendimento pode ser explicado pela desproteção da hidroxila 6 (perda do grupo MIP) no próprio meio reacional ácido, uma vez que a desproteção da hidoxila 6 ocorre preferencialmente em relação às hidroxilas 3 e 4. Sendo assim, o produto majoritário (50%) obtido nas primeiras reações foi o composto 3,4-*O*-(1-metiletilideno)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**63**) (Figura 30). No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metílicos do anel isopropilideno e ausência dos hidrogênios metoxílicos e metílicos do grupo MIP.



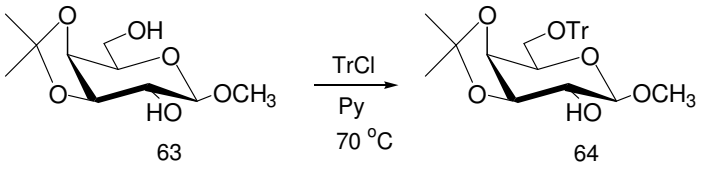
63

Figura 30 - Produto majoritário obtido na tentativa de síntese do intermediário com hidroxila livre em C-2.

A fim de contornar o problema de baixo rendimento, foi observado na literatura (BARILI et al., 1986) que os melhores rendimentos tinham sido obtidos a partir de uma solução diluída (50,0 mM) do açúcar β-D-galactopiranosídeo de metila em 2,2 DMP. Dessa forma, a reação de proteção foi realizada com maior proporção de 2,2 DMP e menor concentração de ácido (0,1 equivalentes ao invés de 0,2) para evitar a clivagem do grupo MIP (procedimento 2 descrito na seção de métodos), resultando na formação do intermediário com hidroxila livre em C-2 (**49**) com rendimento de 90%.

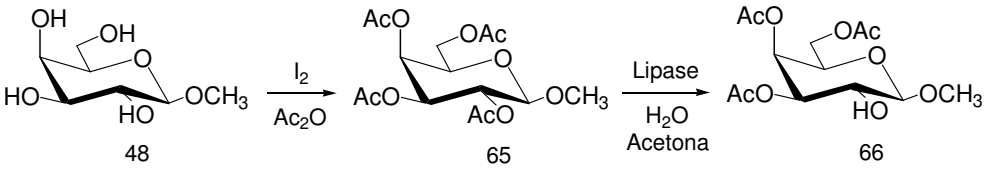
Em virtude da instabilidade do grupo protetor MIP, uma forma alternativa de sintetizar o derivado desejado com hidroxila livre em C-2 foi realizar a proteção da posição 6 do composto **63** com um grupo mais estável. Éteres de tritila e sililа apresentam algumas características particulares, como: fácil introdução, boa estabilidade frente a várias condições e desproteção em apenas uma etapa (KOMIOTIS et al., 2006). Adicionalmente, os grupos tritila (Tr) e dimetoxitritila (DMTr) têm sido os mais empregados na proteção regiosseletiva de hidroxilas primárias em química de carboidratos e nucleosídeos (MALIK; KARTHA, 2009).

Dessa forma, o composto 3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**64**) foi obtido com rendimento de 47% por tritilação do composto **63** com cloreto de tritila em piridina (KOMIOTIS et al., 2006) (Esquema 9). No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 3) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metílicos do anel isopropilideno e dos hidrogênios aromáticos do grupo tritila (multipletos na região de 7 ppm).



Esquema 9 - Proteção regiosseletiva da posição 6 do composto **63** fornecendo **64**.

Além da síntese dos intermediários **49** e **64**, houve também interesse em testar um método de desacetilação regiosseletiva com a enzima triacilglicerol lipase, apesar da literatura encontrada utilizar lipase de fungo (POUYSÉGU et al., 2002). Sendo assim, foi proposta uma rota sintética com duas etapas a partir do açúcar comercial **48** (Esquema 10).



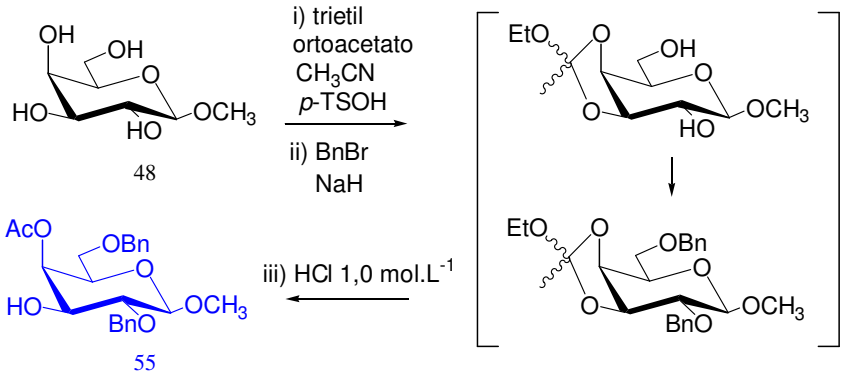
Esquema 10 - Nova rota para síntese de outro intermediário com hidroxila livre em C-2.

A síntese foi realizada através de per-*O*-acetilação do material de partida comercial **48** em anidrido acético e iodo para obtenção de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**65**) com rendimento de 92% (KARTHA; FIELD, 1997). Posteriormente, o composto **65** foi submetido à desacetilação regiosseletiva na presença de lipase em mistura de água e acetona para formação do composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**66**) com rendimento de 32%. Apesar do baixo rendimento, o método foi promissor e permite que alguns parâmetros sejam alterados para obtenção de melhores rendimentos.

No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 4) foram observados três simpletos com integral relativa a nove hidrogênios correspondentes aos grupos acetila (região de 2 ppm). Adicionalmente, o deslocamento do sinal correspondente a H-2 para campo mais alto (duplo dupleto deslocado de 5,20 ppm para 3,77 ppm) quando comparado ao material de partida **65**, indicou a clivagem do grupo acetila na posição 2.

4.1.3 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-3

Com objetivo de explorar a posição 3, foi proposta uma rota com três etapas, mas com vantagem de ser feita em "one pot" (MUKHOPADHYAY; FIELD, 2003) (Esquema 11).

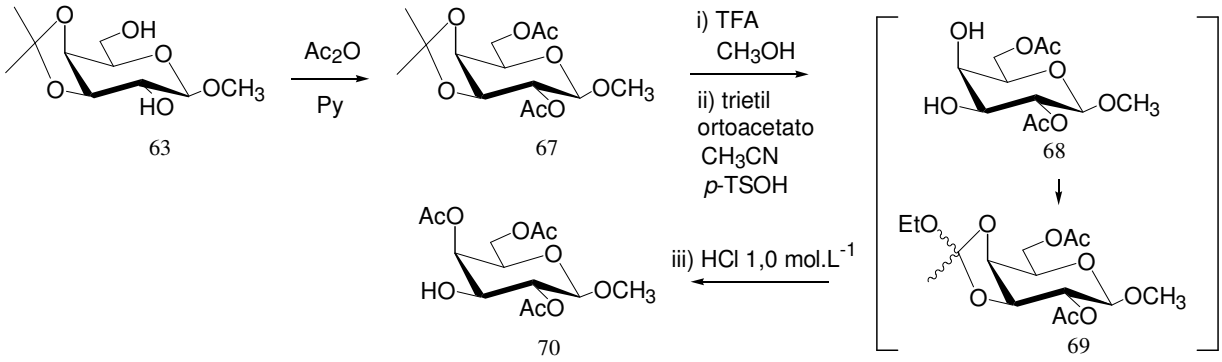


Esquema 11 - Etapas da síntese do intermediário com hidroxila livre em C-3 (**55**).

A síntese foi realizada através da eterificação do material de partida comercial (**48**) com ortoacetato de trietila e quantidade catalítica de ácido em acetonitrila para proteção das hidroxilas 3 e 4 e, no mesmo meio reacional, as hidoxilas 2 e 6 foram benziladas. A mistura foi diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) para obtenção de 4-acetil-2,6-di-*O*-(fenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**55**) com rendimento de 16%. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 5) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos e benzílicos (dupletos, J_{AB} 11,3 Hz, na região de 4,94 a 4,47 ppm) dos grupos benzila e dos hidrogênios do grupo acetila (simpleto em 2,06 ppm).

Como o rendimento foi insatisfatório quando comparado ao da literatura (74%) (MUKHOPADHYAY; FIELD, 2003), algumas condições reacionais foram alteradas. Inicialmente, apenas o tempo de reação foi variado (1 hora para 2 horas), mas o rendimento foi de 10%. Outro parâmetro alterado foi a quantidade do reagente ortoacetato de trietila (de 1,5 equivalentes para 3 equivalentes), mas o rendimento permaneceu baixo (15%). Apesar dos esforços, não foi possível contornar o problema de baixo rendimento dessa rota.

Segundo a literatura (PAULSEN et al., 1985), o composto **70** pode ser sintetizado a partir de **63** em quatro etapas (Esquema 12). De acordo com essa estratégia e considerando a possibilidade de empregar o grupo acetila ao invés do grupo benzila para evitar uma etapa adicional de desproteção, esta rota alternativa foi testada a fim de explorar a posição 3.



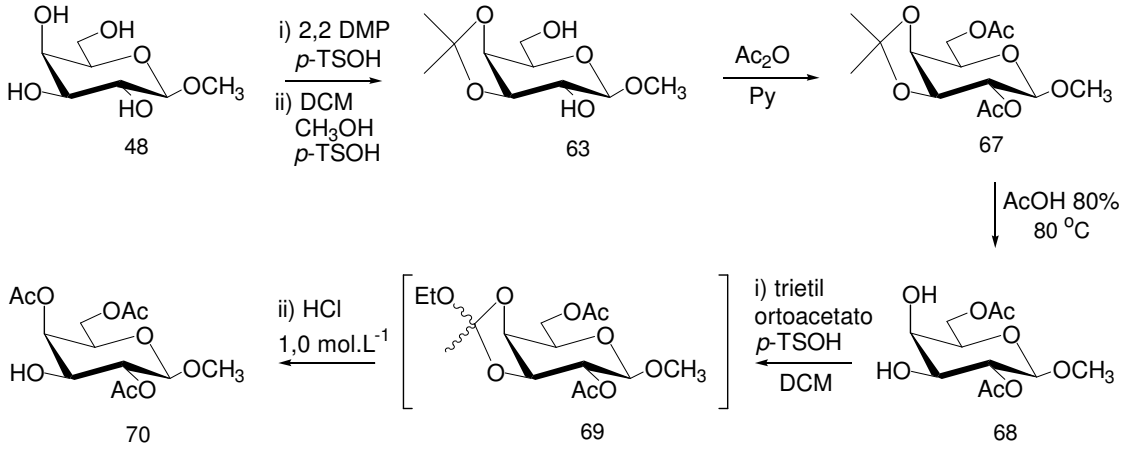
Esquema 12 - Rota alternativa para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-3 (**70**).

A rota foi iniciada com acetilação das hidroxilas 2 e 6 do composto **63** com anidrido acético em piridina para obtenção de 2,6-di-*O*-acetil-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**67**) com rendimento de 90%. Na próxima etapa foi realizada desproteção das posições 3 e 4 do composto **67** através da clivagem do anel isopropilideno na presença de ácido trifluoracético em metanol para formação de **68** (não isolado nessa rota). Após neutralização do meio reacional com Et_3N, foram adicionados acetonitrila, ortoacetato de trietila e quantidade catalítica de ácido para formação do composto **69** (não isolado) pela proteção temporária das posições 3 e 4.

Na sequência, a desproteção da posição 3 ocorreu durante etapa de extração pela presença de ácido (HCl 1,0 mol.L^{-1}) resultando na obtenção de 2,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**70**) com rendimento de 23% (procedimento 1 descrito na seção de métodos). No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 6) foram observados os sinais característicos dos nove hidrogênios dos grupos acetila e ausência dos hidrogênios metílicos do anel isopropilideno. Adicionalmente, foi observado o deslocamento do sinal correspondente a H-3 para campo mais alto (deslocado de 4,37 ppm para região de 3,8

ppm) quando comparado ao material de partida **67**, indicando ausência de grupo protetor na posição 3.

A síntese do composto **70** a partir de **67**, com baixo rendimento, não permitiu avaliar se houve problema na proteção das posições 3 e 4 do composto **68** com ortoacetato de trietila e/ou na desproteção da posição 3 do composto **69**, uma vez que foi feita em "one pot". Sendo assim, a rota foi refeita com objetivo de isolar todos os intermediários reacionais (Esquema 13).



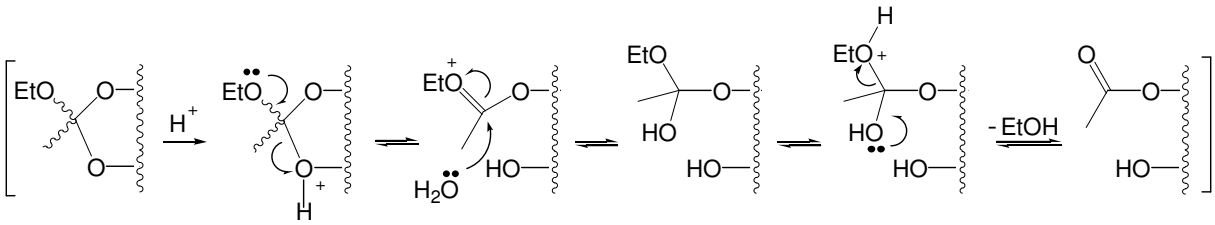
Esquema 13 - Síntese por etapas do composto **68** para estudo de formação de **70**.

A rota foi iniciada com proteção das hidroxilas 3, 4 e 6 de **48** na presença de 2,2 DMP e ácido com subsequente clivagem do grupo MIP na presença de metanol e ácido (BARILI et al., 1986) para formação de **63** (rendimento de 83%), o qual foi acetilado com anidrido acético em piridina para obtenção de **67** com rendimento de 90%. Posteriormente, foi realizada desproteção das posições 3 e 4 (clivagem do anel isopropilideno) de **67** em solução de ácido acético em água (80%) e aquecimento (80 °C) (BARILI et al., 1986) para obtenção de 2,6-di-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**68**) com rendimento de 90% (procedimento 1 descrito na seção de métodos). No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios dos grupos acetila e ausência dos hidrogênios do anel isopropilideno.

O rendimento global da síntese por etapas de **68** a partir de **48** foi considerado satisfatório (67%). No entanto, é importante ressaltar que composto **68** também foi sintetizado praticamente em "one pot" a partir de **48**, isto é, as quatro primeiras etapas mostradas no Esquema 13 foram feitas sem isolamento e purificação (procedimento 2 descrito na seção de métodos). Dessa forma, foi possível reduzir tempo e também manter bom rendimento global (63%) na síntese "one pot" de **68**.

Em seguida, o composto **68** foi tratado com ortoacetato de trietila e quantidade catalítica de *p*-TSOH para proteção das posições 3 e 4 e formação de **69** (não isolado). No entanto, a quantidade de reagente ortoacetato de trietila utilizada foi de 10 equivalentes (procedimento 2 descrito na seção de métodos) (PAULSEN et al., 1985) e não de 6 equivalentes (procedimento 1 descrito na seção de métodos) (MUKHOPADHYAY; FIELD, 2003) e a quantidade de *p*-TSOH (0,1 equivalentes) foi a mesma em ambos procedimentos. Após consumo de todo material de partida em 1 hora, a reação foi neutralizada com Et_3N. Na sequência, ao invés de lavar a fase orgânica com HCl (1,0 mol.L^{-1}), o ácido foi adicionado ao sistema reacional (procedimento 2 descrito na seção de métodos) para rearranjo do ortoéster e desproteção da posição 3 para formação de **70**, com rendimento de 80%.

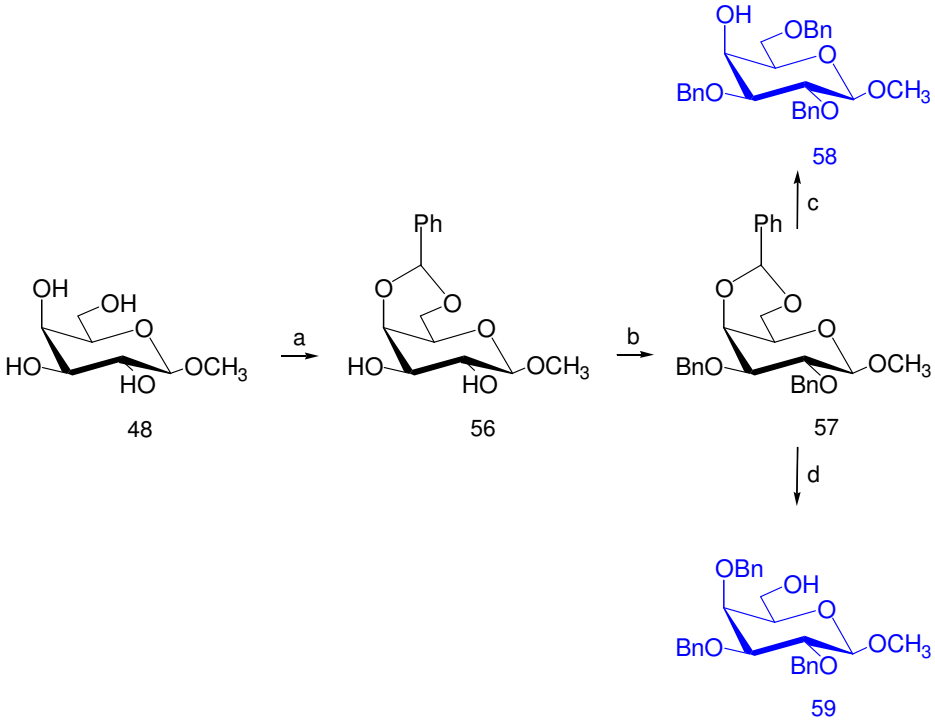
Segundo o mecanismo hidrólise de ortoéster em meio ácido (Esquema 14), após clivagem da ligação pela protonação do oxigêncio em C-3 do açúcar, ocorre ataque de uma molécula de água e subsequente protonação do oxigênio do grupo etil para liberação e de uma molécula de etanol e formação do éster na posição 4 do açúcar.



Esquema 14 - Representação geral do rearranjo do ortoéster em ácido e desproteção da posição 3 do composto **69**.

4.1.4 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-4 ou C-6

Com o objetivo de explorar as posições 4 e 6 separadamente, foi proposta uma rota com três etapas, sendo duas comuns (a, b) e apenas uma diferente (c ou d) (Esquema 15).



a) $Bn(OCH_3)_2$, *p*-TSOH, CH_3CN b) BnBr, NaH, DMF c) $NaBH_3CN$, TFA, THF, 0 ^oC
d) $LiAlH_4$, $AlCl_3$, DCM, Et_2O, 50 ^oC.

Esquema 15 - Rota de síntese de intermediários com hidroxila livre em C-4 (**58**) ou C-6 (**59**).

De acordo com a literatura (ELLERVIK, 2003), um grande número de acetais aromáticos (benzaldeído dimetil acetal, 2-nitro benzaldeído dimetil acetal, benzofenona etc) tem sido usado como grupos protetores em síntese. Esses grupos podem ser facilmente introduzidos sob condições ácidas brandas e, sob condições ácidas rigorosas, podem ser clivados para fornecer um diol. Além disso, sob condições oxidativas ou redutivas fornecem um derivado monoprotegido.

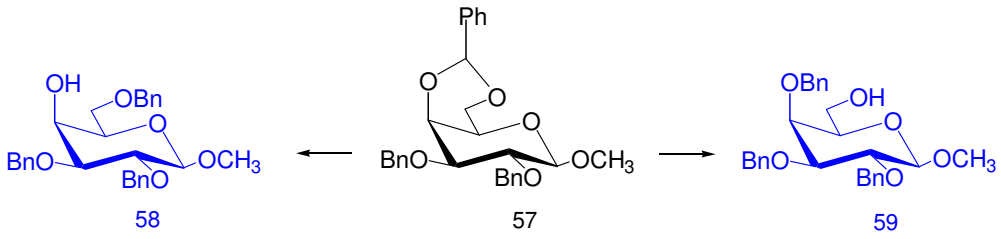
A rota foi iniciada com proteção do material de partida comercial com benzaldeído dimetil acetal e quantidade catalítica de ácido em acetonitrila para obtenção de 4,6-*O*-

(fenilmetileno)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**56**) com rendimento de 63% (LINDBERG et al., 2002). No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos (multipletos na região de 7 ppm) e do hidrogênio metínico do grupo benzilideno (simpleto em 5,55 ppm). Acidionalmente, foi encontrado na literatura (PANCHADHAYEE; MISRA, 2008) outro método cuja vantagem está no alto rendimento, na redução do tempo reacional (de 24 horas para 2 horas) e na quantidade de benzaldeído dimetil acetal (de 5 equivalentes para 1,1 equivalente). Sendo assim, o composto **56** foi sintetizado a partir de benzaldeído dimetil acetal e iodo em acetonitrila com rendimento de 92% (procedimento 2 descrito na seção de métodos).

Posteriormente, **56** foi tratado com hidreto de sódio e brometo de benzila em DMF (OGAWA et al., 1980) para proteção das hidroxilas 2 e 3 resultando na formação de 2,3-di-*O*-(fenilmetil)-4,6-*O*-(fenilmetileno)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**57**) com rendimento de 80%. No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos com integral relativa a três grupos fenila, bem como dos hidrogênios benzílicos (dupletos, J_{AB} 10,6 Hz, na região de 4,91 a 4,74 ppm).

Apesar do bom rendimento, é válido ressaltar que procedimentos (CORSARO et al., 2004) empregando micro-ondas e outros reagentes (KOH e BnBr ou KOH e BnCl) foram testados a fim de reduzir o tempo de reação de 3 horas. Os resultados não foram satisfatórios uma vez que foi observada formação de muitos subprodutos.

A próxima etapa da rota consistiu no estudo da clivagem regiosseletiva do anel benzilideno do composto **57** para obtenção dos intermediários **58** e **59** (Esquema 16).



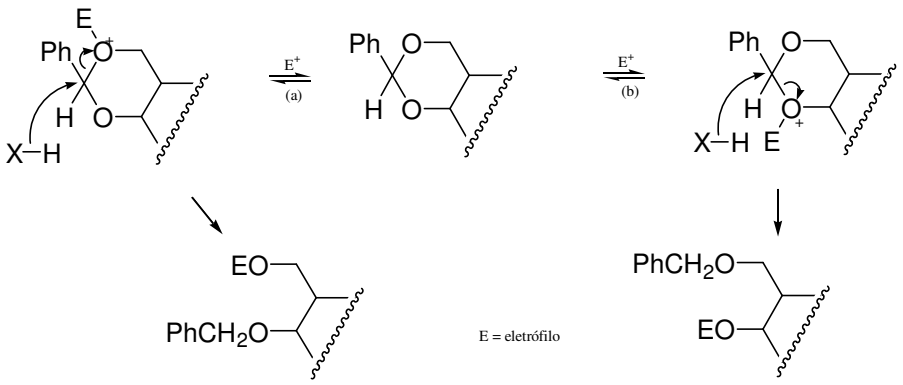
Esquema 16 - Clivagem regiosseletiva do anel benzilideno para obtenção dos intermediários **58** e **59**.

Acetais cíclicos são amplamente utilizados na proteção de dióis em virtude de sua fácil introdução e de sua estabilidade frente a várias condições reacionais. Em química de carboidratos, um dos métodos mais usados é a formação e clivagem do anel 4,6-*O*-benzilideno (STÉVENIN et al., 2010). A clivagem redutiva do anel, formando éter benzílico na posição 4 ou 6, bem como a clivagem oxidativa, formando éster benzílico na posição 4 ou 6, têm sido muito investigadas e vários reagentes têm sido introduzidos para formação de apenas um regioisômero (DARAGICS; FUGEDI, 2009) (STÉVENIN et al., 2010).

Dentre os reagentes mais comuns para síntese do derivado 6-*O*-benzila estão: $NaBH_3CN$-HCl ou Et_3SiH em combinação com TFA, TfOH ou $BF_3.Et_2O$. Por outro lado, a síntese do derivado 4-*O*-benzila pode ser realizada com: $LiAlH_4$-$AlCl_3$, DIBAL-H e BH_3.THF (DARAGICS; FUGEDI, 2009).

De acordo com a literatura (LIPTÁK et al., 1975) a clivagem do anel benzilideno não depende da configuração anomérica nem da natureza do substituinte na posição 2, mas é determinada pela presença de um grupo volumoso (benzila) na posição 3. Segundo outro autor (GAREGG et al., 1982), a direção da clivagem depende também da disposição estérica (exo ou endo) do grupo fenila ligado ao carbono metínico do anel benzilideno.

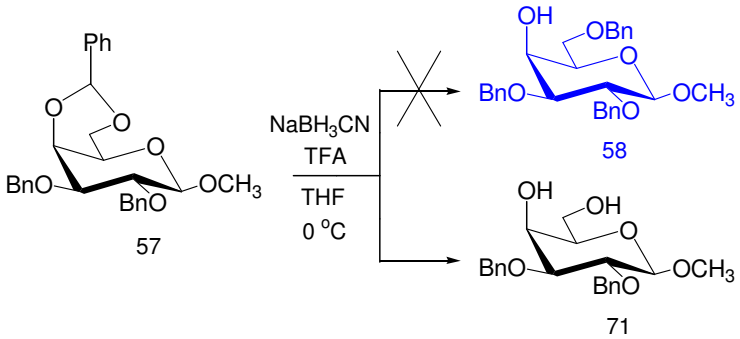
A diferença de regiosseletividade promovida entre $LiAlH_4$-$AlCl_3$ e $NaBH_3CN$-HCl pode estar no fato do ácido de Lewis ($AlCl_3$) ser mais volumoso que o próton (HCl), tendendo a coordenar com o oxigênio da posição 6 (menos impedido estericamente) (direção a) (Esquema 17). A subsequente aproximação e ataque do hidreto ao carbono benzílico leva à formação do derivado 4-*O*-benzila. Por outro lado, como o próton é menos volumoso, o equilíbrio é governado pela diferença de acidez dos oxigênios 4 e 6 (direção b). Dessa forma, é favorecida a formação do derivado 6-*O*-benzila (LEGGETTER; BROWN, 1963) (GAREGG et al., 1982).



Esquema 17 - Mecanismo possível para clivagem regiosseletiva do anel benzilideno.

É válido ressaltar que a regiosseletividade e o rendimento dessas reações podem variar de acordo com material de partida, volume dos grupos vizinhos, tipo de solvente, concentração dos reagentes, temperatura, força e volume do ácido (Bronsted ou Lewis) e presença de traços de água (DARAGICS; FUGEDI, 2009).

Com relação à síntese do intermediário com hidroxila livre em C-4 (**58**), a primeira reação de clivagem regiosseletiva do composto **57** foi realizada com cianoboridreto de sódio e ácido trifluoroacético em THF destilado a 0 °C (ROEN et al., 2003) (Esquema 18).

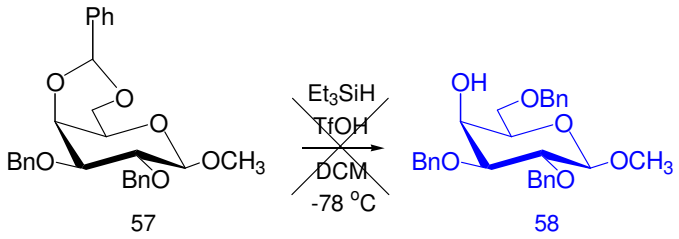


Esquema 18 - Clivagem total do anel benzilideno e formação do composto **71**.

No espectro de RMN ^{1}H do produto isolado foram observados apenas os sinais característicos dos hidrogênios benzílicos e dos hidrogênios aromáticos com integral relativa a dois grupos fenila. Outrossim, a ausência do sinal característico do hidrogênio metínico do grupo benzilideno (simpleto na região de 5 ppm) indica que o composto formado nesse procedimento foi o 2,3-di-*O*-(fenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**71**) (61%).

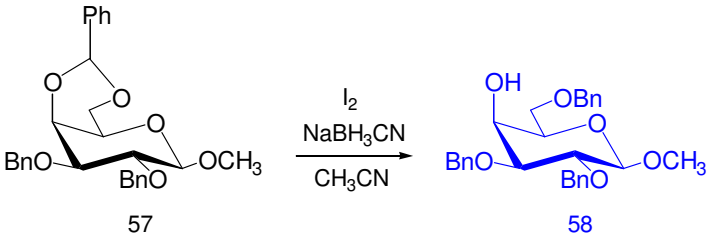
Nesse caso, ácido trifluoroacético foi substituído pelo ácido acético, mas a reação não ocorreu; visto que o acompanhamento por CCD indicou apenas presença do material de partida. Uma alternativa possível (SRIKRISHNA; VISWAJANANI, 1995) foi substituir ácido acético por $BF_3.Et_2O$, mas apenas material de partida e traços do diol (**71**) foram observados. Logo, essas alterações não levaram à formação do produto desejado **58**.

Com objetivo de contornar o problema de clivagem total do anel benzilideno, foi empregado outro método (SAKAGAMI; HAMAMI, 2000) (Esquema 19). A reação foi realizada com trietilsilano (Et_3SiH) e ácido tríflico em DCM e peneira molecular a -78 °C. O tempo descrito para essa reação é de 1 hora, mas durante esse tempo foi observado por CCD que havia exesso de material de partida e traços do diol (**71**). Após várias horas de reação sob as mesmas condições, nenhuma mudança foi observada.



Esquema 19 - Nova tentativa de clivagem regiosseletiva para síntese do intermediário **58**.

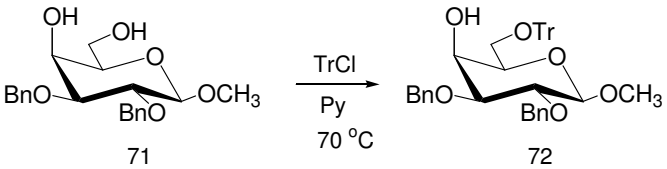
Ainda com objetivo de solucionar o problema de clivagem total do anel benzilideno, foi testado um método que utiliza cianoboridreto de sódio e iodo em acetonitrila destilada e peneira molecular (RAO et al., 2010) (Esquema 20). Esse procedimento levou à formação do produto desejado 2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**58**) com rendimento de 22%. O acompanhamento por CCD indicou consumo do material de partida e formação do diol **71** (75%). Apesar da reação ter sido repetida em condições mais brandas para evitar clivagem total do anel (banho de gelo e adição lenta de iodo) não foi possível aumentar o rendimento dessa etapa.



Esquema 20 - Síntese do intermediário com hidroxila livre em C-4 (**58**).

No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 7) foram observados ausência do sinal característico do hidrogênio metínico do grupo benzilideno e o deslocamento do sinal correspondente a H-4 para campo mais alto (dupleto deslocado de 4,12 ppm para 4,04 ppm) quando comparado ao material de partida **57**, indicando a clivagem do grupo benzilideno na posição 4. Adicionalmente, foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos com integral relativa a três grupos fenila e também dos hidrogênios benzílicos.

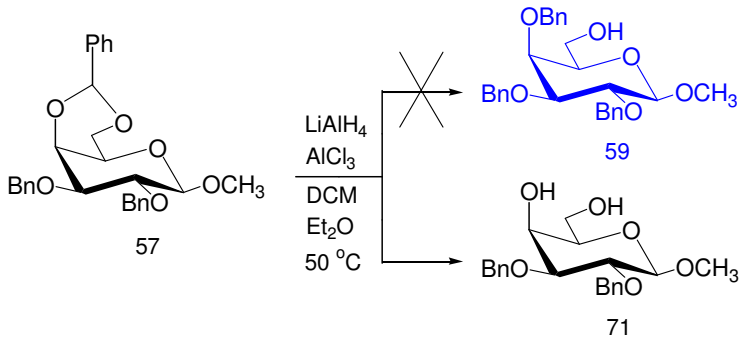
Apesar desse método ter sido promissor, o composto **71** foi utilizado como material de partida na proteção seletiva da hidroxila primária (posição 6) em detrimento da hidroxila secundária (posição 4) por tritilação com cloreto de tritila e piridina (KOMIOTIS et al., 2006) (Esquema 21).



Esquema 21 - Etapa alternativa para síntese do intermediário com hidroxila livre em C-4 (**72**) a partir do composto **71**.

Dessa forma, o composto 2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**72**) foi sintetizado com rendimento de 39%. Apesar do esforço para aumentar o rendimento dessa reação com adição de catalisador (DMAP), aumento de temperatura e de tempo reacional não foi possível contornar o problema. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 8) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios benzílicos (dupletos, J_{AB} 11,2 Hz, na região de 4,89 a 4,69 ppm) e dos hidrogênios aromáticos dos grupos benzila e fenila (multipletos na região de 7 ppm).

Com relação à síntese do intermediário com hidroxila livre em C-6 (**59**), a primeira reação de clivagem regiosseletiva do composto **57** foi realizada de acordo com método descrito por Ellis e col. (ELLIS et al., 2008) para um derivado α-D-glicopiranosídeo de metila. A reação para clivagem regiosseletiva foi realizada com hidreto de lítio e alumínio e cloreto de alumínio em DCM / éter sob aquecimento, mas o resultado obtido foi insatisfatório pois houve clivagem total do anel benzilideno (Esquema 22).

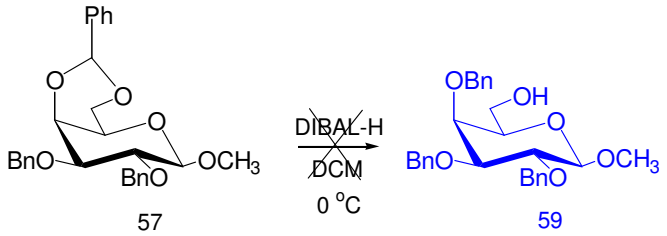


Esquema 22 - Clivagem total do anel benzilideno e formação do composto **71**.

Uma possibilidade de contornar o problema de clivagem total seria alterar alguma(s) condição(ões) reacional(is) ou os reagentes. Sendo assim, a reação foi repetida com os mesmos reagentes e em condições brandas (temperatura ambiente e banho de gelo). Em ambos os casos, a diminuição de temperatura não evitou de clivagem total, pois houve formação do composto **71** e não foi observado consumo total do material de partida **57**, mesmo após 24 horas de reação.

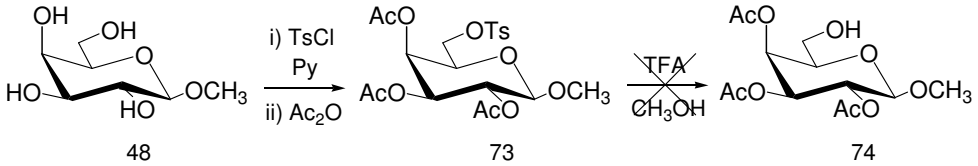
Outra alternativa testada foi a mudança dos reagentes. Nesse caso, Tanaka e col. (TANAKA et al., 2008) descreveram a clivagem regiosseletiva de outro monossacarídeo (α-D-glicopiranosídeo de metila) com hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL-H) em DCM ou tolueno a 0 °C. Após tentativa de clivagem empregando hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL-H) em DCM a 0 °C, a análise do espectro de RMN ^{1}H do produto isolado indicou ausência do sinal característico do hidrogênio metínico do grupo benzilideno e os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos (multipletos na região de 7 ppm) foram

integrados para 10 (ao invés de 15), sugerindo que o intermediário **59** não foi obtido (Esquema 23).



Esquema 23 - Tentativa de clivagem regiosseletiva para formação do composto **59**.

Considerando esse resultado preliminar insatisfatório e o fato de não ter sido encontrado na literatura um método específico para abertura seletiva da posição 6 do anel benzilideno a partir do composto **57** (mas sim a partir de derivados α e β D-glicopiranosídeos de metila), foi proposta uma rota alternativa (CARVALHO et al., 2010a) para obtenção de um intermediário com hidroxila livre em C-6 (Esquema 24).



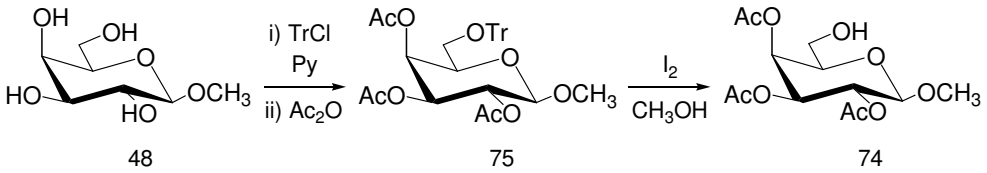
Esquema 24 - Rota alternativa para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-6 (**74**).

A primeira etapa ("one pot") envolveu tosilação do material de **48** com cloreto de tosila em piridina e subsequente per-*O*-acetilação com anidrido acético para obtenção de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-(4-metilbenzenosulfonato)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**73**) com rendimento de 56%. No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos e metílico (simpleto em 2,45 ppm) do grupo tosila. Também foram observados os sinais característicos dos hidrogênios dos grupos acetila.

No entanto, a etapa de clivagem do grupo tosila em meio ácido para obtenção do composto **74** foi insatisfatória, pois houve degradação do material de partida com formação de vários subprodutos. De acordo com a literatura (ANKNER; HILMERSSON, 2009) esse resultado é possível, uma vez que ácidos fortes (HBr ou $HClO_4$) são usados para clivagem

do grupo tosila e essas condições drásticas de reação podem afetar outros grupos de proteção, além da clivagem da ligação glicosídica. Existem outros métodos testados com sucesso, mas os reagentes não são prontamente disponíveis, por isso foi testada uma rota alternativa envolvendo tritilação.

Dessa forma, a primeira etapa ("one pot") da nova rota alternativa (Esquema 25) envolveu tritilação do material de partida **48** com cloreto de tritila em piridina e subsequente per-*O*-acetilação com adição de anidrido acético (KOMIOTIS et al., 2006) para obtenção de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**75**) com rendimento de 82%. No espectro de RMN ^{1}H foram observados os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos do grupo tritila e dos grupos acetila.



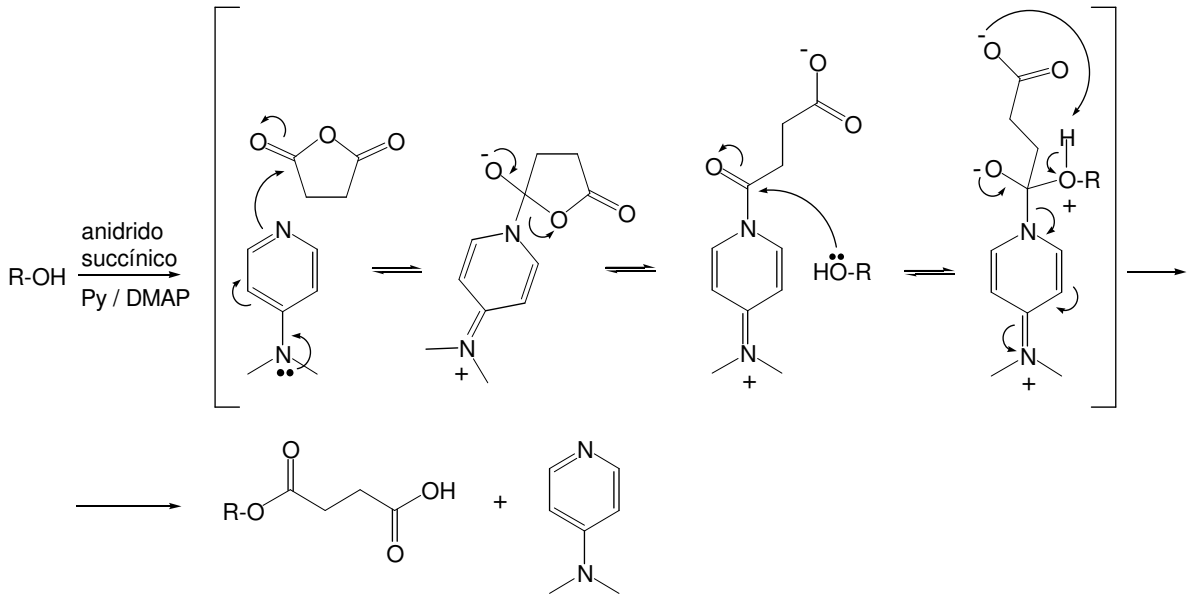
Esquema 25 - Nova rota para síntese de intermediário com hidroxila livre em C-6 (**74**).

A segunda etapa da rota consistiu na desproteção seletiva da posição 6 do composto **75**. A primeira tentativa de clivagem do grupo tritila foi feita através de hidrogenólise (H_2, Pd/C) (FARKAS et al., 2009), mas apenas material de partida foi recuperado, mesmo após vários dias de reação. O fato de ter sido utilizado aparato convencional (bexiga contendo hidrogênio) ao invés de hidrogenador, pode ter influenciado nesse resultado.

Contudo, a clivagem do grupo tritila também foi testada na presença de iodo e metanol (WAHLSTROM; RONALD, 1998) e através desse procedimento o intermediário 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**74**) foi obtido com rendimento de 70%. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 9) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios dos grupos acetila e ausência dos hidrogênios aromáticos do grupo tritila.

4.1.5 Estudos envolvendo síntese de derivados com ácido succínico

Sob ponto de vista químico, ácido succínico e seu anidrido são caracterizados pela reatividade dos grupos carbonílicos e também metilênicos. O reagente anidrido succínico reage com álcoois para fornecer derivados monoésters de ácido succínico, os quais também podem ser esterificados a diésters (KIRK; OTHMER, 1991). Segundo mecanismo de esterificação (Esquema 26), o catalisador DMAP reage com anidrido succínico gerando um intermediário mais suscetível ao ataque da hidroxila para formação da ligação éster.

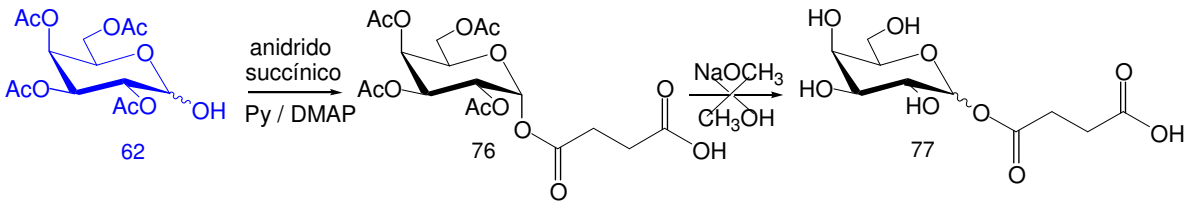


Esquema 26 - Representação do mecanismo de esterificação com anidrido succínico em presença de DMAP e piridina.

Uma vez sintetizados os intermediários com hidroxila livre em diferentes posições do anel, todos foram testados nas mesmas condições descritas na literatura para síntese de derivados com ácido succínico (LEMANSKI; ZIEGLER, 2000). O método utilizado nessa etapa foi de simples execução e também satisfatório frente a compostos com diferentes grupos protetores. No entanto, é importante ressaltar que os rendimentos obtidos inicialmente foram baixos (50%) devido a problemas de extração, ou seja, perda de produto na fase aquosa pela adição de HCl (1,0 mol.L^{-1}) na fase de extração do produto. O problema

foi contornado coevaporando a mistura reacional com tolueno para remoção da piridina antes de lavar a fase orgânica com respectivo ácido.

Inicialmente, o intermediário **62** foi tratado com anidrido succínico e quantidade catalítica de DMAP em piridina para obtenção do derivado butanodioato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila (**76**) com rendimento de 80% (Esquema 27). O rendimento dessa etapa foi considerado satisfatório quando comparado à literatura (90%) (LEMANSKI; ZIEGLER, 2000). No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 10) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ácido succínico (dois multipletos na região de 2,7 ppm) e apenas o sinal correspondente a H-1 (dupleto em 6,35 ppm) do anômero α ($J_{1,2}$ 3,6 Hz). Adicionalmente, no espectro de massas de alta resolução (Anexo 10.2) foi observado o pico do íon $[M+Na]^+$: 471,1108 (calculado 471,1109) referente à massa molecular do composto **76**.

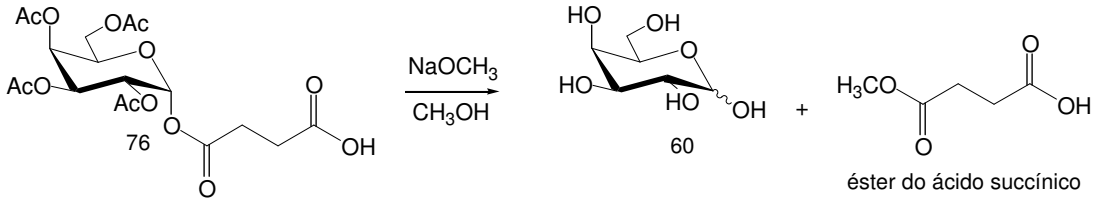


Esquema 27 - Etapas da síntese do derivado com ácido succínico na posição 1 (**77**).

Posteriormente, o composto **76** foi tratado com quantidade catalítica de solução de metóxido de sódio (1,0 M) em metanol (NITZ; BUNDLE, 2000) para promover *O*-desacetilação. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 11) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ácido succínico (simpleto largo em 2,60 ppm) e ausência dos hidrogênios dos grupos acetila, o que caracterizou desproteção.

No entanto, o procedimento adotado levou à formação de mistura de anômeros pois foi observado o sinal correspondente a H-1 (dupleto em 4,52 ppm) do anômero β ($J_{1,2}$ 7,9 Hz) e H-1 (dupleto em 5,20 ppm) do composto α ($J_{1,2}$ 3,3 Hz) na proporção de 1:2 (α/β). Inicialmente esse resultado foi interpretado como inversão de configuração pelo ataque intramolecular do íon carboxilato gerado no meio reacional básico na posição equatorial (β)

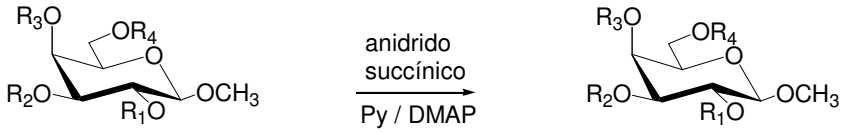
e consequente ruptura da ligação éster original na posição axial (α). No entanto, a análise por espectrometria de massas e RMN bidimensional (HMBC) do produto obtido indicou que também houve clivagem da ligação éster do ácido succínico na posição 1 (Esquema 28).



Esquema 28 - Clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise.

No espectro de massas de alta resolução (Anexo 11.2) não foi observado o pico do íon $[M+Na]^+$: 303,0686 (calculado) correspondente à massa molecular do composto **77**, mas o pico do íon $[M+Na]^+$: 203,0541 (calculado: 203,0532) correspondente ao composto **60** e o pico do íon $[M+Na]^+$: 155,0319 (calculado: 155,0320) correspondente ao éster metílico do ácido succínico. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 11) também foi observado um simpleto em 3,65 ppm com integral relativa a três hidrogênios (correspondente à metila do éster do ácido succínico) e no mapa de contornos HMBC (Anexo 11.3) não foi observada correlação entre H-1 e a carbonila do ácido succínico.

Na sequência, os demais intermediários sintetizados (**49**, **64**, **66**, **70**, **58**, **72** e **74**), a partir do açúcar comercial β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**), foram submetidos à reação de esterificação com anidrido succínico (Esquema 29).



49 R_1= OH, R_2=R_3=$C(CH_3)_2$, R_4= MIP
64 R_1= OH, R_2=R_3=$C(CH_3)_2$, R_4= Tr
66 R_1= OH, R_2=R_3=R_4= Ac
70 R_2= OH, R_1=R_3=R_4= Ac
58 R_3= OH, R_1=R_2=R_4= Bn
72 R_3= OH, R_1=R_2= Bn, R_4= Tr
74 R_4= OH, R_1=R_2=R_3= Ac

78 R_1= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_2=R_3=$C(CH_3)_2$, R_4= Tr
79 R_1= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_2=R_3=R_4= Ac
80 R_2= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_3=R_4= Ac
81 R_3= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_4= Bn
82 R_3= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2= Bn, R_4= Tr
83 R_4= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_3= Ac

Esquema 29 - Etapa da síntese dos derivados com ácido succínico em todas as posições do anel β-D-galactopiranosídeo de metila.

A partir dos intermediários com hidroxila livre em C-2 (**49**, **64** e **66**), foi possível obter os derivados 2-butanodioato-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**78**) (Anexos 12 - 12.2) e 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**79**) (Anexos 13 - 13.3) com bons rendimentos (82% e 71%, respectivamente). No entanto, não foi possível obter o correspondente derivado a partir de **49**, pois o acompanhamento da reação por CCD indicou presença de mistura complexa de difícil separação, possivelmente devido à instabilidade do grupo MIP.

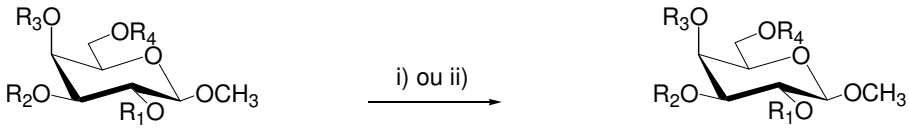
A partir dos demais intermediários (**70**, **58**, **72** e **74**) foi possível obter os correspondentes derivados com ácido succínico 2,4,6-tri-*O*-acetil-3-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**80**) (Anexos 14 - 14.2), 4-butanodioato-2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**81**) (Anexos 15 - 15.2), 4-butanodioato-2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**82**) (Anexos 16 - 16.2) e 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**83**) (Anexos 17 - 17.2), com rendimento de 80, 52, 85 e 71%, respectivamente.

No espectro de RMN ^{1}H destes compostos foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ácido succínico (multipletos na região de 2,7 ppm) e dos hidrogênios de cada grupo protetor. Através de comparação entre os deslocamentos químicos de hidrogênios dos intermediários com hidroxila livre e seus respectivos derivados com ácido succínico (tabela 2) foi possível observar que houve desblindagem pela formação da ligação éster. Adicionalmente, no espectro de massas de alta resolução desses derivados foram observados os picos dos íons correspondentes aos seus respectivos adutos com sódio $[M+Na]^{+}$, exceto para o composto **78**, o qual não apresentou o pico do íon calculado $[M+Na]^{+}$: 577,2432. É importante destacar que todos os derivados com ácido succínico obtidos são inéditos na literatura.

Tabela 2 - Comparação entre deslocamentos químicos dos intermediários e seus respectivos derivados com ácido succínico.

Intermediários	δ ^{1}H (ppm)	Hidrogênios	δ ^{1}H (ppm)	Derivados
64	3,53	H-2	4,48	**78**
66	3,77	H-2	5,22	**79**
70	3,87-3,78	H-3	5,05	**80**
58	4,04	H-4	5,61	**81**
72	3,43-3,35	H-4	5,68	**82**
74	3,77	H-6a	4,20	**83**
		H-6b	4,12	

Por fim, os derivados foram submetidos a condições de desproteção de acordo com protocolos específicos e seletivos para cada grupo protetor (Esquema 30). Os compostos **79**, **80** e **83** foram tratados com quantidade catalítica de solução de metóxido de sódio (1,0 M) em metanol (NITZ; BUNDLE, 2000) e os compostos **81** e **82** foram submetidos à hidrogenólise (FARKAS et al., 2009).



79 R_1= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_2=R_3=R_4= Ac
80 R_2= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_3=R_4= Ac
81 R_3= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_4= Bn
82 R_3= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2= Bn, R_4= Tr
83 R_4= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_3= Ac

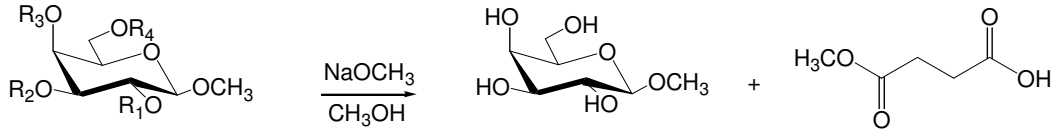
84 R_1= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_2=R_3=R_4= H
46 R_2= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_3=R_4= H
85 R_3= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_4= H
86 R_4= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_3= H

i) $NaOCH_3$, CH_3OH (**79**, **80**, **83**) ii) H_2 Pd/C-10%, CH_3OH, AcOH (**81**, **82**)

Esquema 30 - Etapa de desproteção dos derivados com ácido succínico sintetizados.

Em relação à metanólise, foram observados nos espectros de RMN ^{1}H (Anexos 18, 19 e 20) os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ácido succínico (multipletos na região de 2,7 ppm) e ausência dos hidrogênios dos grupos acetila, caracterizando desproteção e suposta obtenção dos produtos desejados **84**, **46** e **86**. No entanto, a

interpretação inicial desses resultados apenas por RMN ^{1}H e ^{13}C foi equivocada, uma vez que análises recentes de espectrometria de massas e RMN bidimensional (HMBC) indicaram que também houve clivagem da ligação éster do ácido succínico nas posições 2, 3 e 6 (Esquema 31).



79 R_1= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_2=R_3=R_4= Ac
80 R_2= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_3=R_4= Ac
83 R_4= $COCH_2CH_2CO_2H$, R_1=R_2=R_3= Ac

48

éster do ácido succínico

Esquema 31 - Clivagem do ácido succínico na posição 2 (**79**), 3 (**80**) e 6 (**83**) por metanólise.

Nos espectros de massas de alta resolução (Anexos 18.2, 19.2 e 20.2) foram observados os picos dos íons $[M+Na]^+$: 217,0693 correspondente à massa molecular do composto **48** e o pico do íon $[M+Na]^+$: 155,0319 (calculado: 155,0315) correspondente ao éster metílico do ácido succínico. Nos espectros de RMN ^{1}H (Anexos 18, 19 e 20) também foi observado um simpleto em 3,67 ppm com integral relativa a três hidrogênios (correspondente à metila do éster do ácido succínico) e nos mapas de contornos HMBC (Anexo 18.3) não foi observada correlação entre os hidrogênios H-2 (**84**), H-3 (**46**) e H-6 (**86**) e a carbonila do ácido succínico. Dessa forma, não foi possível obter os derivados desprotegidos por metanólise, mas outros métodos serão investigados a fim de solucionar o problema nessa etapa final.

Em relação à hidrogenólise, foi possível obter o derivado desprotegido 4-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**85**) a partir de **81** com rendimento quantitativo. No espectro de RMN ^{1}H (Anexo 21) foram observados os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ácido succínico (dois multipletos na região de 2,7 ppm) e no espectro de massas de alta resolução (Anexo 21.2) foi observado o pico do íon $[M+Na]^+$: 317,0843 (calculado 317,0843) referente à massa molecular do composto **85**. Nas condições empregadas, não foi possível obter o derivado **85** a partir de **82**.

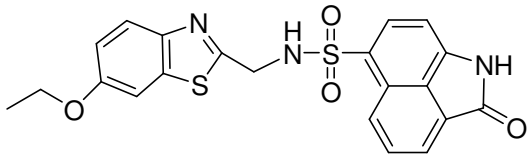
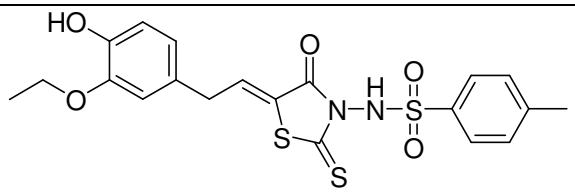
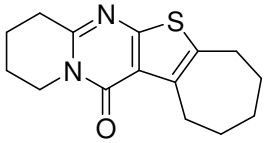
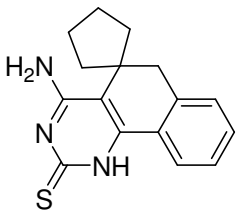
4.2 Modelagem molecular

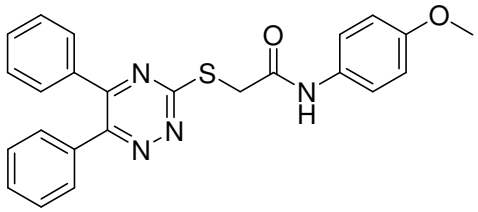
4.2.1 Triagem virtual baseada na estrutura de TcTS

Todo trabalho relacionado à modelagem molecular foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP - USP) sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva.

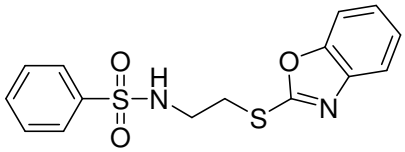
A triagem virtual para busca de potenciais inibidores de TcTS foi realizada na base de compostos diverset com programa GOLD 3.1.1 (NISSINK et al., 2002). A subcoleção de compostos diverset pertence à base de dados da empresa Chembridge e contém aproximadamente 50.000 estruturas de moléculas pequenas com propriedades de fármacos e abrangendo diversas características farmacofóricas espaciais relevantes para a manutenção de interações com os mais diversos alvos moleculares. A partir dos cálculos de simulação de "docking" flexível no complexo cristalográfico da enzima TcTS (código 1MS8) foram pré-selecionadas 2.000 moléculas com maior valor de escore, das quais foram selecionadas 50 moléculas (tabela 3), novamente com base na função de escore.

Tabela 3 - Compostos selecionados da base de compostos diverset por triagem virtual baseada na estrutura de TcTS.

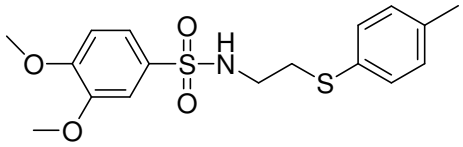
 **DVS 1**	 **DVS 2**
 **DVS 3**	 **DVS 4**



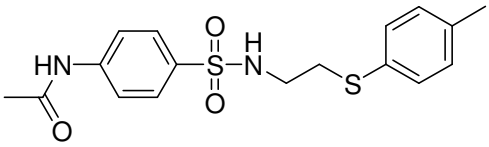
DVS 5



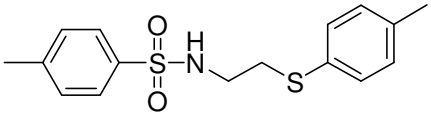
DVS 6



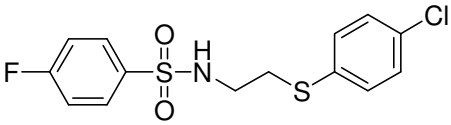
DVS 7



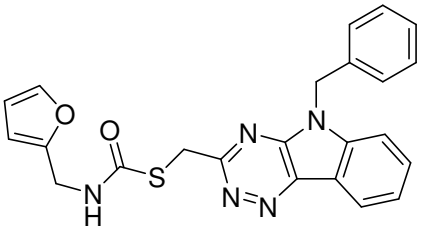
DVS 8



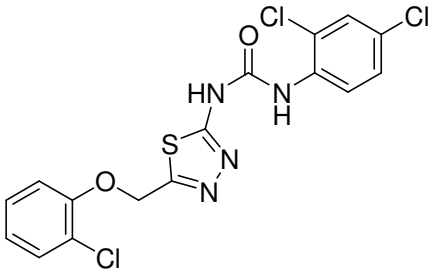
DVS 9



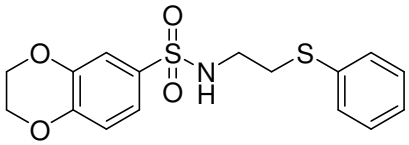
DVS 10



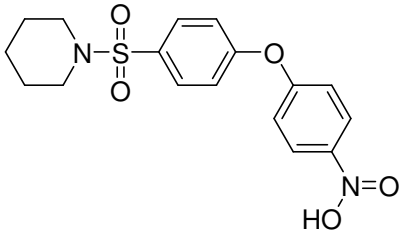
DVS 11



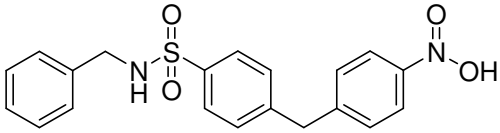
DVS 12



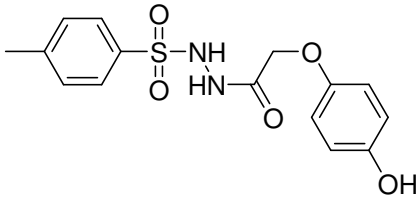
DVS 13



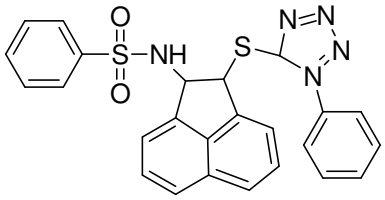
DVS 14



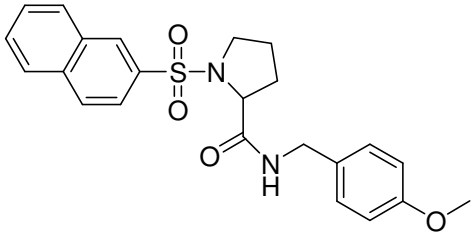
DVS 15



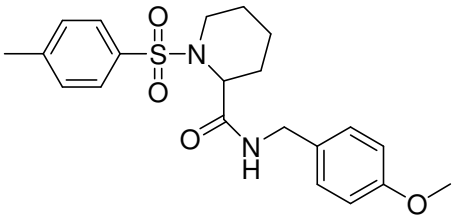
DVS 16



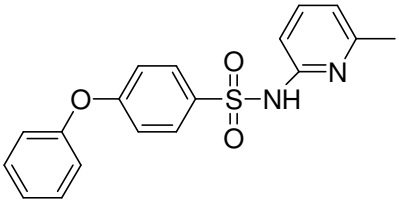
DVS 17



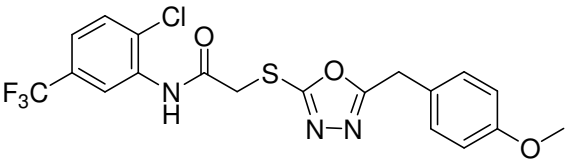
DVS 18



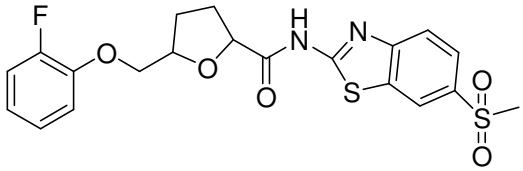
DVS 19



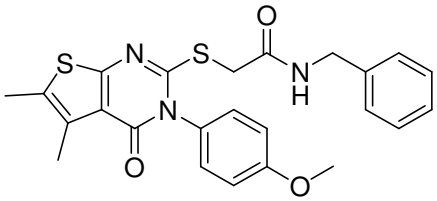
DVS 20



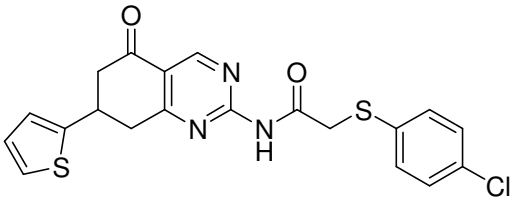
DVS 21



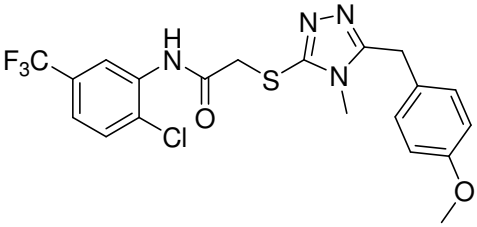
DVS 22



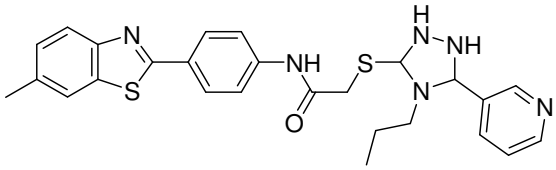
DVS 23



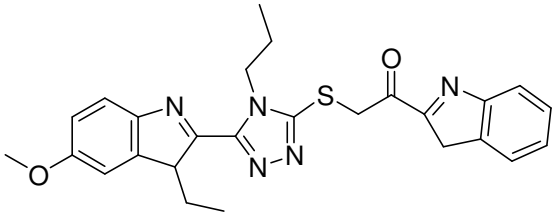
DVS 24



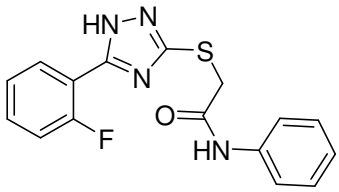
DVS 25



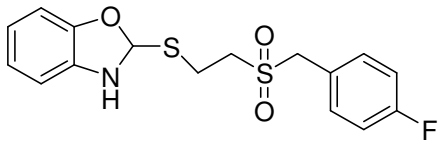
DVS 26



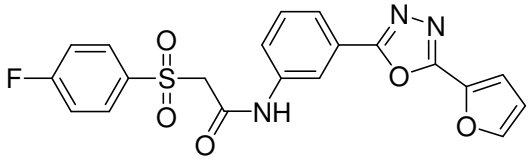
DVS 27



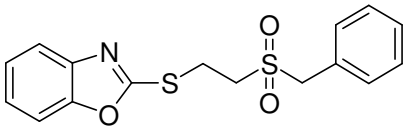
DVS 28



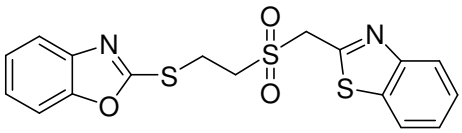
DVS 29



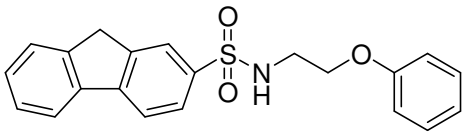
DVS 30



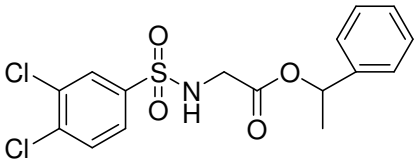
DVS 31



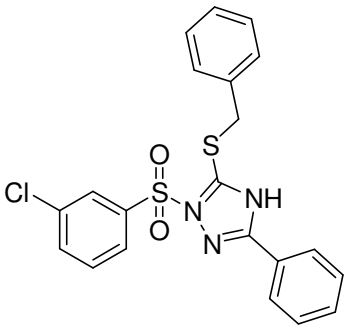
DVS 32



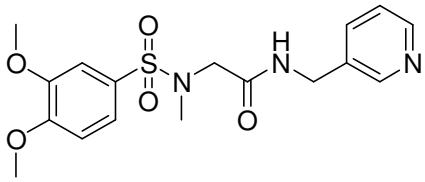
DVS 33



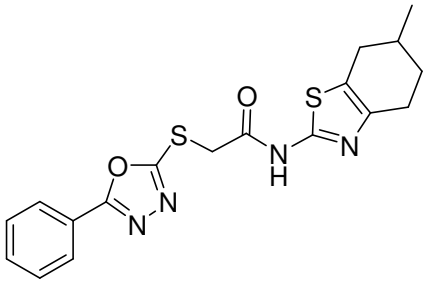
DVS 34



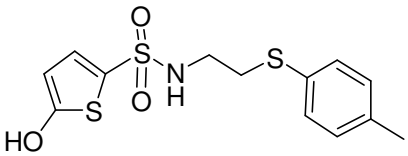
DVS 35



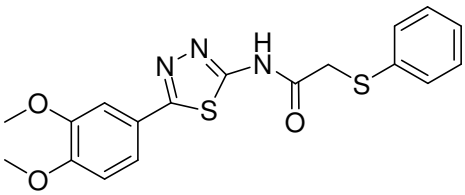
DVS 36



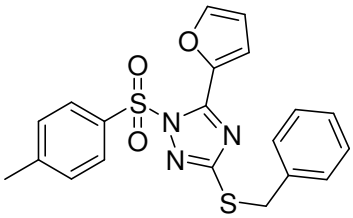
DVS 37



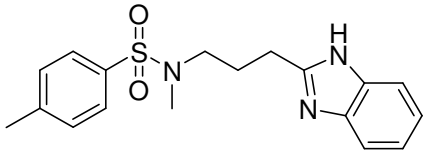
DVS 38



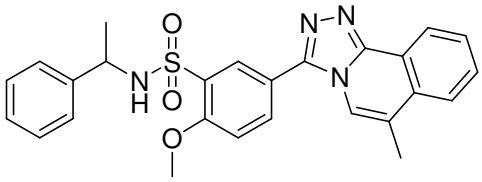
DVS 39



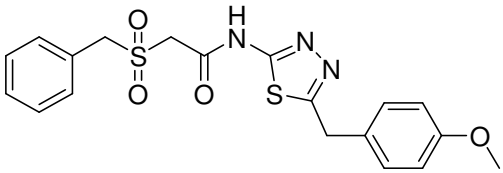
DVS 40



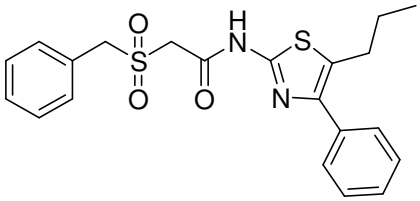
DVS 41



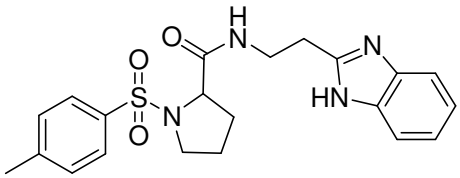
DVS 42



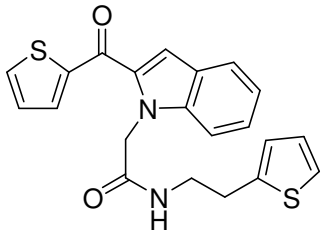
DVS 43



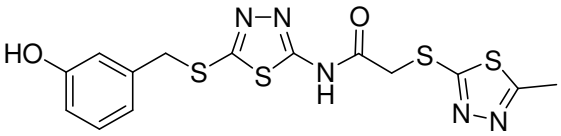
DVS 44



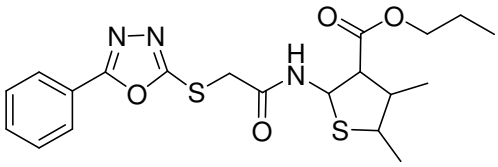
DVS 45



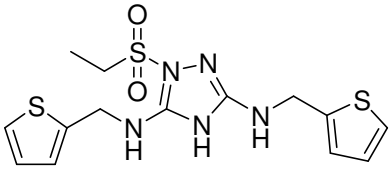
DVS 46



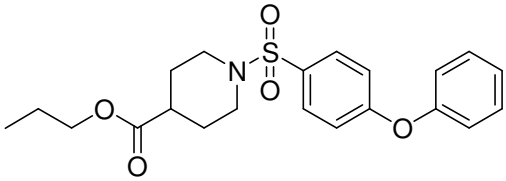
DVS 47



DVS 48



DVS 49



DVS 50

Na sequência, essas 50 moléculas foram submetidas ao processo de “rescore”, isto é, foram geradas dez orientações (conformações) de maior escore para cada uma delas. No momento, todas estas orientações têm sido analisadas no sítio ativo de TcTS na busca de um consenso entre as orientações de uma mesma molécula e o escore de cada confôrmero.

Na próxima etapa do trabalho, as 50 moléculas serão confrontadas com os campos de interação molecular (MIFs) (Figuras 34 e 35), para selecionar aquelas que apresentarem maior número de pontos de interação nas regiões delineadas. Adicionalmente, as 50 moléculas poderão ser confrontadas com os padrões farmacofóricos gerados (Figuras 32 e 33).

Posteriormente, as melhores moléculas selecionadas desta etapa ainda serão submetidas a uma avaliação minuciosa de suas interações com os resíduos de aminoácidos fundamentais do sítio ativo. Por fim, os melhores compostos desta última avaliação serão adquiridos para ensaio de inibição com a enzima TcTS.

4.2.2 Determinação do padrão farmacofórico a partir das estruturas de inibidores de *trans*-sialidase

Atualmente, farmacóforo pode ser definido como um conjunto de atributos funcionais essenciais (como características eletrônicas e estéricas) que permitem que uma molécula (ligante) interaja com um alvo-receptor específico, desencadeando ou bloqueando sua resposta biológica (BUREAU et al., 2002; DROR et al., 2009).

A modelagem do farmacóforo é um método útil para identificar moléculas promissoras, além de ser um mecanismo importante para triagem virtual eficaz, pois gera um modelo para o desenvolvimento de futuros fármacos (BUREAU et al., 2002). Esse modelo pode ser usado para construção de outras moléculas que possam manter a mesma atividade, uma vez que o conceito de farmacóforo é baseado na premissa de que diferentes grupos químicos, como, por exemplo, grupos bioisósteros, podem apresentar os mesmos tipos de interação com uma proteína, agrupando-se em uma mesma categoria de grupo farmacofórico.

Com intuito de minimizar erros, foram utilizados dois métodos para derivação do padrão farmacofórico: o programa Discovery Studio e o web-servidor PharmaGist. Para esse estudo, foram escolhidos 8 compostos (Figura 31) com as melhores atividades inibitórias de

TcTS (IC_{50}: 0,58 µM - 30,0 µM) relatadas na literatura (KIM et al., 2009 e ARIOKA et al., 2010).

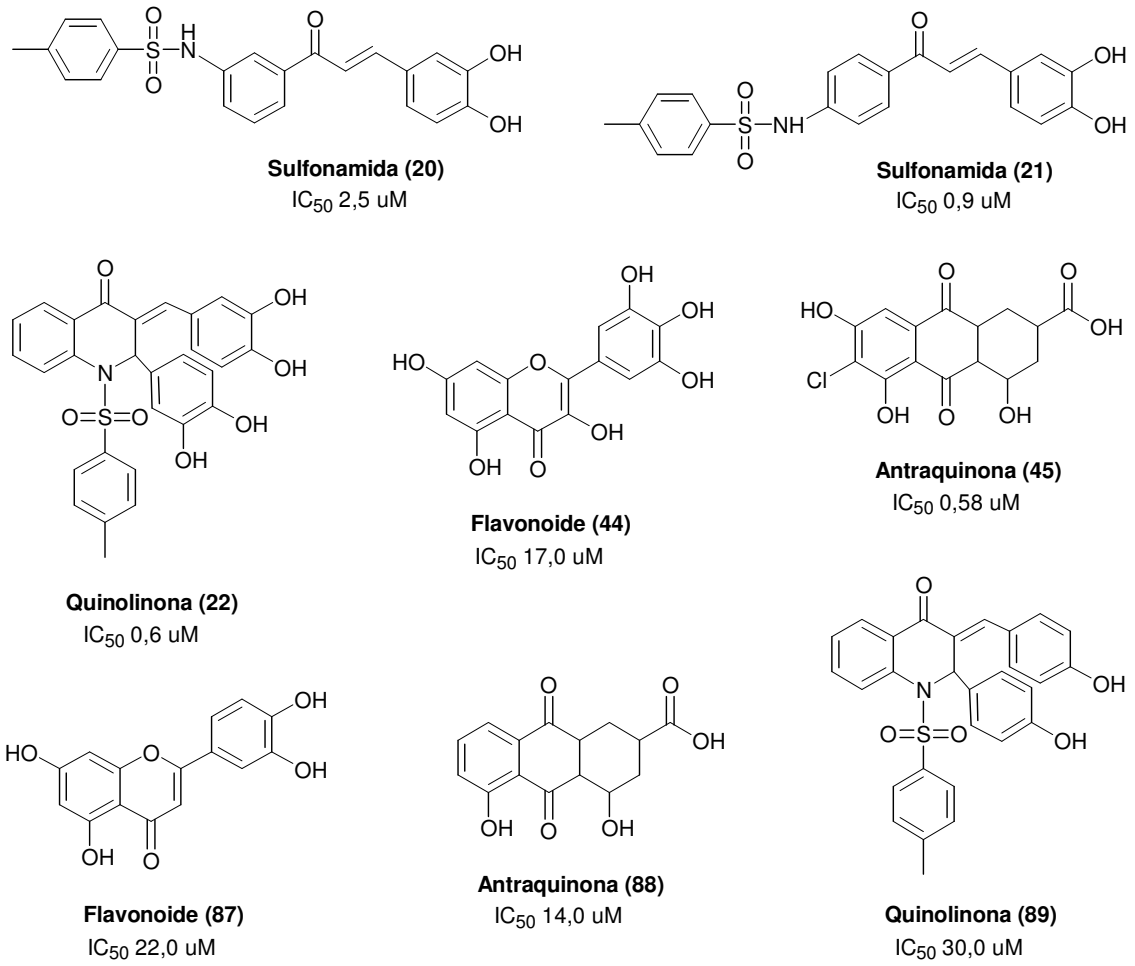


Figura 31 - Inibidores de TcTS escolhidos para derivação do padrão farmacofórico.

Assim, foram consideradas as orientações relativas dos inibidores citados para identificação de grupamentos químicos comuns a todas as estruturas: i) grupos doadores de ligação de hidrogênio, ii) aceptores de ligação de hidrogênio, iii) hidrofóbicos (alifáticos e aromáticos) e iv) positivos e/ou negativos ionizáveis. Na sequência, os grupos em comum a todas as estruturas foram configurados de forma a contribuírem igualmente para a geração do farmacóforo.

Dentre os modelos de farmacóforos obtidos pelo programa Discovery Studio (Figura 32) e pelo web-servidor PharmaGist (Figura 33), foi melhor avaliado o padrão farmacofórico

segundo o qual um inibidor efetivo da enzima TcTS deva possuir 3 grupamentos químicos fundamentais: i) grupo hidrofóbico aromático, ii) grupo aceptor de ligação de hidrogênio e iii) grupos aceptores de ligação de hidrogênio. É importante ressaltar que os dois modelos foram gerados com apenas 5 inibidores (**20**, **44**, **45**, **87** e **88**), uma vez que não foi possível observar consenso no alinhamento dos 8 inibidores escolhidos inicialmente.

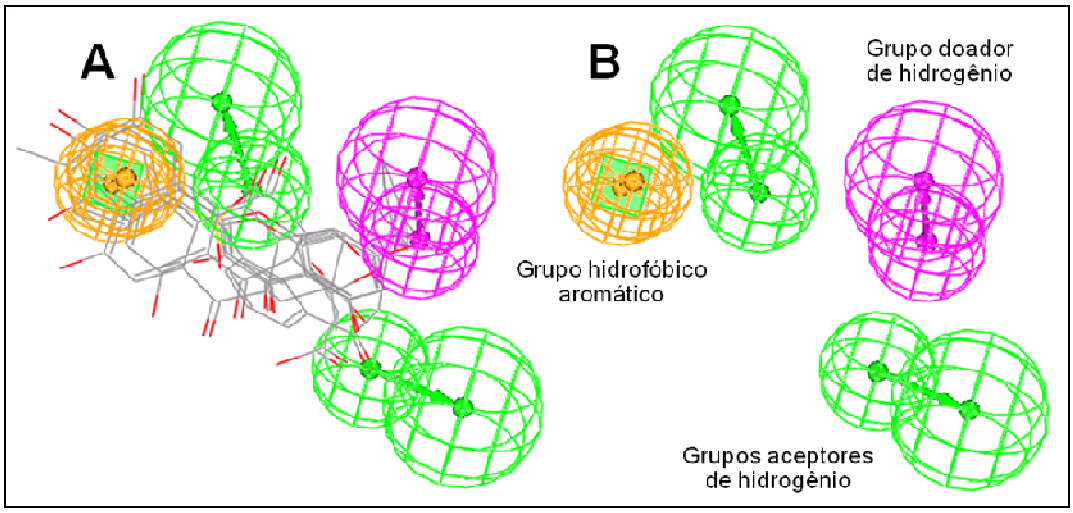


Figura 32 - Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de TcTS obtidos pelo programa Discovery Studio. Em **A** são observados os 5 inibidores sobrepostos e em **B**, apenas o farmacóforo gerado.

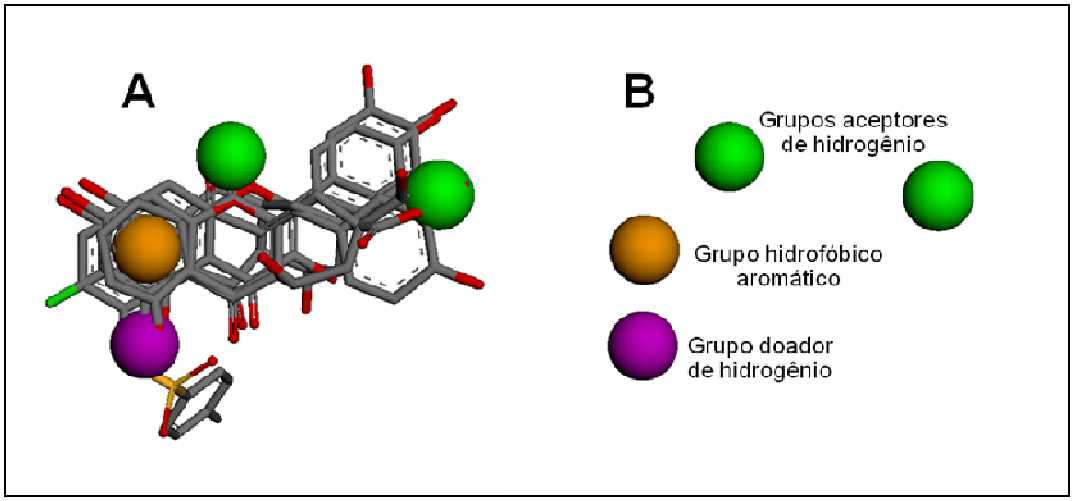


Figura 33 - Determinação do padrão farmacofórico de inibidores de TcTS obtidos pelo web-servidor PharmaGist. Em **A** são observados os inibidores sobrepostos e em **B**, apenas o farmacóforo gerado.

Pode-se observar que os resultados obtidos nos dois métodos estão em consenso, logo, o modelo farmacofórico sugerido poderá ser utilizado para filtrar moléculas provenientes de triagem virtual ou no processo de triagem virtual baseada em ligante. O uso de modelos farmacofóricos na etapa de triagem de compostos é um procedimento eficiente, pois elimina rapidamente moléculas que não possuem características necessárias, o que melhora consideravelmente a qualidade dos resultados.

4.2.3 Determinação dos sítios de interação virtual a partir da topologia do receptor (mapeamento do sítio ativo)

Muitos processos biológicos são determinados por interações não-covalentes entre estruturas moleculares, como é o caso de enzimas e substratos. Um método para investigar as condições energéticas da aproximação entre moléculas é o da geração de campos de interação molecular ("Molecular Interaction Field" - MIF) (HOLTJE et al., 2003). Estes campos descrevem a variação de energia de interação entre um alvo molecular e uma prova química, que reflete as características químicas de um fragmento químico que poderá interagir com o alvo molecular.

Esse método permite predizer as interações intermoleculares baseando-se nos critérios de reconhecimento molecular, fornecendo subsídios para proposição de novos ligantes. Através dos MIFs gerados é possível sugerir importantes pontos de interação entre um receptor e um ligante. Dessa forma, o mapeamento estereoeletrônico do sitio ativo de TcTS foi obtido utilizando-se os seguintes grupos de prova químicos: átomo de oxigênio de carboxila alquílica e arílica, grupo hidroxila alquílico, átomo de carbono sp^2 aromático e carbono sp^3.

De acordo com os resultados obtidos para os cálculos de MIFs, o átomo de oxigênio de carboxila alquílica (em lilás) e arílica (em vermelho) foi o que apresentou interações mais fortes (menor energia) com o sítio ativo de TcTS devido a fortes interações com a tríade de

argininas (Figura 34). É importante ressaltar que as regiões energeticamente favoráveis foram praticamente as mesmas para esses dois grupos de prova.

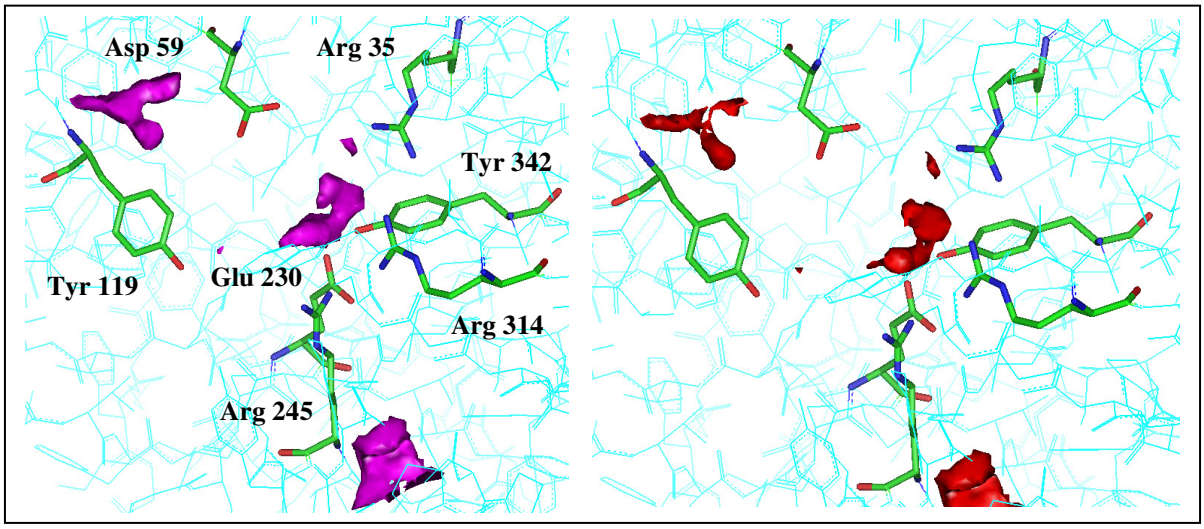


Figura 34 - MIFs utilizando-se átomo de oxigênio de carboxila alquílica (em lilás, E = - 15,0 kcal/mol) e de oxigênio de carboxila arílica (em vermelho, E = - 15,0 kcal/mol).

Adicionalmente, foram verificadas regiões favoráveis a ligações de hidrogênio do grupo de prova hidroxila (em laranja) com os resíduos de Tyr 119 e Asp 59 (Figura 35). Também foi possível visualizar regiões favoráveis a interações hidrofóbicas de carbonos sp^3 e sp^2 (em azul e amarelo, respectivamente) devido à presença dos resíduos Tyr119 e Tyr342 no sítio catalítico da enzima (Figura 35).

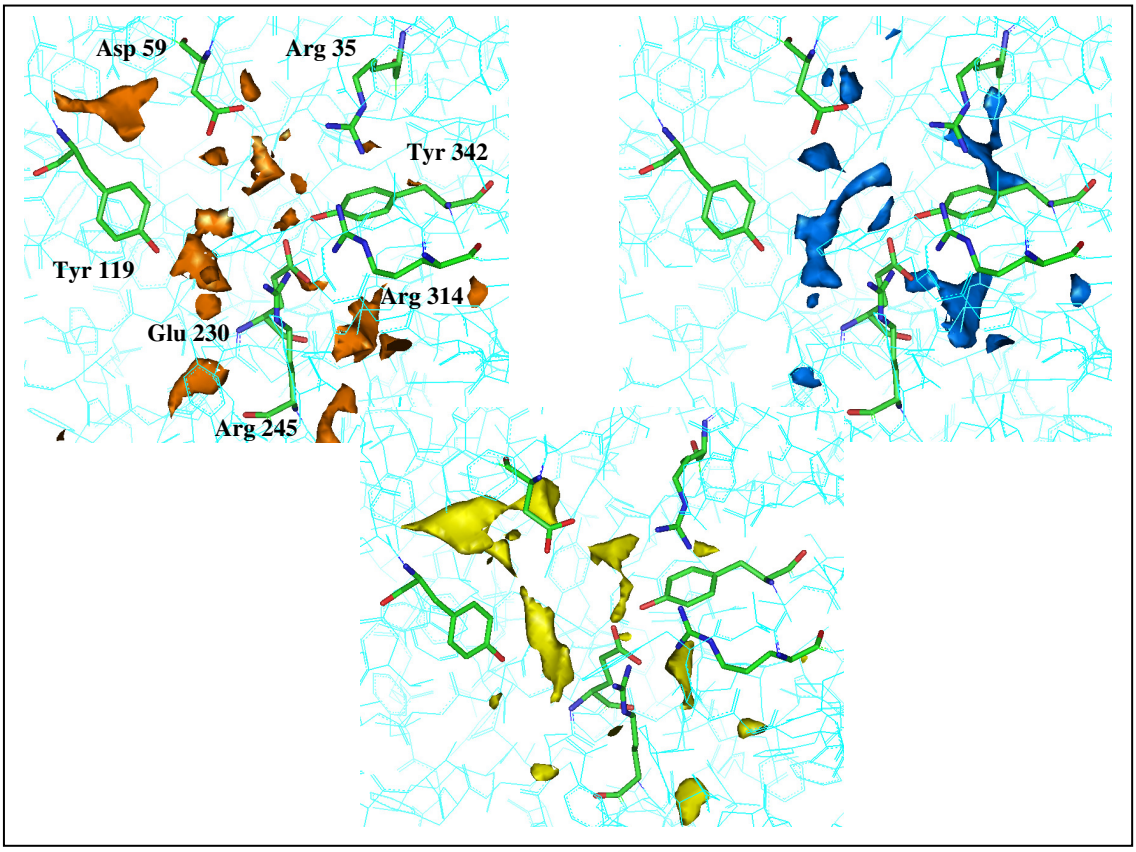


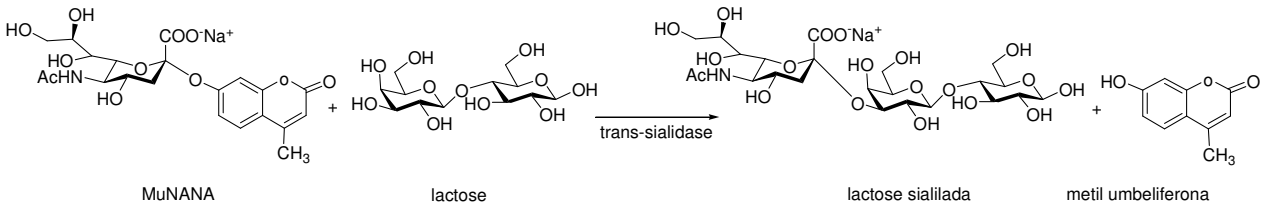
Figura 35 - MIFs utilizando-se grupo hidroxila alquílica (em laranja, E = - 9,0 kcal/mol), átomo de carbono sp^3 (em azul, E = - 10,0 kcal/mol) e átomo de carbono sp^2 aromático (em amarelo, E = - 3,2 kcal/mol).

Considerando os contornos de energia gerados a partir destes cinco grupos de prova e para que uma molécula seja um inibidor promissor de TcTS é importante que a mesma apresente i) grupo(s) carboxilato(s), pois são as interações mais favoráveis (menor energia); ii) grupos que permitam ligações de hidrogênio (com é o caso de grupos hidroxilas) e iii) grupos hidrofóbicos, incluindo cadeia(s) alquílica(s) ou anel(eis) aromático(s).

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Padronização do método fluorimétrico contínuo

Alguns métodos para determinação da atividade enzimática de TcTS foram descritos na literatura (LEE; KIM 2000; SCHRADER et al., 2003; NERES et al., 2006). Dentre eles, o método fluorimétrico é um dos mais sensíveis e mede diretamente a liberação do grupo fluorescente (fluoróforo) metil umbeliferona (Mu) a partir da clivagem da ligação glicosídica do doador ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-*N*-acetilneuramínico (MuNANA) pela ação de TcTS (Esquema 32).



Esquema 32 - Reação de TcTS na presença do doador MuNANA, como substrato doador, e de lactose, como substrato aceptor, acompanhada em fluorímetro.

Inicialmente, estes ensaios foram explorados em estudos de atividade de neuraminidases, incluindo a enzima de Influenza, mas atualmente têm sido empregados também para análise de TcTS. No entanto, uma limitação está justamente relacionada à possibilidade dessa enzima atuar como hidrolase ao invés de transferase, uma vez que tanto o ácido siálico livre quanto o fluoróforo (Mu) podem ter sido liberados no meio reacional e o ácido não necessariamente ter sido incorporado em moléculas aceptoras (NERES et al., 2006).

Apesar deste fato e também do preço do substrato MuNANA ser razoavelmente elevado, houve grande interesse em padronizar o método fluorimétrico através da determinação dos parâmetros cinéticos de TcTS, como K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima), a fim de empregar o método no ensaio de inibição.

A primeira etapa na padronização do método foi estabelecer a melhor diluição enzimática através de um gráfico que relaciona unidades de fluorescência (U.F.) e tempo (minutos). Dessa forma, foi possível avaliar todos os lotes da enzima TcTS fornecidos pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP).

O ensaio para cada lote (total de seis) foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,4 (50,0 µL), solução da enzima *trans*-sialidase recombinante em diferentes diluições (25,0 µL) e MuNANA (25,0 µL de uma solução 0,4 mM). A fluorescência liberada pelo composto foi monitorada a 25 °C durante 120 minutos (leitura em intervalos de 15 minutos) em comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão). Todas as reações foram realizadas em duplicata e seus dados foram analisados no programa Excel (Figura 36).

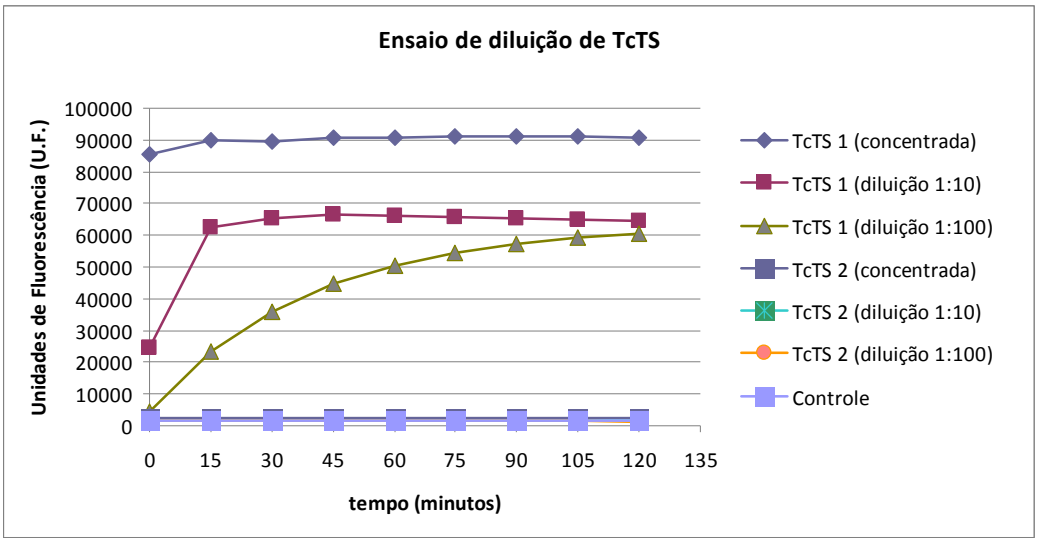


Figura 36 - Resultado gráfico do ensaio de diluição com duas amostras da enzima TcTS.

As curvas representadas no gráfico acima são relativas a dois lotes da enzima (TcTS 1 e 2) em três concentrações diferentes: concentrada (sem diluição), diluída 10 e 100 vezes. O melhor padrão de curva é aquele em que se observa aumento gradual na atividade da enzima até que se atinja o nível de saturação ao longo do tempo. Nestes dois exemplos, isto pôde ser observado apenas com o lote da enzima TcTS 1 diluída 100 vezes. No entanto, o

outro lote (TcTS 2) não apresentou atividade por não ter havido clivagem do substrato, por isso a leitura em U.F. foi a mesma do controle negativo.

A presença do controle negativo (75,0 µL de tampão + 25 µL de MuNANA) permitiu demonstrar que na ausência da enzima não houve liberação espontânea do fluoróforo e, portanto, a leitura de fluorescência feita pelo aparelho se refere apenas à atividade de clivagem da ligação glicosídica do doador MuNANA pela TcTS. Entre todos os lotes testados, apenas três enzimas estavam ativas. O perfil hiperbólico das outras duas enzimas foi observado em diluições de 1:10 e 1:20.

A segunda etapa para padronização do método foi reproduzir os valores de K_m e V_{max} apresentados na literatura (NERES et al., 2006) a fim de avaliar a atividade enzimática dos lotes de TcTS. K_m é equivalente à concentração de substrato na qual a velocidade inicial (V_0) é igual à metade de V_{max}, e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato. Logo, quanto menor for o valor de K_m maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

O método fluorimético pode ser contínuo ou descontínuo. O método descontínuo está relacionado a experimentos nos quais a reação enzimática é lida isoladamente (alíquotas) e somente após sua interrupção com Na_2CO_3 o fluoróforo é lido pelo fluorímetro. Por outro lado, no método contínuo a leitura da fluorescência resultante da liberação de metil umbeliferona é feita ao longo de todo período de incubação, acompanhando a reação durante todo o processo de conversão e não apenas no final.

De acordo com a literatura (NERES et al., 2006), foi demonstrado que apenas o método descontínuo foi apropriado para determinação de K_m e V_{max} em uma ampla faixa de concentração do substrato MuNANA (K_m= 0,68 ± 0,04 mM e V_{max}= 1,32 ± 0,03 × 10^4 U.F./min). Contudo, houve interesse em reproduzir os valores de K_m e V_{max} através do método contínuo, uma vez que sua execução é mais fácil.

O ensaio para calcular estas constantes foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,4 (50,0 µL), solução da enzima *trans*-sialidase devidamente diluída (25,0 µL) e MuNANA (25,0 µL em diferentes concentrações). A fluorescência liberada pelo composto foi monitorada a 25 °C durante 10 minutos (leitura em intervalos de 1 minuto)

em comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão). Todas as reações foram realizadas em duplicata e seus dados foram analisados no programa Prisma 4.0.

A partir do gráfico gerado pelo programa, que relaciona U.F. e tempo de reação, foi calculada a velocidade de reação para cada concentração através de regressão linear, que forneceu o valor do ângulo de inclinação de cada uma das retas. Dessa forma, foi construído um gráfico que relaciona V_0 e concentração do substrato (Figura 37), pois K_m e V_{max} podem ser calculados quando V_0 é medida em função de várias concentrações de substratos.

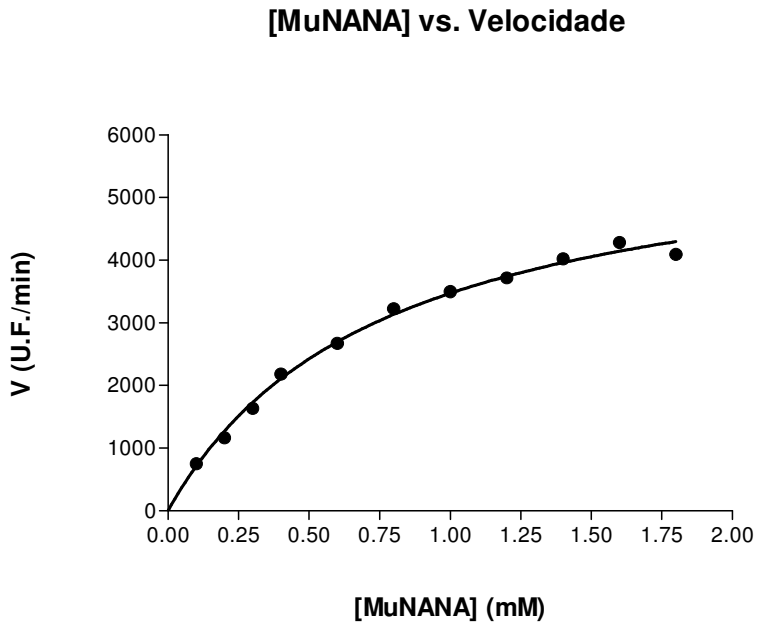


Figura 37 - Curva de Michaelis-Menten levando em consideração o ângulo de cada reta apresentada no gráfico relaciona U.F. e tempo de reação.

Através da construção do gráfico acima só é possível calcular valores aproximados de K_m e V_{max}. A equação matemática que descreve este gráfico é a equação de Michaelis-Menten (Figura 38):

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Figura 38 - Equação matemática de Michaelis-Menten, onde V_0 é a velocidade inicial; [S] é a concentração de substrato; V_{max} é a velocidade máxima e K_m a constante.

No entanto, a determinação precisa destes parâmetros cinéticos pode ser obtida quando os dados são lançados em um gráfico linear, que representa uma equação do tipo y = ax + b. Através da modificação algébrica da equação de Michaelis-Menten, inversão dos dois lados da equação, chega-se à equação abaixo (Figura 39):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Figura 39 - Equação matemática de Michaelis-Menten representada na forma inversa.

A representação gráfica dessa equação que relaciona recíproca de V_0 ($1/V_0$) e recíproca da concentração de substrato (1/[S]) fornece uma linha reta com inclinação K_m/V_{max} em um gráfico duplo-recíproco ou Lineweaver-Burk (Figura 40).

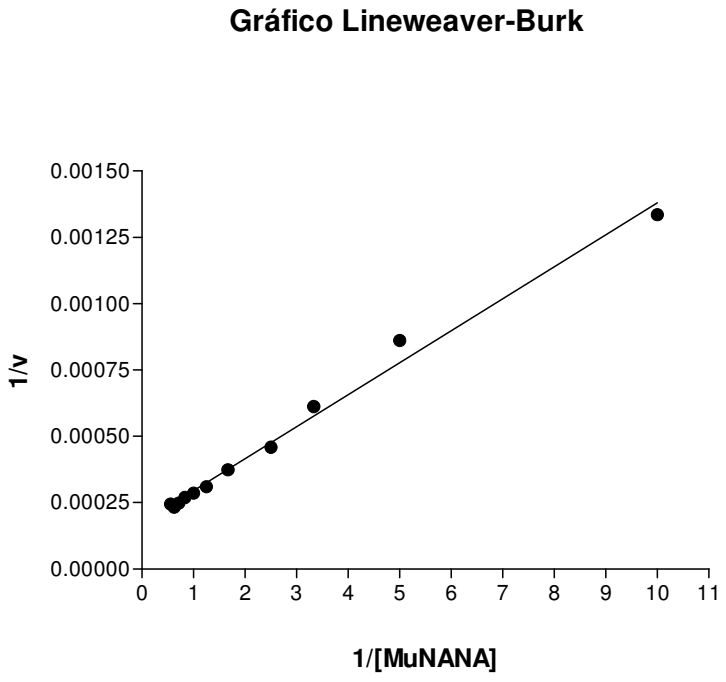


Figura 40 - Duplo-recíproco da curva de Michaelis-Menten para cálculo de K_m e V_{max}.

O ponto onde esta reta intercepta a abscissa é igual a - $1/K_m$ e onde intercepta a ordenada é igual a $1/V_{max}$. Experimentalmente temos que - 1,45 = - $1/K_m$; então K_m = 0,69 mM (K_m da literatura = 0,68 mM). Sendo $K_m = V_{max}/2$; então $V_{max} = 1{,}38 \times 10^4$ U.F./min (V_{max}

da literatura = 1,32 × 10^4 U.F./min). Uma vez que os valores de K_m e V_{max} foram devidamente reproduzidos, o método fluorimétrico contínuo foi empregado no ensaio de inibição de TcTs.

4.3.2 Ensaio de inibição

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,0 (25,0 µL), solução diluída da enzima *trans*-sialidase (25,0 µL), solução do derivado desprotegido com ácido succínico (**85**), β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**) e ácido succínico (25,0 µL de uma solução 4,0 mM) (Figura 41) e solução de substrato MuNANA (25,0 µL de uma solução 0,4 mM). Sabendo que o volume final em cada poço foi de 100,0 µL, a concentração final dos compostos e de substrato foi quatro vezes menor no poço, ou seja, 1,0 mM dos compostos e 0,1 mM de substrato.

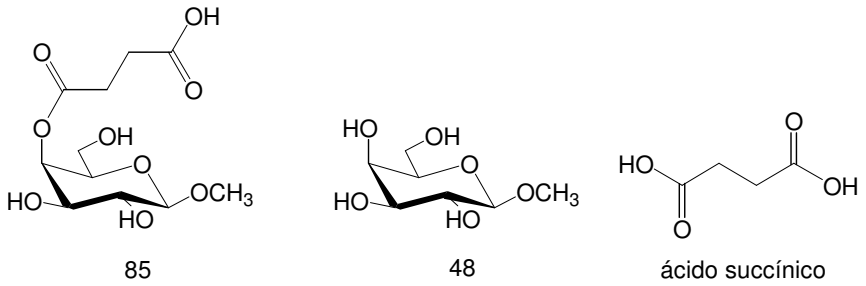


Figura 41 - Compostos testados no ensaio de inibição de TcTS.

O ensaio também foi realizado com controle negativo, isto é, ausência de um inibidor na reação (50,0 µL de tampão + 25,0 µL de enzima + 25,0 µL de MuNANA), e com controles positivos DANA (2-desoxi-2,3-dehidro-*N*-acetil ácido neuramínico) e piridoxal fosfato (Figura 42). Os compostos utilizados como controle positivo estão descritos na literatura como inibidores de TcTS (NERES et al., 2007).

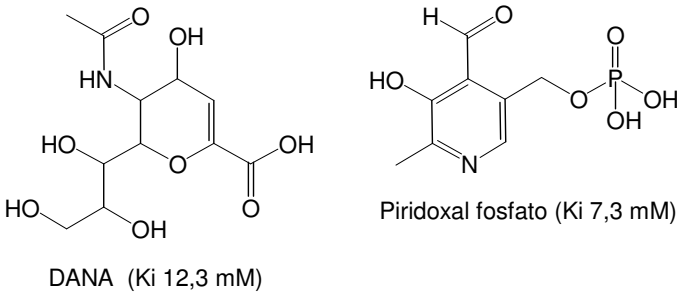


Figura 42 - Estrutura dos compostos utilizados como controle positivo.

Dessa forma, os resultados do ensaio de inibição da enzima TcTS com esses compostos, na concentração de 1,0 mM, estão apresentados abaixo (Figura 43).

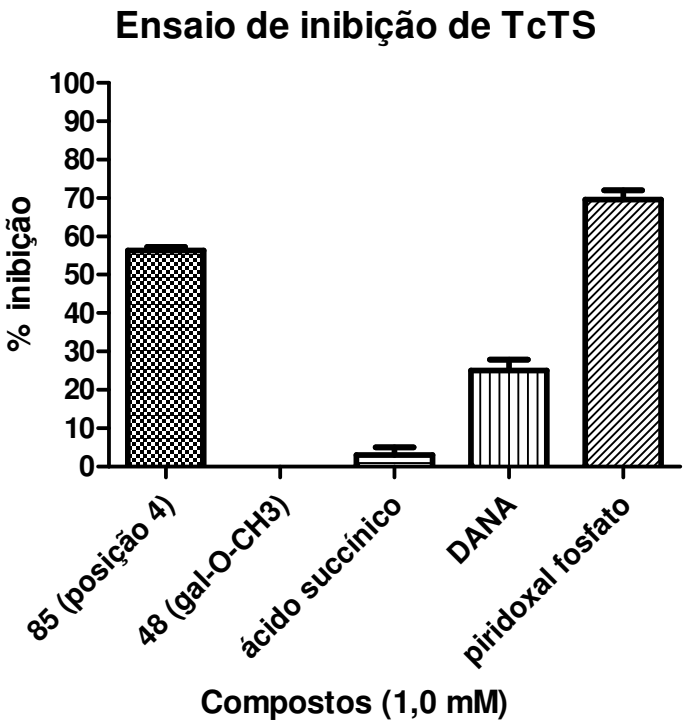


Figura 43 - Resultado do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM.

Com base na figura 43, é possível observar a inibição da enzima *trans*-sialidase na presença do derivado sintetizado **85** (56%). Foram testados também o carboidrato **48** (0%) e o ácido succínico (3%) para mostrar que estes compostos não são inibidores potenciais na concentração testada (1,0 mM). O composto **85** apresentou porcentagem de inibição superior quando comparado ao DANA (30%) e inferior ao piridoxal fosfato (70%). Este

resultado foi bastante promissor e abre perspectiva para estudo das demais posições, para o estabelecimento da relação entre a posição de grupos substituintes no açúcar, com grande diversidade química, e a taxa de inibição da enzima *trans*-sialidase. É importante destacar que o trabalho desenvolvido é inédito e permitirá que novos e potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T. cruzi* sejam sintetizados de forma regiosseletiva e com bons rendimentos pelo emprego dos métodos otimizados aqui descritos.

4.3.3 Ensaio de atividade tripanocida e citotóxica

O composto **85** também foi testado em ensaios *in vitro*, envolvendo a forma tripomastigota de *T. cruzi* cepa Talahuen e usando benznidazol (Bz) como controle, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP - USP) sob supervisão do Prof. Dr. João Santana da Silva (SILVA et al., 2006; GUEDES et al., 2010). De acordo com o gráfico (Figura 44), o valor da atividade tripanocida foi baixo (inferior a 40%) mesmo na concentração mais elevada (0,5 mM). Por outro lado, de acordo com o resultado do ensaio de citotoxicidade (Figura 45), realizado em cultura de células de baço de camundongos, nenhuma citotoxicidade foi observada mesmo na concentração de 0,5 mM.

Na verdade, as atividades de inibição da enzima TcTS (56%) e tripanocida (40%) não se correlacionam diretamente, pois para estudar o impacto da inibição enzimática sobre a morte parasitária é necessário a realização de experimentos específicos de invasão celular, os quais poderão ser realizados futuramente.

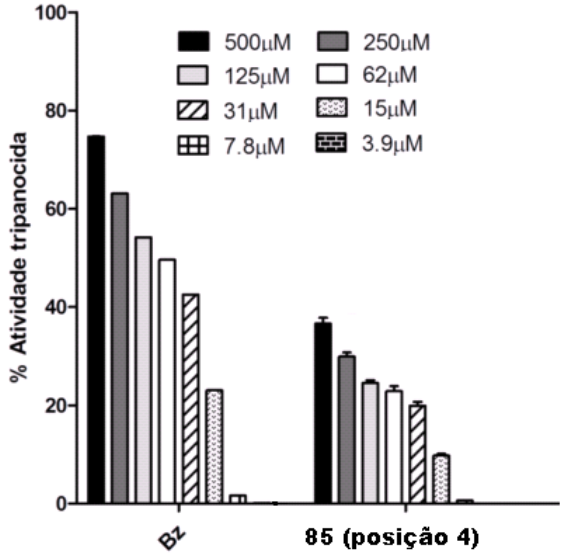


Figura 44 - Atividade tripanocida do composto **85** em relação ao fármaco de referência benznidazol (Bz).

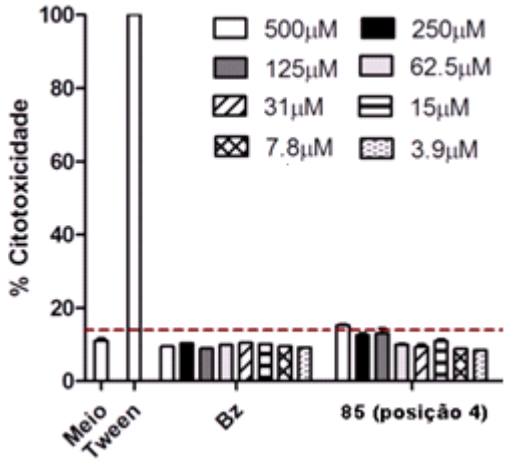


Figura 45 - Porcentagem de morte celular causada pelo composto **85** e benznidazol (Bz), avaliados em ensaios de cultura de células de baço de camundongos.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A pesquisa bibliográfica ao longo do trabalho foi fundamental para expansão dos objetivos propostos inicialmente de síntese, com a finalidade de gerar maior diversidade estrutural de análogos de galactose. Frente às dificuldades encontradas na síntese, é importante destacar que os métodos utilizados na preparação de vários compostos foram reavaliados, repetidos e/ou alterados a fim de que os rendimentos fossem otimizados. Em alguns casos, nos quais os resultados permaneceram insatisfatórios, foram propostas rotas alternativas para síntese de outros intermediários. Dessa forma, o trabalho permitiu a síntese e elucidação estrutural de vários intermediários galactosídicos, bem como de seus derivados com ácido succínico em todas as posições do anel, os quais são inéditos na literatura. Na etapa de desproteção dos grupos acetila houve clivagem do ácido succínico por metanólise, logo outros métodos precisam ser investigados para solucionar o problema. A desproteção dos grupos benzila permitiu a obtenção do derivado com ácido succínico na posição 4 (**85**). O maior tempo investido na síntese dos intermediários impossibilitou o trabalho com ácido benzoico, também proposto incialmente no trabalho.

Com relação aos estudos de modelagem molecular, os resultados obtidos na determinação do padrão farmacofórico a partir dos melhores inibidores de *trans*-sialidase e na determinação dos sítios de interação virtual a partir do mapeamento do sítio ativo foram importantes, pois conduzirão o grupo de pesquisa a um consenso quanto aos campos moleculares, que serão usados como “filtros” para as 50 moléculas selecionadas na base de compostos diverset a partir da triagem virtual baseada na estrutura da enzima. Após esse estudo, os melhores compostos serão adquiridos para ensaio de inibição com TcTS.

Por fim, o método fluorimétrico contínuo foi padronizado com sucesso permitindo a realização do ensaio de inibição de TcTS na presença do derivado de galactose **85**. A inibição de 56% foi bastante promissora e abre perspectiva para investigação da relação entre a presença de ácido succínico nas demais posições da unidade galactosídica e a taxa de inibição da enzima *trans*-sialidase.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

Aparelhagem Analítica:

- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^{1}H) e carbono (RMN ^{13}C): Bruker Advance DRX 300, DRX 400 e DPX 500
- Espectroscopia na região do Infravermelho: Nicolete Protege 460
- Espectrômetro de Massas de alta resolução: Bruker Daltonics micrOTOF II - ESI-TOF
- Fluorímetro: Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader

Aparelhagem Laboratorial:

- Evaporador Rotatório: Büchi RE121
- Agitador magnético: IKA RCT basic
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Luz ultra-violeta: Spectroline CM-10
- Cromatografia Flash de Alta Eficiência (CFAE): Biotage Horizon™
- Pipeta multicanal: Eppendorf

Solventes, Reagentes e Outros Materiais

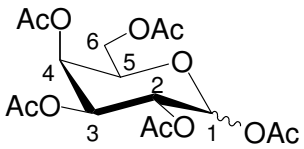
- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) e em Camada Preparativa (CCP) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF_{254} da MERCK®.
- As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel tipo “Flash” (40-63 μm) da MERCK®.
- Alguns solventes e reagentes foram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

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Síntese

6.2.1.1 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-1

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

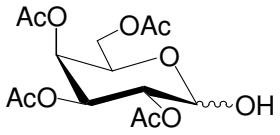


61

A uma suspensão do material de partida comercial D-galactose (**60**) (5,0 g; 27,8 mmol) em anidrido acético (Ac_2O) (25,0 mL) foi adicionado iodo (I_2) (0,25 g; 1,0 mmol) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente. Após 1 hora, todo açúcar havia se dissolvido formando uma solução castanho escura. O acompanhamento da reação por CCD [Hexano: Acetato de Etila (AcOEt) 1:1 (v:v)] mostrou a formação de apenas um produto. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano (DCM) e foi lavada com solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 5%. Em seguida, a fase aquosa foi lavada (2 vezes) com DCM. As fases orgânicas foram reunidas e neutralizadas com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após secagem com sulfato de sódio (Na_2SO_4), filtração e concentração sob pressão reduzida da fase orgânica foi obtido um óleo amarelo claro, que foi cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O composto **61** foi obtido com rendimento de 96% (10,8 g: 26,7 mmol). A proporção entre os anômeros α/β foi 5:1.

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

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranose



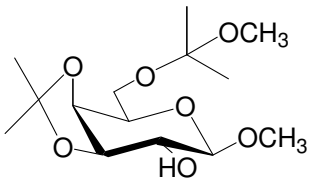
62

O reagente hidrazina acética ($H_2NNH_2.CH_3CO_2H$) (1,3 g; 13,8 mmol) foi adicionado à solução do composto **61** (5,4 g; 13,8 mmol) em dimetilformamida (DMF) (15,0 mL) e a reação foi mantida sob agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi diluído com AcOEt e lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio ($MgSO_4$), filtrada e concentrada. A mistura foi purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] para obtenção do composto **62** com rendimento de 70% (3,4 g; 9,7 mmol) na proporção α/β 3:1.

Dados do composto α: δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 400 MHz) 5,53 (1H, t, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,48 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,5 Hz; $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,42 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,8 Hz, H-2), 5,17 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,5 Hz, H-3), 4,48 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,2 Hz; $J_{5,6}$ 6,3 Hz, H-5), 4,14 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,6 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,1 Hz, H-6a), 4,08 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,8 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,1 Hz, H-6b), 3,12 (1H, dd, *J* 1,2 Hz; *J* 3,5 Hz, O*H*), 2,15-2,00 (12H, 4 s, 4 COCH_3).

6.2.1.2 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-2

3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(1-metoxi-1-metiletil)-β-D-galactopiranosídeo de metila



49

Procedimento 1

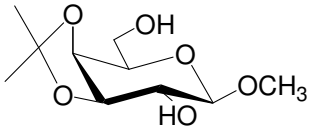
A uma suspensão do material de partida comercial β-D-galactopiranosídeo de metila (**48**) (0,1 g; 0,51 mmol) em 2,2 dimetoxipropano (2,2 DMP) (3,0 mL) foi adicionado ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH) (0,02 g; 0,10 mmol). Após 48 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com trietilamina (Et_3N) e a mistura foi concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)]. O composto **49** foi obtido com rendimento de 40% (0,06 g; 0,20 mmol).

Procedimento 2

A uma suspensão do material de partida **48** (0,1 g; 0,51 mmol) em 2,2 dimetoxipropano (2,2 DMP) (10,0 mL) foi adicionado ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH) (0,009 g; 0,05 mmol). Após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com trietilamina (Et_3N), concentrada, coevaporada com tolueno e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)]. O composto **49** foi obtido com rendimento de 90% (0,14 g; 0,46 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 4,17 (1H, dd, $J_{3,4}$ 5,3 Hz; $J_{4,5}$ 2,0 Hz, H-4), 4,10 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,2 Hz, H-1), 4,06 (1H, dd, $J_{2,3}$ 7,3 Hz; $J_{3,4}$ 5,4 Hz, H-3), 3,87 (1H, dt, $J_{4,5}$ 2,0 Hz; $J_{5,6}$ 6,3 Hz, H-5), 3,72 (2H, d, $J_{5,6}$ 6,3 Hz, H-6a, H6-b), 3,56-3,52 (4H, m, H-2, OCH_3), 3,24 [3H, s, $C(OCH_3)(CH_3)_2$], 2,36 (1H, d, *J* 2,2 Hz, O*H*), 1,52 [3H, s, $C(CH_3)_2$], 1,37 [3H, s, $C(OCH_3)(CH_3)_2$], 1,36 [3H, s, $C(OCH_3)(CH_3)_2$], 1,34 [3H, s, $C(CH_3)_2$].

3,4-*O*-(1-metiletilideno)-β-D-galactopiranosídeo de metila



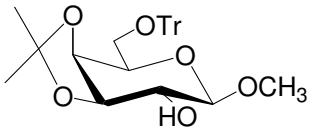
63

A uma suspensão do material de partida **48** (0,5 g; 2,58 mmol) em 2,2 DMP (20,0 mL) foi adicionado *p*-TSOH (0,025 g; 0,145 mmol). Após 5 horas sob agitação à temperatura

ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e concentrada. Na seqüência, DCM (20,0 mL), metanol (5,0 mL) e *p*-TSOH (pH 6) foram adicionados à mistura reacional, que foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi neutralizada com Et_3N, concentrada e cristalizada em Acetona: Hexano para isolamento do composto **63** com rendimento de 83% (0,5 g; 2,14 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 4,17 (1H, dd, $J_{3,4}$ 5,4 Hz; $J_{4,5}$ 2,1 Hz, H-4), 4,12 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,3 Hz, H-1), 4,10 (1H, dd, $J_{2,3}$ 7,3 Hz; $J_{3,4}$ 5,7 Hz, H-3), 4,04-3,98 (1H, m, H-5), 3,90-3,83 (2H, m, H-6a, H6-b), 3,57 (3H, s, OC*H*$_3$), 3,54 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz; $J_{2,3}$ 2,1 Hz, H-2), 2,46 (1H, d, *J* 2,3 Hz, O*H*), 2,16 (1H, dd, *J* 3,6 Hz; *J* 9,3 Hz, O*H*), 1,52 [3H, s, C(C*H*$_3$)$_2$], 1,35 [3H, s, C(C*H*$_3$)$_2$].

3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila

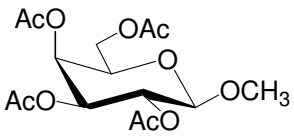


64

A uma suspensão do material de partida **63** (0,24 g; 1,03 mmol) em Py destilada (3,5 mL) foi adicionado TrCl (0,420 g; 1,50 mmol) e o sistema foi mantido sob agitação durante 24 horas a 70 °C. Posteriormente, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com AcOEt e lavada com água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)]. O composto **64** foi obtido com rendimento de 47% (0,23 g; 0,48 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,48 (6H, d, J_{orto} 7,2 Hz, C*H* arom.), 7,31 (6H, t, J_{orto} 7,5 Hz, C*H* arom.), 7,28-7,23 (3H, m, C*H* arom.), 4,25 (1H, dd, $J_{3,4}$ 5,4 Hz; $J_{4,5}$ 2,0 Hz, H-4), 4,09-4,04 (2H, m, H-1, H-3), 3,80 (1H, dt, $J_{4,5}$ 2,0 Hz; $J_{5,6}$ 6,5 Hz, H-5), 3,55 (3H, s, OC*H*$_3$), 3,53 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,8 Hz, H-2), 3,50-3,46 (2H, m, H-6a, H6-b), 2,40 (1H, sl, O*H*), 1,49 [3H, s, C(C*H*$_3$)$_2$], 1,37 [3H, s, C(C*H*$_3$)$_2$].

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila

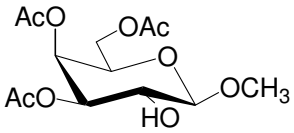


65

A uma suspensão do material de partida **48** (0,20 g; 1,03 mmol) em anidrido acético (2,0 mL) foi adicionado iodo (0,025 g; 0,010 mmol) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente. Após 1 hora, a mistura reacional diluída com DCM, lavada com solução de tiossulfato de sódio 5% e neutralizada com carbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada. O composto **65** foi obtido com rendimento de 92% (0,34 g: 0,95 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 5,39 (1H, dl, $J_{3,4}$ 2,7 Hz, H-4), 5,20 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,1 Hz; $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-2), 5,02 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,5 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,40 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,6 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 7,1 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6b), 3,91 (1H, tl, $J_{5,6}$ 6,6 Hz, H-5), 3,52 (3H, s, OCH_3), 2,15-1,98 (12H, 4 s, 4 CH_3CO).

3,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila



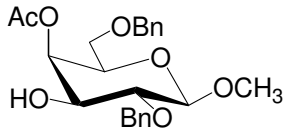
66

A uma suspensão do composto **65** (0,32 g; 0,88 mmol) em uma mistura de tampão fosfato (0,1 M pH 7) (9,0 mL) e acetona (1,0 mL) foi adicionada a enzima triacilglicerol lipase de suíno (0,21 g) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente por 5 dias. Posteriormente, a mistura reacional foi diluída com AcOEt, filtrada sobre celite e lavada com água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-45% e 45-45% (v:v)]. O composto **66** foi obtido com rendimento de 32% (0,09 g: 0,28 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 5,36 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 0,9 Hz, H-4), 4,90 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,3 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,27 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 4,17 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6a), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,8 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6b), 3,89 (1H, dt, $J_{4,5}$ 0,9 Hz; $J_{5,6}$ 6,8 Hz, H-5), 3,77 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,9 Hz, H-2), 3,57 (3H, s, OC*H3*), 2,64 (1H, sl, O*H*), 2,11-2,03 (9H, 2 s, 3 C*H3*CO).

6.2.1.3 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-3

4-acetil-2,6-di-*O*-(fenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila



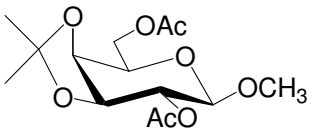
55

A uma suspensão do material de partida **48** (0,1 g; 0,51 mmol) em acetonitrila destilada (CH_3CN) (3,5 mL) foram adicionados os reagentes ortoacetato de trietila (0,14 mL; 0,77 mmol) e *p*-TSOH (0,009 g; 0,05 mmol). Após 1 hora sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N para adição de hidreto de sódio disperso em óleo mineral (60%) (NaH) (0,03 g; 0,77 mmol) e brometo de benzila (BnBr) (0,07 mL; 0,62 mmol). Após 1 hora sob agitação, metanol (0,5 mL) foi adicionado para destruir excesso de NaH e a mistura reacional foi diluída com DCM, lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e neutralizada com solução de $NaHCO_3$ saturada. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)]. O composto **55** foi obtido com rendimento de 16% (0,033 g; 0,08 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,37-7,27 (10H, m, C*H* arom.), 5,40 (1H, d, *J* 3,2 Hz, H-4), 4,94 e 4,66 (2H, AB, J_{AB} 11,3 Hz, CH_2Ph), 4,56 e 4,47 (2H, AB, J_{AB} 11,9 Hz, CH_2Ph), 4,32 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,7 Hz, H-1), 3,80-374 (2H, m, H-3, H-5), 3,59 (3H, s, OC*H3*), 3,56 (2H, dd, $J_{5,6}$

6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6a, H-6b), 3,48 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,9 Hz; $J_{2,3}$ 9,5 Hz, H-2), 2,37 (1H, d, *J* 2,6 Hz, O*H*), 2,06 (3H, s, CH_3CO).

2,6-di-*O*-acetil-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-β-D-galactopiranosídeo de metila

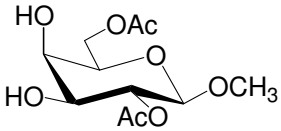


67

A uma solução do composto **63** (0,2 g; 0,85 mmol) em Py (1,5 mL) foi adicionado Ac_2O (1,0 mL). Após 16 horas sob agitação à temperatura ambiente, o meio reacional foi diluído com AcOEt, lavado com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-40% e 40-40% (v:v)]. O composto **67** foi obtido com rendimento de 90% (0,24 g; 0,76 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 5,00-4,91 (1H, m, H-4), 4,37 (2H, d, *J* 6,1 Hz, H-2, H-3), 4,25 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 4,21-4,13 (2H, m, H-6a, H-6b), 3,98 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,9 Hz; $J_{5,6}$ 6,1 Hz, H-5), 3,47 (3H, s, OCH_3), 2,10-2,09 (6H, 2 s, 2 CH_3CO), 1,55 [3H, s, C(CH_3)$_2$], 1,33 [3H, s, C(CH_3)$_2$].

2,6-di-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila



68

Procedimento 1

O composto **67** (0,1 g; 0,31 mmol) foi dissolvido em solução de AcOH 80% (3,0 mL) e o sistema foi mantido sob agitação durante 3 horas a 80 °C. O meio reacional foi diluído com AcOEt e lavado com água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente:

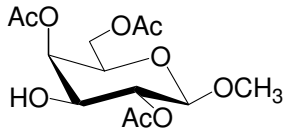
0-60% e 60-60% (v:v)]. O composto **68** foi obtido com rendimento de 90% (0,08 g; 0,28 mmol).

Procedimento 2

A uma suspensão do material de partida **48** (0,1 g; 0,51 mmol) em 2,2 DMP (5,0 mL) foi adicionado *p*-TSOH (0,009 g; 0,05 mmol). Após 5 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e concentrada. Na seqüência, DCM (4,0 mL), metanol (1,0 mL) e *p*-TSOH (pH 6) foram adicionados à mistura reacional, que foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente, novamente neutralizada com Et_3N e concentrada. Em seguida, Py (1,5 mL) e Ac_2O (1,0 mL) foram adicionados à mistura reacional, que foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente e diluída com AcOEt, lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi concentrada e dissolvida em solução de AcOH 80% (3,0 mL) para reagir durante 3 horas a 80 °C. Por fim, o meio reacional foi diluído com AcOEt e lavado com água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)]. O composto **68** foi obtido com rendimento de 63% (0,09 g; 0,32 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 4,92 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 4,41 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,4 Hz, H-6a), 4,32 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 4,30 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,6 Hz, H-6b), 3,89 (1H, d, $J_{3,4}$ 2,6 Hz, H-4), 3,68 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,0 Hz; $J_{5,6}$ 6,5 Hz, H-5), 3,65 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,6 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 3,50 (3H, s, OCH_3), 2,14-2,10 (6H, 2 s, 2 CH_3CO).

2,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila



70

Procedimento 1

A uma solução do composto **67** (0,15 g; 0,47 mmol) em metanol (3,0 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) (0,001 mL). Após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e concentrada. Na seqüência, foram adicionados CH_3CN destilada (2,0 mL), ortoacetato de trietila (0,5 mL; 2,73 mmol) e *p*-TSOH (0,009 g; 0,05 mmol). Após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N, lavada com HCl (1,0 mol.L^{-1}), seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-50% e 50-50% (v:v)]. O composto **70** foi obtido com rendimento de 23% (0,036 g; 0,11 mmol).

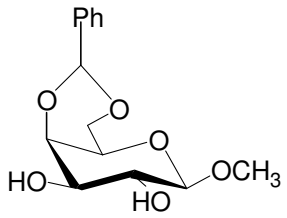
Procedimento 2

A uma solução do composto **68** (0,045 g; 0,16 mmol) em DCM destilado (1,0 mL) foram adicionados os reagentes ortoacetato de trietila (0,29 mL; 16,0 mmol) e *p*-TSOH (0,003 g; 0,016 mmol). Após 1 hora sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e HCl (1,0 mol.L^{-1}) foi adicionado ao sistema, que foi agitado durante 10 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, a fase orgânica foi separada, seca com $MgSO_4$, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-50% e 50-50% (v:v)]. O composto **70** foi obtido com rendimento de 80% (0,04 g; 0,13 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 5,31 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,6 Hz; $J_{4,5}$ 0,8 Hz, H-4), 4,95 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz; $J_{2,3}$ 10,1 Hz, H-2), 4,34 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 4,14 (2H, dd, $J_{5,6}$ 6,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,4 Hz, H-6a, H-6b), 3,87-3,78 (2H, m, H-3, H-5), 3,50 (3H, s, OCH_3), 2,16-2,05 (9H, 3 s, 3 CH_3CO).

6.2.1.4 Estudos envolvendo síntese regiosseletiva para obtenção de intermediário com hidroxila livre em C-4 ou C-6

4,6-*O*-(fenilmetileno)-β-D-galactopiranosídeo de metila



56

Procedimento 1

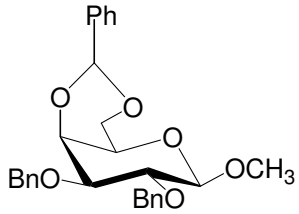
A uma suspensão do material de partida **48** (0,1 g; 0,51 mmol) em acetonitrila destilada (CH_3CN) (1,0 mL) foram adicionados os reagentes benzaldeído dimetil acetal [$PhCH(OCH_3)_2$] (0,38 mL; 2,6 mmol) e *p*-TSOH (0,017 g; 0,10 mmol). Após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e a mistura foi concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 12 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-100% e 100-100% (v:v)]. O composto **56** foi obtido com rendimento de 63% (0,09 g; 0,32 mmol).

Procedimento 2

A uma suspensão do material de partida **48** (1,94 g; 10,0 mmol) em acetonitrila destilada (CH_3CN) (20,0 mL) foram adicionados os reagentes benzaldeído dimetil acetal [$PhCH(OCH_3)_2$] (1,6 mL; 11,0 mmol) e iodo (I_2) (0,25 g; 1,0 mmol). Após 2 horas sob agitação à temperatura ambiente, a mistura reacional foi concentrada e cristalizada com metanol. O composto **56** foi obtido com rendimento de 92% (2,6 g; 9,2 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,78-7,53 (2H, m, C*H* arom.), 7,38-7,34 (3H, m, C*H* arom.), 5,55 (1H, s, C*H*Ph), 4,36 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 1,6 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,6 Hz, H-6a), 4,23-4,20 (2H, m, H-1, H-4), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 1,9 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,6 Hz, H-6b), 3,75 (1H, ddd, $J_{1,2}$ 7,6 Hz; $J_{2,3}$ 9,2 Hz; *J* 1,6 Hz, H-2), 3,69 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,1 Hz; $J_{3,4}$ 3,8 Hz, H-3), 3,59 (3H, s, OCH_3), 3,49 (1H, dl, $J_{4,5}$ 1,3 Hz, H-5), 2,61 (1H, dl, *J* 1,6 Hz, O*H*), 2,58 (1H, dl, *J* 9,1 Hz, O*H*).

2,3-di-*O*-(fenilmetil)-4,6-*O*-(fenilmetileno)-β-D-galactopiranosídeo de metila

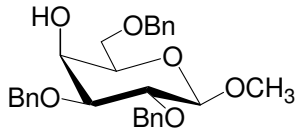


57

A uma solução do composto **56** (1,0 g; 3,5 mmol) em DMF destilado (10,0 mL) foi adicionado hidreto de sódio disperso em óleo mineral (60%) (0,56 g; 14,0 mmol). Após 1 hora e 30 minutos sob agitação a 20 °C, o sistema foi resfriado a -5 °C para adição lenta de brometo de benzila (BnBr) (1,0 mL; 8,8 mmol) e mantido sob agitação por 3 horas. Após esse tempo, a mistura reacional foi diluída com DCM e foi adicionada água gelada para destruir excesso de NaH. A fase orgânica foi separada em funil de adição, seca com sulfato de magnésio, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 25 mm; fluxo: 25 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)]. O composto **57** foi obtido com rendimento de 80% (1,3 g; 2,8 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,58-7,53 (2H, m, C*H* arom.), 7,41-7,27 (13H, m, C*H* arom.), 5,50 (1H, s, C*H*Ph), 4,91 (1H, d, J_{AB} 10,6 Hz, CH_2Ph), 4,81-4,74 (3H, m, CH_2Ph), 4,33 (1H, d, $J_{5,6a}$ 1,3 Hz, H-6a), 4,32 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 4,12 (1H, d, $J_{3,4}$ 3,1 Hz, H-4), 4,02 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 1,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,2 Hz, H-6b), 3,84 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 3,59 (3H, s, OCH_3), 3,56 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,6 Hz; $J_{3,4}$ 3,6 Hz, H-3), 3,33 (1H, sl, H-5).

2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila



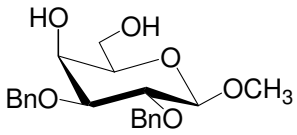
58

A uma solução do composto **57** (0,01 g; 0,216 mmol) em acetonitrila destilada (2,0 mL), sob atmosfera inerte e agitação à temperatura ambiente, foram adicionados cianoboridreto de sódio ($NaBH_3CN$) (0,068 g; 1,08 mmol) e peneira molecular (4 Å). Na

seqüência, iodo (0,19 g; 0,75 mmol) foi adicionado lentamente (15 minutos) ao meio reacional que foi mantido sob agitação por 30 minutos. Após esse tempo, o sistema foi diluído com DCM, filtrado sobre celite e lavado com solução de carbonato de sódio 10% e água. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-20% e 20-20% (v:v)]. O composto **58** foi obtido com rendimento de 22% (0,023 g; 0,049 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 7,42-7,27 (15H, m, C*H* arom.), 4,90 (1H, d, J_{AB} 10,9 Hz, CH_2Ph), 4,73 (1H, d, J_{AB} 10,9 Hz, CH_2Ph), 4,72 (2H, s, CH_2Ph), 4,60 (2H, s, CH_2Ph), 4,29 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,5 Hz, H-1), 4,04 (1H, d, $J_{3,4}$ 3,1 Hz, H-4), 3,82 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,0 Hz, H-6a), 3,75 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,0 Hz, H-6b), 3,64 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2), 3,60-3,54 (4H, m, H-5, OCH_3), 3,50 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,3 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3).

2,3-di-*O*-(fenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila

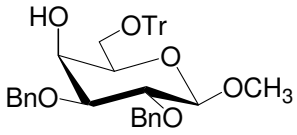


71

Sob atmosfera inerte (N_2), hidreto de lítio e alumínio ($LiAlH_4$) (0,16 g; 4,31 mmol) foi adicionado em porções a uma solução do composto **57** (0,5 g; 1,08 mmol) em DCM/éter (1:1) destilados (12,0 mL). Na seqüência, cloreto de alumínio ($AlCl_3$) em éter destilado (6 mL) foi adicionado lentamente e o meio reacional foi aquecido (50 ^oC) e mantido sob agitação durante 2 horas e 30 minutos. Após esse tempo, o sistema foi resfriado em banho de gelo e AcOEt e água foram adicionados para destruir excesso de hidreto. Posteriormente, foi adicionado éter e a fase orgânica foi separada em funil de adição, seca com sulfato de magnésio, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 12 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-70% e 70-70% (v:v)]. O composto **71** foi obtido com rendimento de 61% (0,25 g; 0,66 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 7,40-7,27 (10H, m, C*H* arom.), 4,90 (1H, d, J_{AB} 11,1 Hz, CH_2Ph), 4,77-4,68 (3H, m, CH_2Ph), 4,30 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,6 Hz, H-1), 4,02-3,94 (2H, m, H-4, H-6a), 3,83 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 4,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,7 Hz, H-6b), 3,64 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,6 Hz; $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2), 3,58 (3H, s, OCH_3), 3,54-3,44 (2H, m, H-3, H-5), 2,30 (2H, sl, O*H*).

2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila

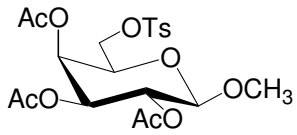


72

A uma suspensão do material de partida **71** (0,40 g; 1,07 mmol) em Py destilada (5,0 mL) foi adicionado TrCl (0,450 g; 1,60 mmol) e o sistema foi mantido sob agitação durante 24 horas a 70 °C. Posteriormente, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com AcOEt e lavada com água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-15% e 15-15% (v:v)]. O composto **72** foi obtido com rendimento de 39% (0,26 g; 0,42 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,46 (5H, d, J_{orto} 7,2 Hz, C*H* arom.), 7,40-7,21 (20H, m, C*H* arom.), 4,89 (1H, d, J_{AB} 11,2 Hz, CH_2Ph), 4,77-4,69 (3H, m, CH_2Ph), 4,25 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 3,98 (1H, sl, H-5), 3,63 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2), 3,59 (3H, s, OCH_3), 3,49-3,44 (2H, m, H-3, H-6a), 3,43-3,35 (2H, m, H-4, H-6b), 2,40 (1H, d, *J* 2,3 Hz, O*H*).

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-(4-metilbenzenosulfonato)-β-D-galactopiranosídeo de metila



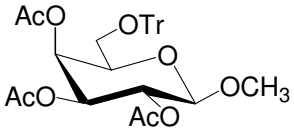
73

Uma suspensão do material de partida **48** (0,1 g; 0,51 mmol) em piridina destilada (0,4 mL) foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte. Cloreto de tosila

(TsCl) (0,01 g; 0,56 mmol) em piridina destilada (0,2 mL) foi adicionado lentamente à suspensão, que foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Na seqüência, piridina destilada (1,0 mL) e anidrido acético (0,5 mL) foram adicionados à mistura reacional, que foi agitada durante 15 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o meio reacional foi diluído com AcOEt, lavado com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 8 mL/min; solvente: Tolueno/AcOEt; gradiente: 0-10% e 10-10% (v:v)]. O composto **73** foi obtido com rendimento de 56% (0,13 g; 0,28 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 7,76 (2H, d, J_{orto} 8,3 Hz, C*H* arom.), 7,35 (2H, d, J_{orto} 8,0 Hz, C*H* arom.), 5,35 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 0,9 Hz, H-4), 5,14 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz; $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 4,97 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,36 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 4,13 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,8 Hz, H-6a), 4,01 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,8 Hz, H-6b), 3,94 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,1 Hz; $J_{5,6}$ 6,4 Hz, H-5), 3,48 (3H, s, OCH_3), 2,45 (3H, s, SO_2PhCH_3), 2,05-1,96 (9H, 3 s, 3 CH_3CO).

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila



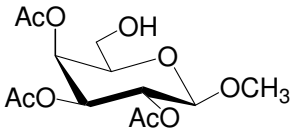
75

A uma suspensão do material de partida **48** (0,2 g; 1,0 mmol) em Py destilada (2,5 mL) foi adicionado cloreto de tritila (TrCl) (0,42 g; 1,5 mmol) e o sistema foi mantido sob agitação durante 24 horas a 70 °C. Após acompanhamento da reação por CCD [Hexano: Acetato de Etila 0:1 (v:v)], Ac_2O (2,0 mL) foi adicionado à mistura reacional, que foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o meio reacional foi diluído com AcOEt, lavado com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min;

solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-20% e 20-20% (v:v)]. O composto **75** foi obtido com rendimento de 82% (0,46 g; 0,82 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,41-7,36 (6H, m, C*H* arom.), 7,33-7,28 (6H, m, C*H* arom.), 7,26-7,21 (3H, m, C*H* arom.), 5,58 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 0,8 Hz, H-4), 5,13 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,06 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,37 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 3,83 (1H, dt, $J_{4,5}$ 0,8 Hz; $J_{5,6}$ 6,5 Hz, H-5), 3,49 (3H, s, OCH_3), 3,41 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 8,8 Hz, H-6a), 3,10 (1H, t, $J_{6a,6b}$ 8,8 Hz, H-6b), 2,06-1,89 (9H, 3 s, 3 CH_3CO).

2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila



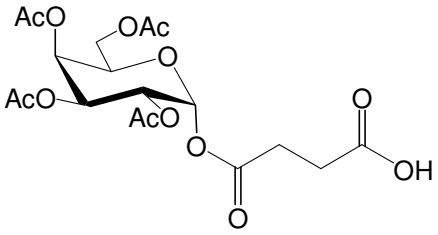
74

A uma solução de I_2 (0,02 g; 0,08 mmol) em metanol (2,0 mL) foi adicionado o composto **75** (0,06 g; 0,1 mmol) e o sistema foi mantido sob agitação durante 72 horas a 60 ^oC. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada, diluída com AcOEt, lavada com solução de $Na_2S_2O_3$ (10%) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 12 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-30% e 30-30% (v:v)]. O composto **74** foi obtido com rendimento de 70% (0,023 g; 0,07 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 5,37 (1H, d, $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-4), 5,23 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,05 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,42 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 3,77 (2H, dd, $J_{5,6}$ 6,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,4 Hz, H-6a, H-6b), 3,55-3,53 (1H, m, H-5), 3,53 (3H, s, OCH_3), 2,17-2,00 (9H, 3 s, 3 CH_3CO).

6.2.1.5 Estudos envolvendo síntese de derivados com ácido succínico

butanodioato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila

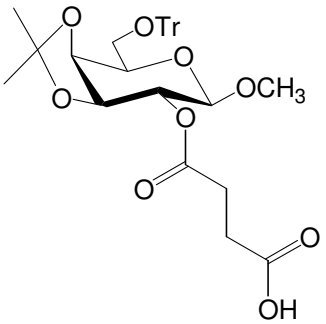


76

O reagente anidrido succínico (0,51 g; 5,07 mmol) e o catalisador 4-(N,N-dimetilamino) piridina (DMAP) (0,06 g; 0,50 mmol) foram adicionados à solução do composto **62** (0,59 g; 1,69 mmol) em Py (6,0 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada, concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt: AcOH 1:1:gotas (v:v)] para obtenção do composto **76** (apenas o anômero α) com rendimento de 80% (0,6 g; 1,35 mmol).

δ_H (ppm) (CD_3OD, 300 MHz) 6,35 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1), 5,52 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 1,1 Hz, H-4), 5,36 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,7 Hz; $J_{3,4}$ 3,3 Hz, H-3), 5,22 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,6 Hz; $J_{2,3}$ 10,7 Hz, H-2), 4,46 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,2; $J_{5,6}$ 6,5 Hz, H-5), 4,15 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6a), 4,05 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6b), 2,77-2,69 (2H, m, $OCOCH_2CH_2COOH$), 2,67-2,59 (2H, m, $OCOCH_2CH_2COOH$), 2,15-1,98 (12H, 4 s, 4 $COCH_3$). δ_C (ppm) (CD_3OD, 75 MHz) 174,2 (CO_2H); 171,0 ($OCOCH_2CH_2$); 170,7, 170,5, 170,3, 170,1 ($COCH_3$); 89,5 (C-1); 68,7 (C-5); 67,6 (C-4); 67,4 (C-2); 66,6 (C-3); 61,0 (C-6); 28,4, 28,2 (CH_2CH_2); 19,1, 19,0, 19,0 ($COCH_3$). ESI-MS calculado para $C_{18}H_{24}O_{13}$ $[M+Na]^+$: 471,1109 e encontrado: 471,1108.

2-butanodioato-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila

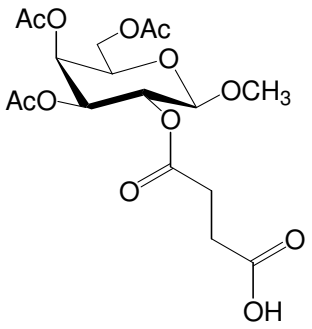


78

O reagente anidrido succínico (0,03 g; 0,32 mmol) e o catalisador DMAP (0,004 g; 0,03 mmol) foram adicionados à solução do composto **64** (0,05 g; 0,11 mmol) em Py (1,0 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 19 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-50% e 50-50% (v:v)] para obtenção do composto **78** com rendimento de 82% (0,05 g; 0,09 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 7,44-7,37 (6H, m, C*H* arom.), 7,28-7,18 (9H, m, C*H* arom.), 4,48 (1H, t, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-2), 4,18 (1H, dd, $J_{3,4}$ 5,3 Hz; $J_{4,5}$ 1,8 Hz, H-4), 4,15 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,1 Hz, H-1), 4,08 (1H, dd, $J_{2,3}$ 7,1 Hz; $J_{3,4}$ 5,3 Hz, H-3), 3,74 (1H, dt, $J_{4,5}$ 1,8 Hz; $J_{5,6}$ 6,2 Hz, H-5), 3,45 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 3,1 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,3 Hz, H-6a), 3,40 (3H, s, OCH_3), 3,37 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 2,8 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,0 Hz, H-6b), 2,66-2,61 (4H, m, OCOCH_2CH_2COOH), 1,44 [3H, s, C(CH_3)$_2$], 1,27 [3H, s, C(CH_3)$_2$]. δ_C (ppm) ($CDCl_3$, 75 MHz) 176,6 (*C*O_2H); 171,0 (O*C*OCH_2CH_2); 143,9 (C-quat. arom.); 128,7 127,9 127,8 127,3, 127,0 (*C*H arom.); 101,2 (C-1); 76,8 (C-3); 73,7 (C-4); 73,4 (C-2); 72,2 (C-5); 62,6 (C-6); 56,3 (O*C*H_3); 28,8, 28,4 (*C*H_2*C*H_2); 29,0 [*C*(CH_3)$_2$]; 27,3, 26,0 [C(*C*H_3)$_2$]. ESI-MS calculado para $C_{33}H_{36}O_9$ $[M+Na]^+$: 577,2432 e encontrado: 243,1179.

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila

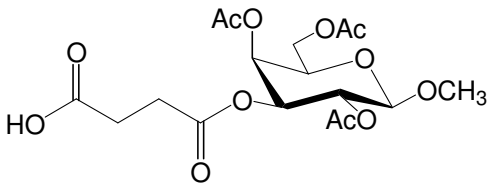


79

O reagente anidrido succínico (0,08 g; 0,84 mmol) e o catalisador DMAP (0,01 g; 0,08 mmol) foram adicionados à solução do composto **66** (0,09 g; 0,28 mmol) em Py (1,0 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 48 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)] para obtenção do composto **79** com rendimento de 71% (0,11 g; 0,26 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 5,38 (1H, dl, $J_{3,4}$ 3,1 Hz, H-4), 5,22 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,03 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,41 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,1 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 7,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,1 Hz, H-6b), 3,91 (1H, t, $J_{5,6}$ 6,5 Hz, H-5), 3,51 (3H, s, OC*H*$_3$), 2,74-2,59 (4H, m, OCOC*H*$_2$C*H*$_2$COOH), 2,15-1,97 (9H, 3 s, 3 C*H*$_3$CO). δ_C (ppm) ($CDCl_3$, 75 MHz) 176,9 (*C*O_2H); 170,7 (O*C*OCH_2CH_2); 170,4, 170,3, 170,2 (*C*OCH_3); 101,9 (C-1); 70,8 (C-5); 70,6 (C-3); 69,2 (C-2); 67,1 (C-4); 61,3 (C-6); 57,0 (O*C*H_3); 28,7, 28,6 (*C*H_2*C*H_2); 20,6, 20,6, 20,5 (CO*C*H_3). ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+K]^+$: 459,0899 e encontrado: 459,0894.

2,4,6-tri-*O*-acetil-3-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila

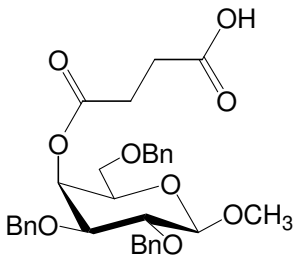


80

O reagente anidrido succínico (0,09 g; 0,93 mmol) e o catalisador DMAP (0,01 g; 0,09 mmol) foram adicionados à solução do composto **70** (0,10 g; 0,31 mmol) em Py (1,5 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 4 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)] para obtenção do composto **80** com rendimento de 80% (0,10 g; 0,25 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 5,37 (1H, d, $J_{3,4}$ 3,1 Hz, H-4), 5,20 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,05 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,40 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,4 Hz, H-6a), 4,13 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6b), 3,91 (1H, t, $J_{5,6}$ 6,7 Hz, H-5), 3,51 (3H, s, OC*H*$_3$), 2,70-2,48 (4H, m, OCOC*H*$_2$C*H*$_2$COOH), 2,15-2,05 (9H, 2 s, 3 C*H*$_3$CO). δ_C (ppm) ($CDCl_3$, 125 MHz) 176,9 (*C*O_2H); 171,5 (O*C*OCH_2CH_2); 170,8, 170,1 (*C*OCH_3); 102,4 (C-1); 71,8 (C-3); 70,4 (C-5); 69,1 (C-2); 67,6 (C-4); 61,7 (C-6); 57,3 (O*C*H_3); 29,1, 28,8 (*C*H_2*C*H_2); 21,1, 21,0 (CO*C*H_3). ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 443,1159 e encontrado: 443,1160.

4-butanodioato-2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila

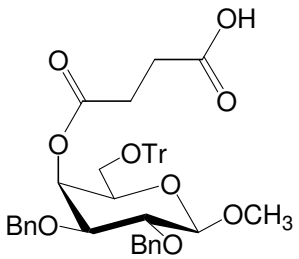


81

O reagente anidrido succínico (0,048 g; 0,48 mmol) e o catalisador DMAP (0,006 g; 0,05 mmol) foram adicionados à solução do composto **58** (0,075 g; 0,16 mmol) em Py (1,5 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 48 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-20%, 20-20% (v:v)] para obtenção do composto **81** com rendimento de 52% (0,047 g; 0,08 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 500 MHz) 7,39-7,26 (15H, m, C*H* arom.), 5,61 (1H, d, $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 4,84 (1H, d, J_{AB} 10,9 Hz, CH_2Ph), 4,72 (2H, 2d, J_{AB} 10,9 Hz, J_{AB} 11,4 Hz, CH_2Ph), 4,56-4,45 (3H, m, CH_2Ph), 4,30 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,5 Hz, H-1), 3,71 (1H, t, $J_{5,6}$ 6,8 Hz, H-5), 3,62 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,0 Hz; $J_{2,3}$ 9,5 Hz, H-2), 3,58 (3H, s, OCH_3), 3,57-3,49 (3H, m, H-3, H-6a, H-6b), 2,66-2,55 (4H, m, OCOCH_2CH_2COOH). δ_C (ppm) ($CDCl_3$, 75 MHz) 177,0 (*C*O_2H); 171,5 (O*C*OCH_2CH_2); 138,6, 137,8, 137,7 (C-quat. arom.); 128,5-127,5 (*C*H arom.); 104,8 (C-1); 72,0 (C-5); 79,0 (C-3); 75,2, 73,7 (*C*H_2 benzil); 60,3 (C-2); 71,9 (*C*H_2 benzil); 67,5 (C-4); 66,6 (*C*H_2 benzil); 60,8 (C-6); 57,0 (O*C*H_3); 28,8, 28,7 (*C*H_2*C*H_2). ESI-MS calculado para $C_{32}H_{36}O_9$ $[M+Na]^+$: 587,2251 e encontrado: 587,2256.

4-butanodioato-2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila

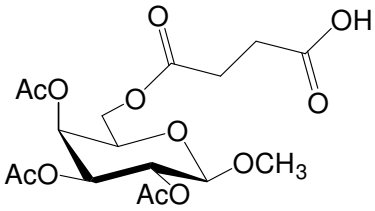


82

O reagente anidrido succínico (0,05 g; 0,49 mmol) e o catalisador DMAP (0,006 g; 0,05 mmol) foram adicionados à solução do composto **72** (0,10 g; 0,16 mmol) em Py (2,0 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-20%, 20-20%, 20%-50% (v:v)] para obtenção do composto **82** com rendimento de 85% (0,10 g; 0,14 mmol).

δ_H (ppm) (CD_3OD, 300 MHz) 7,44 (5H, d, J_{orto} 7,0 Hz, C*H* arom.), 7,38-7,25 (20H, m, C*H* arom.), 5,68 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 0,8 Hz, H-4), 4,78 (2H, d, J_{AB} 11,2 Hz, CH_2Ph), 4,67 (1H, d, J_{AB} 11,0 Hz, CH_2Ph), 4,52 (1H, d, J_{AB} 11,0 Hz, CH_2Ph), 4,35 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 3,80 (1H, dt, $J_{4,5}$ 0,6 Hz; $J_{5,6}$ 6,7 Hz, H-5), 3,69 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,6 Hz, H-3), 3,54 (3H, s, OCH_3), 3,43 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 9,7 Hz, H-2), 3,36 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,9 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,2 Hz, H-6a), 3,07 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 7,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 9,0 Hz, H-6b), 2,48-2,41 (4H, m, OCOCH_2CH_2COOH).

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila

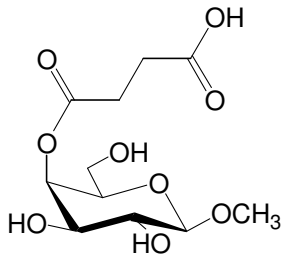


83

O reagente anidrido succínico (0,12 g; 1,20 mmol) e o catalisador DMAP (0,01 g; 0,09 mmol) foram adicionados à solução do composto **74** (0,13 g; 0,40 mmol) em Py (2,0 mL). A reação foi mantida sob agitação durante 17 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a mistura reacional foi coevaporada com tolueno, diluída com DCM e lavada com solução de HCl (1,0 mol.L^{-1}) e água. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e purificada por CFAE [coluna: 12 mm; fluxo: 10 mL/min; solvente: Hexano/AcOEt; gradiente: 0-60% e 60-60% (v:v)] para obtenção do composto **83** com rendimento de 71% (0,12 g; 0,28 mmol).

δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 300 MHz) 5,43 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,4 Hz; $J_{4,5}$ 1,1 Hz, H-4), 5,18 (1H, dd, $J_{1,2}$ 7,8 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,00 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 4,40 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,9 Hz, H-1), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6a), 4,12 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 7,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz, H-6b), 3,92 (1H, dt, $J_{4,5}$ 0,9 Hz; $J_{5,6}$ 6,7 Hz, H-5), 3,51 (3H, s, OC*H*$_3$), 2,78-2,65 (4H, m, OCOC*H*$_2$C*H*$_2$COOH), 2,06-1,96 (9H, 3 s, 3 C*H*$_3$CO). δ_C (ppm) ($CDCl_3$, 75 MHz) 176,2 (*C*O$_2$H); 171,6 (O*C*OCH$_2$CH$_2$); 170,6, 170,3, 169,7 (*C*OCH$_3$); 102,0 (C-1); 70,9 (C-5); 70,6 (C-3); 68,8 (C-2); 67,4 (C-4); 61,3 (C-6); 56,9 (O*C*H$_3$); 28,8, 28,7 (*C*H$_2$*C*H$_2$); 20,8, 20,7, 20,5 (CO*C*H$_3$). ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 443,1159 e encontrado: 443,1164.

4-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila



85

A uma solução do composto **81** (0,03 g; 0,05 mmol) em metanol/ácido acético (10:1) (1,5 mL) foi adicionado paládio-carvão 10% (30 mg) e o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente e atmosfera de hidrogênio por 12 horas. O meio reacional foi diluído

com metanol, filtrado sobre celite e concentrado. Dessa forma, foi obtido o composto **85** com rendimento de 100% (0,014 g; 0,05 mmol).

δ_H (ppm) (D_2O, 500 MHz) 5,29 (1H, d, $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-4), 4,37 (1H, d, $J_{1,2}$ 7,8 Hz, H-1), 3,87-3,84 (1H, m, H-5), 3,83 (1H, dd, $J_{2,3}$ 9,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,4 Hz, H-3), 3,60-3,57 (2H, m, H-6a, H-6b), 3,55 (1H, s, OCH_3), 3,48 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,0 Hz; $J_{2,3}$ 9,8 Hz, H-2), 2,77-2,72 (2H, m, $OCOCH_2CH_2COOH$), 2,70-2,65 (2H, m, $OCOCH_2CH_2COOH$). δ_C (ppm) (D_2O, 75 MHz) 177,0 (CO_2H); 174,0 ($OCOCH_2CH_2$); 103,7 (C-1); 73,5 (C-5); 70,9 (C-3); 70,3 (C-2); 70,5 (C-4); 60,3 (C-6); 57,1 (OCH_3); 29,2, 28,9 (CH_2CH_2). ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 317,0843 e encontrado: 317,0843.

6.2.2 Modelagem molecular

6.2.2.1 Triagem virtual baseada na estrutura de TcTS

Foram utilizadas duas técnicas para a derivação do padrão farmacofórico, o web-servidor PharmaGist e o programa Discovery Studio 2.5 (Discovery Studio Viewer Pro, 2007). O servidor de dados PharmaGist é um método baseado no ligante e o arquivo de entrada do programa consiste em diversos modelos farmacofóricos que são computados pelos múltiplos alinhamentos flexíveis dos ligantes. Sendo assim, esse ligante funciona como uma molécula “pivô” no alinhamento dos outros ligantes. Adicionalmente, o programa Discovery Studio 2.5, baseado no algoritmo Hypogen, considera as moléculas analisadas como modelos para a criação de um padrão estérico da localização de grupos funcionais comuns a todas as estruturas, capazes de realizar interações efetivas com sítios de ligação complementares da proteína.

6.2.2.2 Determinação do padrão farmacofórico a partir das estruturas de inibidores de *trans*-sialidase

O farmacóforo do ponto de vista do sítio receptor foi determinado a partir dos campos de interação molecular (MIFs), obtidos com diferentes grupos de prova (carboxila alquílica, carboxila arílica, hidroxila alquílica e carbono aromático). Os MIFs foram gerados com o programa GRID v.22 (Molecular Discovery Ltd) (GOODFORD, 1985) para o sítio ativo da enzima TcTS (código PDB: 1MS8). As energias de interação foram calculadas em um arranjo regular tridimensional (grade) de pontos ao redor da molécula alvo movendo-se sistematicamente os grupos de prova através desse arranjo. Dessa forma, a cada ponto, a energia de interação entre a prova e o alvo foi calculada usando uma função de energia.

6.2.2.3 Determinação dos sítios de interação virtual a partir da topologia do receptor (mapeamento do sítio ativo)

A triagem virtual para a busca de potenciais inibidores de TcTS foi realizada com o programa GOLD 3.1.1 (NISSINK et al., 2002) na base de compostos diverset. O complexo cristalográfico da enzima TcTS com o inibidor DANA, selecionado do PDB (código 1MS8), foi escolhido para as simulações de “docking” flexível, que foram realizadas utilizando o programa GOLD 3.1.1, o qual contém um algoritmo genético. Os cálculos de “docking” foram realizados no interior de uma esfera de 12 Å centralizada no átomo 5323 (OH) do resíduo de Tyr342 de TcTS. Previamente aos cálculos de “docking” e após a remoção do ligante DANA, bem como de moléculas de água, átomos de hidrogênio das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos foram adicionados e orientados utilizando o programa DS ViewerPro 2.5. As dez orientações de maior escore para cada composto foram selecionadas utilizando a função de escore denominada GoldScore (NISSINK et al., 2002). Com base nesta função, o programa classificou as orientações das moléculas em ordem decrescente de afinidade (“fitness” ou escore) com o sítio ligante do receptor.

6.2.3 Ensaios biológicos

6.2.3.1 Ensaio de inibição

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

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e em tréplica (três dias diferentes) e seus dados foram analisados no programa Prisma 4.0. Para cada composto testado foi gerado um gráfico que relaciona U.F. e tempo de reação através do qual foi possível calcular a velocidade de reação (ângulo de inclinação de cada uma das retas) por regressão linear. O valor da porcentagem de inibição foi calculado empregando-se a equação $\% I = 100 \times [1 - (Vi / V_0)]$, onde Vi é a velocidade da reação na presença do composto testado e V_0 é a velocidade da reação na ausência do composto (controle).

6.2.3.2 Ensaio de atividade tripanocida e citotóxica

Células de rim de macacos (LLC-MK2 strain- ATCC) foram ressuspendidas em meio RPMI na ausência de vermelho fenol (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY) contend 10,0% de soro fetal bovino (Life Technologies Inc., Bethesda, MD) e antibióticos

(Sigma Chemical Co., St. Louis) a 2,0 x 10^3 células/poço e foram cultivadas em places de 96 poços por 24 h. As células foram infectadas com 1,0 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, a qual expressa o gene de β-galactosidase a partir de *E. coli*, e após 24 h os compostos foram adicionados nas concentrações de 0,5 mM-3,5 µM. Após 4 dias de cultura, 50,0 µl de PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e 100,0 µM "Chlorophenol Red-β-D-galactoside" (CPRG -Sigma) foram adicionados. As placas foram incubadas a 37°C por 4 h e os valores de absorbância foram lidos a 570 nm (BUCKNER et al., 1996)

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada em células de baço de camundongos C57BL/6 (SILVA et al*.,* 2008). Estas células foram isoladas por dissociação e incubadas por 5 minutos com tampão para lise das hemáceas (uma parte de 0,17 M Tris-HCl pH 7,5 e nove partes de 0,16 M cloreto de amônio). As células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e mantidas em cultura em placas de 96 poços contendo 5,0 × 10^5 célula/poço com diferentes concentrações dos compostos a 37°C por 24 h. Tween 20 a 0,5% foi usado como controle positivo na geração de células morta. As células foram separadas e incubadas com 10,0 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma) e analisadas no aparelho FACSCantoII (Becton-Dickinson Immunocytometry System Inc., San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo (Ashland, Oregon, USA).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. **Molecular and Biochemical Parasitololgy**, v.114, p.143-150, 2001.

AGRELOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Acα2→3Galpβ1→6(Galfβ1→4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.93-96, 2003.

AGUSTI, R.; PARIS, G.; RATIER, L.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v.14, p.659-670, 2004.

AGUSTI, R.; GIORGI, M. E.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; LEDERKREMER, R. M. Comparative rates of sialylation by recombinant *trans*-sialidase and inhibitor properties of synthetic oligosaccharides from *Trypanosoma cruzi* mucins-containing galactofuranose and galactopyranose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2611-2616, 2007.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.A.; GREADY, J.E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews,** v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Chagas disease centenary. **Revista de Saúde Pública,** v. 43, p.381-382, 2009.

AMAYA M. F.; BUSCHIAZZO A.; NGUYEN T.; ALZARI P. M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with T-cruzi *trans*-sialidase. **Journal of Molecular Biology**, v.325, p.773-784, 2003.

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

ANKNER, T.; HILMERSSON, G. Instantaneous deprotection of tosylamides and esters with SmI2/Amine/Water. **Organic Letters**, v.11, n.3, p.503-506, 2009.

ARIOKA S.; SAKAGAMI, M.; UEMATSU, R.; YAMAGUCHI, H.; TOGAME, H.; TAKEMOTO, H.; HINOU, H.; NISHIMURA, S. Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1633-1640, 2010.

BARILI P. L.; BERTI G.; BERTOZZI, D.; CATELANI, G.; COLONNA, F.; CORSETTI, T.; D'ANDREA, F. Meta-chloroperbenzoic acid as a selective reagent for the removal of O-propenyl groups. Its use in the synthesis of some D-galactopyranoside and 4-deoxy-L-threo-4-hexenopyranoside derivatives. **Tetrahedron,** v.46, p.5365-5376, 1990.

BARILI, P. L.; BERTI, G.; CATELANI, G.; COLONNA, F.; MARRA, A. New results in the isopropylidenation of galactopyranosides: useful intermediates for the synthesis of galactose derivatives. **Tetrahedron Letters,** v.27, n.20, p.2307-2310, 1986.

BARILI, P. L.; BERTI, G.; D'ANDREA, F.; DI BUSSOLO, V.; GRANUCCI, I. A new synthesis of L-Ascorbic acid from D-galactose. **Tetrahedron,** v.48, p. 6273-6284, 1992.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p.347-382, 1973.

BRENK, R., NAERUM, L., GRAEDLER, U., GERBER, H., D., GARCIA, G. A. Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 46, p. 1133-1143, 2003.

BUCHINI, S.; BUSCHIAZZO, A.; WITHERS, S. G. A New Generation of Specific *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase Inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v.47, p.2700-2703, 2008.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β-galactoside. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.11, p.2592 - 2597, 1996.

BUREAU, R.; DAVEU, C.; LANCELOT, J. C.; RAULT, S. Molecular design based on 3D-pharmacophore. Application to 5-HT subtypes receptors. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences,** vol. 42, n. 2, p. 429-436, 2002.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review Microbiology**, v.49, p.175-200, 1995

BUSCHIAZZO A.; AMAYA M. F.; CREMONA M. L.; FRASCH A. C.; ALZARI P. M. The crystal structure and mode of action of *trans*-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Molecular Cell**, v.10, p.757-768, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; MUIÁ, R.; LARRIEUX, N.; PITCOVSKY, T.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2012.

BUSSE, H.; HAKODA, M., STANLEY, M.; STREICHER, H. Galactose-phosphonates as mimetics of the sialyltransfer by trypanosomal sialidases. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.26, p.159-194, 2007.

CAMPO, V. L.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; CARVALHO, I. Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface *trans*-sialidase **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 145-156, 2012.

CAREY F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry - A**: structure and mechanisms. 4ª ed. New York: Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000. 823 p.

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, 2010a.

CARVALHO, S. T.; SOLA-PENNA, M.; OLIVEIRA, I. A.;, PITA, S.; GONÇALVES, A. S.; NEVES, B. C.; SOUSA, F. R.; FREIRE-DE-LIMA, L.; KUROGOCHI, M.; HINOU, H.; NISHIMURA, S.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; TODESCHINI, A. R. A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiology,** v. 20, n. 8, p. 1034-1045, 2010b.

CHEN, G. S., CHANG, C. S., KAN, W. M., CHANG, C. L., WANG, K. C., CHERN, J. W. Novel lead generation through hypothetical pharmacophore three-dimensional database searching: discovery of isoflavonoids as nonsteroidal inhibitors of rat 5 alpha-reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3759-3763, 2001.

CHENG, H.; CAO, X.; XIAN, M.; FANG, L.; CAI, T. B.; JI, J. J.; TUNAC, J. B.; SUN, D.; WANG, P.G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate-Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.645-652, 2005.

CLAYTON, J. Outlook: Chagas disease. **Nature,** v. 465, p. S4-S22, 2010.

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

CORSARO, A.; CHIACCHIO, U.; PISTARA, V.; ROMEO, G. Microwave-assisted chemistry of carbohydrates. **Current Organic Chemistry**, v.8, n.6, p.511-538, 2004.

COURA, J. R.; De CASTRO, S. L. A Critical Rewiew on Chagas Disease Chemoterapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.

DA SILVA, C. O. Efeito Anomérico em Carboidratos: Fatos e Hipóteses **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, 235-246, 2011.

DARAGICS, K.; FUEGEDI, P. Regio- and chemoselective reductive cleavage of 4,6-*O*-benzylidene-type acetals of hexopyranosides using BH_3 THF-TMSOTf. **Tetrahedron Letters**, v.50, n.24, p.2914-2916, 2009.

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

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO**,** A. D. Quimioterapia da Doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova***,* v 32, n.9, p.2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas Disease (*American Trypanosomiasis*) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.103-121, 1999.

DI-NOIA, J. M.; POLLEVICK, G. D.; XAVIER, M. T.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.32078-32083, 1996.

DO CAMPO, R. Recent developments in the chemoterapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, p.1157-1164, 2001.

DONG, H.; PEI, Z.; BYSTRÖM, S.; RAMSTRÖM, O. Reagent-dependent regioselective control in multiple carbohydrate esterifications. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 1499-1502, 2007.

DROR, O.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Novel Approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: method and applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2333-2343, 2009.

EGIMA C. M.; BRIONES M. R. S.; FREITAS L. H.G.; SCHENKMAN R. P. F.; UEMURA H.; SCHENKMAN S. Organization of *trans*-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.77, p.115-125, 1996.

ELLERVIK, U. 9-Anthraldehyde acetals as protecting groups. **Tetrahedron Letters**, v.44, p.2279-2281, 2003.

ELLIS, D.; NORMAN, S. E.; OSBORN, H. M. I. Synthesis of *S*-linked carbohydrate analogues via a Ferrier reaction. **Tetrahedron**, v.64, n.12, p.2832-2854, 2008.

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

FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chaga's Disease. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59, supl.II, p.179-187, 1999.

FARKAS, F.; THURNER, A.; KOVACS, E.; FAIGL, F.; HEGEDUS, L. Hydrogenolysis of *O*-protected hydroxyoxetanes over palladium: An efficient method for a one-step ring opening and detritylation reaction. **Catalysis Communications**, v.10, n.5, p.635-639, 2009.

FERRERO-GARCIA, M. A.; TROMBETTA, S. E.; SANCHEZ, D. O.; REGLERO, A.; FRASCH, A. C. C.; PARODI, A. J. The action of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase on glycolipids and glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v.213, p.765-771, 1993.

FRASCH, A. C. C.; BUSCAGLIA, C. A.; LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase enhances the immune response against the enzymatic domain. **Journal of Infectious Disease**, v.177, p.431, 1998.

FERRIER, R. J.; COLLINS, P. M. **Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products**. New York: Wiley, 1996. 594 p.

FRIESNER, R.A.; BANKS, J.L.; MURPHY, R.B.; HALGREN, T.A.; KLICIC, J.J.; MAINZ, D.T.; REPASKY, M.P.; KNOLL, E.H.; SHELLEY, M.; PERRY, J.K.; SHAW, D.E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P.S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Centenário de Descoberta da Doença de Chagas.** Portal da Fiocruz, 2009. Disponível em: <www.fiocruz.br>. Acesso em: 12 de agosto de 2009.

GAREGG, J.; HULTBERG, H.; WALLIN, S. A novel, reductive ring-opening of carbohydrate benzylidene acetals. **Carbohydrate Research**, v.108, n.1, p.97-101, 1982.

GIORGI, M. E.; RATIER, L.; AGUSTI, R.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Synthesis of PEGylated lactose analogs for inhibition studies on *T.cruzi trans*-sialidase. **Glycoconjugate Journal**, v.27, p.549-559, 2010.

GIORGI, M. E.; PIUSELLI, D.; AGUSTI, R.; DE LEDERKREMER, R. M. Synthesis of oseltamivir conjugates with lactose analogs for inhibition studies on *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **ARKIVOC,** v. 7, p. 260-271, 2011.

GRAEBIN, C. S.; UCHOA, F. D.; BERNARDES, L.S.C.; CAMPO, V.L.; CARVALHO, I.; EIFLER-LIMA, V. L. Antiprotozoal Agents: An Overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.345-366, 2009.

GRINDLEY, T. B. Application of tin-containing intermediates to carbohydrate chemistry. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 53 p.17-142, 1998.

GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J. K. (Eds.) Reporte del grupo de trabajo cientifico sobre la enfermedad de Chagas. **WHO & PAHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Report**, v.9, p.1-2, 2007.

GUEDES, P. M.M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; DA SILVA, G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; DO VALLE MATTA, M. A.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. BR. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([15]aneN4)NO]2+ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **Journal of Pharmacology**, v.160, n.2, p.270 - 282, 2010.

HALGREN T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1750-1759, 2004.

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

HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P.; FOURNIER, E. J.; LOWARY, T. L.; MALET, C.; NILSSON, U. J.; HINDSGAUL, O.; SCHENKMAN, S.; NAISMITH, J. H.; FIELD, R. A. Probing the acceptor substrate binding site of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase with systematically modified substrates and glycoside libraries. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 1653-1660, 2011.

HOLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In: **Molecular modeling: basic principles and applications.** Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p. 87-143.

Insight II User Guide, version 2005, Accelrys: CA, USA, 2005.

JIN, X. Y.; DING, H. X.; YANG, R. C.; XIAO, Q.; JU, Y. Synthesis of carbohydrate-conjugated furo[2,3-d] pyrimidine using “Click Chemistry”. **Synthesis**, v. 6, p. 865-870, 2008.

JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies of the anomeric effect. **Tetrahedron**, v. 48, p. 5019-5087, 1992.

KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-*O*-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v.53, n.34, p.11753-11766, 1997.

KIM, J. H.; RYU, H. W.; SHIM, J. H.; PARK, K. H.; WITHERS, S. G. Development of New and Selective *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase Inhibitors from Sulfonamide Chalcones and Their Derivatives. **Chembiochem**, v.10, p.2475-2479, 2009.

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.** 4ª ed. New York: John Wiley and Sons, 1991. 585 p.

KOMIOTIS, D.; AGELIS, G.; MANTA, S.; TZIOUMAKI, N.; TSOUKALA, E.; ANTONAKIS, K. A facile, one-step conversion of 6-*O*-trityl and 6-*O*-TBDMS monosaccharides into the corresponding formate esters. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.25, n.6, p.441-450, 2006.

KRAUS J. M.; VERLINDE, C. L.; KARIMI, M.; LEPESHEVA, G. I.; GELB, M. H.; BUCKNER, F. S. Rational Modification of a Candidate Cancer Drug for Use Against Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.1639–1647, 2009.

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

LEE, S-G.; KIM, B-G. Development of spectrophotometric method for monitoring *trans*-sialidase reaction and its application **Biotechnology Letters,** v.22, p.819-823, 2000.

LEGGETTER, B. E.; BROWN, R. K. The reductive cleavage of 1,3-oxathiolanes with lithium aluminum hydride in the presence of aluminum chloride or boron trifluoride. **Canadian Journal of Chemistry**, v.41, n.10, p.2671-2682, 1963.

LEMANSKI, G.; ZIEGLER, T. Prearranged Glycosides Part 12: Intramolecular Mannosylations of Glucose Derivatives via Prearranged Glycosides. **Helvetica Chimica Acta**, v.83, p.2655-2675, 2000.

LINDBERG, J.; OHBERG, L.; GAREGG, P. J.; KONRADSSON, P. Efficient routes to glucosamine-myo-inositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. **Tetrahedron**, v.58, p.1387-1398, 2002.

LIMA, A. H.; LAMEIRA, J.; ALVES, C. N. Protein ligand interaction of *T. cruzi* trans-sialidase inhibitors: a docking and QM/MM MD study. **Structural Chemistry**, v. 23, p. 147-152, 2011.

LIPTAK, A.; JODAL, I.; NANASI, P. Stereoselective ring cleavage of 3-*O*-benzyl- and 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidenehexopyranoside derivatives with the lithium aluminum hydride-aluminum chloride reagent. **Carbohydrate Research**, v.44, n.1, p.1-11, 1975.

MALIK, S.; KARTHA, K. P. R. A mild, highly efficient, and chemoselective deprotection of trityl ethers of carbohydrates and nucleosides using iodine monobromide. **Synlett**, v.11, p.1809-1811, 2009.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery.** Weinheim: WILEYVHC, 2004. p. 1-22.

MEINKE, S.; SCHROVEN, A.; THIEM, J. Sialic acid *C*-glycosides with aromatic residues: investigating enzyme binding and inhibition of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4487-4497, 2011.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.401-404, 1999.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p.17-30, 2009.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current Drug Targets**, v.10, p.212-231, 2009.

MUELAS, S.; SUÁREZ, M.; PËREZ, R.; RODRIGUEZ, H.; OCHOA, C.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-tiadizin-2-thione derivatives agaisnt *Trypanosoma cruzi.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.269-272, 2002.

MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.9, p.553-557, 2002.

MUKHOPADHYAY, B.; FIELD, R. A. A simple one-pot method for the synthesis of partially protected mono- and disaccharide building blocks using an orthoesterification- benzylation-orthoester rearrangement approach. **Carbohydrate research**, v.338, p.2149-2152, 2003.

MUTHANA, S.; CAO, H.; CHEN, X. Recent progress in chemical and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 13, p. 573-581, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9a. edição, Ed. Atheneu, Belo Horizonte, 1995, p.82.

NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 110-117, 2008.

NERES, J.; BREWER, M. L.; RATIER, L.; BOTTI, H.; BUSCHIAZZO, A.; EDWARDS, P. N.; MORTENSON, P.N.; CHARLTON, M. H.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase from in silico screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 589-596, 2009.

NERES, J.; BONNET, P.; EDWARDS, P. N.; KOTIAN, P. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2106-2119, 2007.

NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous Fuorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi.* **Analytical Biochemistry**, v.357, p.302-304, 2006.

NICOLAOU, K. C.; MITCHELL, H. J. Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology. **Angewandte Chemie International**, v. 40, n. 9, p. 1576-1624.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.

NITZ, M.; BUNDLE, D. R. Efficient synthesis of 3,6-dideoxy-beta-D-arabino-hexopyranosyl-terminated LacdiNac glycan chains of the Trichinella spiralis parasite. **Journal of Organic Chemistry**, v.65, p.3064-3073, 2000.

OGAWA, T.; KATANO, K.; MATSUI, M. Total synthesis of sorbistin A1 and a positional isomer. **Tetrahedron**, v.36, n.19, p.2727-2733, 1980.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **First WHO report on neglected tropical diseases**. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Genebra, Suíça: OMS, 2010. p. 75-78.

PANCHADHAYEE, R.; MISRA, A. K. Efficient iodine-catalyzed preparation of benzylidene acetals of carbohydrate derivatives. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.27, n.3, p.148-155, 2008.

PARIS, G.; RATIER, L.; AMAYA, M. F.; NGUYEN, T.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C. C. A sialidase mutant displaying *trans*-sialidase activity. **Journal of Molecular Biology**, v.345, p.923-934, 2005.

PARODI, A. J.; POLLEVICK, G. D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. Identification of the Gene(S) Coding for the *trans*-Sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v.11, p.1705, 1992.

PAULSEN, H.; HASENKAMP, T.; PAAL, M. Building blocks for oligosaccharides. LXIV. A building block for 3-*O*-β-D-galactopyranosyl-D-galactopyranose. **Carbohydrate Research**, v.144, n.1, p.45-55, 1985.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 angstrom resolution. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters)**, v.520, p.13-17, 2002.

PEI, Z.; DONG, H.; CARABALLO, R.; RAMSTRÖM, O. Synthesis of positional thiol analogs of β-D galactopyranose. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 4927-4934, 2007.

PEITSCH, M. C. Manuel Peitsch discusses knowledge management and informatics in drug discovery. **Drug Discovery Today: BIOSILICO,** v. 2, n. 3, p. 94-96, 2004.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA de ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p.1299-1307, 2000.

PÉTURSSON, S. Protecting groups in carbohydrate chemistry. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 11, p. 1297-1303, 1997.

PFEIFFER-MAREK, S.; MATTER, H.; ENGLERT, H.; GERLACH, U.; KNIEPS, S.; SCHUDOK, M., LEHR, K. H. Using VolSurf descriptors to model pharmacokinetic properties during lead optimization. In: FORD, M., LIVINGSTONE, D., DERDEN, J., VAN DE WATERBEEMD, H. (Eds). **Designing drugs and crop protectants,** Proceedings of the 14th European Symposium on QSAR. Oxford: Blackwell Publishers, 2003. p.104-105.

POUYSÉGU, L.; DE JÉSO, B.; LARTIGUE, J. C.; PÉTRAUD, M.; RATIER, M. Structural analysis of partially acetylated glycosides by refocused-decoupled insensitive nuclei enhanced by polarization transfer (INEPT) experiments: a qualitative and quantitative method. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 1114-1117, 2002.

PREVIATO, J. O.; JONES, C.; XAVIER, M. T.; WAIT, R.; PARODI, A. J.; PREVIATO, L. M. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.7241-7250, 1995.

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

RAO, K. V.; PATIL, P. R.; ATMAKURI, S.; KARTHA, K. P. Iodine-sodium cyanoborohydride-mediated reductive ring opening of 4,6-O-benzylidene acetals of hexopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p. 2709-2713, 2010.

RASSI, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v.95, p.524-534, 2009.

REMME, J. H. F.; FEENSTRA, P.; LEVER, P. R.; MÉDICI, A.; MOREL, C.; NOMA, M.; RAMAIAH, K. D.; RICHARDS, F.; SEKETELI, A.; SCHMUNIS, G.; VAN BRAKEL, W. H.; ANNA VASSALL, A. Tropical diseases targeted for elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In: JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROVE, P. (eds) **Disease control priorities in developing countries.** 2ª ed. Washington: The World Bank, 2006, p.433-449.

REN, T.; ZHANG, G.; LIU, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.1007–1010, 2001.

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

ROEN, A.; PADRON, J. I.; VAZQUEZ, J. T. Hydroxymethyl rotamer populations in disaccharides. **Journal of Organic Chemistry**, v.68, n.12, p.4615-4630, 2003.

SAKAGAMI, M.; HAMANA, H. A selective ring opening reaction of 4,6-*O*-benzylidene acetals in carbohydrates using trialkylsilane derivatives. **Tetrahedron Letters**, v.41, n.29, p.5547-5551, 2000.

SANCHEZ-MORENO, M.; SANZ, A. M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARIN, C.; RAMÍREZ-MACIAS, I.; ROSALES, M. J.; OLMO, F.; GARCIA-ARANDA, I.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; ARREBOLA, F.; YUNTA, M. J. R. *In Vivo* Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[*g*]phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p.970-979, 2011.

SCHRADER, S.; TIRALONGO, E.; PARIS, G.; YOSHINO, T.; SHAUER, R. A nonradioactive 96-well plate assay for screening of *trans*-sialidase activity. **Analytical Biochemistry**, v.322, p.139-147, 2003.

SEEBERGER, P. H.; HAASE, W. C. Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. **Chemical Reviews,** v.100, p.4349-4394, 2000.

SILVA, R. S. F.; COSTA, E. M.; TRINDADE, U. L. T.; TEIXEIRA, D. V.; PINTO, M. D. F. R.; SANTOS, G. L.; MALTA, V. R. S.; DE SIMONE, C. A.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.41, n.4, p.526-530, 2006.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R. S.; LIMA, F. C. A.; SILVA, A. B. F.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Complexation of the anit-*Trypanosoma cruzi* Drug Benznidazole Improves Solubility and Efficaccy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.14, p.4104 - 4114, 2008.

SRIKRISHNA, A.; VISWAJANANI, R. A mild and simple procedure for the reductive cleavage of acetals and ketals. **Tetrahedron**, v.51, n.11, p.3339-3344, 1995.

STEVENIN, A.; BOYER, F.; BEAU, J. Regioselective Control in the Oxidative Cleavage of 4,6-*O*-Benzylidene Acetals of Glycopyranosides by Dimethyldioxirane. **Journal of Organic Chemistry**, v.75, n.5, p.1783-1786, 2010.

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

STREICHER, H.; BUSSE, H. Building a successful structural motif into sialylmimetics-cyclohexene phosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.1047-1057, 2006.

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

***Sybyl User Guide*,** version 7.1, Tripos Inc: CA, USA, 2005.

TANAKA, N.; OGAWA, I.; YOSHIGASE, S.; NOKAMI, J. Regioselective ring opening of benzylidene acetal protecting group(s) of hexopyranoside derivatives by DIBAL-H. **Carbohydrate Research**, v.343, v15, p.2675-2679, 2008.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.222-265, 2007.

TESTA, B.; BALMAT, A.; LONG, A.; JUDSON, P. Predicting drug metabolism - an evaluation of the expert system METEOR. **Chemistry & Biodiversity,** v. 02, p. 872-885, 2005.

THE LANCET. Chagas disease: a neglected emergency. Editorial. **The Lancet,** n.9678, p.1820-1820, jun. 2009.

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

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.39-48, 2003.

VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; TOMLINSON, S.; KISO, M., YOSHIDA, M.; HASEGAWA, A.; NUSSENZWEIG, V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Glicobiology**, v.2, p.541-548, 1992.

VENDEVILLE, S.; BOUREL, L.; DAVIOUD-CHARVET, E.; GRELLIER, P.; DEPREZ, B.; SHERGHERAERT, C. Uromated parallel synthesis of a tetrahydroisoquinolin-based library: potential prolyl endopeptidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.437-442, 1999.

VIK, A,; PROSZENYÁK, A.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L.; GUNDERSEN, L. L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for visceral leishmaniasis and Chagas disease. **Molecules**, v.14, v.279-288, 2009.

WAHLSTROM, J. L.; RONALD, R. C. Detritylation of ethers using iodine-alcohol reagents: An acid-catalyzed reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v.63, n.17, p.6021-6022, 1998.

WANG, C. C.; LEE, J. C.; LUO, S. Y.; KULKARNI, S. S.; HUANG, Y. W.; LEE, C. C.; CHANG, K. L.; HUNG, S. C. Regioselective one-pot protection of carbohydrates. **Nature Letters**, v. 446, p. 896-899, 2007.

WANG, H.; SHE, J.; ZHANG, L.; YE, X. Silver (I) oxide mediated selective monoprotection of diols in pyranosides. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, n.17, p.5774-5777, 2004.

WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; AMAYA, M. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G. *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.532-7533, 2003.

WENDEL, S.; GONZAGA, A. L. Chaga's Disease and Blood Transfusion: a new world problem? **Vox Sanguinis**, v.64, p.1-12, 1993.

WERZ, D. B.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrates as the next frontier in pharmaceutical research. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, p. 3194-3206, 2005.

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

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** v.13, n. 2, p. 238-248, 2009.

ZUCCOTTO, F.; BRUM, R.; PACANOWSKA, D. G.; PEREZ, L. M. R.; GILBERT, I. H. The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.1463-1468, 1999.

8. ANEXOS

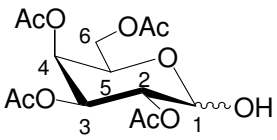
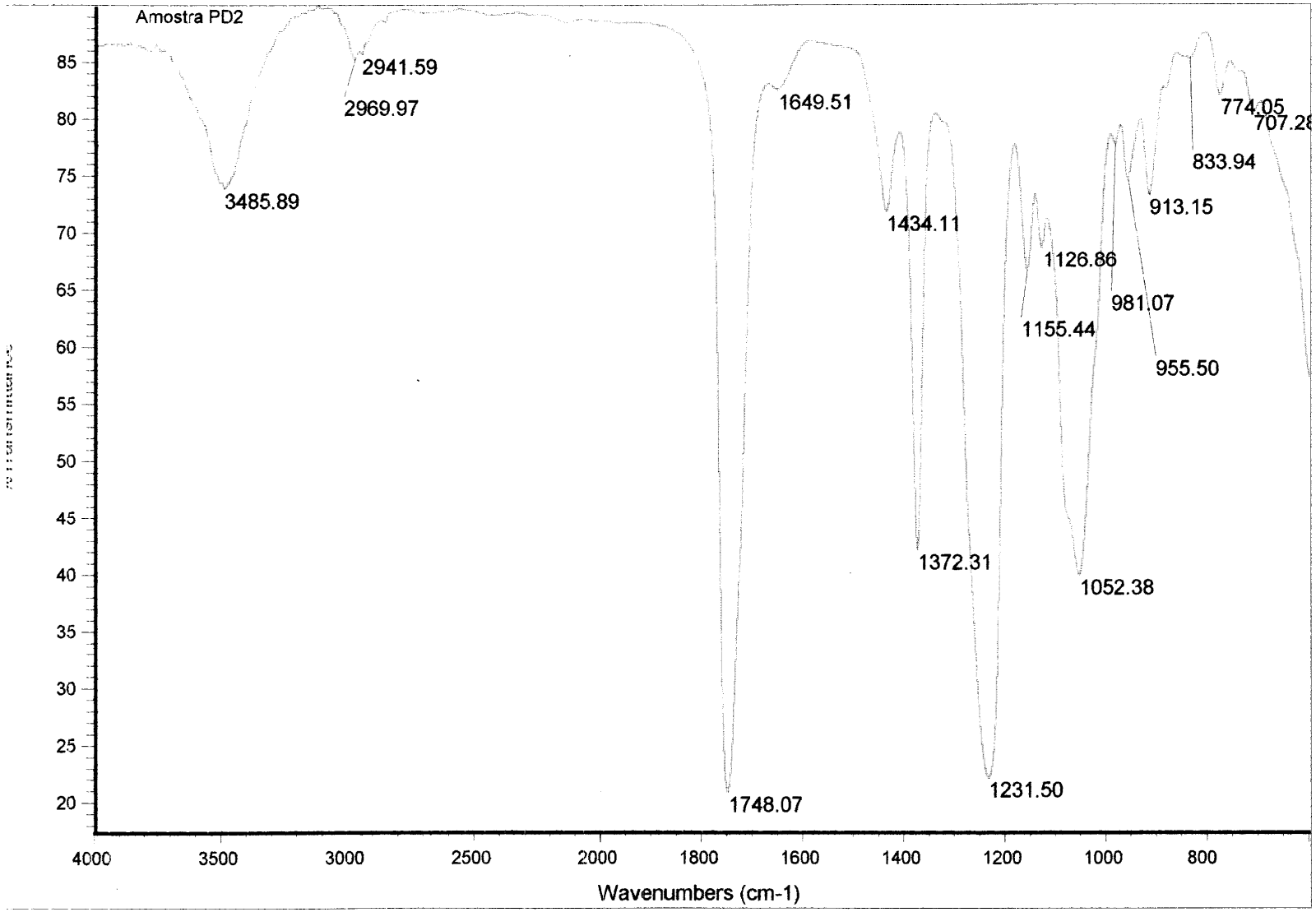


Tabela 4 - Dados espectroscópicos do composto **62** (anômero α).

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	5,53	1	t	$J_{1,2}$ = 3,5
2	5,42	1	dd	$J_{1,2}$ = 3,5; $J_{2,3}$ = 10,8
3	5,17	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,8; $J_{3,4}$ = 3,5
4	5,48	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,5; $J_{4,5}$ = 1,2
5	4,48	1	dt	$J_{4,5}$ = 1,2; $J_{5,6}$ = 6,3
6a	4,14	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,6; $J_{6a,6b}$ = 11,1
6b	4,08	1	dd	$J_{5,6b}$ = 6,8; $J_{6a,6b}$ = 11,3
$COCH_3$	2,15-2,00	12	s	-
OH	3,12	1	dd	J = 1,2; J = 3,5



Anexo 1. Espectro na região do infravermelho do composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranose (**62**).

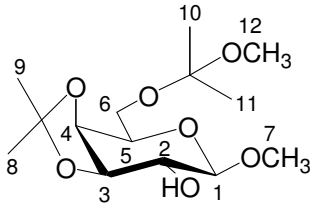
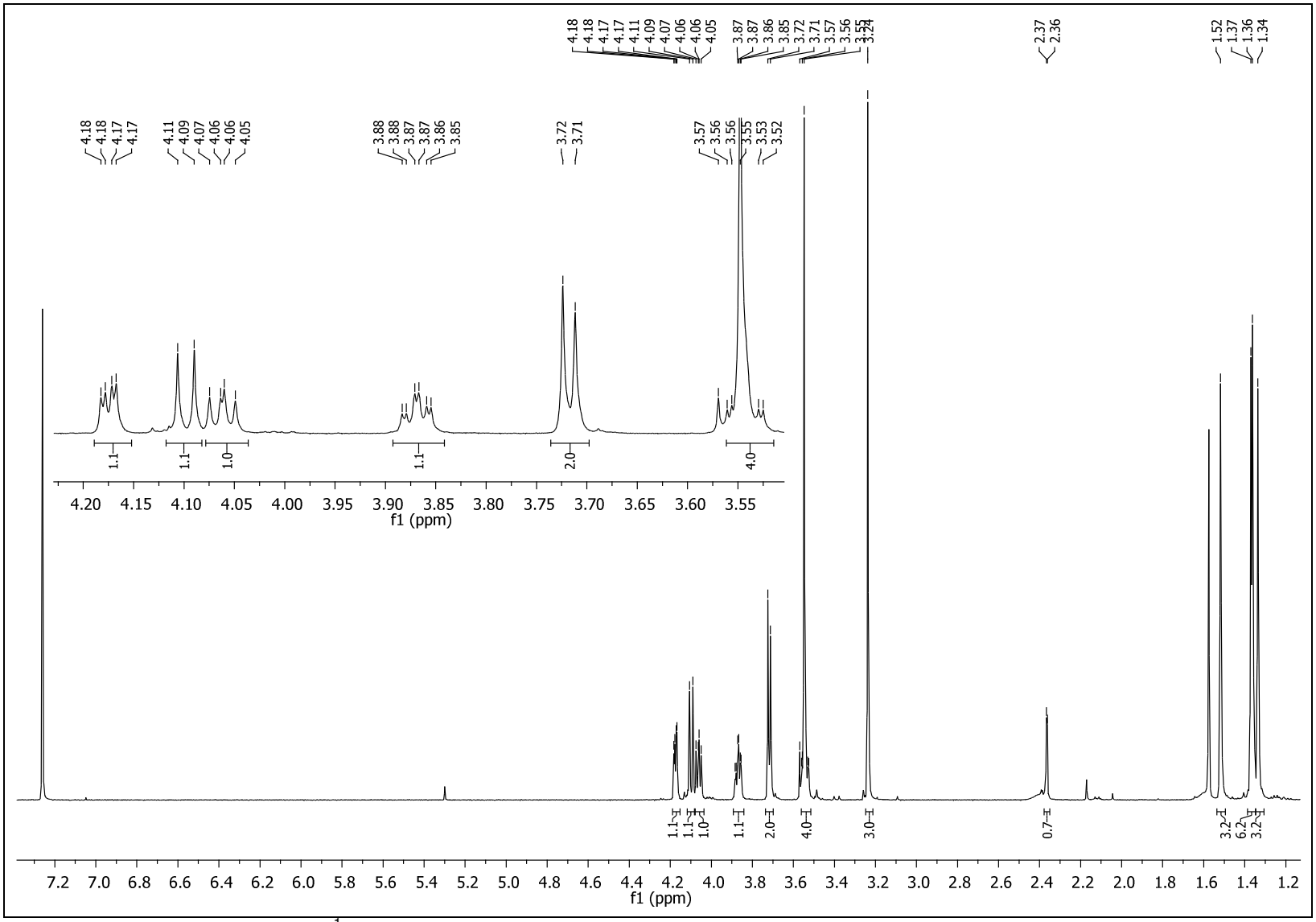


Tabela 5 - Dados espectroscópicos do composto **49**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,10	1	d	$J_{1,2}$ = 8,2
2	3,56-3,52	1	m	-
3	4,06	1	dd	$J_{2,3}$ = 7,3; $J_{3,4}$ = 5,4
4	4,17	1	dd	$J_{3,4}$ = 5,3; $J_{4,5}$ = 2,0
5	3,87	1	dt	$J_{4,5}$ = 2,0; $J_{5,6}$ = 6,3
6a 6b	3,72	2	d	$J_{5,6}$ = 6,3
7	3,56-3,52	3	s	-
8	1,34	3	s	-
9	1,52	3	s	-
10	1,36	3	s	-
11	1,37	3	s	-
12	3,24	3	s	-
OH	2,36	1	d	J = 2,2



Anexo 2. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(1-metoxi-1-metiletil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**49**).

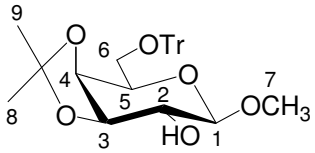
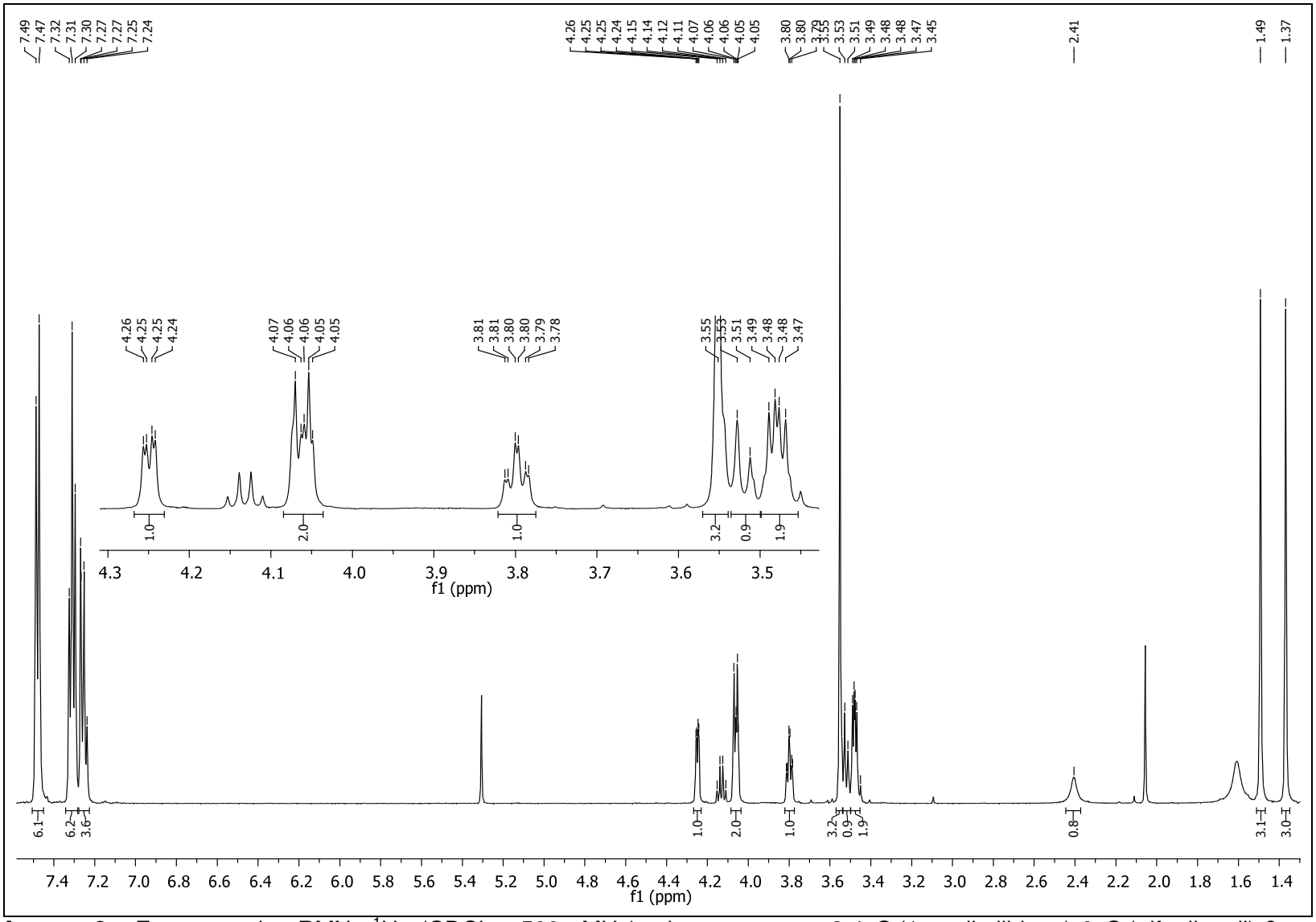


Tabela 6 - Dados espectroscópicos do composto **64**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,09-4,04	1	m	-
2	3,53	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 9,8
3	4,09-4,04	1	m	-
4	4,25	1	dd	$J_{3,4}$ = 5,4; $J_{4,5}$ = 2,0
5	3,80	1	dt	$J_{4,5}$ = 2,0; $J_{5,6}$ = 6,5
6a 6b	3,50-3,46	2	m	-
7	3,55	3	s	-
8	1,37	3	s	-
9	1,49	3	s	-
CH arom.	7,48	6	d	J_{orto} = 7,2
CH arom.	7,31	6	d	J_{orto} = 7,5
CH arom.	7,31	3	m	-
OH	2,40	1	sl	-



Anexo 3. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**64**).

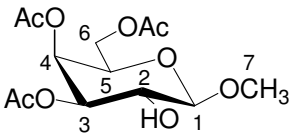
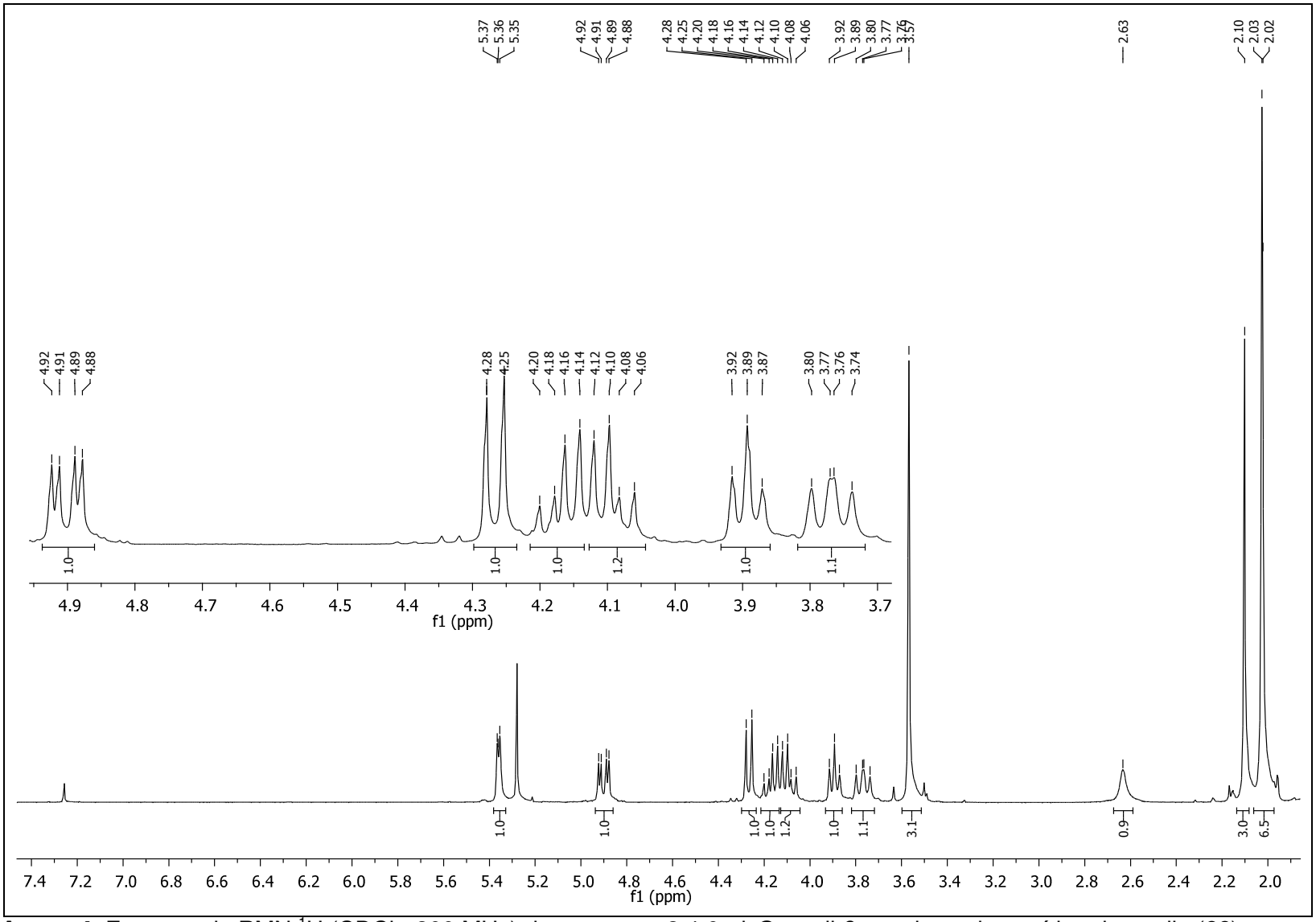


Tabela 7 - Dados espectroscópicos do composto **66**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,27	1	d	$J_{1,2}$ = 7,8
2	3,77	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 9,9
3	4,90	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,3; $J_{3,4}$ = 3,4
4	5,36	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,4; $J_{4,5}$ = 0,9
5	3,89	1	dt	$J_{4,5}$ = 0,9; $J_{5,6}$ = 6,8
6a	4,17	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,2
6b	4,09	1	dd	$J_{5,6b}$ = 6,8; $J_{6a,6b}$ = 11,2
7	3,57	3	s	-
$COCH_3$	2,11-2,03	9	s	-
OH	2,64	1	sl	-



Anexo 4. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**66**).

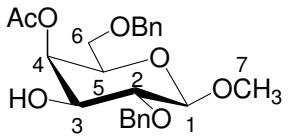
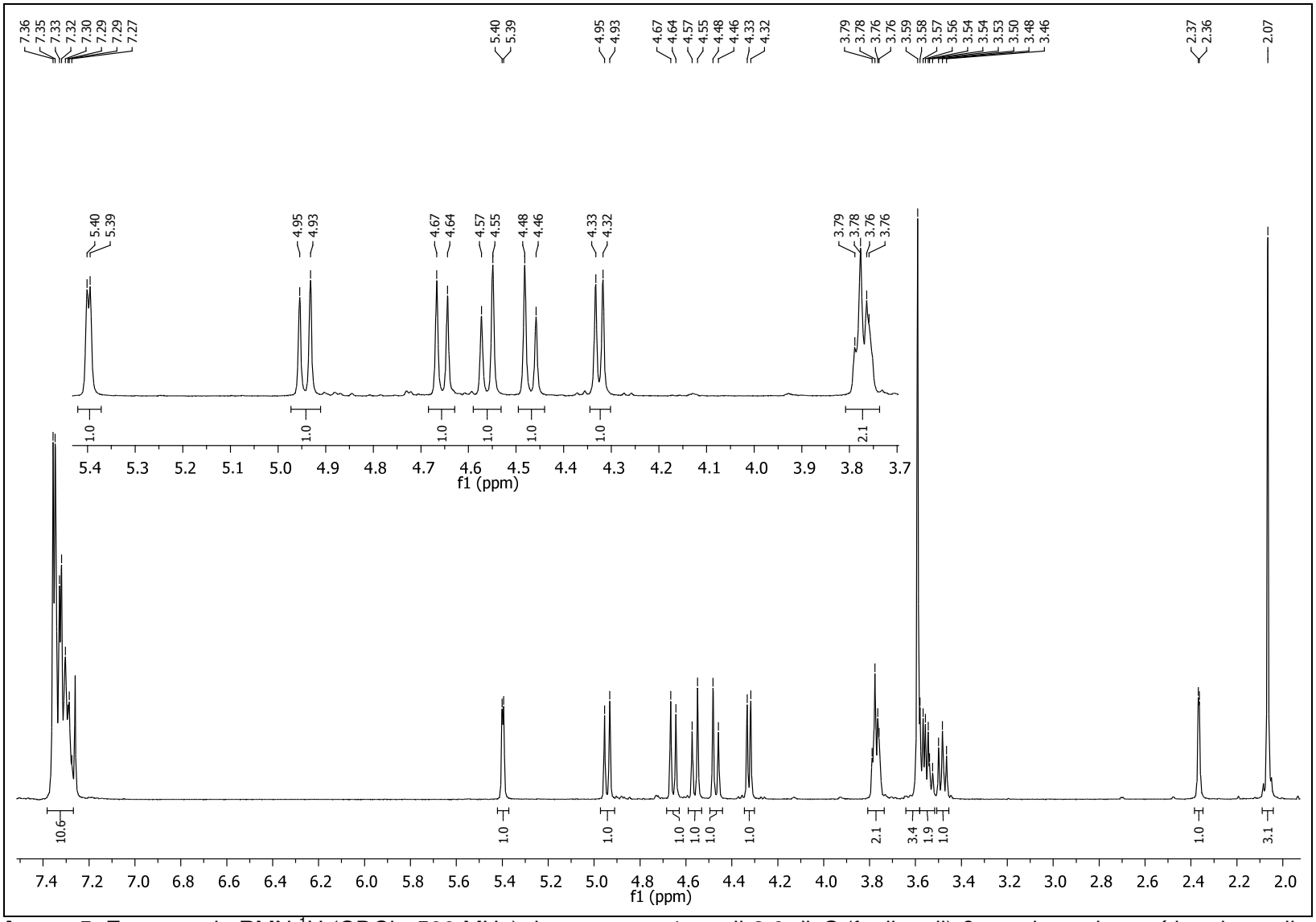


Tabela 8 - Dados espectroscópicos do composto **55**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,32	1	d	$J_{1,2}$ = 7,7
2	3,48	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,9; $J_{2,3}$ = 9,5
3	3,80-3,74	1	m	-
4	5,40	1	d	$J_{3,4}$ = 3,2
5	3,80-3,74	1	m	-
6a 6b	3,56	2	dd	$J_{5,6}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,3
7	3,59	3	s	-
C$\underline{H}_2$Ph	4,94 e 4,66	2	d	J_{AB} = 11,3
C$\underline{H}_2$Ph	4,56 e 4,47	2	d	J_{AB} = 11,9
CH arom.	7,37-7,27	10	m	-
$COCH_3$	2,06	3	s	-
OH	2,37	1	d	J = 2,6



Anexo 5. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 4-acetil-2,6-di-*O*-(fenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**55**).

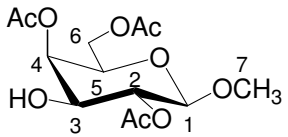
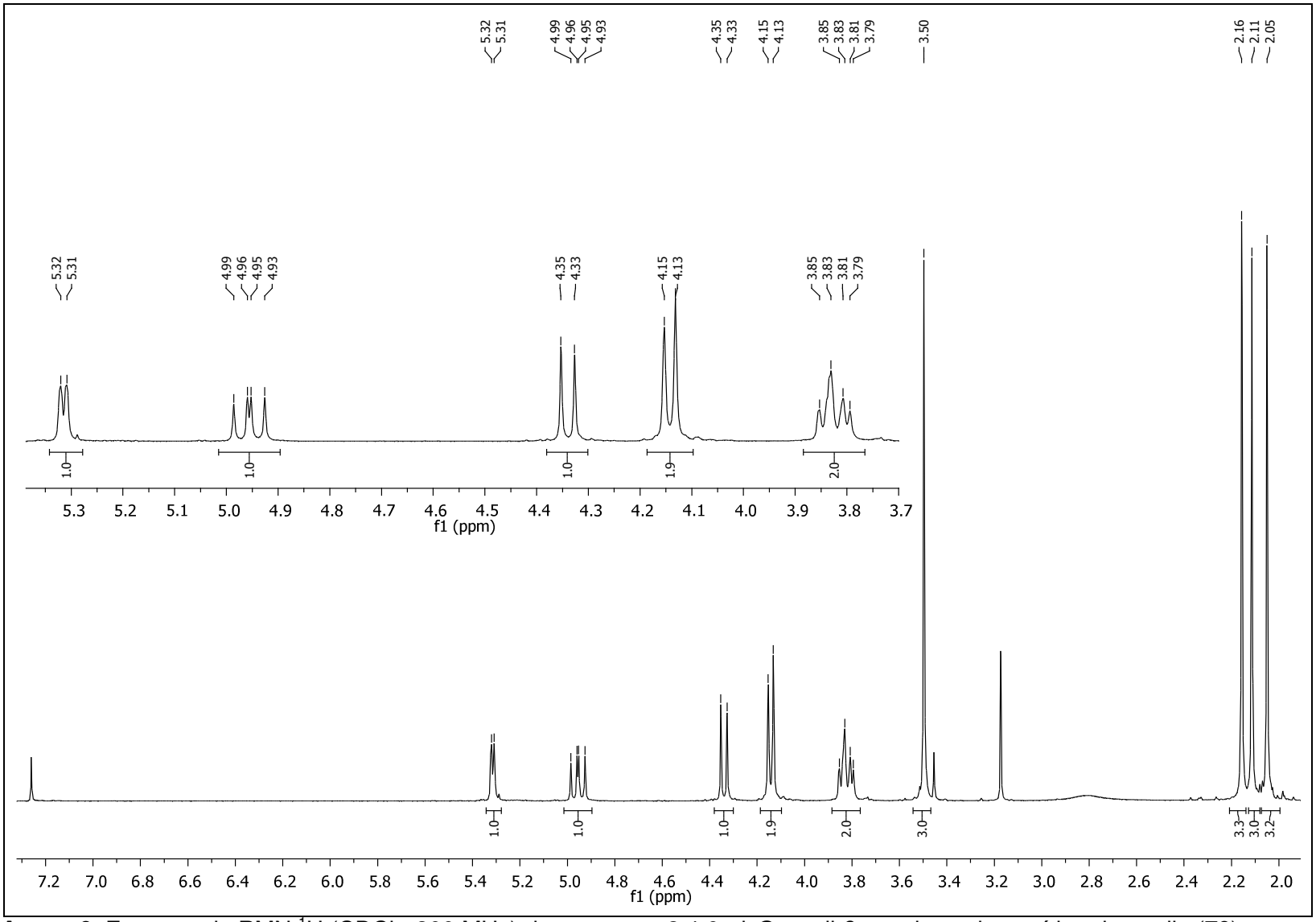


Tabela 9 - Dados espectroscópicos do composto **70**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,34	1	d	$J_{1,2}$ = 8,0
2	4,95	1	dd	$J_{1,2}$ = 8,0; $J_{2,3}$ = 10,1
3	3,87-3,78	1	m	-
4	5,31	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,6; $J_{4,5}$ = 0,8
5	3,87-3,78	1	m	-
6a 6b	4,14	2	dd	$J_{5,6}$ = 6,4; $J_{6a,6b}$ = 11,4
7	3,50	3	s	-
$COCH_3$	2,16-2,05	9	s	-



Anexo 6. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 2,4,6-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**70**).

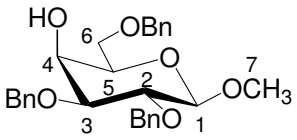
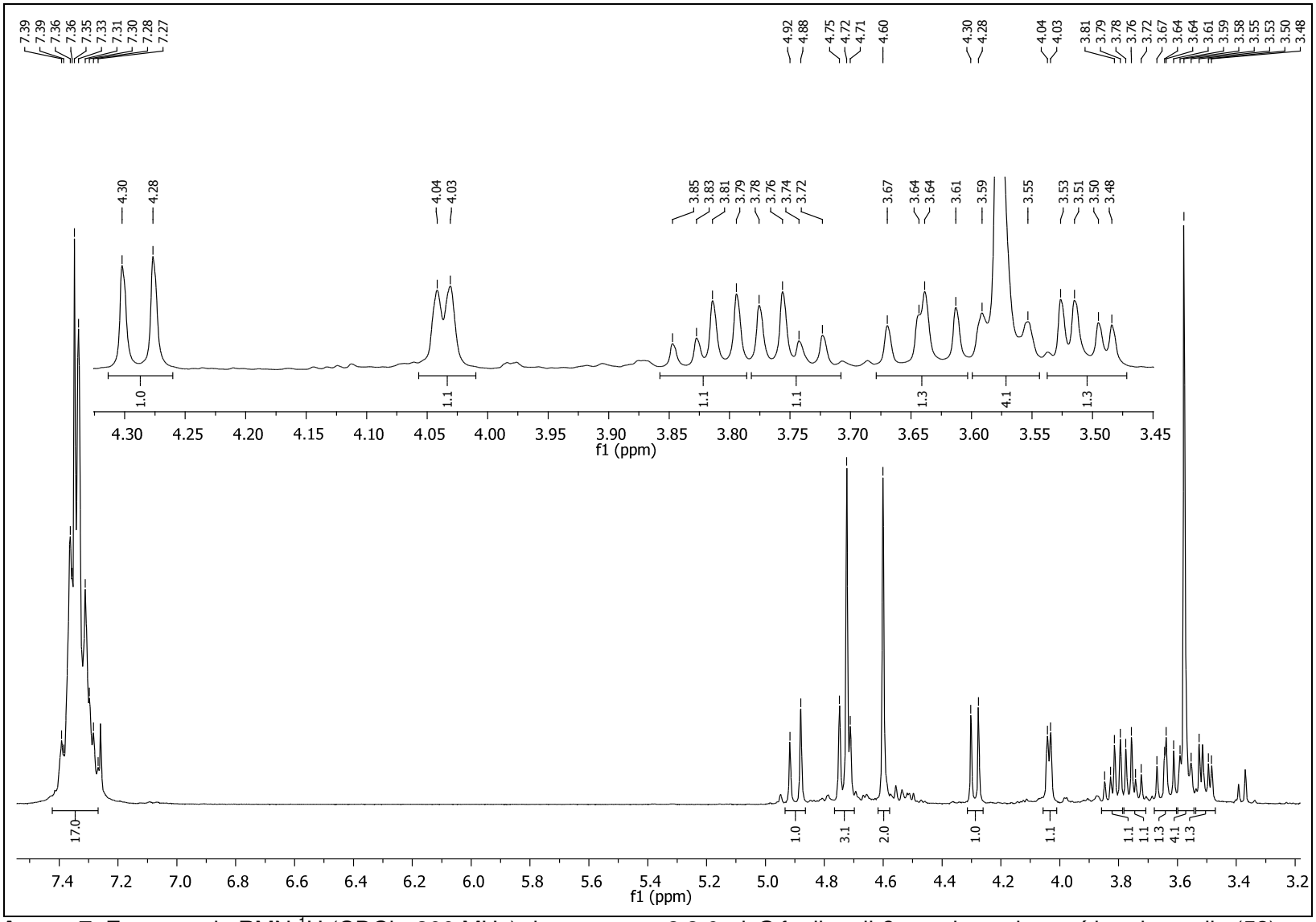


Tabela 10 - Dados espectroscópicos do composto **58**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,29	1	d	$J_{1,2}$ = 7,5
2	3,64	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 9,3
3	3,50	1	dd	$J_{2,3}$ = 9,3; $J_{3,4}$ = 3,4
4	4,04	1	d	$J_{3,4}$ = 3,1
5	3,60-3,54	1	m	-
6a	3,82	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,0; $J_{6a,6b}$ = 10,0
6b	3,75	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,0; $J_{6a,6b}$ = 10,0
7	3,60-3,54	3	m	-
C$\underline{H}_2$Ph	4,90 e 4,73	2	d	J_{AB} = 10,9
C$\underline{H}_2$Ph	4,72	2	s	-
C$\underline{H}_2$Ph	4,60	2	s	-
CH arom.	7,42-7,27	15	m	-



Anexo 7. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**58**).

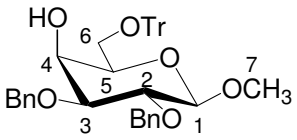
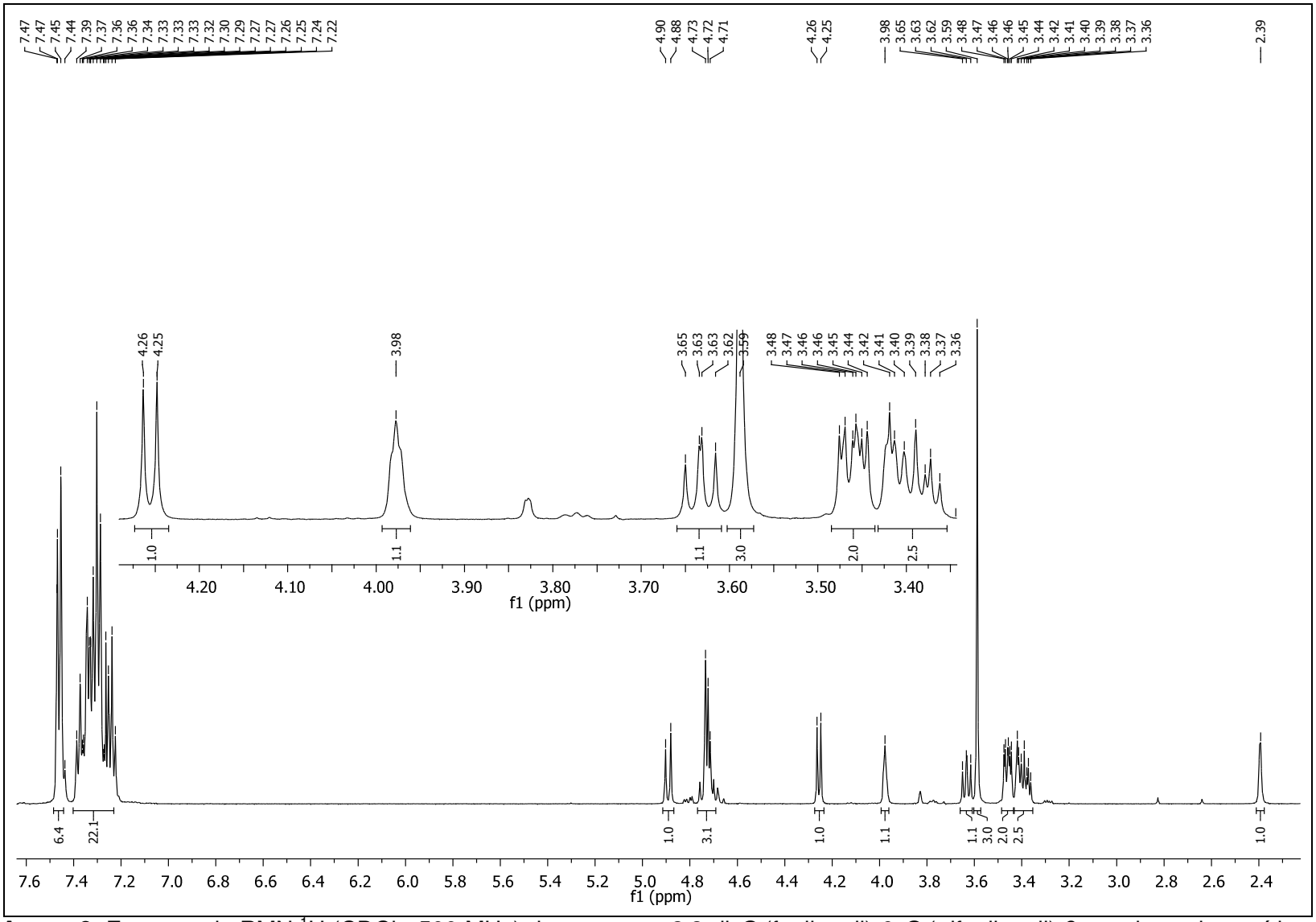


Tabela 11 - Dados espectroscópicos do composto **72**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,25	1	d	$J_{1,2}$ = 7,8
2	3,63	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 9,3
3	3,49-3,44	1	m	-
4	3,43-3,35	1	m	-
5	3,98	1	sl	-
6a	3,49-3,44	1	m	-
6b	3,43-3,35	1	m	-
7	3,59	3	s	-
C$\underline{H}_2$Ph	4,89	1	d	J_{AB} = 11,2
C$\underline{H}_2$Ph	4,77-4,69	3	m	-
CH arom.	7,46	5	d	J_{orto} = 7,2
CH arom.	7,40-7,21	20	m	-
OH	2,40	1	d	J = 2,3



Anexo 8. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**72**).

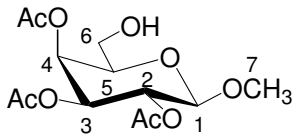
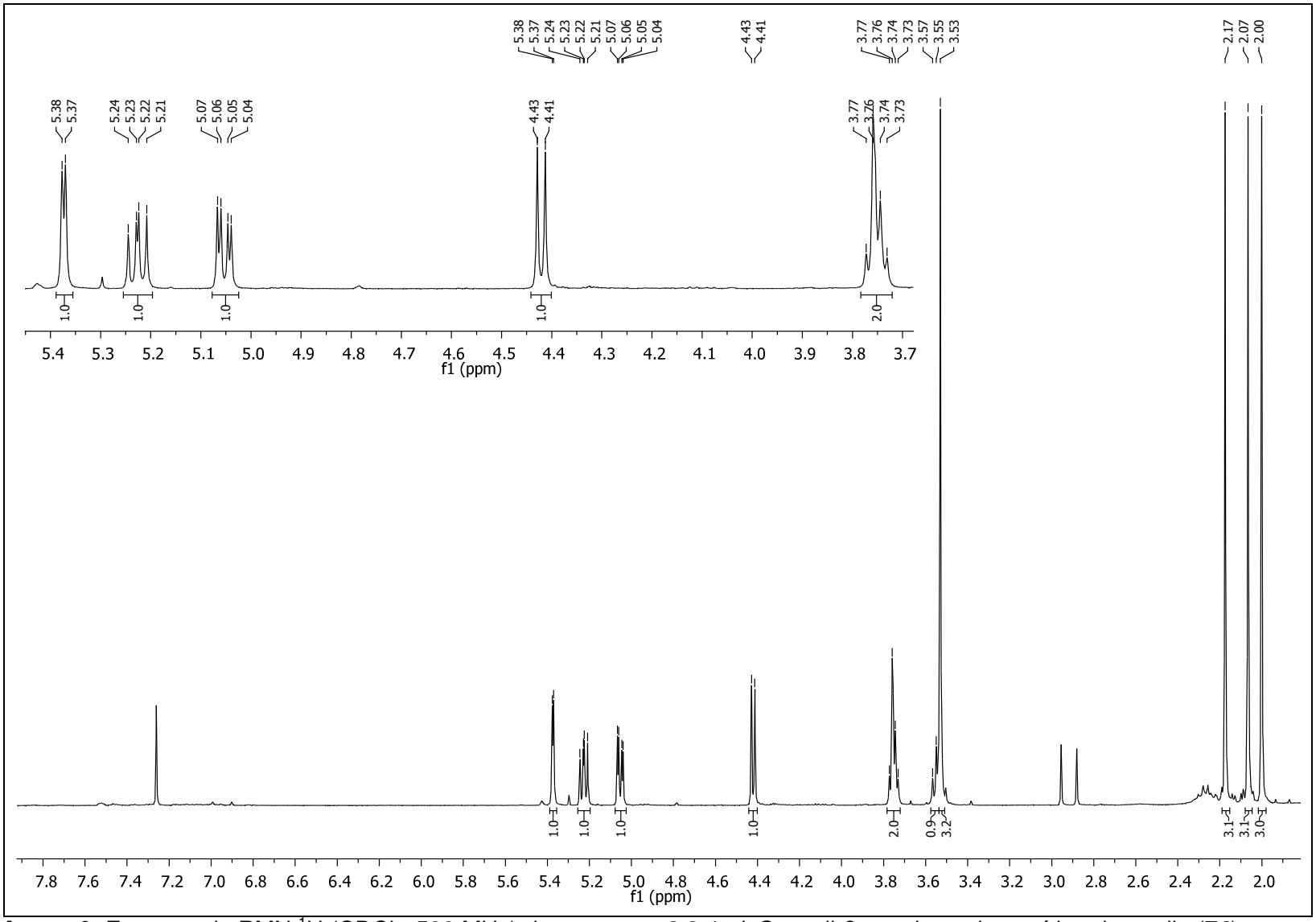


Tabela 12 - Dados espectroscópicos do composto **74**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,42	1	d	$J_{1,2}$ = 8,0
2	5,23	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 10,4
3	5,05	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,4; $J_{3,4}$ = 3,4
4	5,37	1	d	$J_{3,4}$ = 3,4
5	3,55-3,53	1	m	-
6a 6b	3,77	2	dd	$J_{5,6}$ = 6,7; $J_{6a,6b}$ = 11,4
7	3,53	3	s	-
$COCH_3$	2,17-2,00	9	s	-
OH	2,64	1	sl	-



Anexo 9. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**74**).

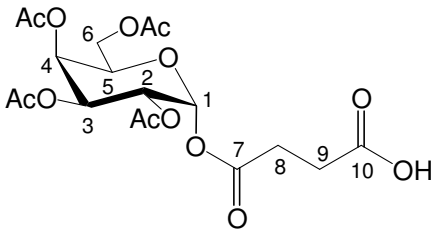
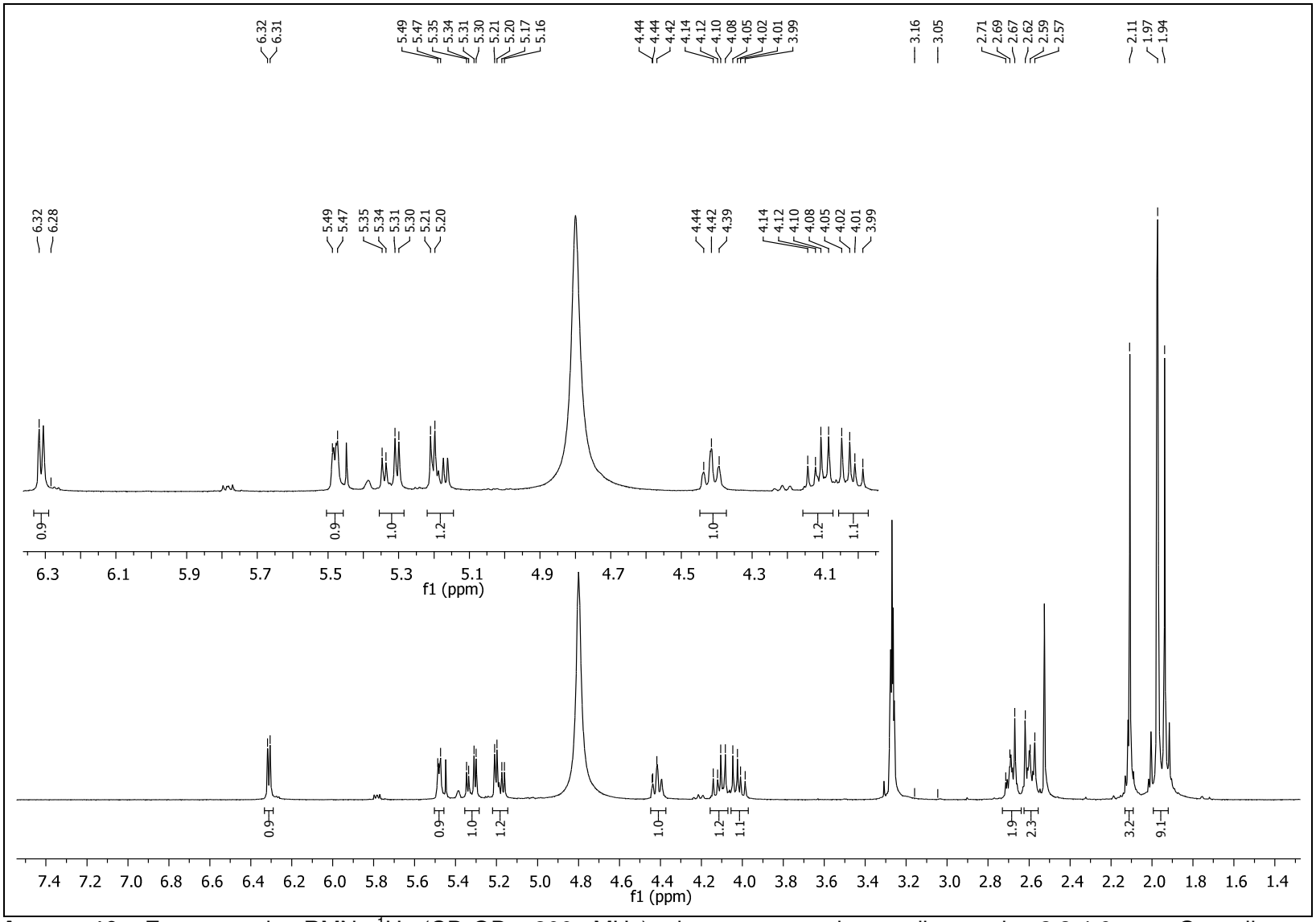
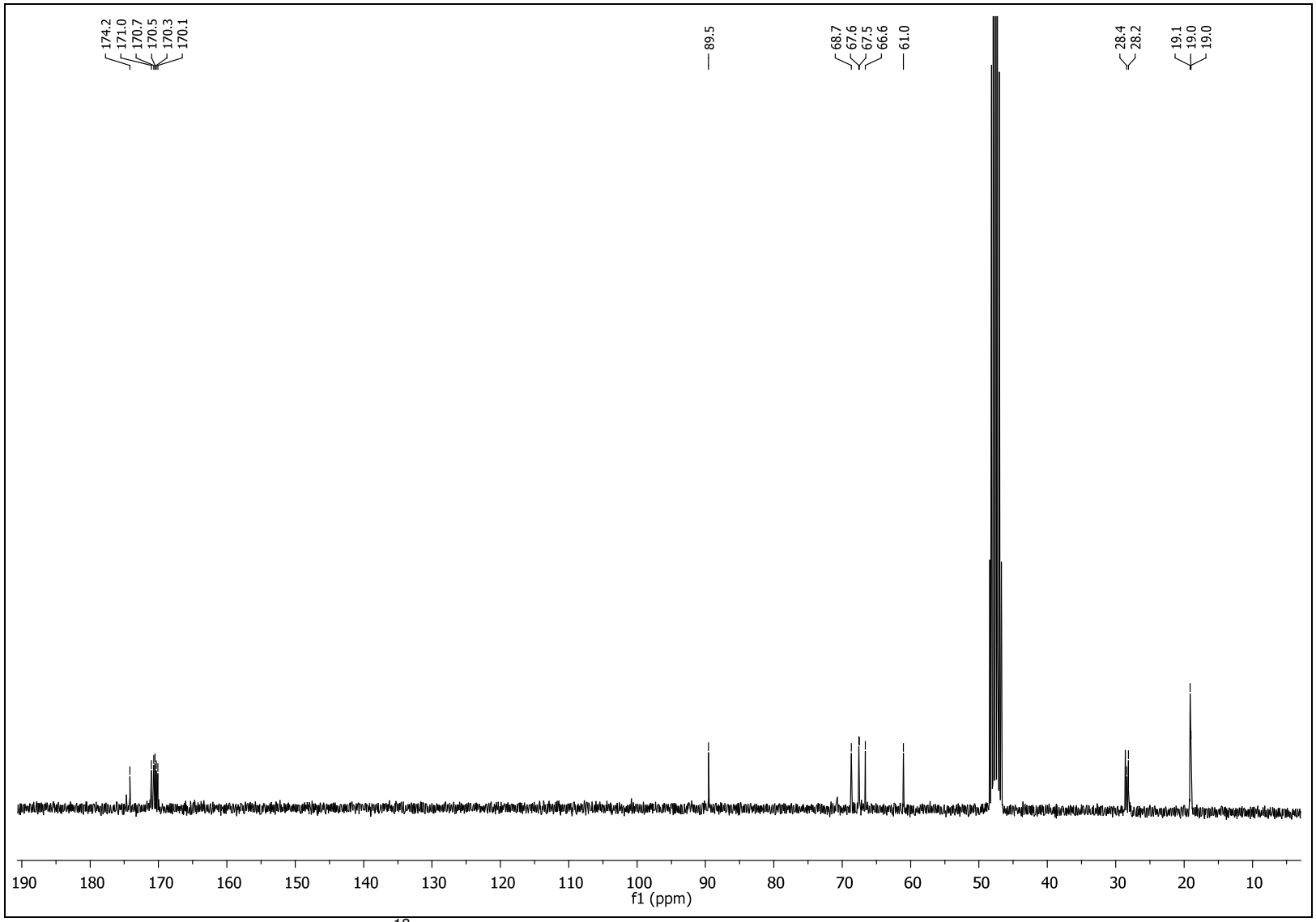


Tabela 13 - Dados espectroscópicos do composto **76**.

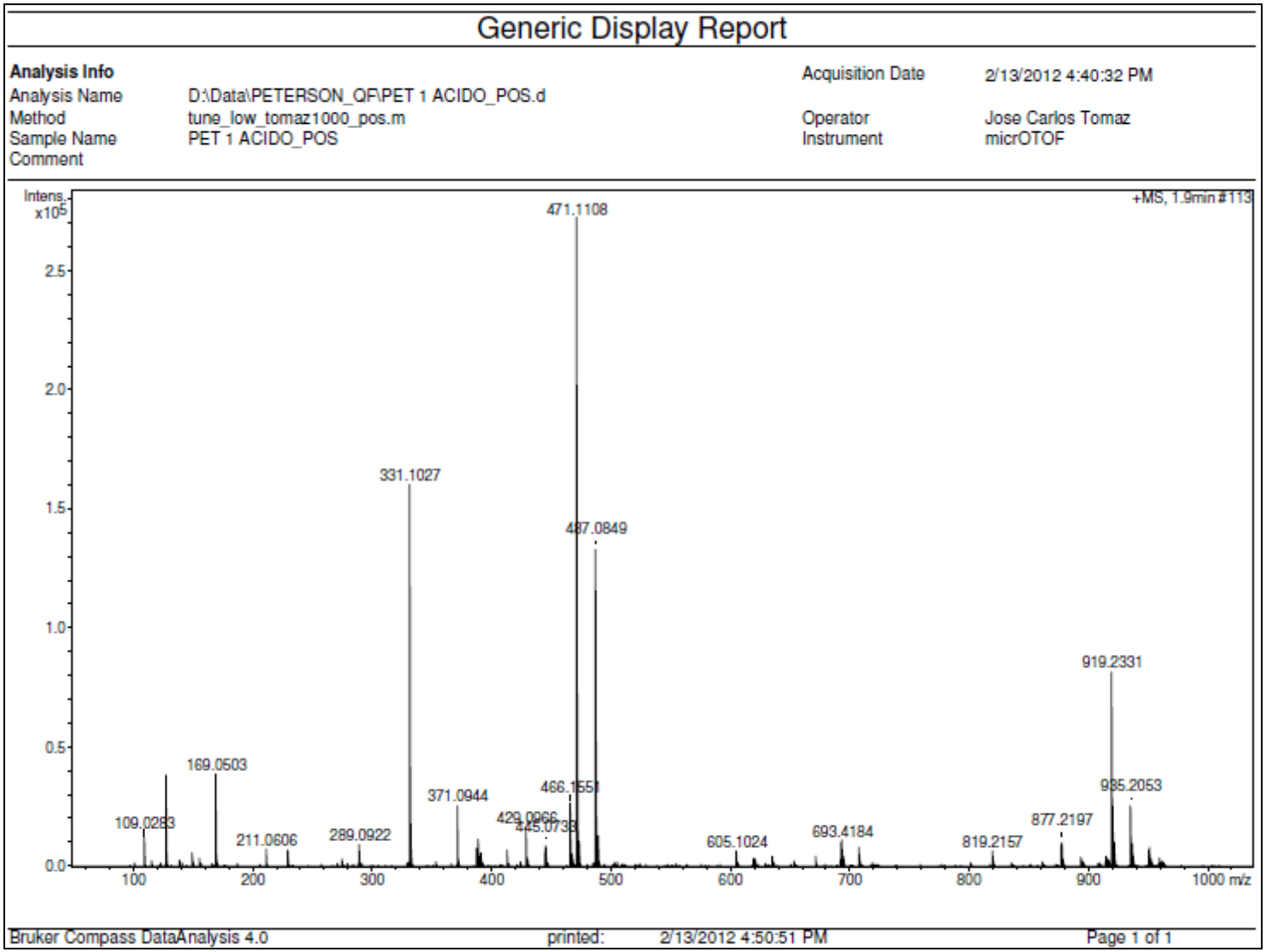
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	89,5	6,35	1	d	$J_{1,2}$ = 3,6
2	67,4	5,22	1	dd	$J_{1,2}$ = 3,6; $J_{2,3}$ = 10,7
3	66,3	5,36	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,7; $J_{3,4}$ = 3,3
4	67,6	5,52	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,4; $J_{4,5}$ = 1,1
5	68,7	4,46	1	dt	$J_{4,5}$ = 1,2; $J_{5,6}$ = 6,5
6a	61,0	4,15	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,2
6b		4,05	1	dd	$J_{5,6b}$ = 6,7; $J_{6a,6b}$ = 11,2
7	171,0	-	-	-	-
8	28,2	2,67-2,59	2	m	-
9	28,4	2,77-2,69	2	m	-
10	174,2	-	-	-	-
CO<u>C</u>H$_3$	19,1-19,0	2,15-1,98	12	s	-



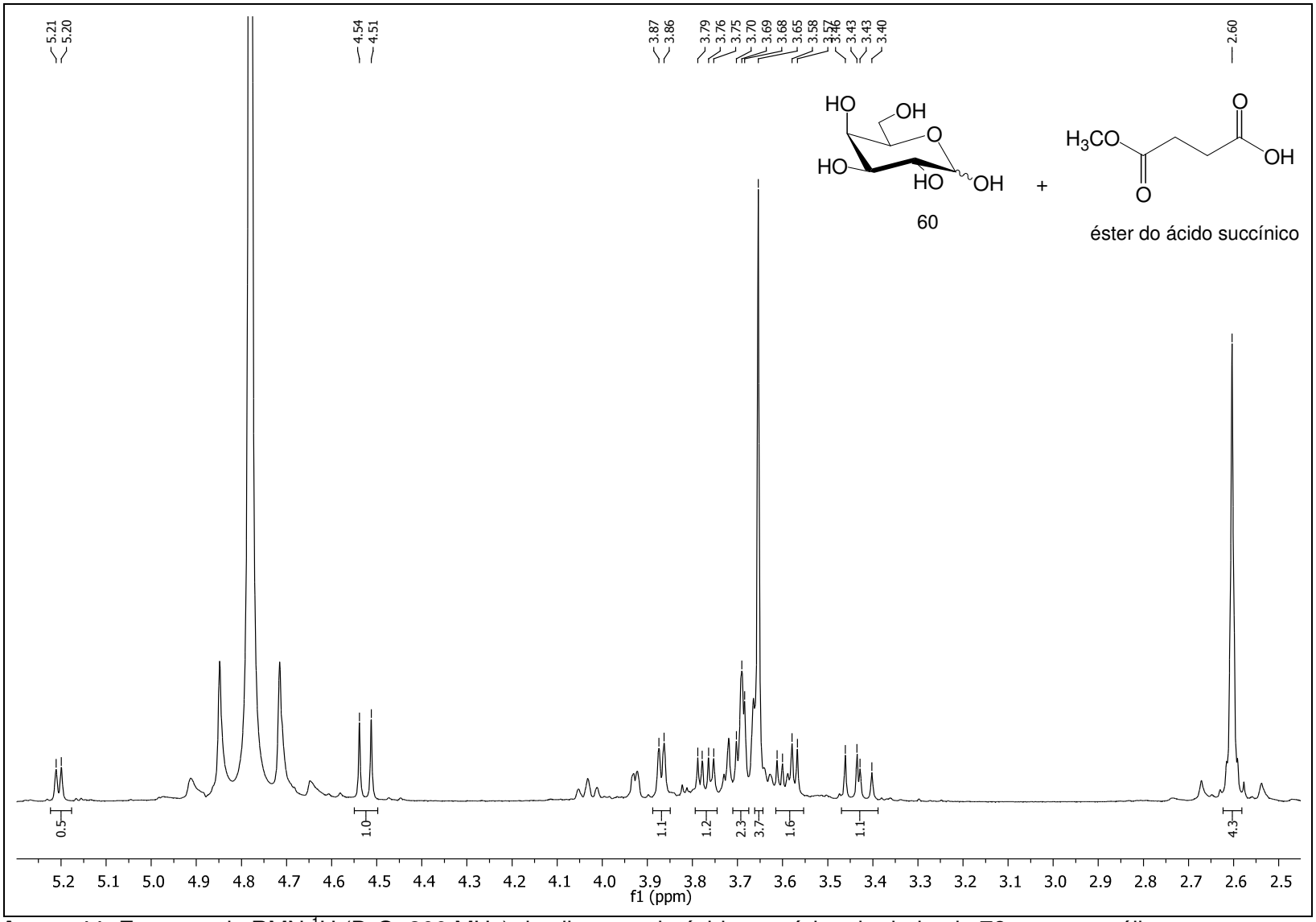
Anexo 10. Espectro de RMN ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) do composto butanodioato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila (**76**).



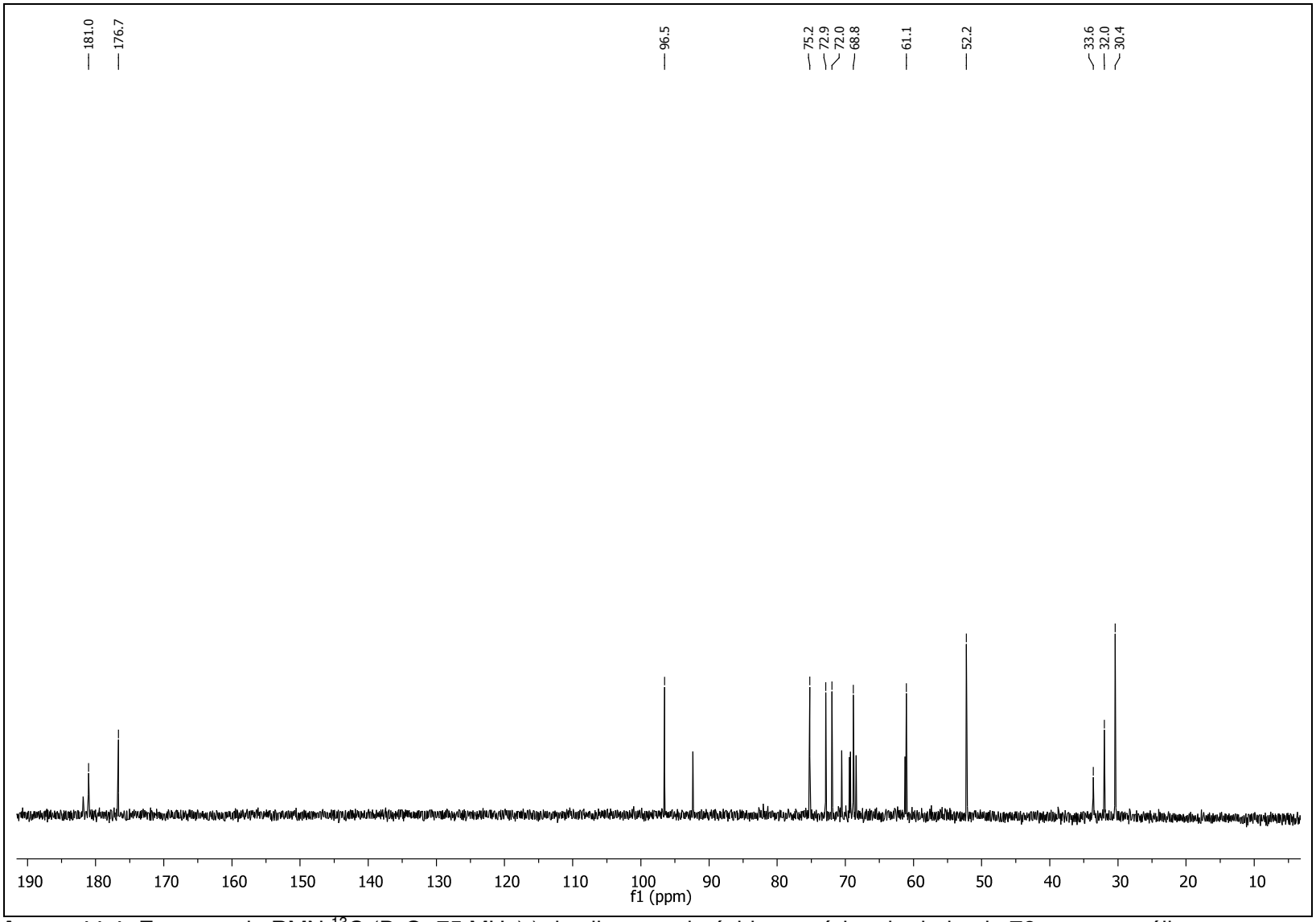
Anexo 10.1. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75 MHz) do composto butanodioato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila (**76**).



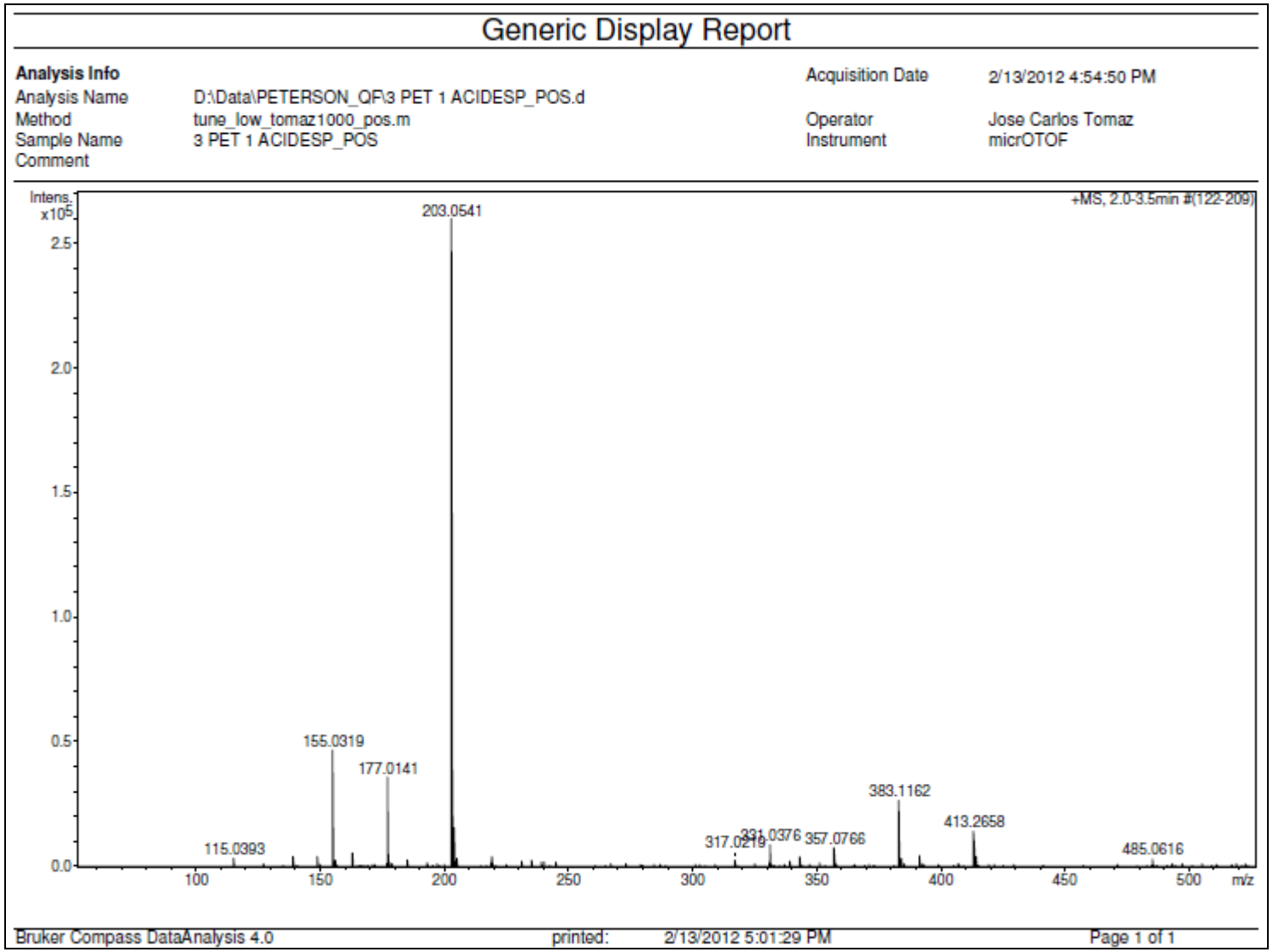
Anexo 10.2. Espectro de massas do composto **76**. ESI-MS calculado para $C_{18}H_{24}O_{13}$ $[M+Na]^+$: 471,1109 e encontrado: 471,1108.



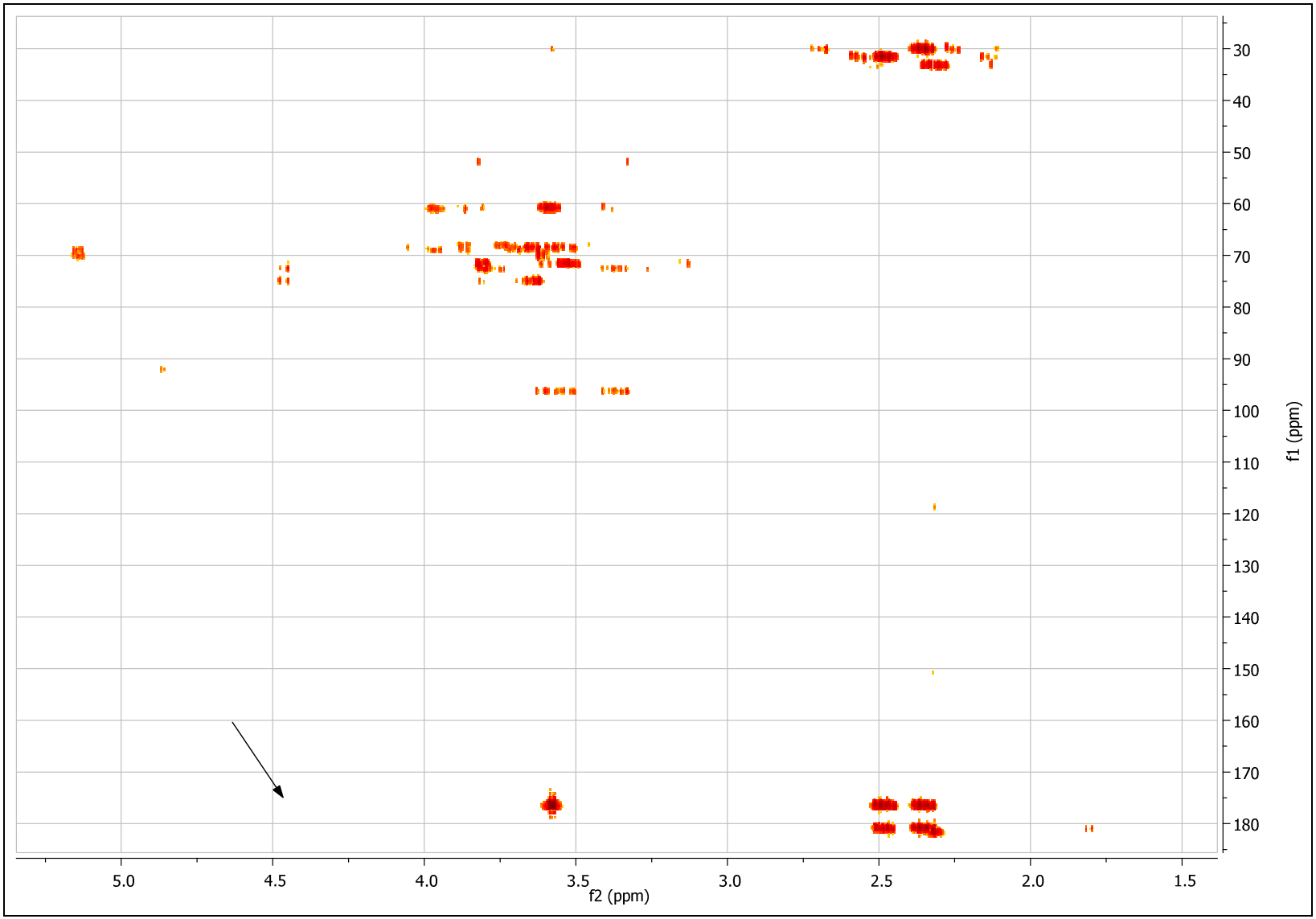
Anexo 11. Espectro de RMN ^1H (D_2O, 300 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise.



Anexo 11.1. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75 MHz)) da clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise.



Anexo 11.2. Espectro de massas da clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise. ESI-MS calculado para $C_{10}H_{16}O_9$ $[M+Na]^+$: 303,0686 e encontrado: 203,0541.



Anexo 11.3. Mapa de contornos HMBC (D_2O, 300 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **76** por metanólise.

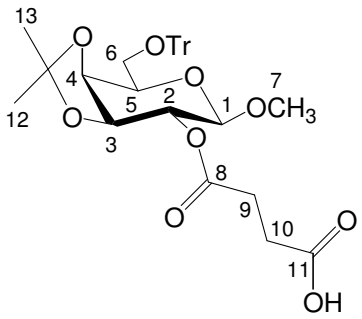
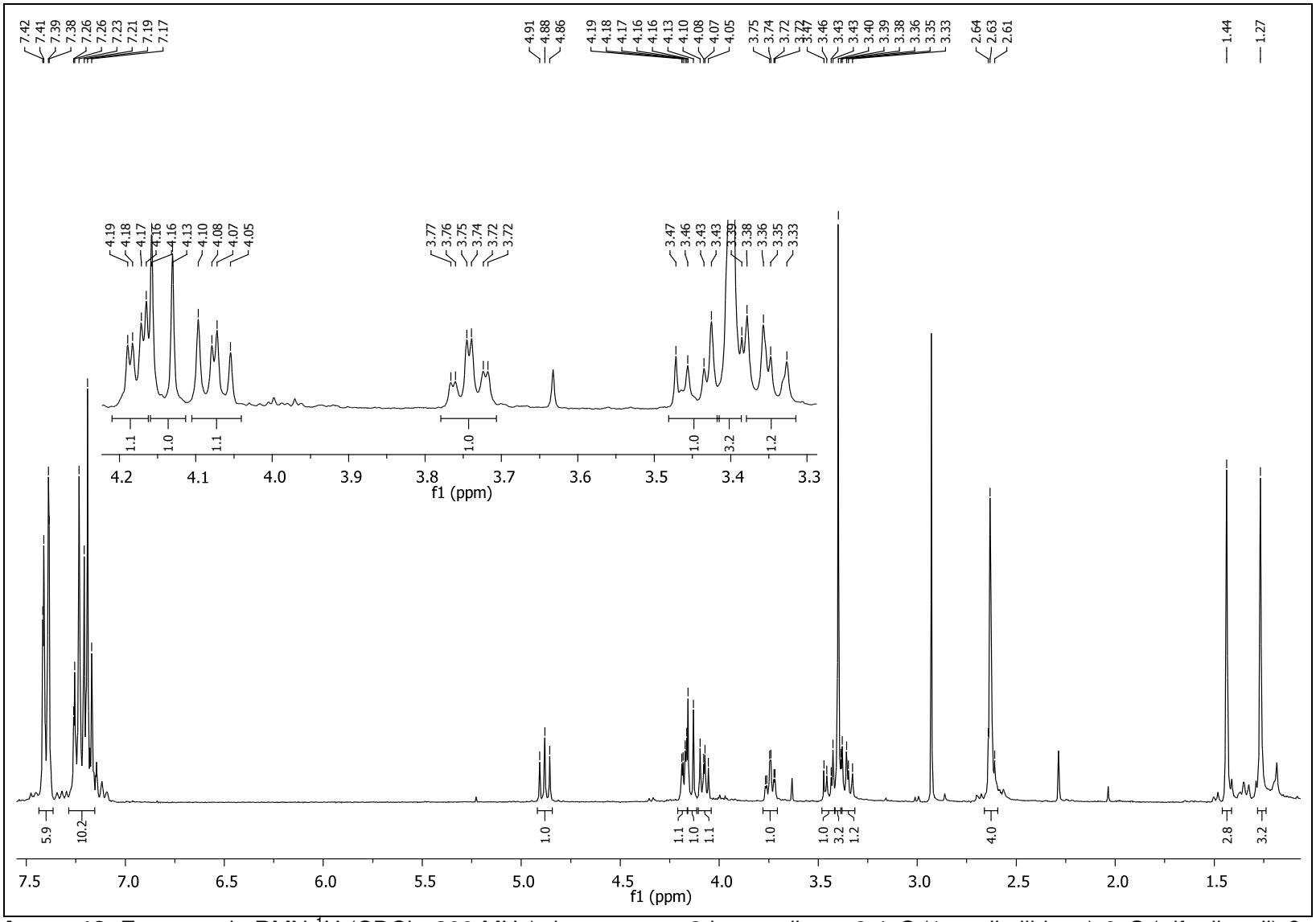
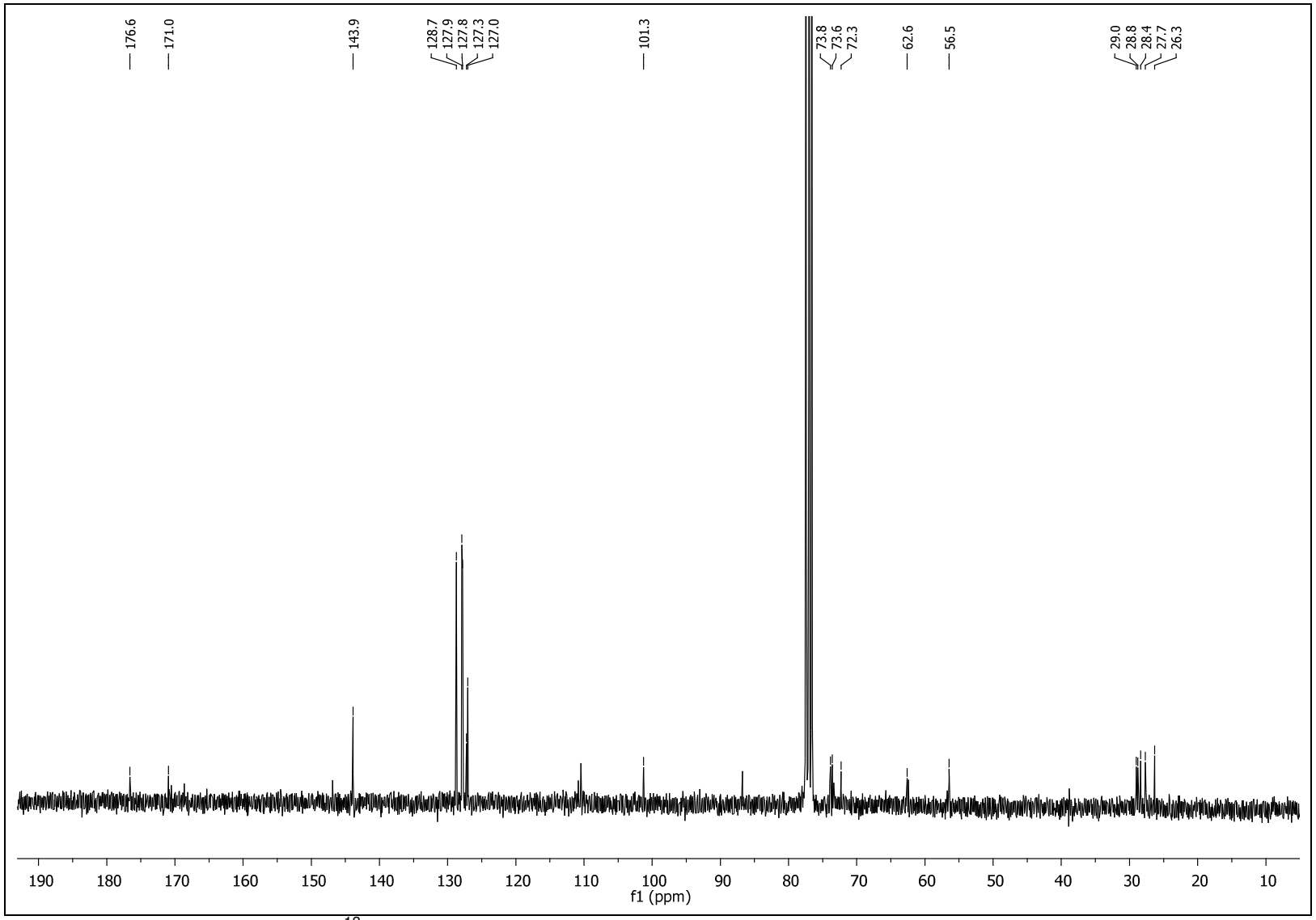


Tabela 14 - Dados espectroscópicos do composto **78**.

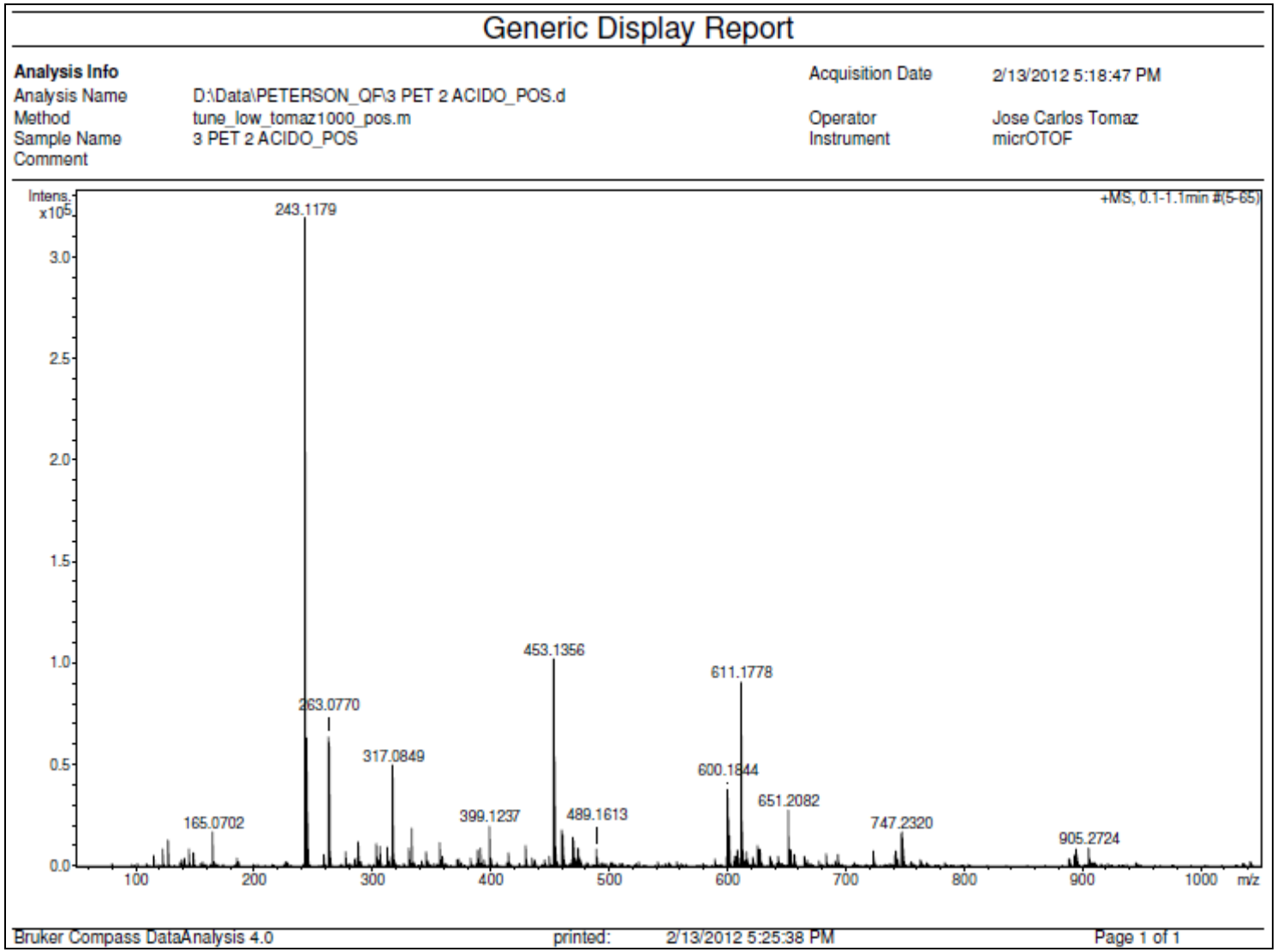
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	101,2	4,15	1	d	$J_{1,2}$ = 8,1
2	73,4	4,48	1	t	$J_{1,2}$ = 7,8
3	76,8	4,08	1	dd	$J_{2,3}$ = 7,1; $J_{3,4}$ = 5,3
4	73,7	4,18	1	dd	$J_{3,4}$ = 5,3; $J_{4,5}$ = 1,8
5	72,2	3,74	1	dt	$J_{4,5}$ = 1,8; $J_{5,6}$ = 6,2
6a	62,6	3,45	1	dd	$J_{5,6a}$ = 3,1; $J_{6a,6b}$ = 9,3
6b		3,37	1	dd	$J_{5,6b}$ = 2,8; $J_{6a,6b}$ = 9,0
7	56,3	3,40	3	s	-
8	171,0	-	-	-	-
9	28,4	2,66-2,61	4	m	-
10	28,8				
11	176,6	-	-	-	-
12	26,0	1,27	3	s	-
13	27,3	1,44	3	s	-



Anexo 12. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 2-butanodioato-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**78**).



Anexo 12.1. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do composto 2-butanodioato-3,4-*O*-(1-metiletilideno)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**78**).



Anexo 12.2. Espectro de massas do composto **78**. ESI-MS calculado para $C_{33}H_{36}O_9$ $[M+Na]^+$: 577,2432 e encontrado: 243,1179.

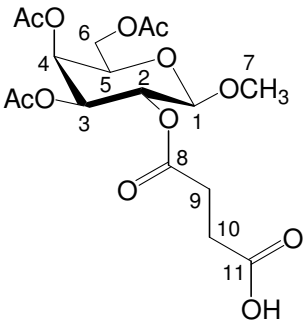
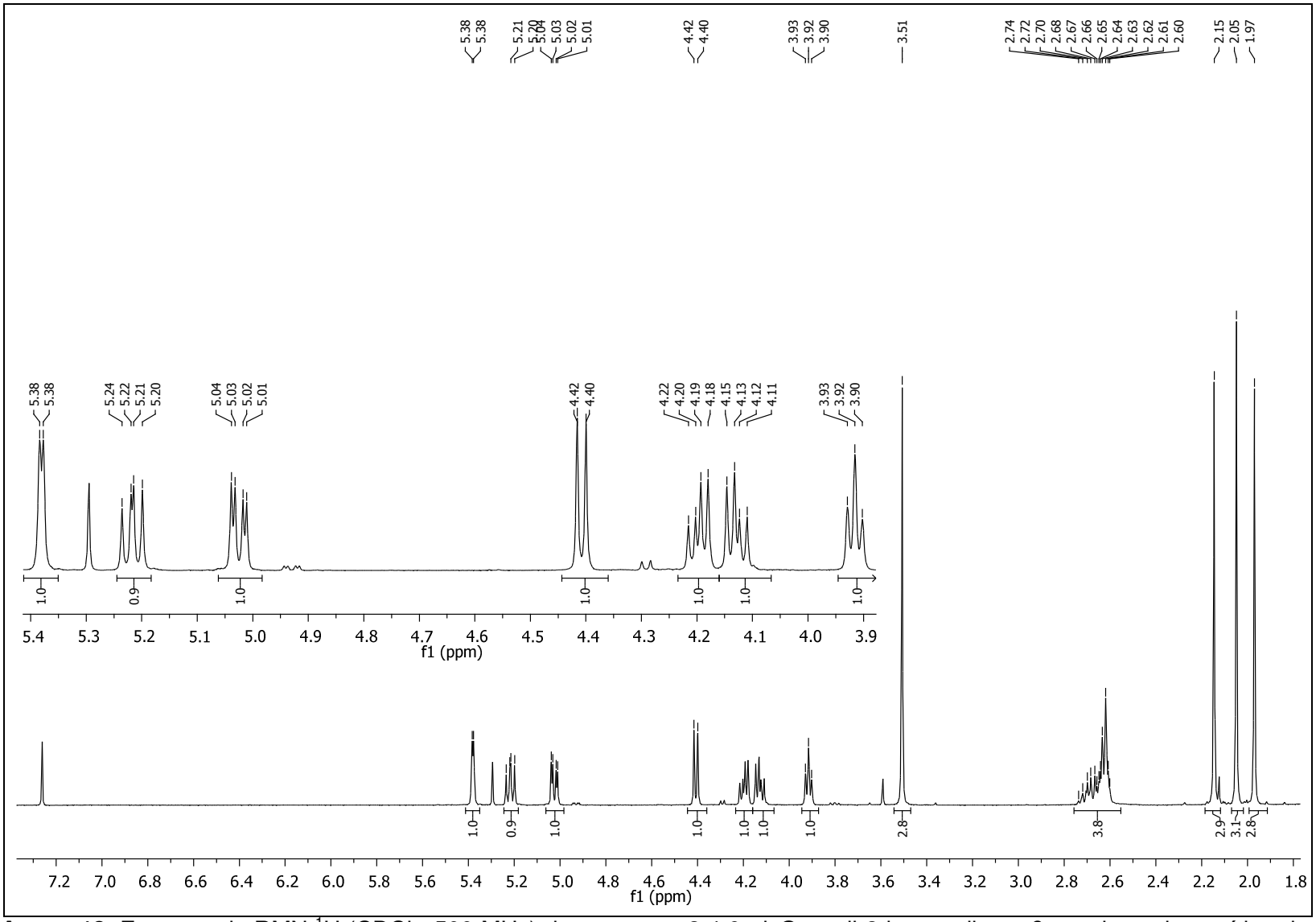
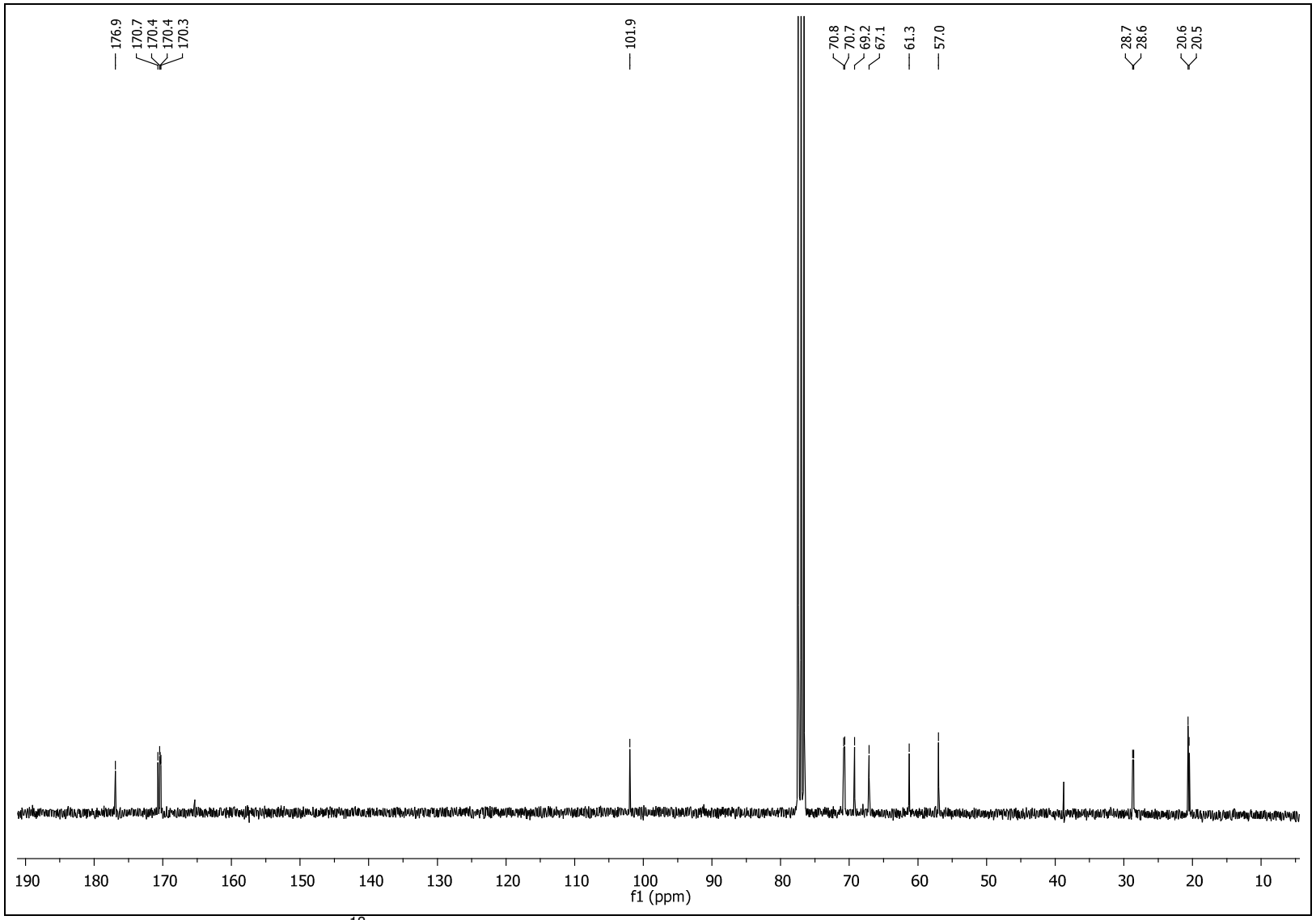


Tabela 15 - Dados espectroscópicos do composto **79**.

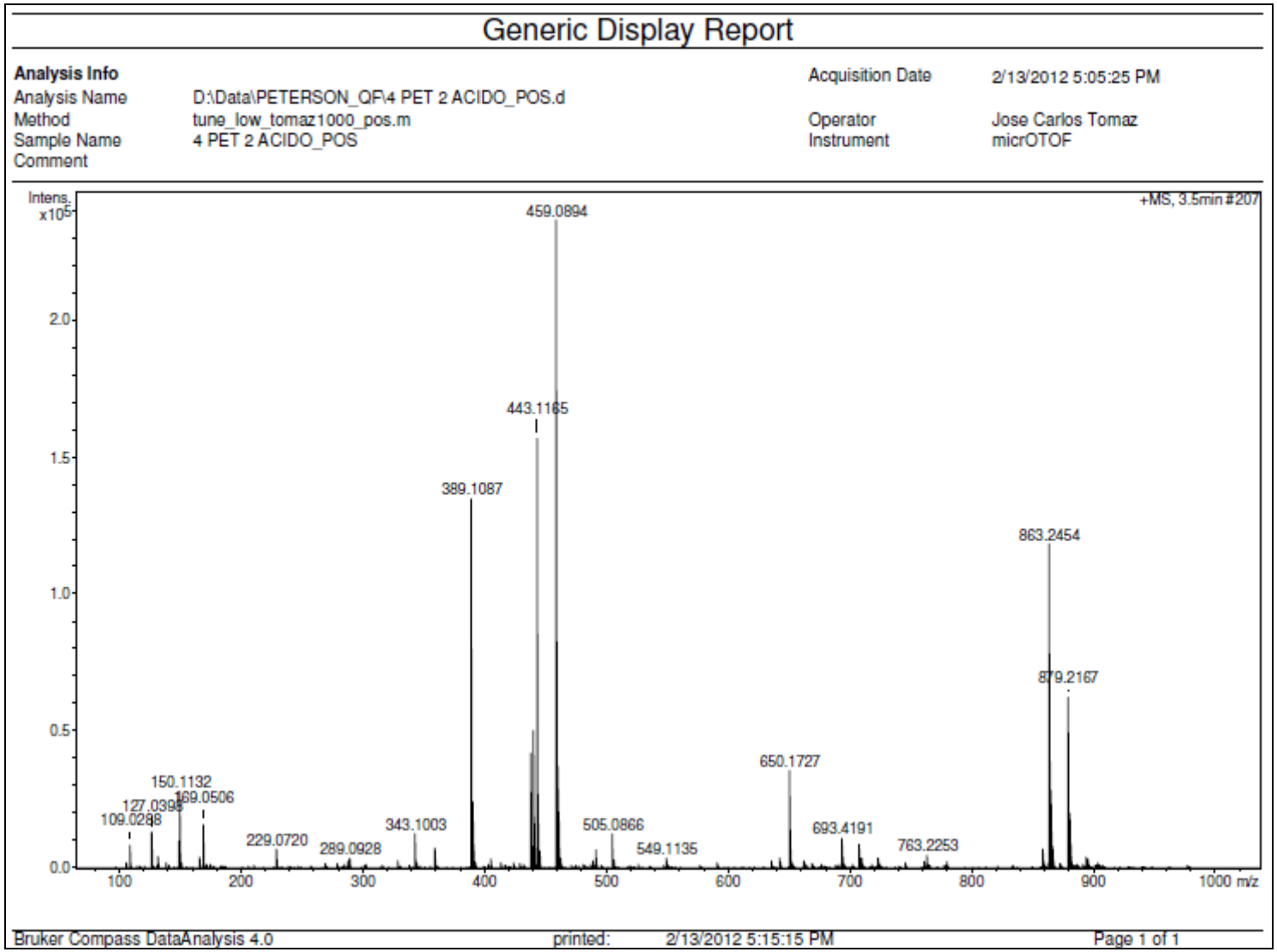
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	101,9	4,41	1	d	$J_{1,2}$ = 7,8
2	69,2	5,22	1	dd	$J_{1,2}$ = 8,0; $J_{2,3}$ = 10,4
3	70,6	5,03	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,4; $J_{3,4}$ = 3,4
4	67,1	5,38	1	dl	$J_{3,4}$ = 3,1
5	70,8	3,91	1	t	$J_{5,6}$ = 6,5
6a	61,3	4,20	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,1
6b		4,13	1	dd	$J_{5,6b}$ = 7,0; $J_{6a,6b}$ = 11,1
7	57,0	3,51	3	s	-
8	170,7	-	-	-	-
9	28,6	2,74-2,59	4	m	-
10	28,7				
11	176,9	-	-	-	-
CO<u>C</u>H$_3$	20,6 -20,5	2,15-1,97	9	s	-



Anexo 13. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**79**).



Anexo 13.1. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**79**).



Anexo 13.2. Espectro de massas do composto **79**. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+K]^+$: 459,0899 e encontrado: 459,0894.

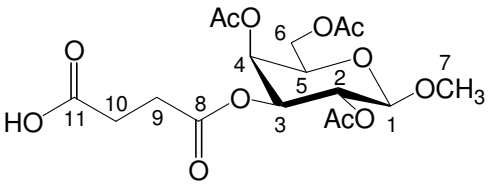
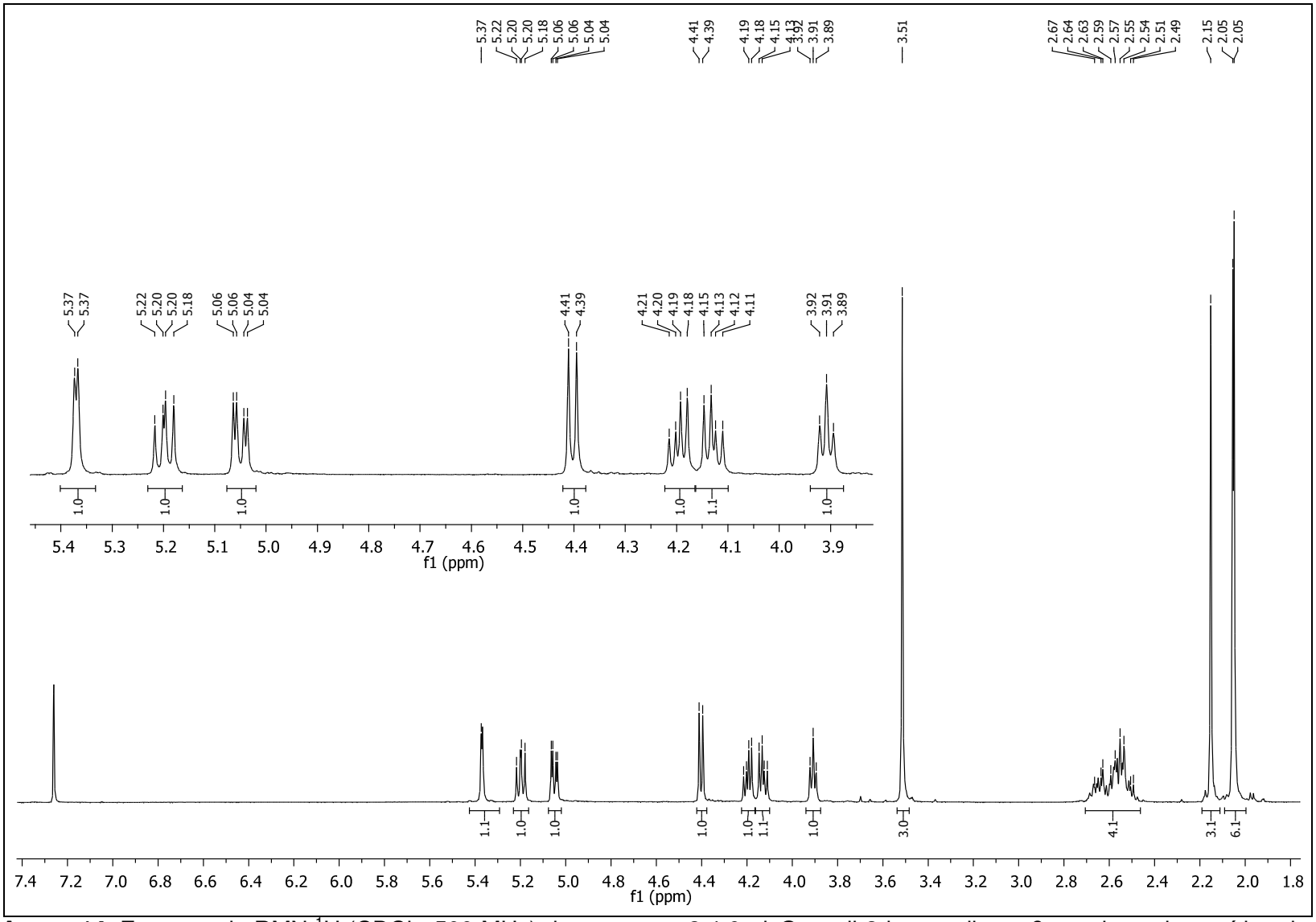
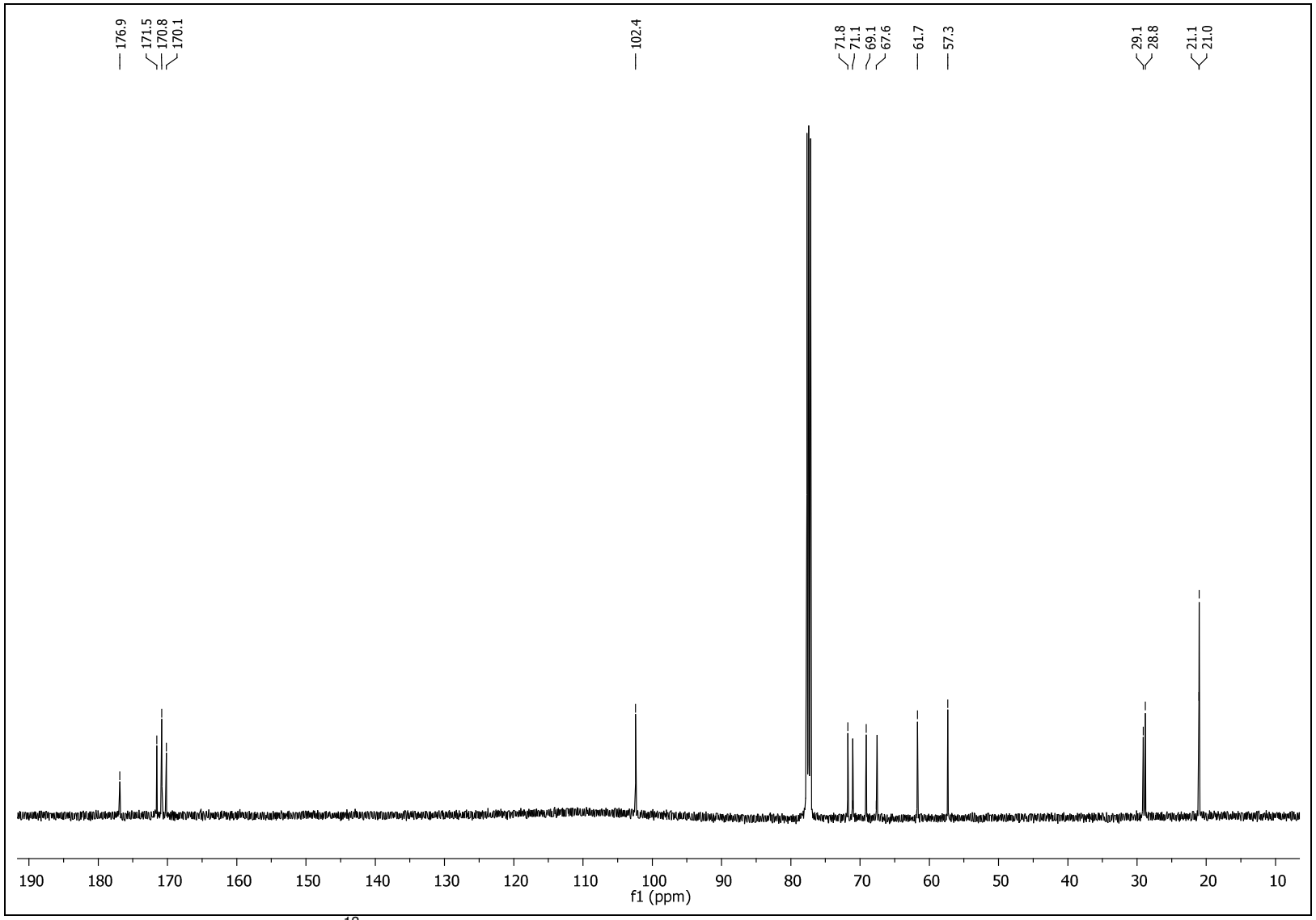


Tabela 16 - Dados espectroscópicos do composto **80**.

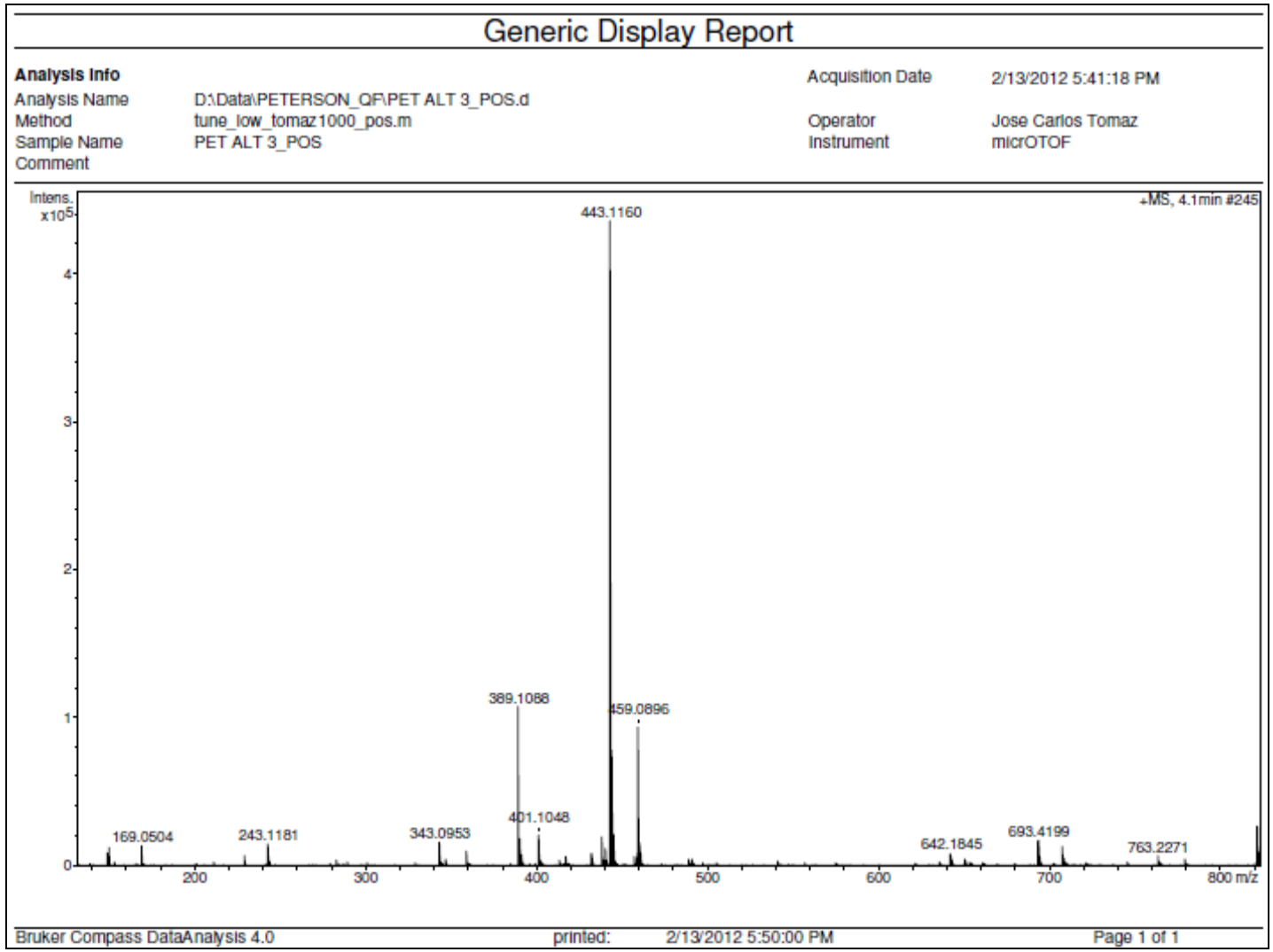
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	102,4	4,40	1	d	$J_{1,2}$ = 8,0
2	69,1	5,20	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 10,4
3	71,8	5,05	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,4; $J_{3,4}$ = 3,4
4	67,6	5,37	1	dl	$J_{3,4}$ = 3,1
5	70,4	3,91	1	t	$J_{5,6}$ = 6,7
6a	61,7	4,20	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,4
6b		4,13	1	dd	$J_{5,6b}$ = 6,7; $J_{6a,6b}$ = 11,2
7	57,3	3,51	3	s	-
8	171,5	-	-	-	-
9	28,8	2,70-2,48	4	m	-
10	29,1				
11	176,9	-	-	-	-
CO<u>C</u>H$_3$	21,1-21,0	2,15-2,05	9	s	-



Anexo 14. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 2,4,6-tri-*O*-acetil-3-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**80**).



Anexo 14.1. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) do composto 2,4,6-tri-*O*-acetil-3-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**80**).



Anexo 14.2. Espectro de massas do composto **80**. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 443,1159 e encontrado: 443,1160.

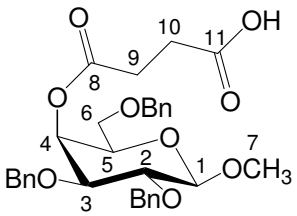
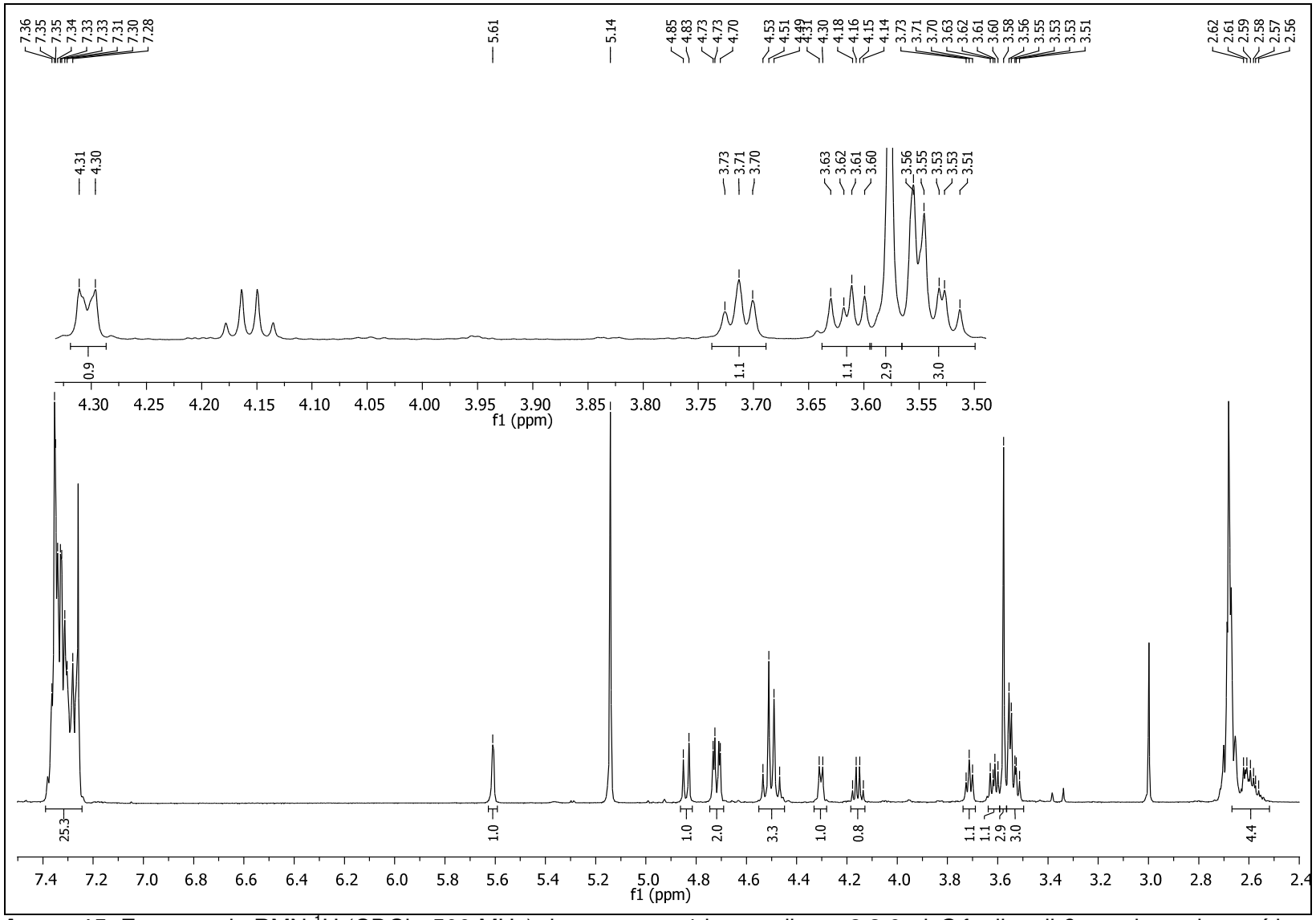
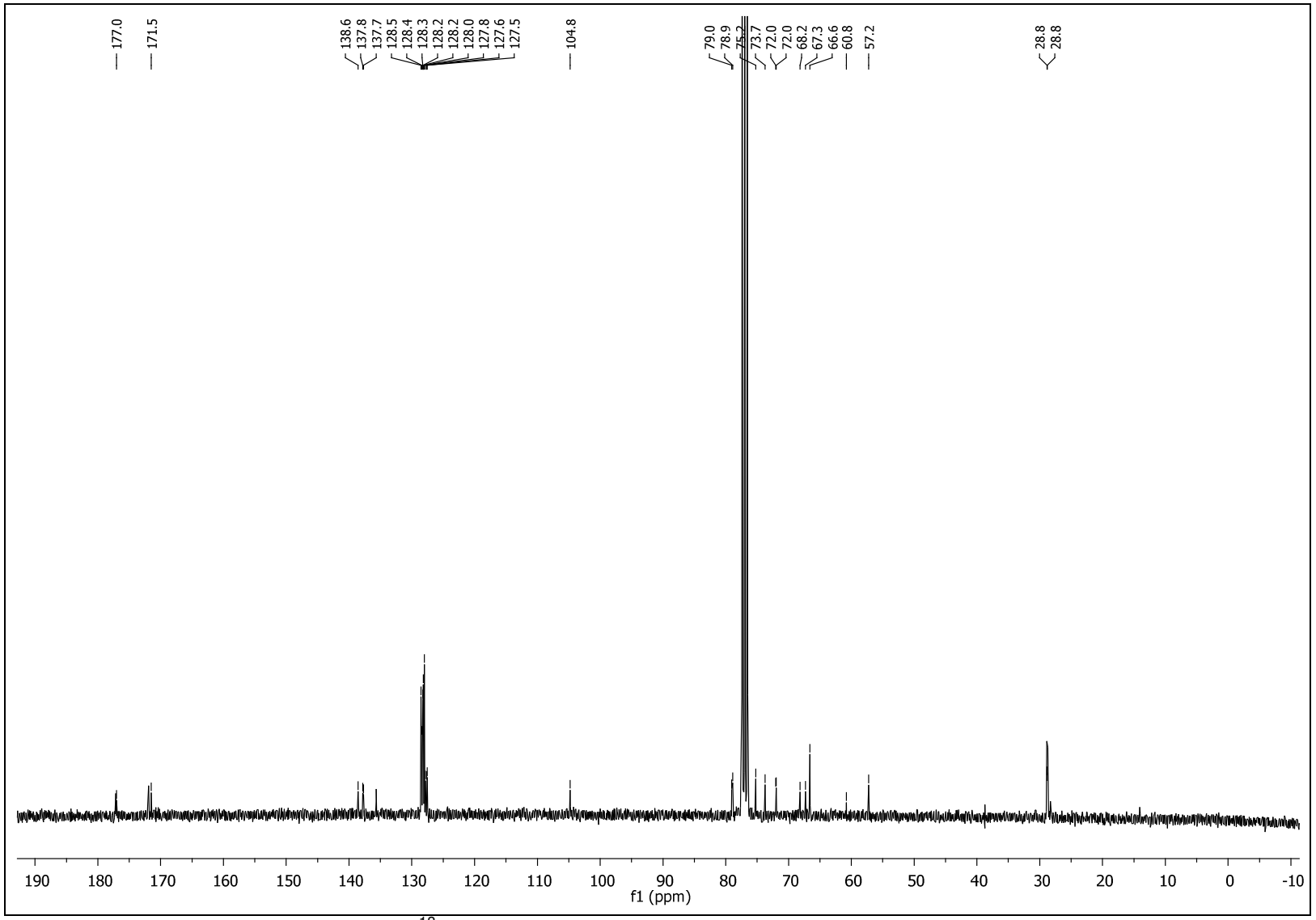


Tabela 17 - Dados espectroscópicos do composto **81**.

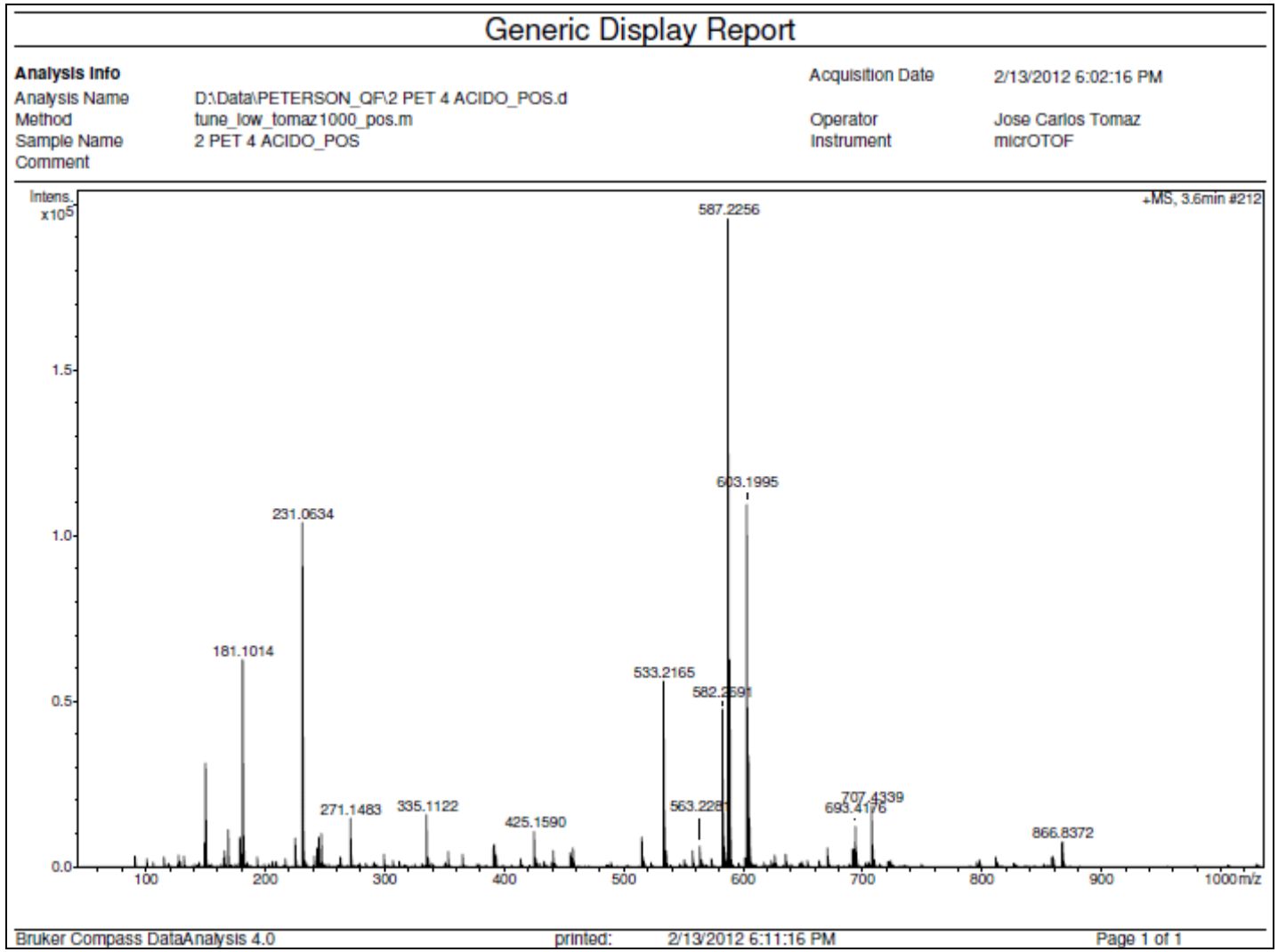
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	104,8	4,30	1	d	$J_{1,2}$ = 7,6
2	60,3	3,62	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,0; $J_{2,3}$ = 9,5
3	79,0	3,57-3,49	1	m	-
4	67,5	5,61	1	d	$J_{4,5}$ = 1,2
5	72,0	3,71	1	t	$J_{5,6}$ = 6,8
6a 6b	60,8	3,57-3,49	2	m	-
7	57,0	3,58	3	s	-
8	171,5	-	-	-	-
9 10	28,7 28,8	2,66-2,55	4	m	-
11	177,0	-	-	-	-
C*H*$_2$Ph	75,2	4,84 e 4,72	3	3d	J_{AB} = 10,9 e J_{AB} = 11,4
C*H*$_2$Ph	73,7 e 71,9	4,56-4,45	3	m	-
CH arom.	128,5-127,5	7,39-7,26	15	m	-



Anexo 15. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do composto 4-butanodioato-2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**81**).



Anexo 15.1. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do composto 4-butanodioato-2,3,6-tri-*O*-fenilmetil-β-D-galactopiranosídeo de metila (**81**).



Anexo 15.2. Espectro de massas do composto **81**. ESI-MS calculado para $C_{32}H_{36}O_9$ $[M+Na]^+$: 587,2251 e encontrado: 587,2256.

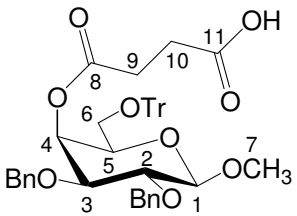
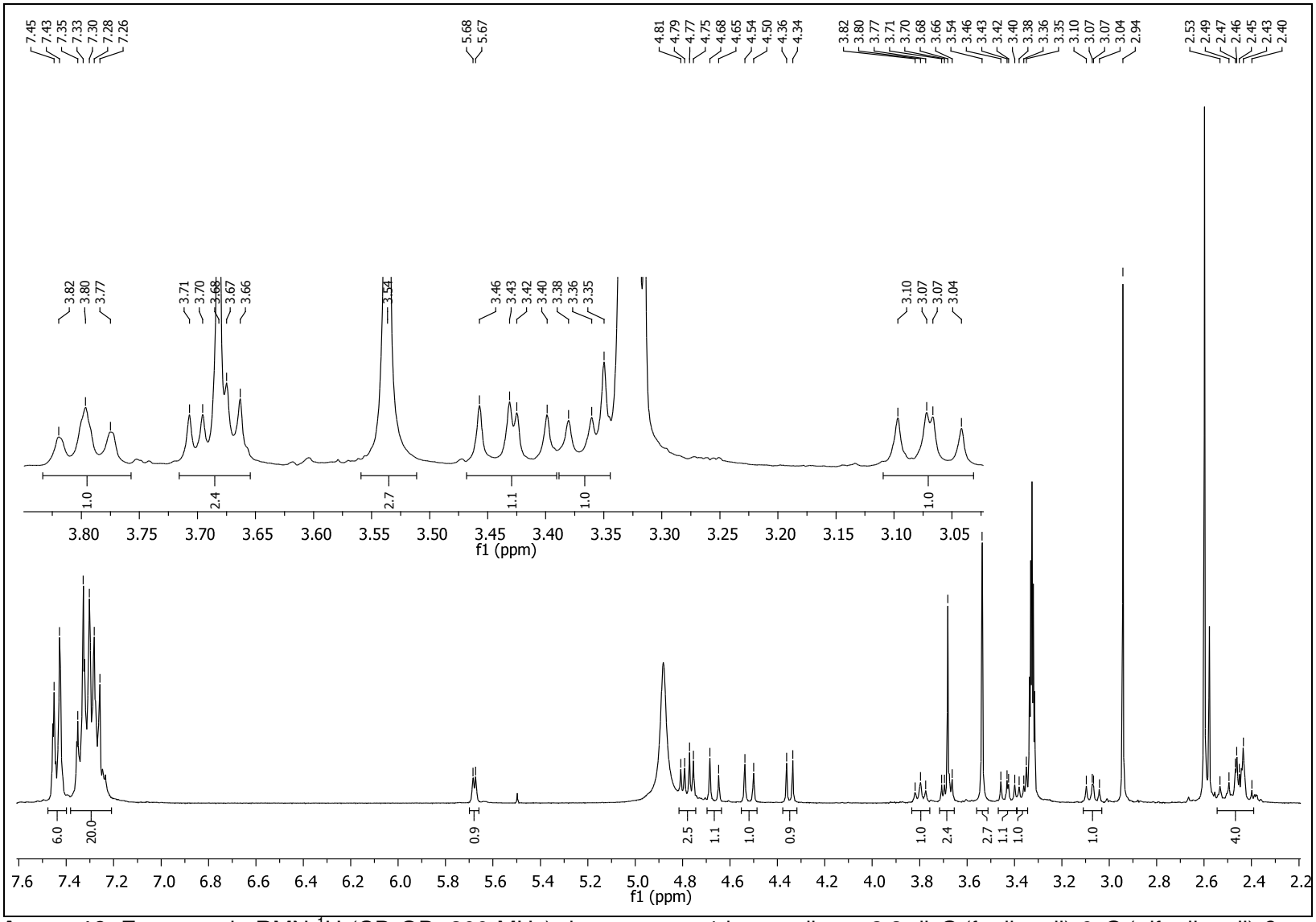


Tabela 18 - Dados espectroscópicos do composto **82**.

Número	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	4,35	1	d	$J_{1,2}$ = 7,8
2	3,43	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 9,7
3	3,69	1	dd	$J_{2,3}$ = 9,8; $J_{3,4}$ = 3,6
4	5,68	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,4; $J_{4,5}$ = 0,8
5	3,80	1	dt	$J_{4,5}$ = 0,6; $J_{5,6}$ = 6,5
6a	3,36	1	dd	$J_{5,6a}$ = 5,9; $J_{6a,6b}$ = 9,2
6b	3,07	1	dd	$J_{5,6b}$ = 7,3; $J_{6a,6b}$ = 9,0
7	3,54	3	s	-
8	-	-	-	-
9 10	2,48-2,41	4	m	-
11	-	-	-	-
C$\underline{H_2}$Ph	4,78	2	d	J_{AB} = 11,2
C$\underline{H_2}$Ph	4,67 e 4,52	2	d	J_{AB} = 11,0
CH arom.	7,44	5	d	J_{orto} = 7,0
CH arom.	7,38-7,25	20	m	-



Anexo 16. Espectro de RMN ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) do composto 4-butanodioato-2,3-di-*O*-(fenilmetil)-6-*O*-(trifenilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de metila (**82**).

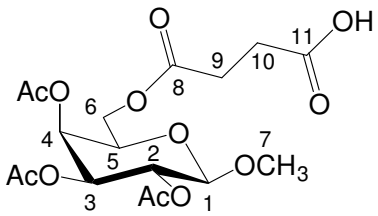
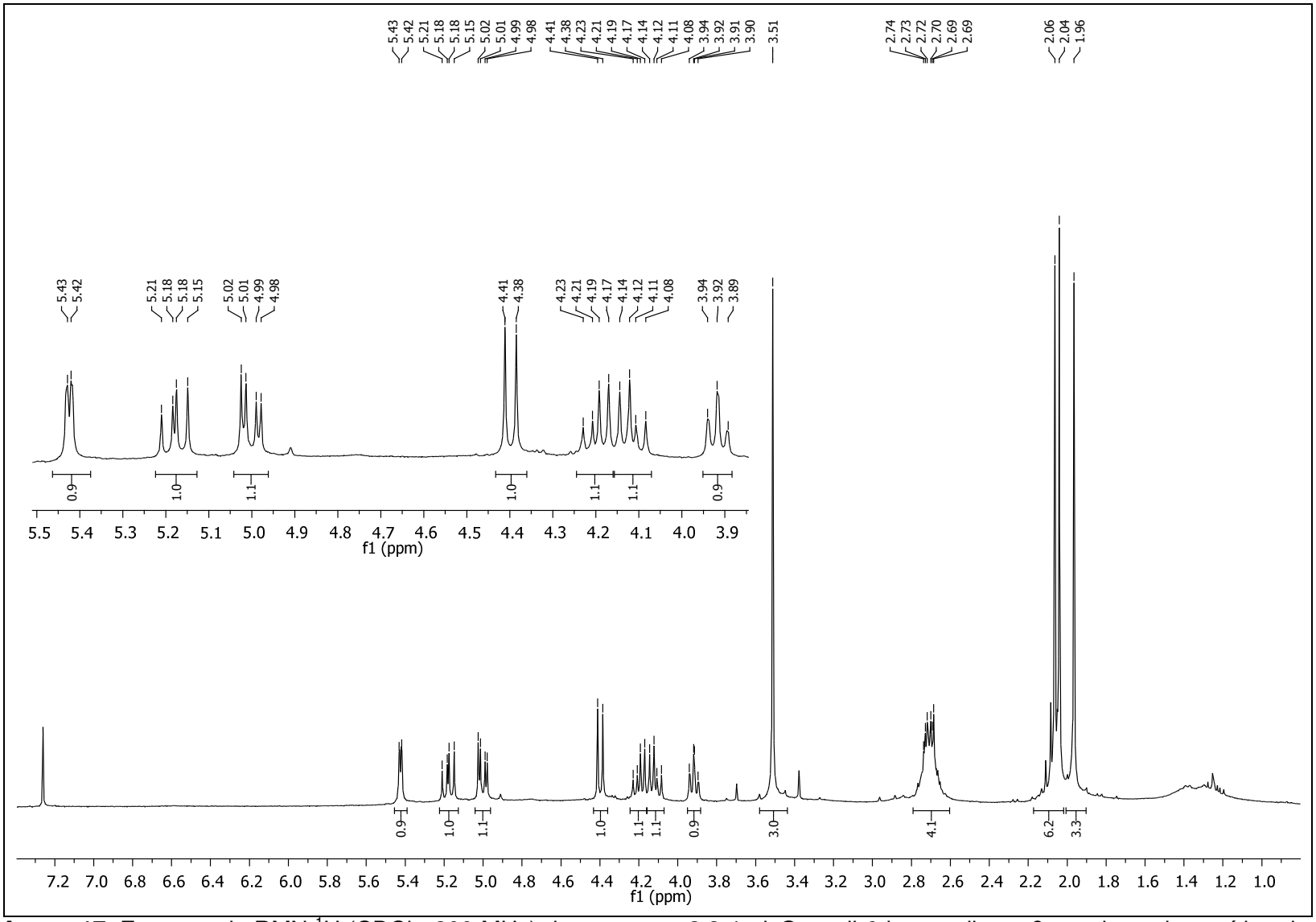
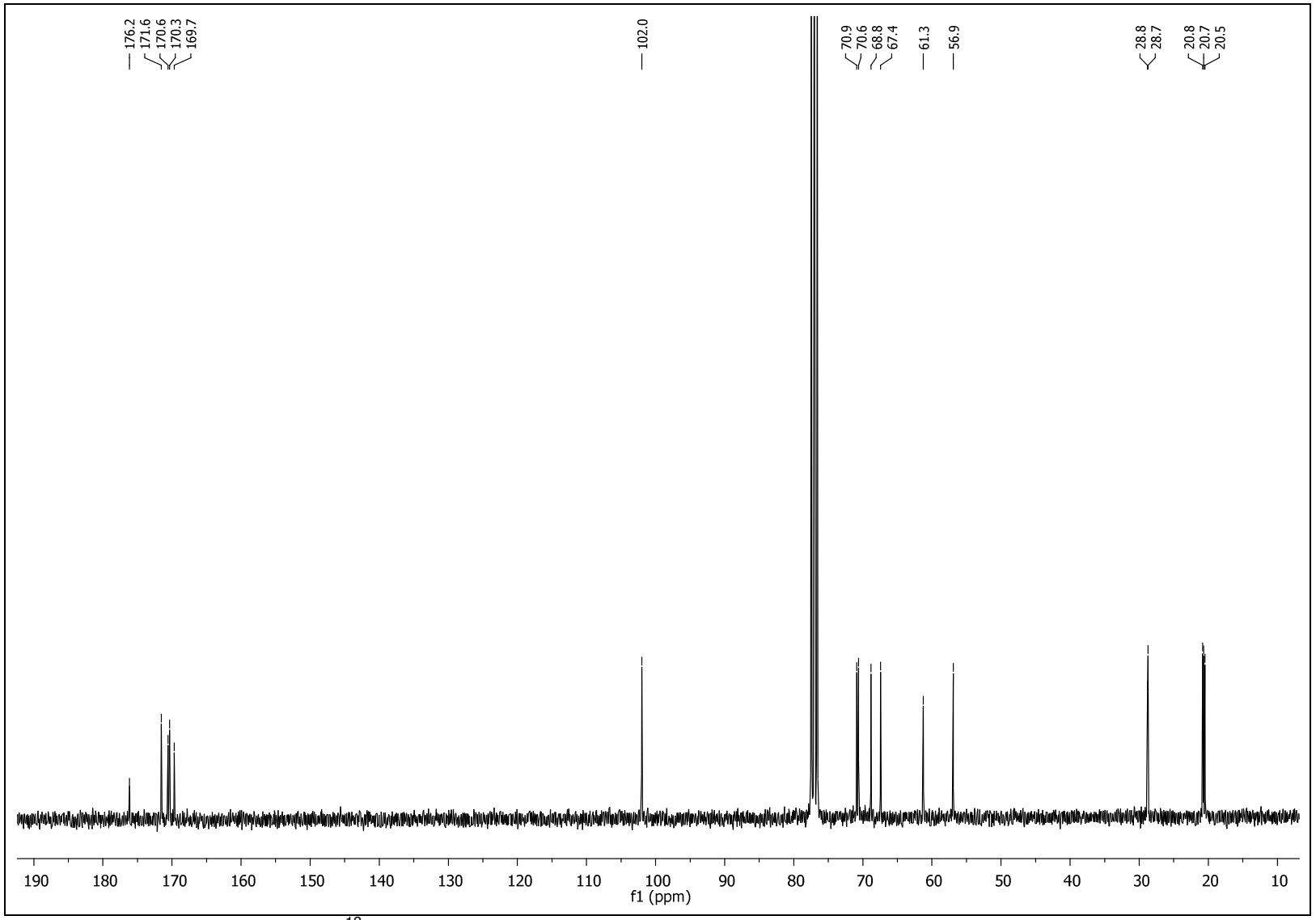


Tabela 19 - Dados espectroscópicos do composto **83**.

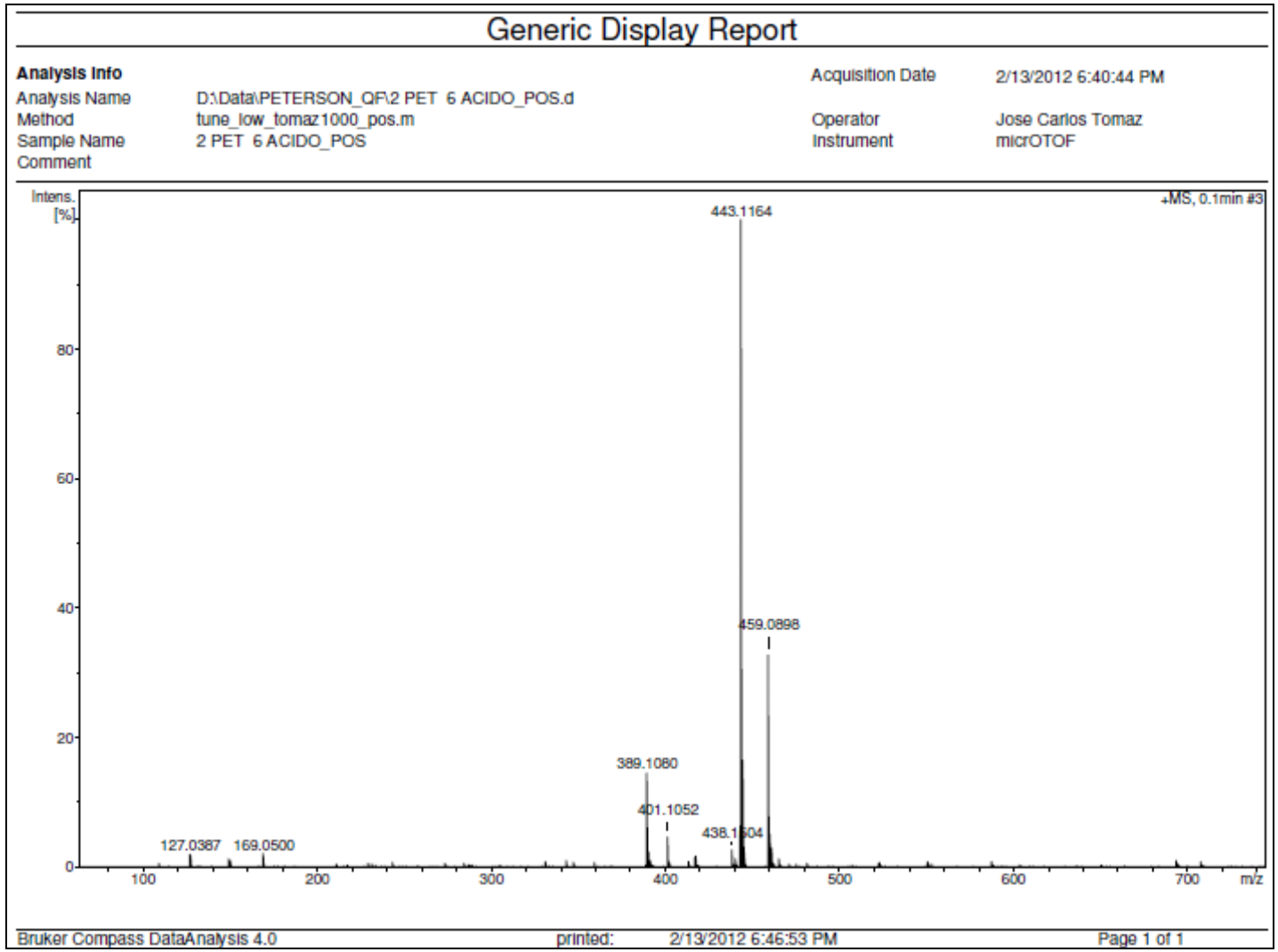
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	102,0	4,40	1	d	$J_{1,2}$ = 7,9
2	68,8	5,18	1	dd	$J_{1,2}$ = 7,8; $J_{2,3}$ = 10,4
3	70,6	5,00	1	dd	$J_{2,3}$ = 10,4; $J_{3,4}$ = 3,4
4	67,4	5,43	1	dd	$J_{3,4}$ = 3,4; $J_{4,5}$ = 1,1
5	70,9	3,92	1	dt	$J_{4,5}$ = 0,9; $J_{5,6}$ = 6,7
6a	61,3	4,20	1	dd	$J_{5,6a}$ = 6,5; $J_{6a,6b}$ = 11,2
6b		4,12	1	dd	$J_{5,6b}$ = 7,0; $J_{6a,6b}$ = 11,2
7	56,9	3,51	3	s	-
8	171,6	-	-	-	-
9	28,7	2,78-2,65	4	m	-
10	28,8				
11	176,2	-	-	-	-
CO<u>*C*</u>H$_3$	20,8-20,5	2,06-1,96	9	s	-



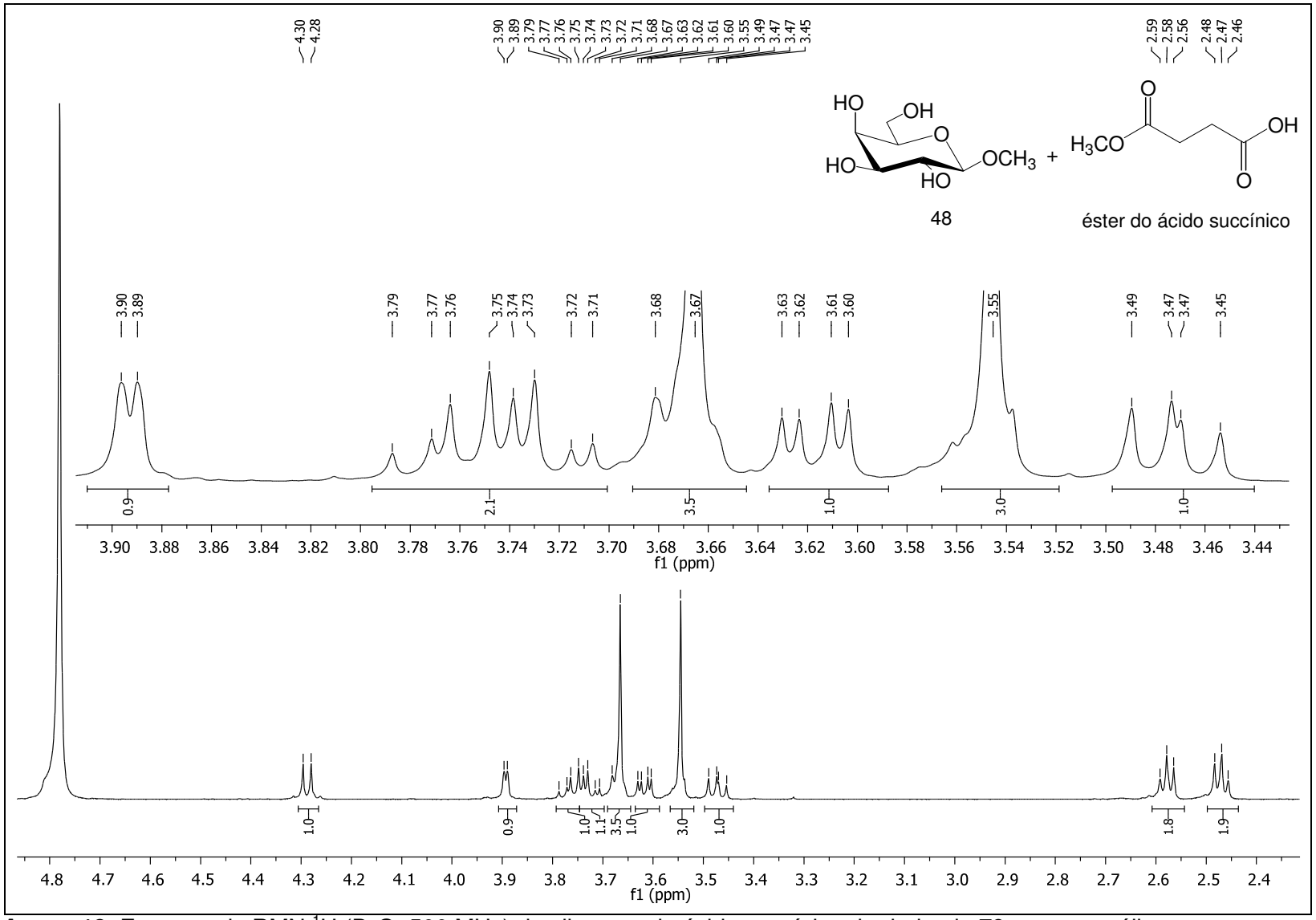
Anexo 17. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**83**).



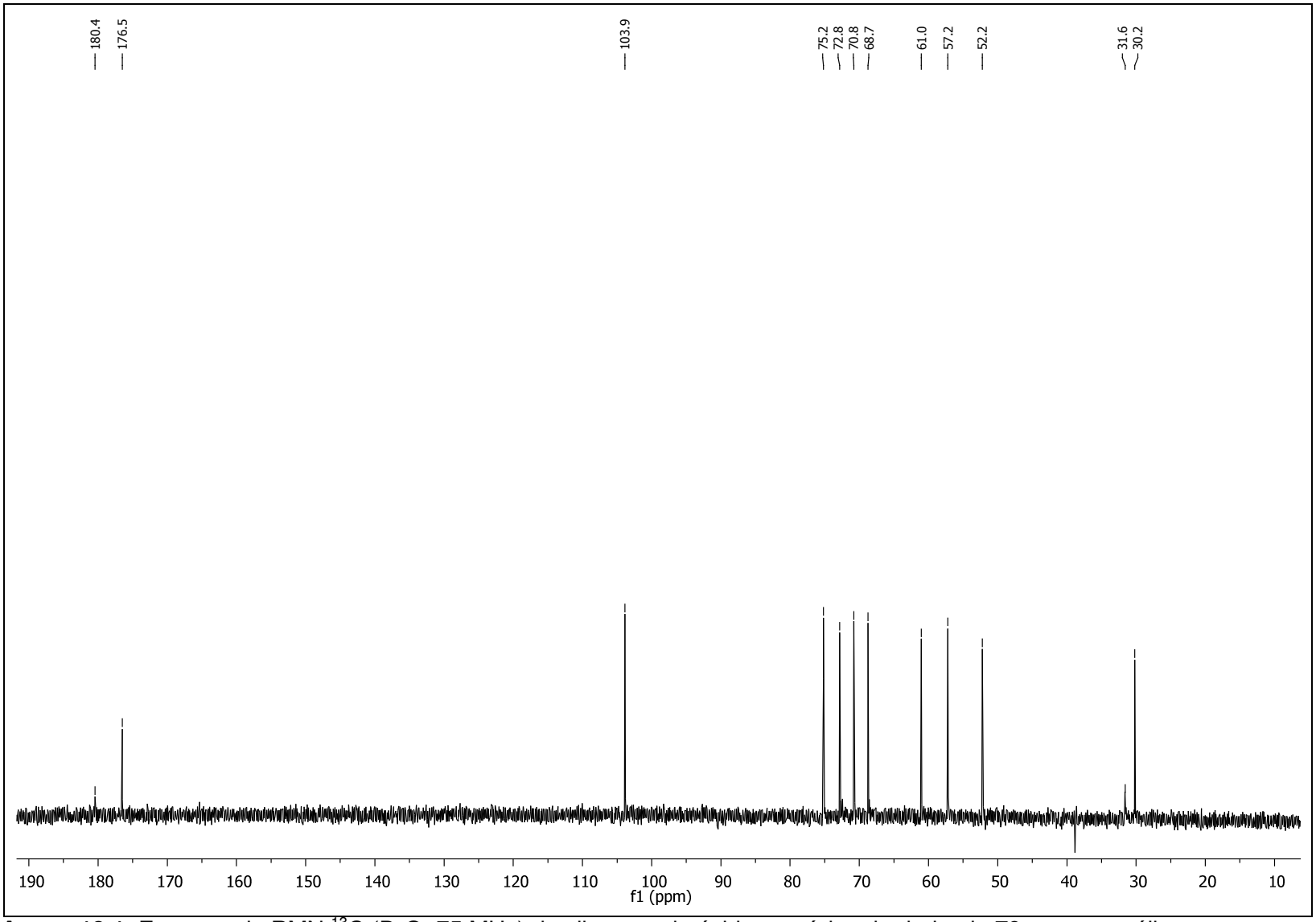
Anexo 17.1. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) do composto 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**83**).



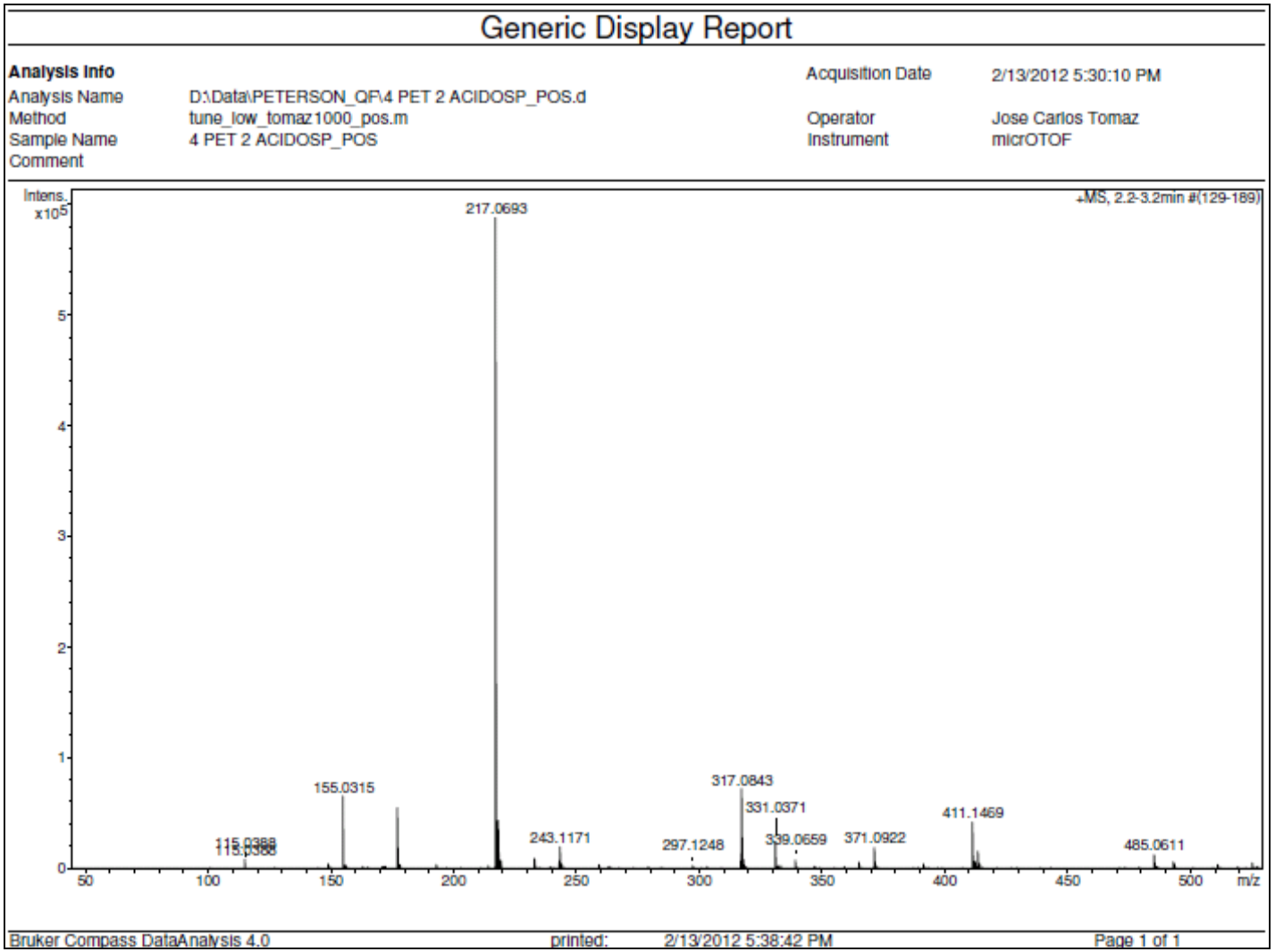
Anexo 17.2. Espectro de massas do composto **83**. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 443,1159 e encontrado: 443,1164.



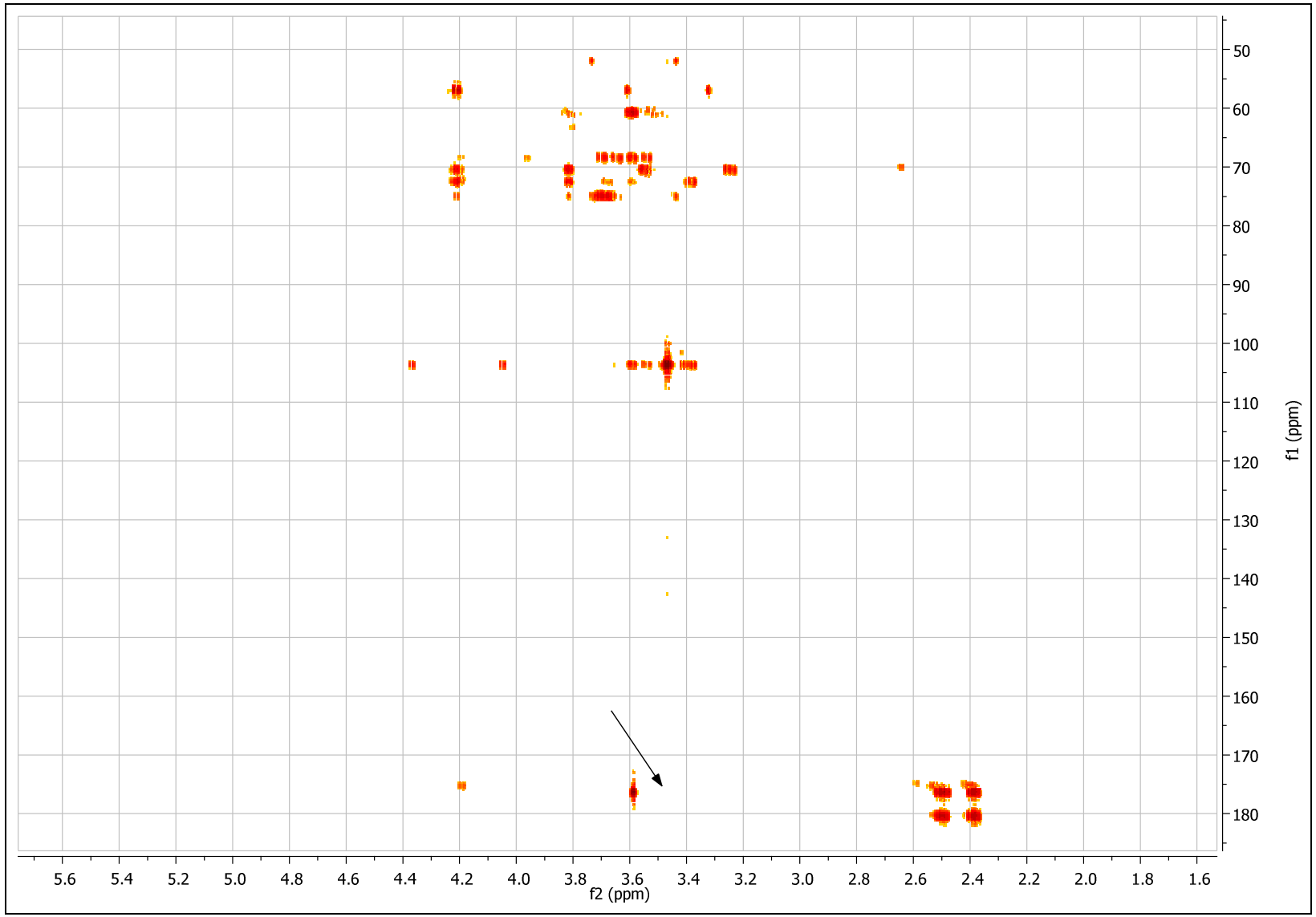
Anexo 18. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **79** por metanólise.



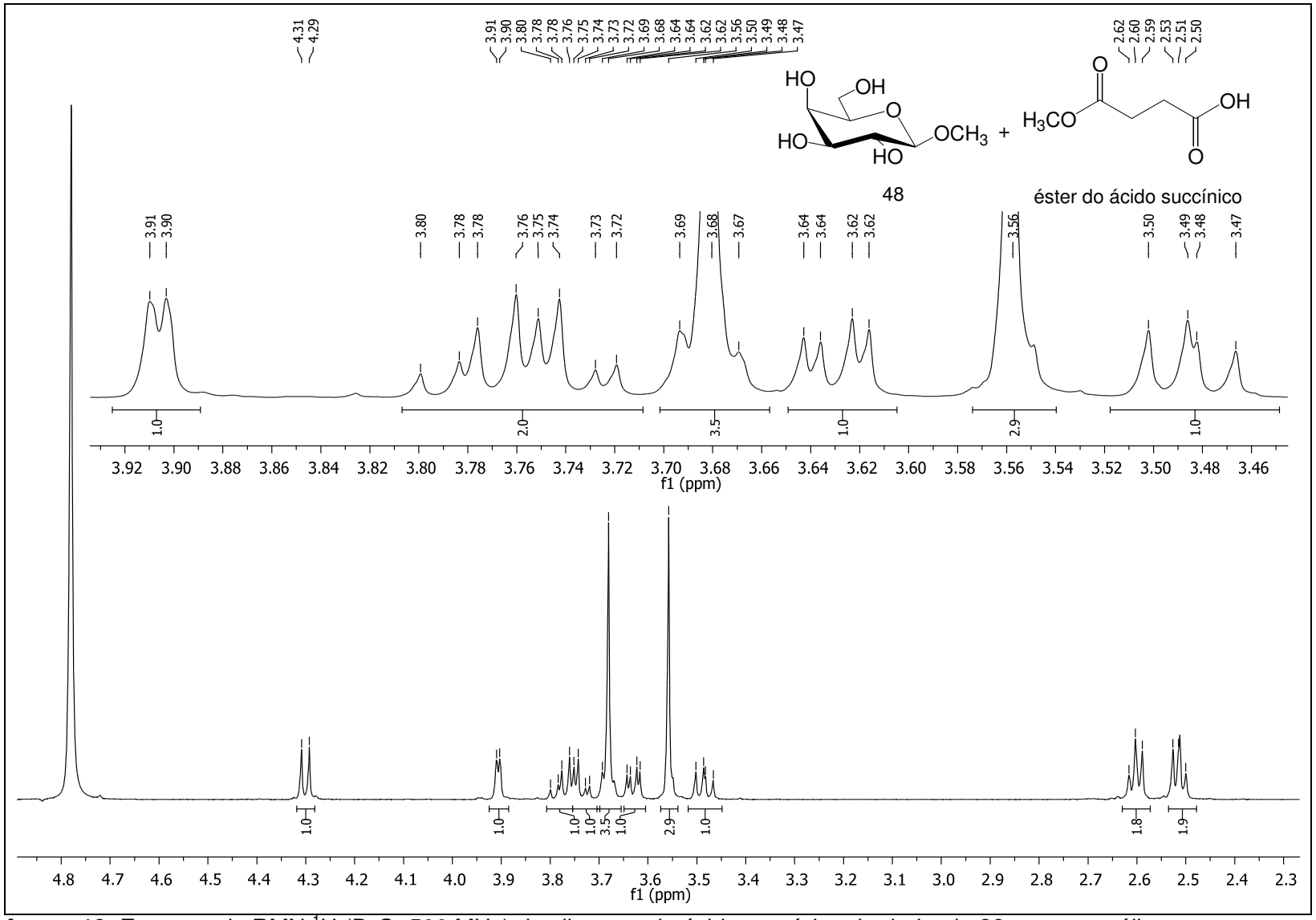
Anexo 18.1. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **79** por metanólise.



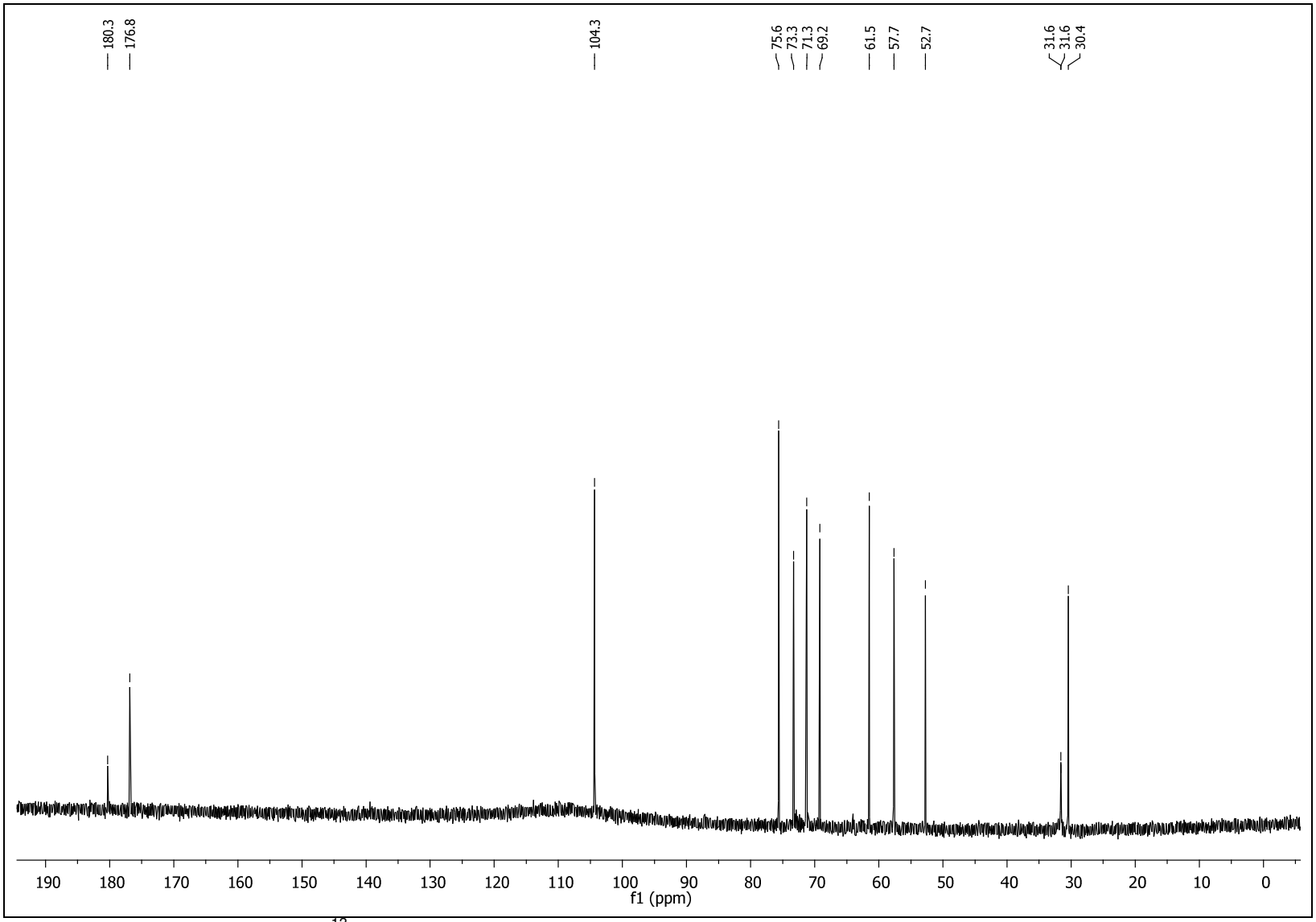
Anexo 18.2. Espectro de massas da clivagem do ácido succínico do derivado **79** por metanólise. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 317,0843 e encontrado: 217,0693.



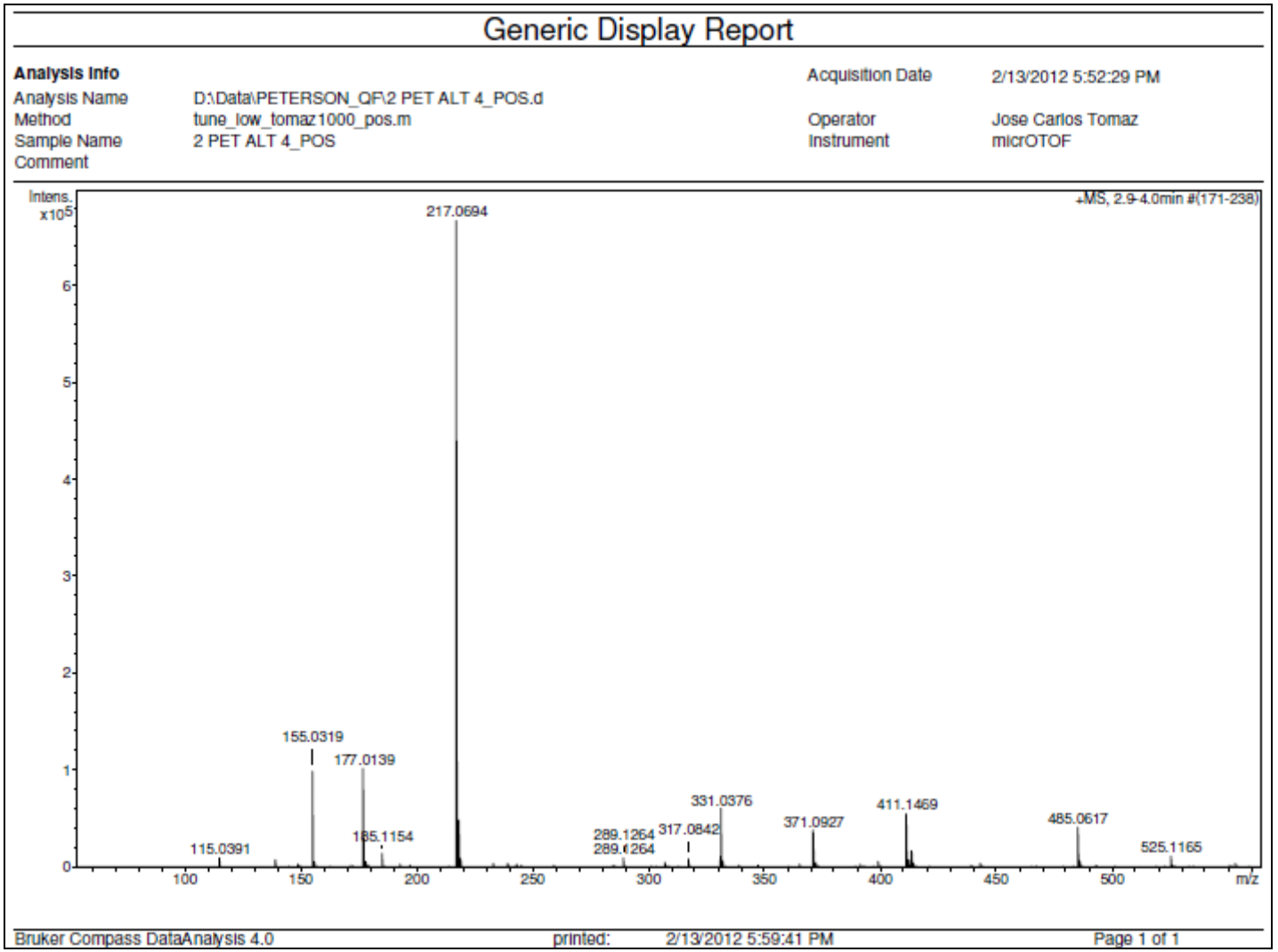
Anexo 18.3. Mapa de contornos HMBC (D_2O, 500 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **79** por metanólise.



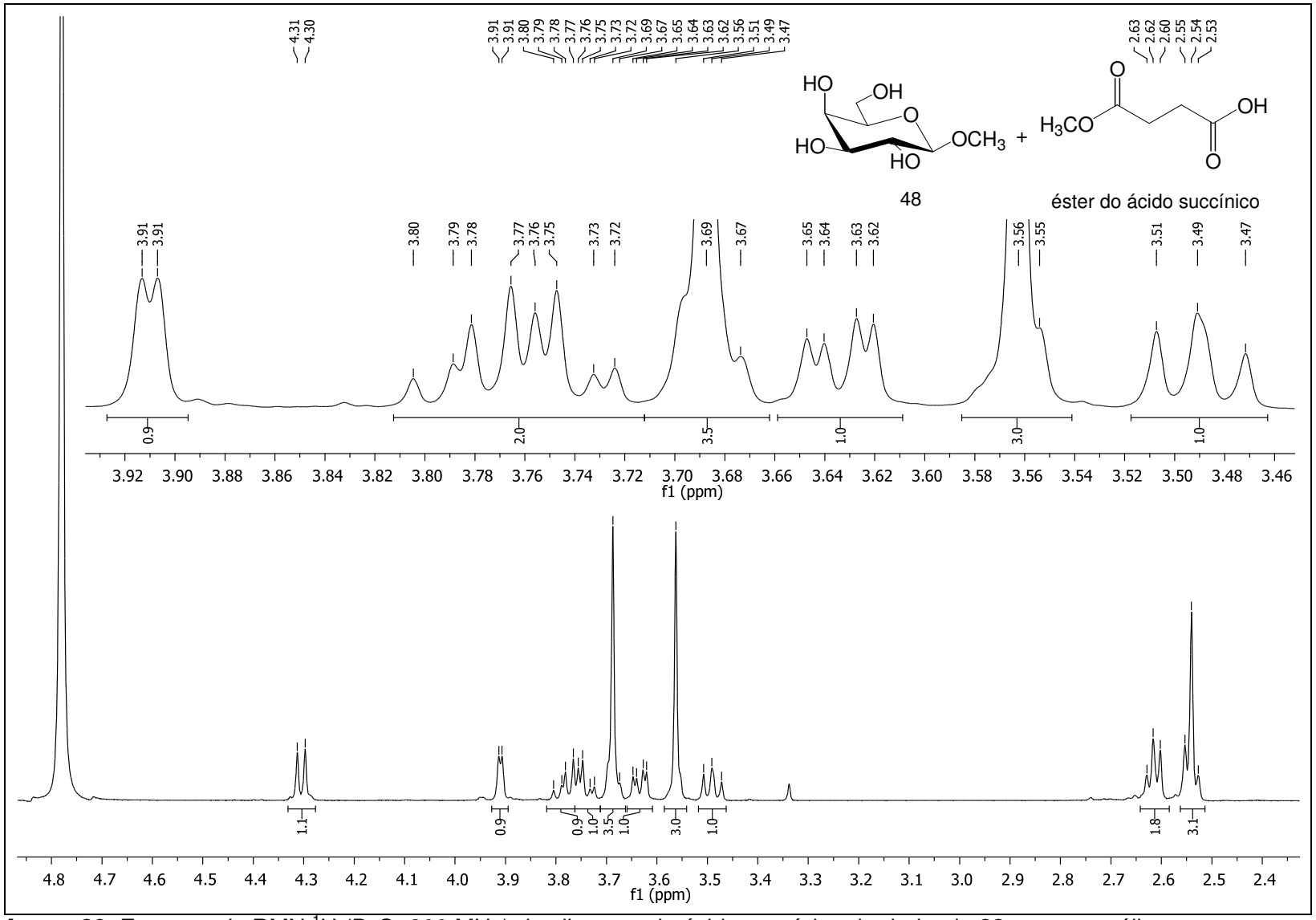
Anexo 19. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **80** por metanólise.



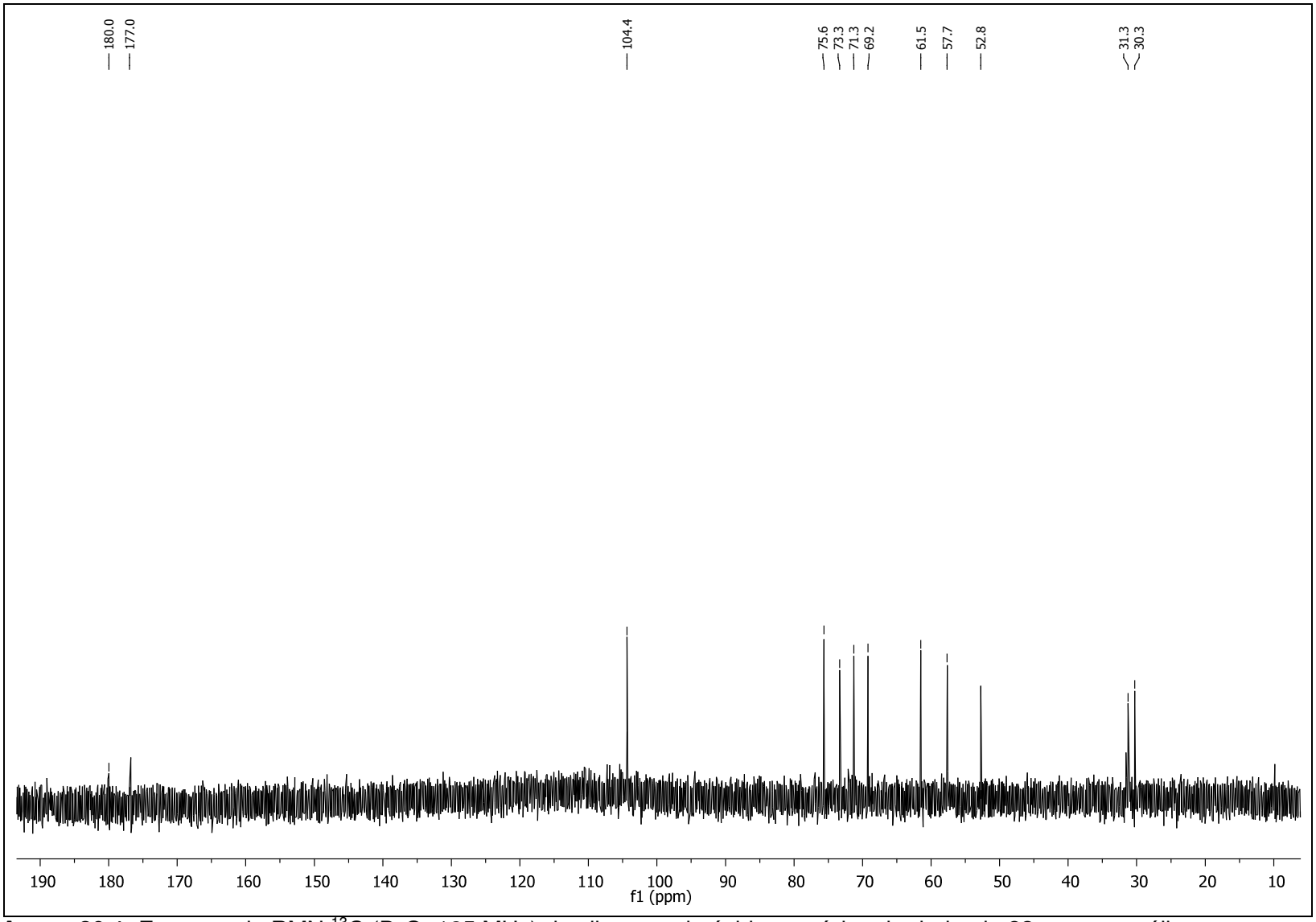
Anexo 19.1. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 125 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **80** por metanólise.



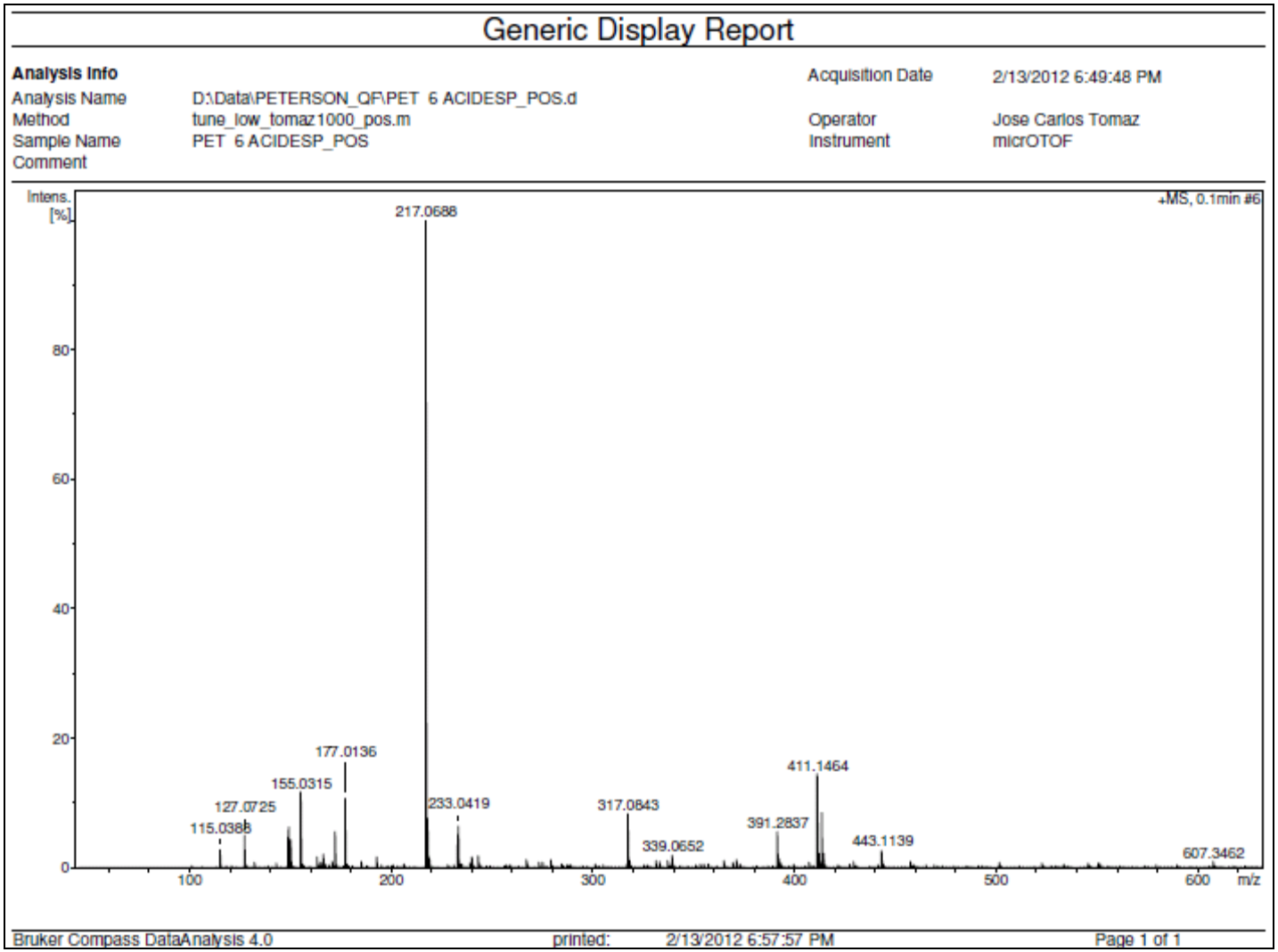
Anexo 19.2. Espectro de massas da clivagem do ácido succínico do derivado **80** por metanólise. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 317,0843 e encontrado: 217,0694.



Anexo 20. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **83** por metanólise.



Anexo 20.1. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 125 MHz) da clivagem do ácido succínico do derivado **83** por metanólise.



Anexo 20.2. Espectro de massas da clivagem do ácido succínico do derivado **83** por metanólise. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 317,0843 e encontrado: 217,0688.

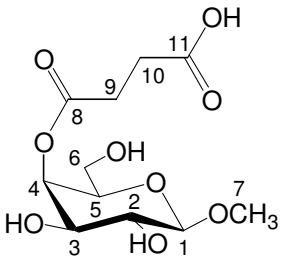
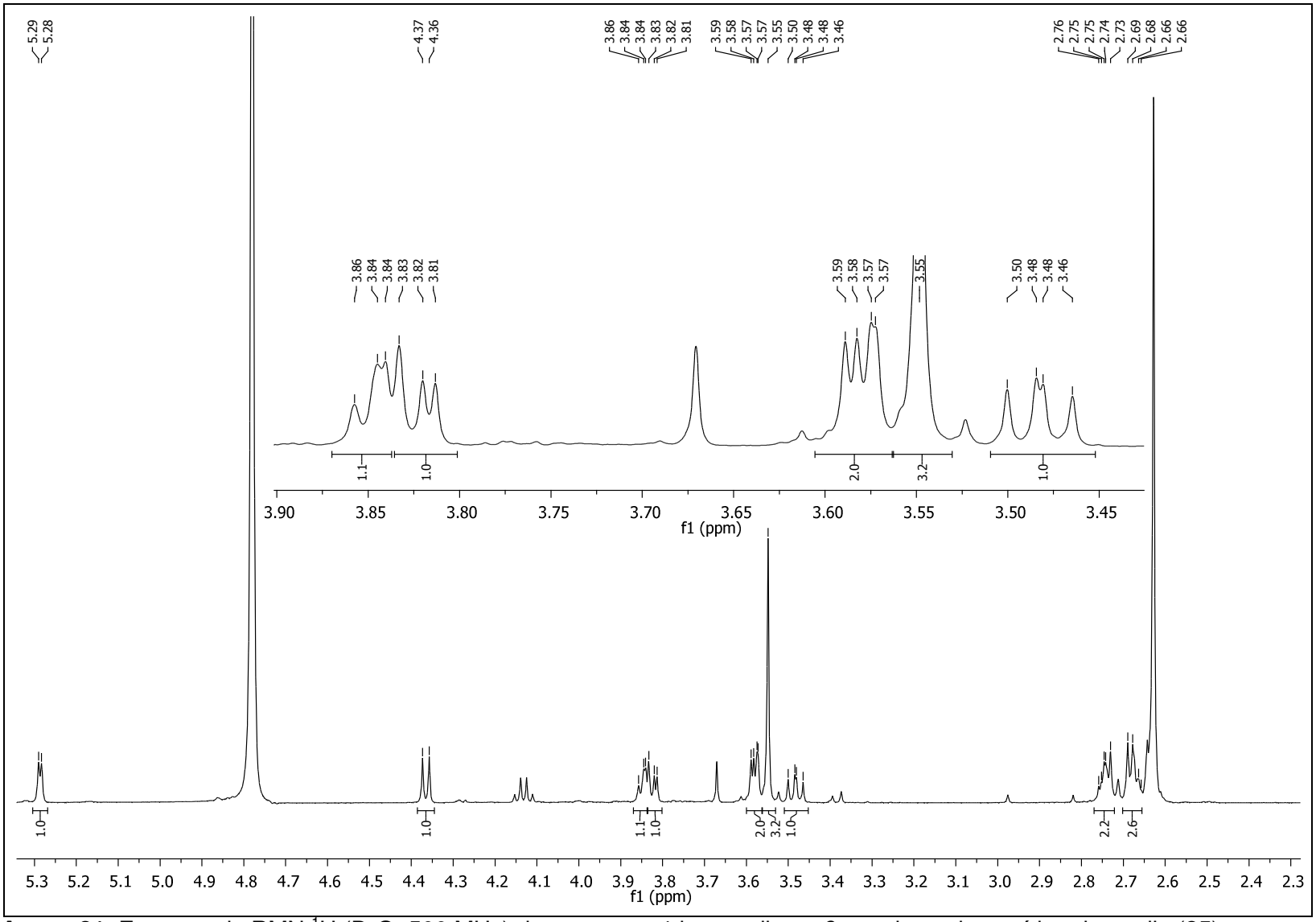
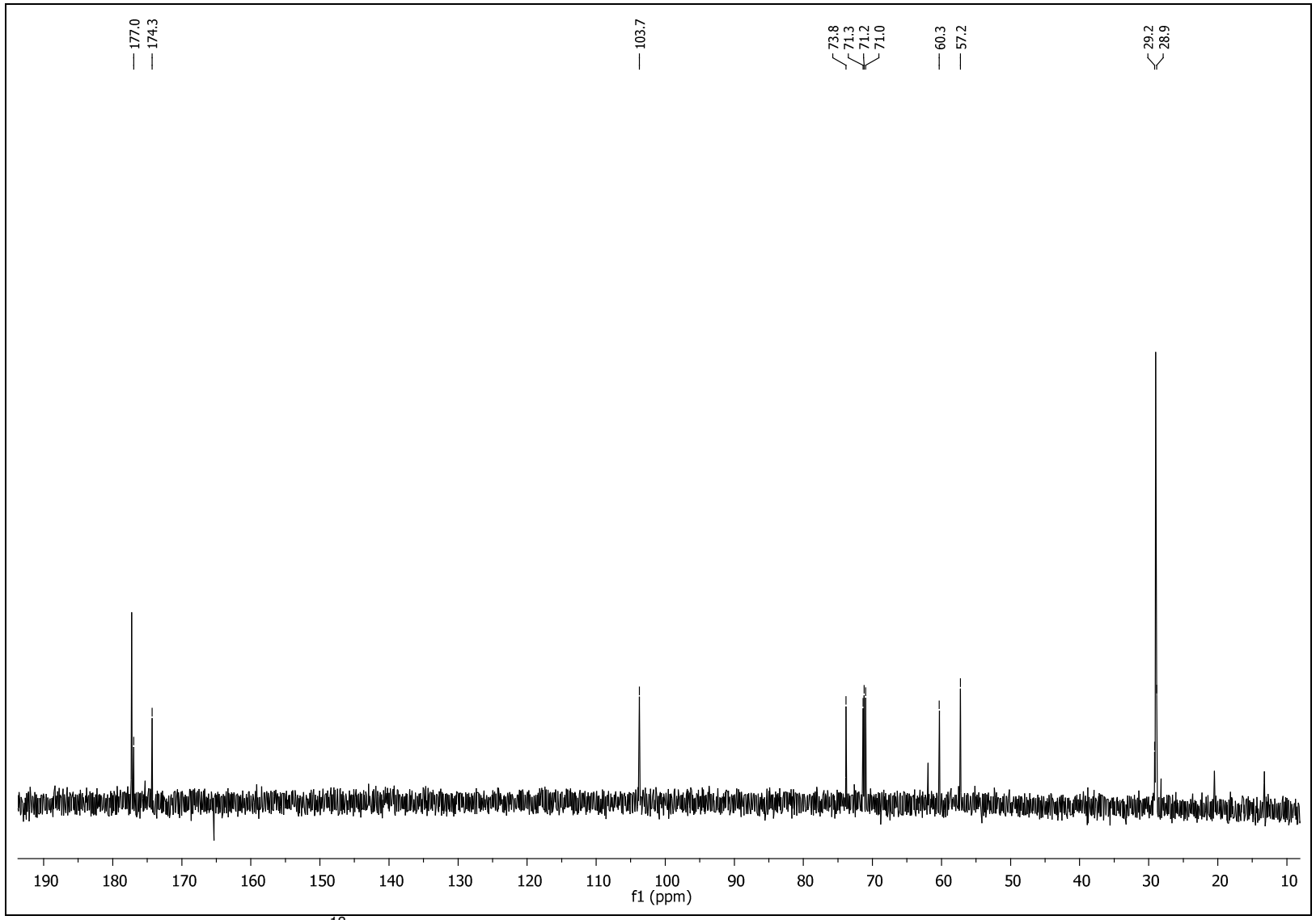


Tabela 20 - Dados espectroscópicos do composto **85**.

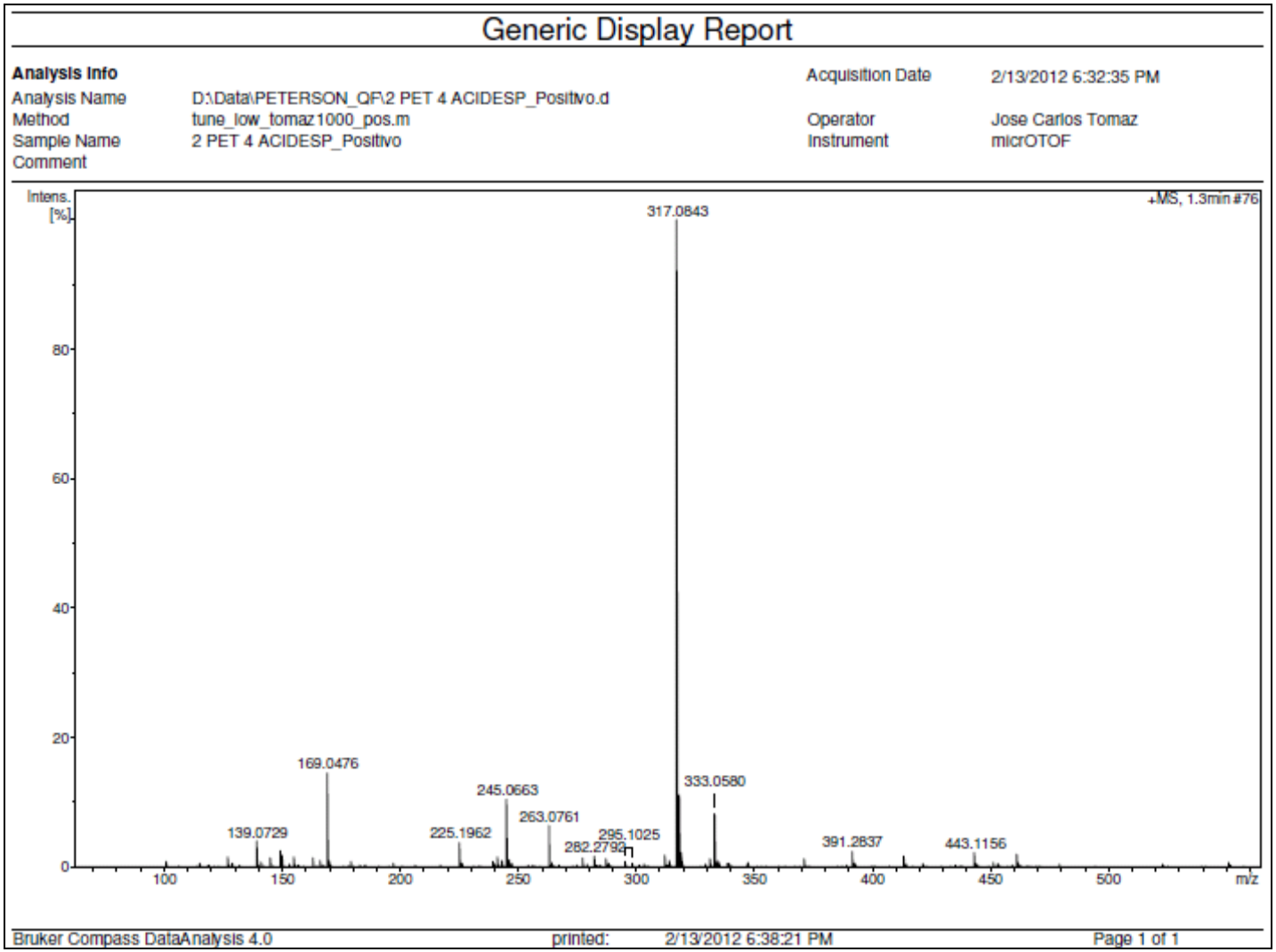
Número	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	103,7	4,37	1	d	$J_{1,2}$ = 7,8
2	70,3	3,48	1	dd	$J_{1,2}$ = 8,0; $J_{2,3}$ = 9,8
3	70,9	3,83	1	dd	$J_{2,3}$ = 9,8; $J_{3,4}$ = 3,4
4	70,5	5,29	1	d	$J_{3,4}$ = 3,4
5	73,5	3,87-3,84	1	m	-
6a 6b	60,3	3,60-3,57	2	m	-
7	57,1	3,55	3	s	-
8	174,0	-	-	-	-
9	28,9	2,70-2,65	2	m	-
10	29,2	2,77-2,72	2	m	-
11	177,0	-	-	-	-



Anexo 21. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) do composto 4-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**85**).



Anexo 21.1. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75 MHz) do composto 4-butanodioato-β-D-galactopiranosídeo de metila (**85**).



Anexo 21.2. Espectro de massas do composto **85**. ESI-MS calculado para $C_{17}H_{24}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 317,0843 e encontrado: 317,0843.