



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

**Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo  
análogo de antígeno tumoral, com possíveis  
aplicações terapêuticas em câncer**

**Marcelo Fiori Marchiori**

**Ribeirão Preto**

**2018**

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

Marcelo Fiori Marchiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer

Ribeirão Preto

2018

MARCELO FIORI MARCHIORI

**Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivone Carvalho

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Vanessa Leiria Campo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 16/08/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

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.

Marchiori, Marcelo Fiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer. Ribeirão Preto, 2018.

154 p. : il.; 30 cm

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

Coorientadora: Dra. Vanessa Leiria Campo.

1. Câncer; 2. Antígenos tumorais; 3. Mucina tumoral; 4. Análogo de STn, 5. Síntese de carboidratos; 6. *Click chemistry*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Fiori Marchiori

Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

### BANCA EXAMINADORA

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais, Odair e Vergínia,  
pelo amor incondicional, amparo e incentivo constantes, além de serem exemplos de  
integridade e dedicação;*

*À minha irmã, Gianna,  
pelo carinho, apoio e momentos de descontração;*

*Aos meus avós, Gian e Alcindo,  
por todos os ensinamentos passados ao longo da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Dr.<sup>a</sup> Vanessa L. Campo, coorientadora desse trabalho, pelos anos de orientação que embasou minha formação científica, pela fundamental contribuição nesse estudo, pelas discussões acadêmicas, idéias e amizade decorrente desse convívio.*

*À professora Dr.<sup>a</sup> Ivone Carvalho, orientadora desse trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança, paciência, constante incentivo e respeito.*

*Aos queridos companheiros do grupo de pesquisa em Química Farmacêutica da FCFRP: Ana Hartmann, Analu, Maris, Michelle, Paulo, Peterson, Susi e Talita, pelos momentos de alegria e frustração compartilhados e também pela prontidão em ajudar uns aos outros.*

*Aos queridos amigos do 1º andar do bloco M da FCFRP: Fukuda, Barbie, Carla, Fer, Gabi, Margot, Maraina 1, Maraina 2, Paixã, Primona e Ritouner, que contribuíram com amizade, café e momentos de diversão, minha eterna gratidão.*

*Aos meus amigos: Combs, Er, Lu, Pepê, Neném, Saritcha, Naty, André e Rébs, pelo apoio nos dias difíceis, pelos inesquecíveis anos de amizade, por não permitirem que o tempo e a distância afetassem nossa relação, e pela torcida sempre sincera.*

*Aos técnicos dos laboratórios da FCFRP e FFCLRP, José Luís Capelari, Marcelo Carvalho, Luís Otávio, Vinicius Palaretti, Claudia Macedo, José Carlos Tomaz, pela ajuda e gentileza.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro (Processo: 2016/04699-7).*

## **EPÍGRAFE**

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

(Robert Collier)



## RESUMO

MARCHIORI, M. F. **Síntese de glicopeptídeo de mucina, contendo análogo de antígeno tumoral, com possíveis aplicações terapêuticas em câncer.** 154f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, que tem como característica fundamental a ligação entre o açúcar  $\alpha$ GalNAc e resíduos de aminoácidos de Ser/Thr ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). Em tumores, a biossíntese de mucinas encontra-se desregulada, com conseqüente alteração nos padrões de *O*-glicosilação de suas glicoproteínas. Como resultado, formam-se glicanas anormais e incompletas, as quais são continuamente expressas nas células tumorais e geralmente ausentes nos tecidos saudáveis, sendo assim denominadas de Antígenos de Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”), tais como os antígenos Tn ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr), sialil-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2,6- $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) e TF ( $\beta$ Gal1-3 $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). Dentre as mucinas tumorais, a MUC1 é a mais investigada, sendo constituída por regiões repetidas em *tandem* da sequência HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA, com cinco sítios potenciais para *O*-glicosilação (*O*- $\alpha$ GalNAc). Uma vez constatada a importância dos “TACAs”, estes começaram a ser utilizados em ensaios clínicos como vacinas terapêuticas, mas com limitado sucesso devido à sua baixa imunogenicidade. Sendo assim, glicopeptídeos sintéticos que mimetizem a sequência peptídica imunogênica do tipo MUC1 (PDTRP) e que contenham análogos de TACAs apresentam elevado potencial de aplicação no desenvolvimento de novas vacinas antitumorais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a síntese do glicopeptídeo Pro-Asp-[Neu5Ac $\alpha$ / $\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-Thr]-Arg-Pro-GlyOH **19B  $\alpha/\beta$** , mimetizando mucina do tipo MUC1 de tumores e contendo análogo do antígeno STn. Para preparação do glicopeptídeo **19B  $\alpha/\beta$**  foi necessária a síntese prévia do glicoaminoácido triazólico Neu5Ac- $\alpha/\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-ThrOH **20B  $\alpha/\beta$**  por reações sequenciais de CuAAC (*click chemistry*) entre os blocos **68 e 24  $\alpha/\beta$**  e hidrogenólise. O precursor azido N<sub>3</sub>-6- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** foi obtido por duas rotas sintéticas assim como o intermediário alcino Neu5Ac $\alpha/\beta$ -2,3-prop-2-inil **24  $\alpha/\beta$** , porém, este último não sendo obtido como anômero puro. O emprego de **20B  $\alpha/\beta$**  em reações de acoplamento com aminoácidos (*SPPS*) forneceu o glicopeptídeo **19B  $\alpha/\beta$**  após purificação por CLAE. Também foi realizada a síntese e purificação do glicopeptídeo modelo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21**, contendo o antígeno natural Tn. Futuras etapas de conjugação de **19B  $\alpha/\beta$**  e **21** à proteína carreadora BSA e ensaios de imunização em camundongos (BALB/c) serão realizadas para avaliação da capacidade de indução de resposta imunológica destes glicopeptídeos.

**Palavras-chave:** 1. Câncer; 2. Antígenos tumorais; 3. Mucina tumoral; 4. Análogo de STn, 5. Síntese de carboidratos; 6. *Click chemistry*.

## ABSTRACT

MARCHIORI, M. F. **Synthesis of mucin glycopeptide, containing tumor antigen analog, with possible therapeutic applications in cancer.** 154p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Mucins are high molecular weight glycoproteins that keep as fundamental characteristic the linkage between  $\alpha$ GalNAc sugar and amino acid residues of Ser/Thr ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr). In tumors, mucin production is dysregulated once their biosynthetic mechanisms are impaired with consequent alteration in the *O*-glycosylation patterns. As a result, abnormal and incomplete glycans are formed, which are continuously expressed in tumor cells and generally absent in healthy tissues. The continual exposure of these glycans gives them the name of Tumor Associated Carbohydrates Antigens ("TACAs"), such as Tn ( $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr), sialyl-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2,6- $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) and TF ( $\beta$ Gal1-3 $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr) antigens. Among tumor mucins, MUC1 is the most extensively investigated and is composed by tandem repeat regions HGVTSA $\beta$ DRPAPGSTAPPA sequence with five potential sites for *O*-glycosylation (*O*- $\alpha$ GalNAc). In view of the importance of "TACAS" as tumor markers of clinical significance, they started to be used in clinical trials as therapeutic vaccines, but with limited success due to their low immunogenicity. Thus, considering their constant presence in tumor mucins such as MUC1, synthetic glycopeptides that not only mimic the peptide sequence of the MUC1 type (PDTRP), but also possess TACAS analogs linked to their peptide chain have high potential for application in the development of anti-tumor vaccines. Thus, the aim of this study was the synthesis of glycopeptide Neu5Ac $\alpha$ 2-triazole-6- $\alpha$ GalNAc-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-GlyOH **19B**  $\alpha/\beta$ , mimicking mucin MUC1 type tumors and owing STn analogue. In order to obtain glycopeptide **19B**  $\alpha/\beta$  it was firstly necessary to synthesize the triazole glycoamino acid Neu5Ac- $\alpha/\beta$ 2-triazol-6- $\beta$ GalNAc-ThrOH **20B**  $\alpha/\beta$  by sequential reactions of CuAAC ('*click chemistry*') between the building blocks **68** and **24**  $\alpha/\beta$  and hydrogenolysis. The azide precursor N<sub>3</sub>-6- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** was obtained by two different synthetic routes, as well as the intermediate alkyne. The use of **20B**  $\alpha/\beta$  in coupling reactions with amino acid (SPPS) provided the glycopeptide **19B**  $\alpha/\beta$  after HPLC purification. The synthesis and purifications of the glycopeptide model NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21**, which owns the natural Tn antigen was also performed. Future steps of conjugation of **19B**  $\alpha/\beta$  e **21** to carrier protein BSA and immunization assays with mice (BALB/c) will be made to evaluate the ability of these glycopeptides to induce immune response.

**Keywords:** 1. Cancer; 2. Tumor antigens; 3. Tumoral mucin; 4. STn analogue; 5. Carbohydrate synthesis; 6. Click chemistry.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Primeiras capacidades biológicas adquiridas pelas células tumorais durante seu desenvolvimento (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000).....1
- Figura 2.** Quadro atualizado das quatro novas capacidades biológicas adquiridas pelas células que facilitam sua malignização (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).....2
- Figura 3.** Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos (SEEBERGER & WERZ, 2007).....4
- Figura 4.** Representação esquemática de mucina MUC1 sendo descrita a seqüência em *tandem* dos 20 aminoácidos e o epítipo imunodominante PDTRPAP destacado em azul (Adaptado de MARTINEZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017).....5
- Figura 5.** Representação dos principais Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”).....6
- Figura 6.** Representação comparativa da resposta imune quando utilizando: **A)** TACAs isolados: desencadeamento de uma resposta células T-independente, ativando somente linfócitos B, com produção de anticorpos do tipo IgM. **B)** TACAs conjugados: desencadeamento de uma resposta imune células T-dependente, com produção de anticorpos do tipo IgG (Adaptado de WILSON & DANISHEFSKY, 2013).....8
- Figura 7.** Representação estrutural de vacinas sintéticas. **A)** Cluster com três antígenos Tn ligados a proteína KLH por um linker. **B)** Theratope®, visando uma abordagem imunoterápica anti-STn .....9
- Figura 8.** Representação geral de estruturas de análogos de Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”) já descritos na literatura, focando em análogos do antígeno STn.....10
- Figura 9.** Representação geral de glicopeptídeos que exploraram a utilização do grupo triazol como parte de um linker entre os TACAs e a cadeia peptídica.....11
- Figura 10.** Estruturas químicas de glicose e seus epímeros, evidenciando as diferenças de configuração de algumas ligações e reatividade de suas hidroxilas.....12
- Figura 11.** Representação dos constituintes do efeito anomérico. **A)** Influência dos dipolos presentes na estrutura para determinar a orientação do substituinte na posição anomérica. **B)** Representação da deslocalização de um par de elétrons isolado do oxigênio endocíclico para o orbital sigma antiligante ( $\sigma^*$ ) da ligação C<sub>1</sub>-O<sub>exo</sub>, favorecida no confômero axial.....15
- Figura 12.** Similaridade estrutural entre uma ligação amida e o anel 1,2,3-triazol.....19

- Figura 13.** Estrutura química dos glicopeptídeos contendo análogos triazólicos do antígeno STn **19A** ou **19B**. As posições do grupo *O*-metileno ligado ao anel triazólico foram destacadas para evidenciar a diferença estrutural entre **19A** e **19B**.....20
- Figura 14.** **A)** Estrutura química dos glicoaminoácidos triazólicos Neu5Ac- $\alpha$ 2-triazol-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOH **20A** / **20B**. **B)** Estrutura química do glicopeptídeo modelo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc-Thr]-Arg-Pro-GlyOH **21** contendo antígeno natural Tn.....21
- Figura 15.** Análise de infra-vermelho (IV) do composto **44** indicando a presença do grupo N<sub>3</sub> pela banda em 2100 cm<sup>-1</sup> .....53
- Figura 16.** Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de **64** e **65**, evidenciando a diferença de deslocamento dos H-3 em vermelho.....60
- Figura 17.** Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) do material de partida **63 $\beta$**  e da oxazolina formada, evidenciando a diferença na constante de acoplamento de H-1 entre os compostos.....63
- Figura 18.** Expansão do espectro de <sup>1</sup>H RMN da mistura de **24  $\alpha/\beta$**  evidenciando as diferenças no deslocamento químico dos hidrogênios referentes aos H-3<sub>eq</sub> e do grupo propinil entre os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ .....72
- Figura 19.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do produto isolado **77  $\alpha/\beta$**  após reação de CuAAC evidenciando sinais característicos: H-triazólico (roxo), da unidade ácido siálico (azul) e  $\beta$ GalNAcThr (vermelho), bem como os sinais duplicados OMe, H-3<sub>eq</sub> e CH<sub>3</sub>-Thr.....74
- Figura 20.** **A)** Cromatograma obtido da purificação da mistura **77  $\alpha/\beta$**  por CLAE. **B e C)** Espectros de RMN <sup>1</sup>H dos produtos **77 $\alpha$**  e **77 $\beta$** , respectivamente, evidenciando o desaparecimento dos sinais duplicados.....75

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 ( <b>A</b> ) e 4,6 ( <b>B</b> ) de D-galactose através da formação de acetais.....	13
<b>Esquema 2.</b> Representação de formação da ligação <i>O</i> -glicosídica.....	14
<b>Esquema 3.</b> Representação do efeito da <i>assistência anquimérica</i> na formação da ligação <i>O</i> -glicosídica. Cada quadro pontilhado representa o anômero formado em maior proporção na reação de glicosilação.....	16
<b>Esquema 4.</b> Representação esquemática da reação de “CuAAC” resultando em um composto 1,4-triazólico.....	17
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo proposto para a reação de CuAAC (Adaptado de BOCK, HIEMSTRA & VAN MAARSEVEEN, 2006).....	18
<b>Esquema 6.</b> <b>A)</b> Retrossíntese proposta para obtenção de <b>20A</b> empregando-se os derivados Neu5Ac $\alpha$ 2-N <sub>3</sub> <b>22</b> e 3-prop-2-inil-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn <b>23</b> . <b>B)</b> Retrossíntese proposta para a obtenção de <b>20B</b> empregando-se os derivados Neu5Ac $\alpha$ 2-3-prop-2-inil <b>24</b> e N <sub>3</sub> -6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn <b>25</b> .....	47
<b>Esquema 7.</b> <b>A)</b> Rota utilizada para funcionalização da posição C-6 da galactose com alcino terminal <b>26</b> . <b>B)</b> Síntese freqüentemente utilizada para obtenção do glicoaminoácido <b>27</b> a partir da galactose.....	48
<b>Esquema 8.</b> Retrossíntese de <b>23</b> utilizando galactose como material de partida evidenciando, a funcionalização de C-6 previamente a etapa de glicosilação.....	48
<b>Esquema 9.</b> Primeira rota sintética proposta para obtenção do bloco <b>23</b> a partir da galactose.....	49
<b>Esquema 10.</b> Proposta de síntese do doador <b>41</b> , análogo de <b>36</b> , a partir do galactal peracetilado <b>39</b> .....	50
<b>Esquema 11.</b> Tentativa de síntese do doador <b>41</b> partindo de $\alpha$ GalN <sub>3</sub> Cl <b>28</b> .....	50
<b>Esquema 12.</b> Síntese proposta para obtenção de <b>49</b> a partir do cloridrato de galactosamina.....	51
<b>Esquema 13.</b> <b>A)</b> Formação 'in situ' do reagente TfN <sub>3</sub> . <b>B)</b> Mecanismo proposto para a reação de diazotransferência na obtenção do composto <b>43</b> .....	52
<b>Esquema 14.</b> Etapa de adaptação da rota proposta na tentativa de obtenção de <b>47</b> a partir de <b>50</b> .....	54
<b>Esquema 15.</b> Síntese do glicoaminoácido $\alpha$ GalN <sub>3</sub> -FmocThrOBn <b>27</b> a partir do derivado <b>45</b> , provando a eficácia do sistema catalítico NIS/TMSOTf na reação de glicosilação.....	54

- Esquema 16.** A) Formação do intermediário NIS-OTf. B) Mecanismo proposto para obtenção do glicoaminoácido  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** a partir do derivado **45**.....55
- Esquema 17.** Rota sintética proposta para síntese dos glicoaminoácidos tosilados **55** e **56** via intermediários comuns **51** e **27**. Obtenção do antígeno Tn **52** via composto **27**.....56
- Esquema 18.** Rota sintética proposta para obtenção de **23** e/ou **25** via intermediário **56** seletivamente tosilado em C-6.....58
- Esquema 19.** Rota sintética adaptada para obtenção do azido-glicoaminoácido **68**. A) Mesmas etapas aplicadas anteriormente para obtenção de **58**. B) Novas etapas propostas na síntese de **68**.....62
- Esquema 20.** Tentativa de obtenção do glicoaminoácido **68** a partir do doador com STol em C-1 **63 $\beta$**  utilizando sistema catalítico NIS/TMSOTf, porém, obtendo-se apenas a oxazolidina.....64
- Esquema 21.** Reações de glicosilação empregando o promotor SnCl<sub>4</sub>. A) Síntese de tio-açúcar modelo 2-N<sub>3</sub>Gal(OAc)<sub>3</sub>STol **45** para validação da metodologia com SnCl<sub>4</sub>. B) Obtenção do  $\beta$  azido-glicoaminoácido **68** a partir do doador com OAc em C-1 **68**.....65
- Esquema 22.** Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **68** a partir de **66** utilizando SnCl<sub>4</sub> como promotor.....65
- Esquema 23.** Otimização da rota sintética para obtenção do doador com OAc em C-1 **66** e o bloco de construção desejado 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAcThr **68**.....67
- Esquema 24.** Rota sintética proposta para obtenção dos blocos **22** e **24** a partir do cloreto de ácido siálico **76**.....68
- Esquema 25.** Rota sintética utilizada na obtenção do bloco **24**  $\alpha/\beta$  a partir do ácido siálico esterificado e peracetilado **75**.....69
- Esquema 26.** Mecanismo proposto para obtenção do derivado de ácido siálico com grupo alcino **24**  $\alpha/\beta$  a partir do composto **75** e utilizando-se o promotor BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O.....70
- Esquema 27.** Síntese da mistura  $\alpha/\beta$  de 2-propinil-ácido siálico **24**  $\alpha/\beta$  utilizando AgOTf como catalisador e o cloreto **76** como precursor.....71
- Esquema 28.** Reação de ciclo-adição-1,3-dipolar catalisada por Cu(I) realizada para obtenção do derivado triazólico-1,4-dissubstituído **77**  $\alpha/\beta$ .....73

- Esquema 29.** Etapas de purificação por CLAE do composto em mistura **77  $\alpha/\beta$** , resultando nos anômeros puros **77 $\alpha$**  e **77 $\beta$**  e remoção do grupo metileno do éster benzílico de **77  $\alpha/\beta$**  por reação de hidrogenólise, fornecendo o derivado desprotegido **20B  $\alpha/\beta$** .....76
- Esquema 30.** Representação do ciclo de alongamento da cadeia peptídica evidenciando as etapas-chave e os reagentes utilizados.....78
- Esquema 31.** Síntese em fase sólida dos glicopeptídeos **19B  $\alpha/\beta$**  e **21**, miméticos de MUC1contendo análogo do antígeno STn e o antígeno natural Tn, respectivamente.....79
- Esquema 32.** Mecanismo proposto para formação da ligação peptídica utilizando os reagentes de acoplamento DIPEA, PyBOP e HOBt.....80

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

Ac<sub>2</sub>O: anidrido acético  
AcOEt: acetato de etila  
AgOTf: triflato de prata  
Arg: arginina  
arom: aromático  
Bn: benzil  
BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O: eterato de trifluoreto de boro  
BSA: albumina sérica bovina  
CAN: nitrato cérico de amônio  
CCC: cromatografia em coluna clássica  
CCD: cromatografia em coluna delgada  
CCP: cromatografia em camada preparativa  
CDCl<sub>3</sub>: clorofórmio deuterado  
CD<sub>3</sub>OD: metanol deuterado  
DCE: 1,2-dicloroetano  
DCM: diclorometano  
DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina  
DMF: *N,N*-dimetilformamida  
D<sub>2</sub>O: água deuterada  
2,2 DMP: 2,2 dimetoxipropano  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
ESI: ionização por *electrospray*  
Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonil  
Gal: galactose  
GalNAc: *N*-acetil-galactosamina  
Hex: hexano  
HOBt: hidroxibenzotriazol  
HRMS: espectrometria de massas de alta resolução  
MeCN: acetonitrila  
MHC: complexo de histocompatibilidade principal  
MHz: mega-Hertz  
MO: micro-ondas



Pro: prolina

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfônio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

$\delta$ : deslocamento químico

ap.: aparente

d: duplete

dd: duplo duplete

ddd: duplo duplo duplete

dt: duplo tripleto

J: constante de acoplamento

m: multiplete

s: simpleto

t: tripleto

Ser: serina

TACA: antígeno de carboidrato associado a tumor

TFA: ácido trifluoroacético

Tf<sub>2</sub>O: anidrido trifílico

THF: tetrahidrofurano

Thr: treonina

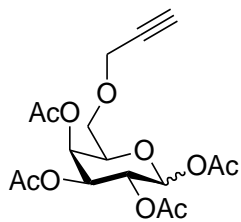
TMS: trimetilsilila

Tol: tolueno

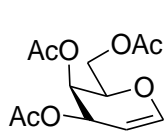
TsCl: Cloreto de toсила

*p*-TSOH: ácido *p*-toluenossulfônico

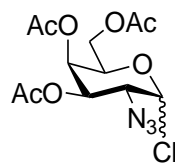
LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS



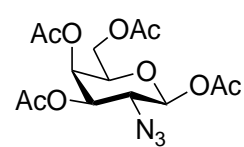
26



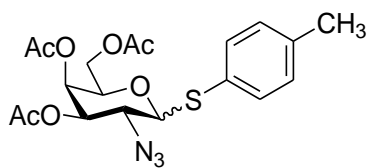
39



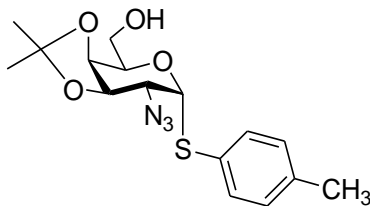
28



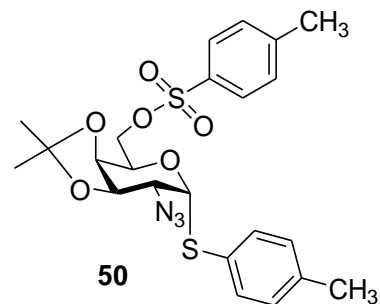
44



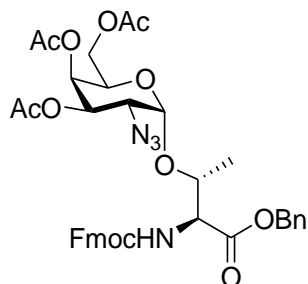
45



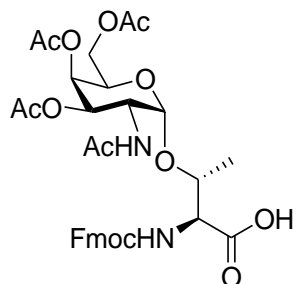
46



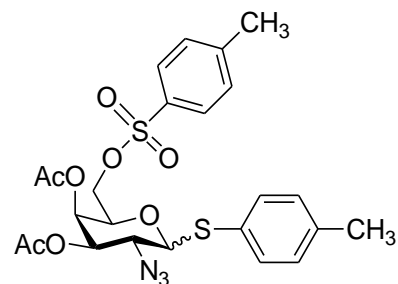
50



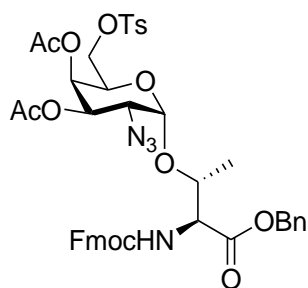
27



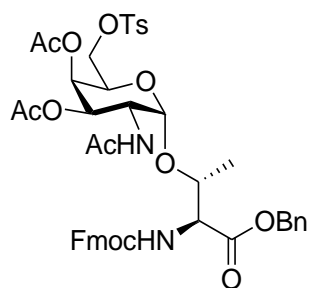
52



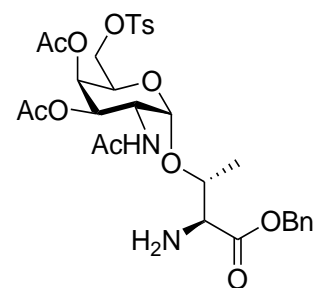
58



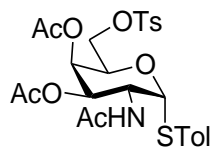
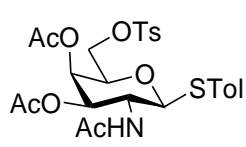
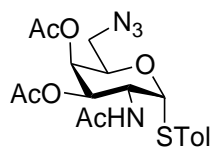
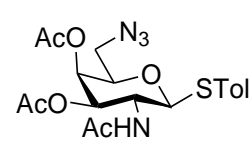
59



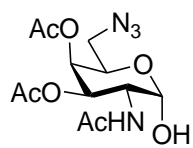
56



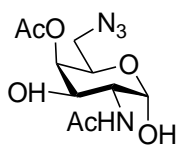
60

62  $\alpha$ 62  $\beta$ 63  $\alpha$ 63  $\beta$

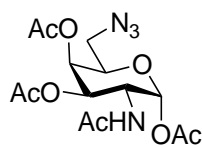
## LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS



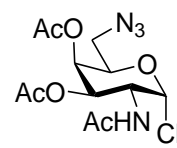
64



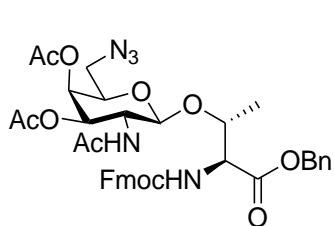
65



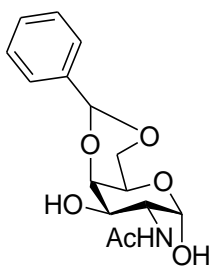
66



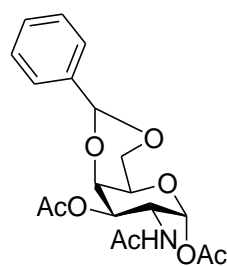
67



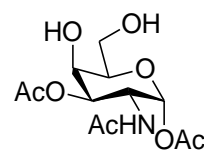
68



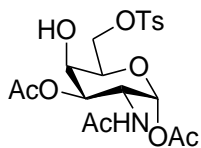
69



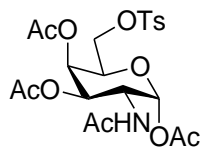
70



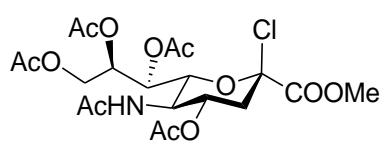
71



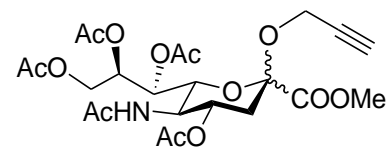
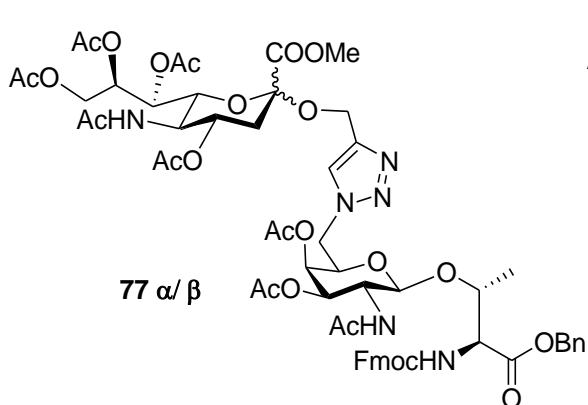
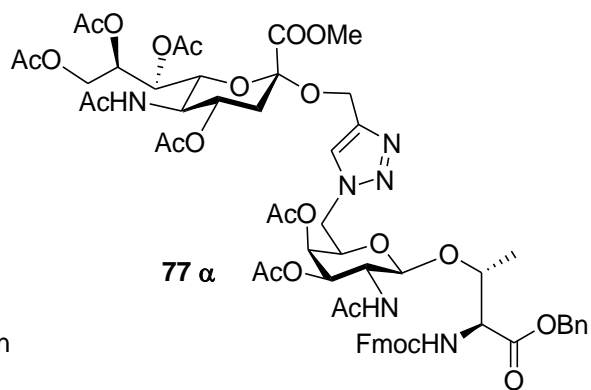
72



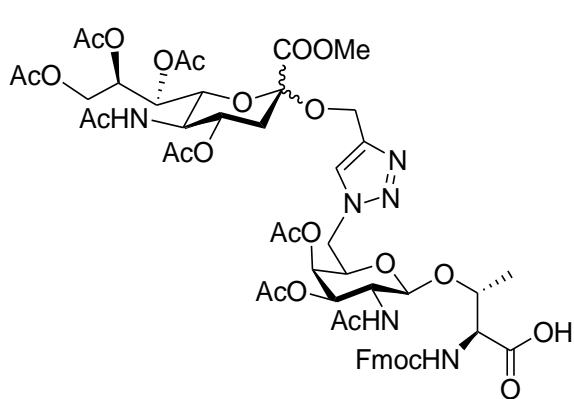
73



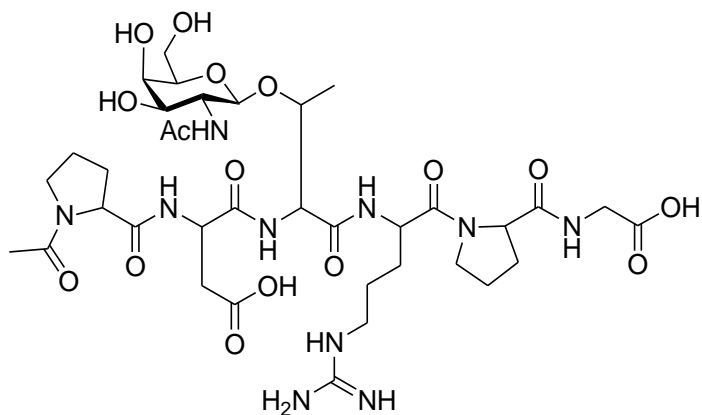
76

24  $\alpha/\beta$ 77  $\alpha/\beta$ 77  $\alpha$

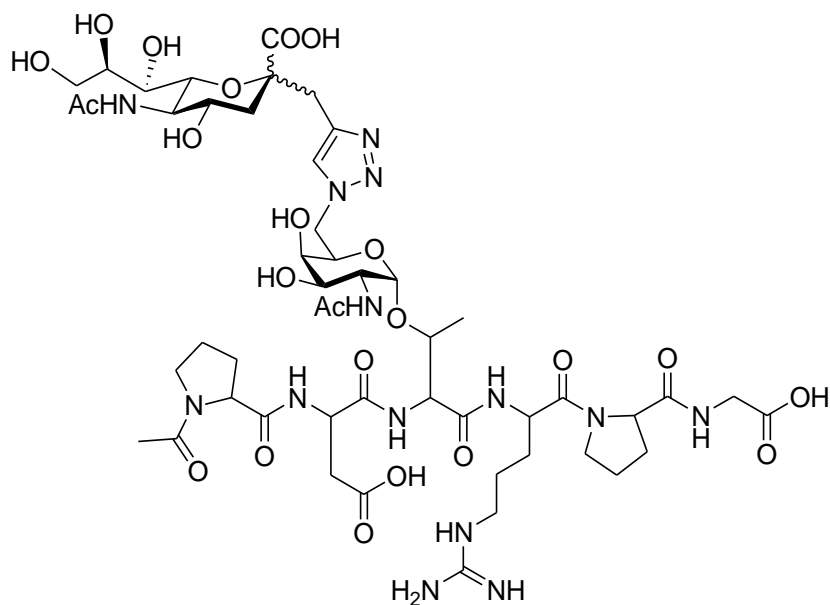
## LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS



**20 B  $\alpha/\beta$**

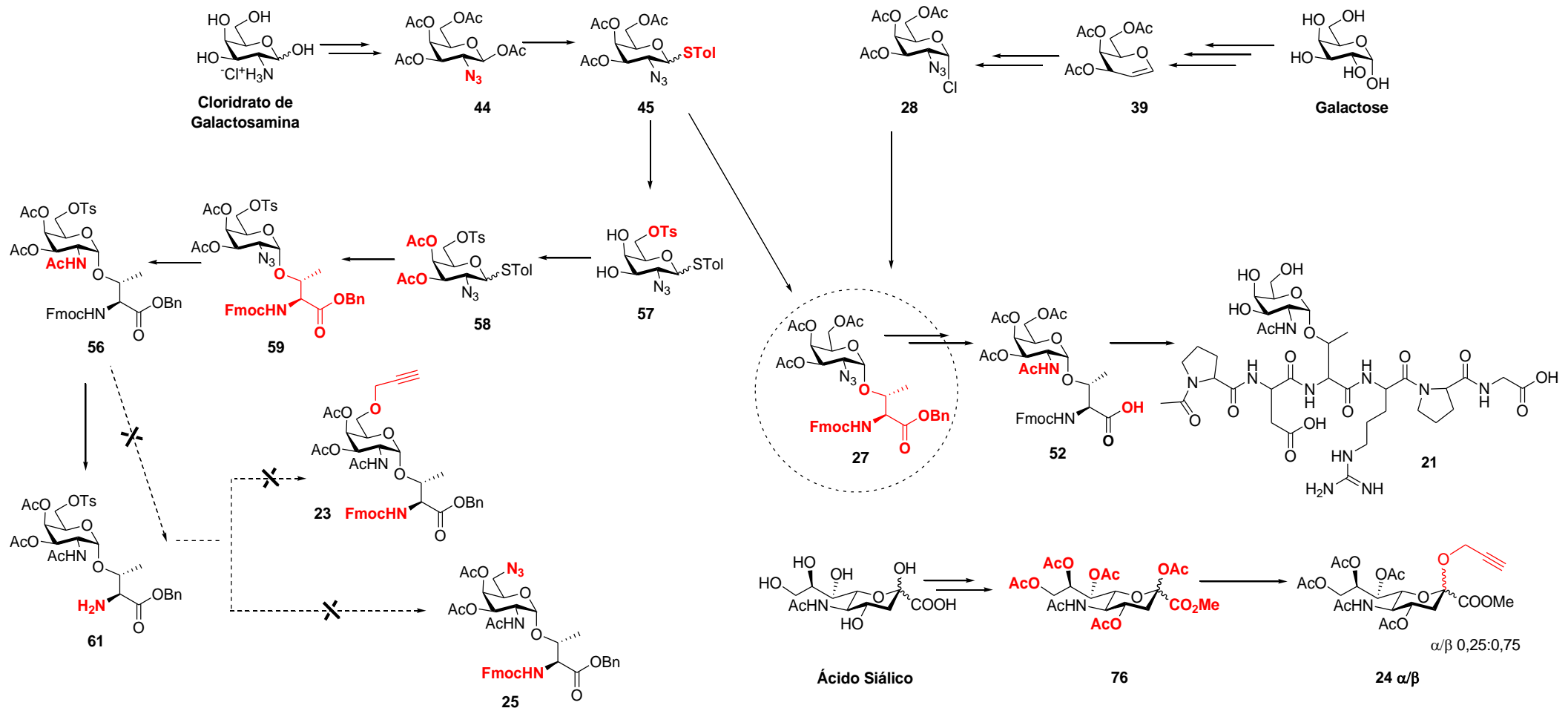


**21**

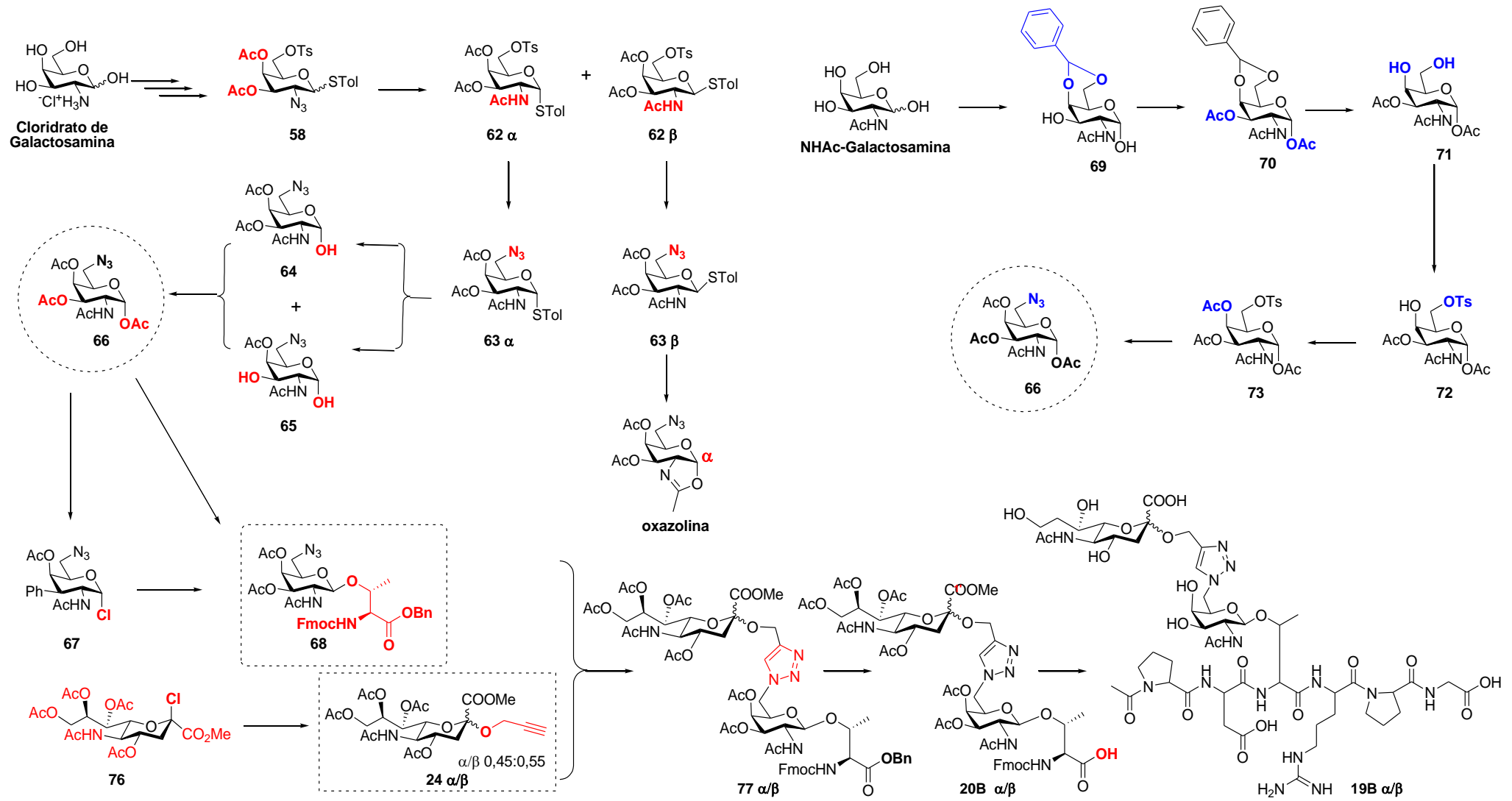


**19 B  $\alpha/\beta$**

# RESUMO DAS ROTAS SINTÉTICAS PARA OBTENÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DESCRITOS



# RESUMO DAS ROTAS SINTÉTICAS PARA OBTENÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DESCRITOS



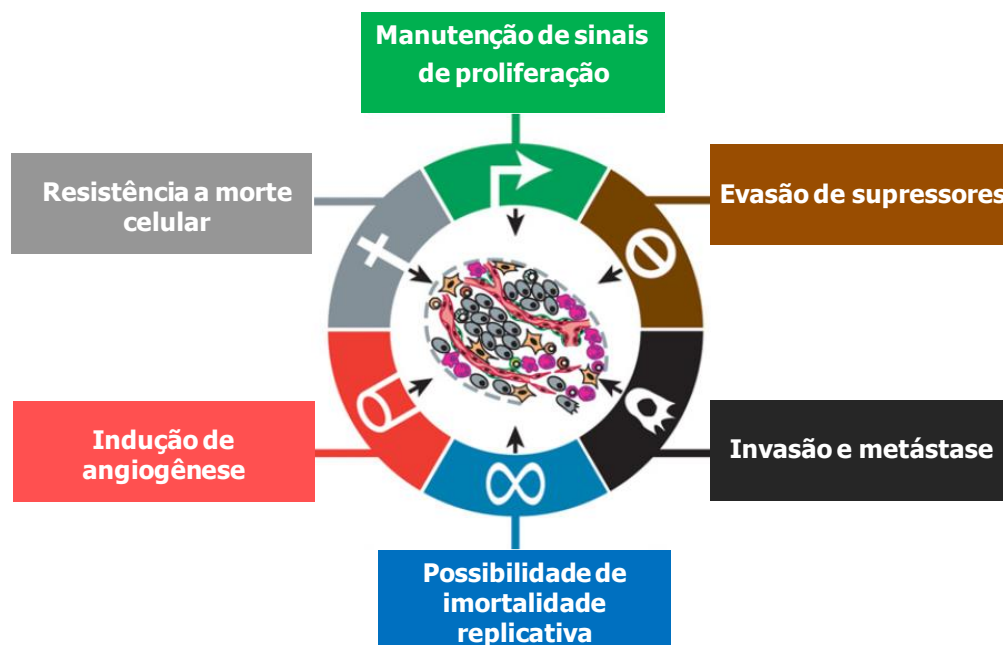
## SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ESQUEMAS.	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER: UM PROBLEMA DE SAÚDE MUNDIAL	1
1.2 IMPORTÂNCIAS BIOLÓGICA E TERAPÊUTICA DE CARBOIDRATOS E GLICOCONJUGADOS	3
1.2.1 GLICOPROTEÍNAS DE MUCINAS	4
1.2.1.1 MUCINAS TUMORAIS	5
1.2.2 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTITUMORAIS SINTÉTICAS A PARTIR DE ANÁLOGOS DE TACAS	6
1.3. ASPECTOS GERAIS DA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS	12
1.3.1 ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÕES SELETIVAS EM CARBOIDRATOS	12
1.3.2 A ESTEREOSELETIVIDADE NA SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS	13
1.3.2.1 O EFEITO ANOMÉRICO	14
1.3.2.2 A ASSISTÊNCIA ANQUIMÉRICA	16
1.4. A ESTRATÉGIA DE “CLICK CHEMISTRY”	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIAIS	22
3.2 MÉTODOS SINTÉTICOS	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
4.1 SÍNTESE	47
4.1.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA DOS GLICOAMINOÁCIDOS TRIAZÓLICOS	47
4.1.2 SÍNTESE DOS PRECURSORES CONTENDO UNIDADE GalNAc	48
4.1.2.1 OTIMIZAÇÃO DE ROTA PARA OBTENÇÃO DO BLOCO 6-N <sub>3</sub> -βGalNAc-ThrOBn	68
4.1.3. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE ÁCIDO SIÁLICO	68
4.1.4 SÍNTESE DO GLICOAMINOÁCIDO TRIAZÓLICO ANÁLOGO DO ANTÍGENO ST <sub>n</sub>	72
4.1.5. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA PARA OBTENÇÃO DE GLICOPEPTÍDEOS	77
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>89</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER: UM PROBLEMA DE SAÚDE MUNDIAL

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 enfermidades que tem em comum o crescimento anormal e desordenado de uma população de células, podendo invadir tecidos e órgãos adjacentes além de difundir-se para outras regiões do corpo. Tal desequilíbrio ocorre à medida que células normais adquirem, progressivamente, uma sucessão de habilidades marcantes, tais como: capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evitar estímulos supressores de crescimento, resistir à morte celular programada (apoptose), permitir imortalidade replicativa e induzir a angiogênese e metástase (Figura 1) (HANAHAN & WEINBERG, 2000; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).



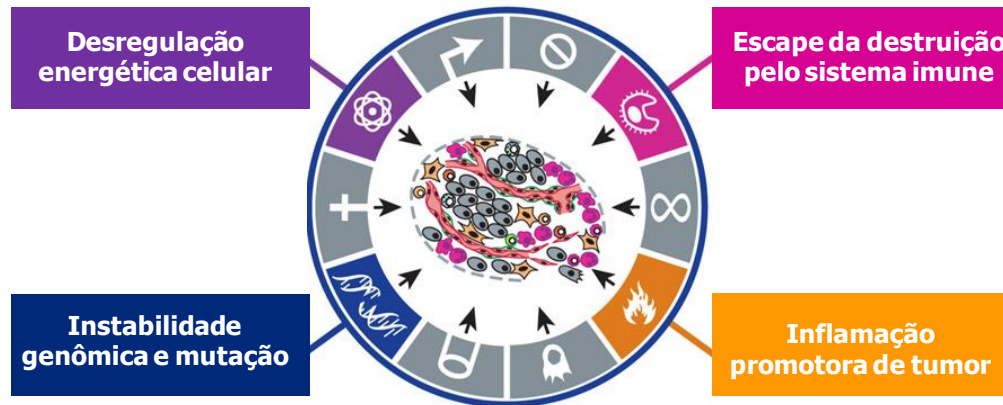
**Figura 1.** Primeiras capacidades biológicas adquiridas pelas células tumorais durante seu desenvolvimento (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Na última década, esse quadro geral de características foi atualizado, compreendendo agora quatro novas capacidades facilitadoras que uma célula normal pode possuir ao iniciar seu processo de malignização, sendo estas:

1. a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, aumentando a eficácia na sua proliferação;
2. conseguir escapar do sistema imunológico, em particular dos linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer*, aumentando a sua sobrevivência celular;
3. apresentar instabilidade genômica, ou seja, mutabilidade, a qual confere às células alterações genéticas randômicas e impulsionam a progressão do tumor;



- encontrar-se constantemente em ambiente de inflamação, geralmente proporcionada por células do sistema imunológico, a qual facilita o fornecimento de substâncias como fatores de crescimento e pró-angiogênicos, além de espécies reativas de oxigênio (EROs), que aceleram o processo de malignização (Figura 2) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



**Figura 2.** Quadro atualizado das quatro novas capacidades biológicas adquiridas pelas células que facilitam sua malignização (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

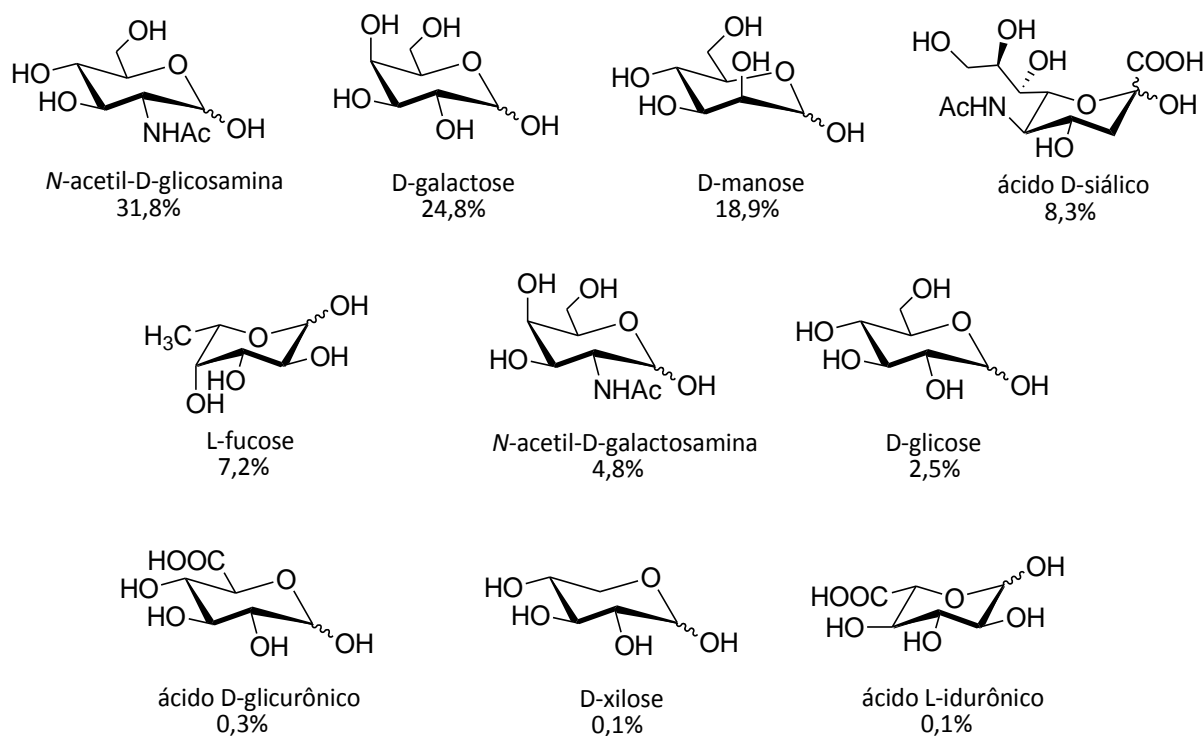
Tal disfunção tem tomado proporções alarmantes na sociedade moderna e mostra-se um problema de saúde pública, sendo os tipos de câncer mais incidentes no mundo os de pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão) (FERLAY et al., 2015). No ano de 2012, calculou-se cerca de 14,1 milhões de casos mundiais, um crescimento de 20% quando comparado com a década anterior. Estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer para cada ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018). Vale ressaltar ainda que estudos preveem um aumento de 9,9 milhões de casos para 2035, uma ascensão de mais de 70% em relação aos valores de 2012 (WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL, 2018).

O impacto econômico do câncer também deve ser destacado visto seu significativo custo global de aproximadamente US \$ 1,16 trilhão em 2010. Estimativas de aumento desse valor para as décadas seguintes foram feitas vistos os expressivos esforços que foram e estão sendo feitos para desenvolver novas estratégias que possam erradicar seletivamente tumores sem efeitos prejudiciais às células saudáveis (STEWART & WILD, 2014).

## **1.2. IMPORTÂNCIAS BIOLÓGICA E TERAPÊUTICA DE CARBOIDRATOS E GLICOCONJUGADOS**

A abundância de carboidratos na natureza e suas diversas funções nos sistemas biológicos justificam a importância dos estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas. Os carboidratos são encontrados como monossacarídeos, oligossacarídeos, ou sob a forma de glicoconjugados, estruturas nas quais as glicanas encontram-se acopladas a biomoléculas de outras naturezas, principalmente proteínas e lipídios (HOLEMANN & SEEBERGER, 2004; SEEBERGER & WERZ, 2007).

Além de suas funções energéticas e estruturais, vastamente conhecidas e exploradas, os carboidratos e glicoconjugados estão envolvidos em diferentes eventos fisiológicos e patológicos relacionados a processos de reconhecimento, sinalização e diferenciação celular, crescimento tecidual, adesão, metástase, infecção por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. A diversidade de funções e estruturas dos carboidratos está diretamente relacionada ao seu caráter polifuncional, com capacidade de acoplamento a outros monossacarídeos, aminoácidos, nucleotídeos e cadeias lipídicas em diferentes posições. Adicionalmente, outros fatores que agregam complexidade estrutural aos carboidratos e glicoconjugados são a estereoquímica dos centros quirais, tipo de ligação glicosídica formada e configuração anomérica (HOLEMANN & SEEBERGER, 2004; DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006). Dessa forma, ao considerar apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (Figura 3), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são, teoricamente, viáveis, número esse que cresce significativamente com a extensão da cadeia (SEEBERGER & WERZ, 2007).



**Figura 3.** Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos (SEEBERGER & WERZ, 2007).

### 1.2.1 GLICOPROTEÍNAS DE MUCINAS

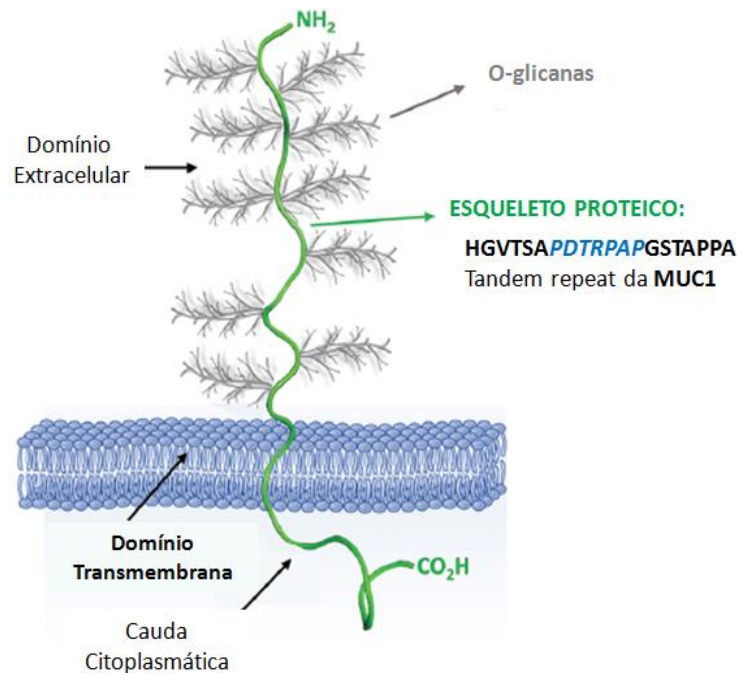
Glicosilação é um mecanismo de modificação pós-traducional de proteínas fundamental para definir a estrutura, estabilidade e função protéicas. A maior parte dos carboidratos está ligada em glicoproteínas por meio de ligações *O*-glicosídicas a cadeias laterais de serina ou treonina (*OH*), e, mais raramente, de tirosina (*OH-arom.*), ou através de ligações *N*-glicosídicas a cadeias laterais de resíduos de asparagina ( $NH_2$ ) (DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006; OSINAGA, 2007). Desse modo, a variabilidade de aminoácidos glicosilados e a extensão da glicosilação possibilitam a existência de uma vasta diversidade de glicoproteínas, exercendo grande impacto sobre suas propriedades (WONG, 2003).

Mucinas são *O*-glicoproteínas densamente glicosiladas de elevado peso molecular (1000 kDa), contendo até 80% da massa total em carboidratos estando presentes na superfície celular - glicocálix - de numerosos tipos de tecidos epiteliais. Tais estruturas estão envolvidas em funções primárias de proteção, hidratação e lubrificação, além de processos biológicos complexos como renovação, diferenciação, sinalização e adesão celular, fertilização, infecções e inflamação (WINTERFELD; KHODAIR; SCHMIDT, 2003, ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006; BUSCAGLIA et al, 2006). Estas glicoproteínas possuem motivos repetidos em *tandem* típicos, ricos em resíduos de

aminoácidos de serina (Ser) e treonina (Thr), os quais, como descrito acima, representam potenciais sítios para *O*-glicosilação (GAIDZIK; WESTERLIND; KUNZ, 2013; WITCZAK & BIELSKI, 2013).

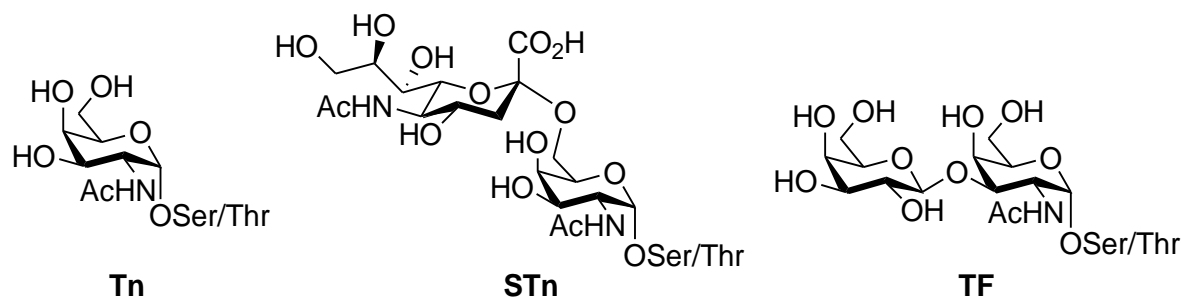
### 1.2.1.1 MUCINAS TUMORAIS

O metabolismo desregulado de mucinas está associado a processos inflamatórios e a muitos tipos de câncer, de tal forma que determinadas classes, tal como MUC1, são empregadas como marcadores tumorais de relevância clínica. A MUC1 é a mucina mais estudada e um marcador para câncer de mama, próstata e pulmão. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana caracterizada por um domínio N-terminal extracelular e uma cauda citoplasmática C-terminal que estão ligadas na membrana celular por um domínio único. Além disso, é constituída por várias repetições (20-125) em *tandem* da seqüência de 20 aminoácidos HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, a qual apresenta cinco potenciais sítios de *O*-glicosilação (Thr/Ser), sendo o motivo peptídico PDTRPAP glicosilado considerado o epítipo imunodominante dessa classe (Figura 4). Outra característica das mucinas tumorais é a primeira ligação do açúcar  $\alpha$ GalNAc aos resíduos de Ser/Thr da cadeia peptídica, o que promove a formação do derivado  $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr (DZIADEK; KOWALCZYK; KUNZ, 2005, MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017).



**Figura 4.** Representação esquemática de mucina MUC1 sendo descrita a seqüência em *tandem* dos 20 aminoácidos e o epítipo imunodominante PDTRPAP destacado em azul (Adaptado de MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017).

Ademais, uma vez que as células cancerígenas apresentam alteração no padrão de *O*-glicosilação de mucinas, há como resultado uma alta frequência de glicanas anormais, incompletas e/ou precocemente terminadas por adição de ácido siálico na porção sacarídica (sialilação). Assim, glicanas com cadeias encurtadas como  $\alpha$ GalNAc (Tn), Neu5Ac $\alpha$ 2-6 $\alpha$ GalNAc (STn) e  $\beta$ Gal-1-3 $\alpha$ GalNAc (TF) são abundantes e continuamente expressas nas células tumorais, além da exposição de epítomos peptídicos, que são mascarados em células saudáveis. Suas constantes exposições ao meio extracelular dão a elas a denominação de Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (TACAs) (Figura 5), com propriedades funcionais de adesão, invasão e metástase celular (WINTERFELD; KODAIR; SCHMIDT, 2003; McDONALD; BYRNE; PAYNE; 2015). O envolvimento destes antígenos na indução de imunidade ativa e a limitada ocorrência dos mesmos em tecidos normais os tornaram potenciais alvos para uma imunoterapia contra tumores.



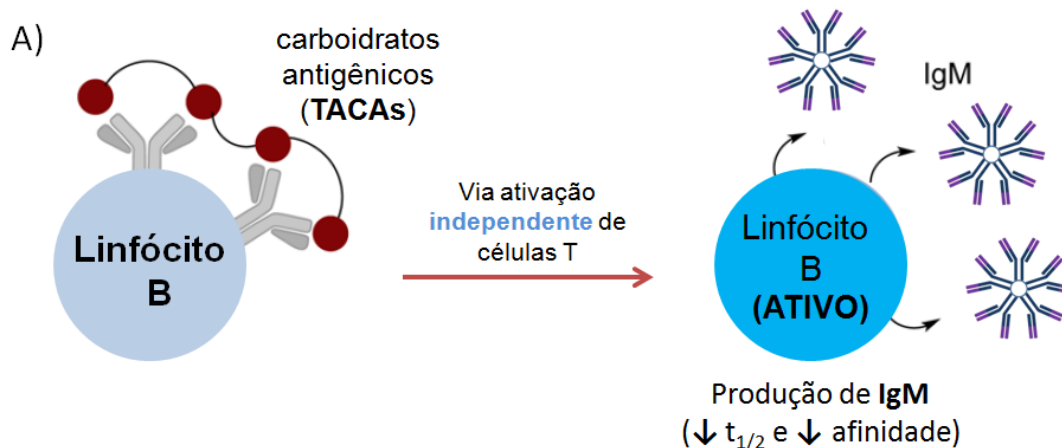
**Figura 5.** Representação dos principais Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”).

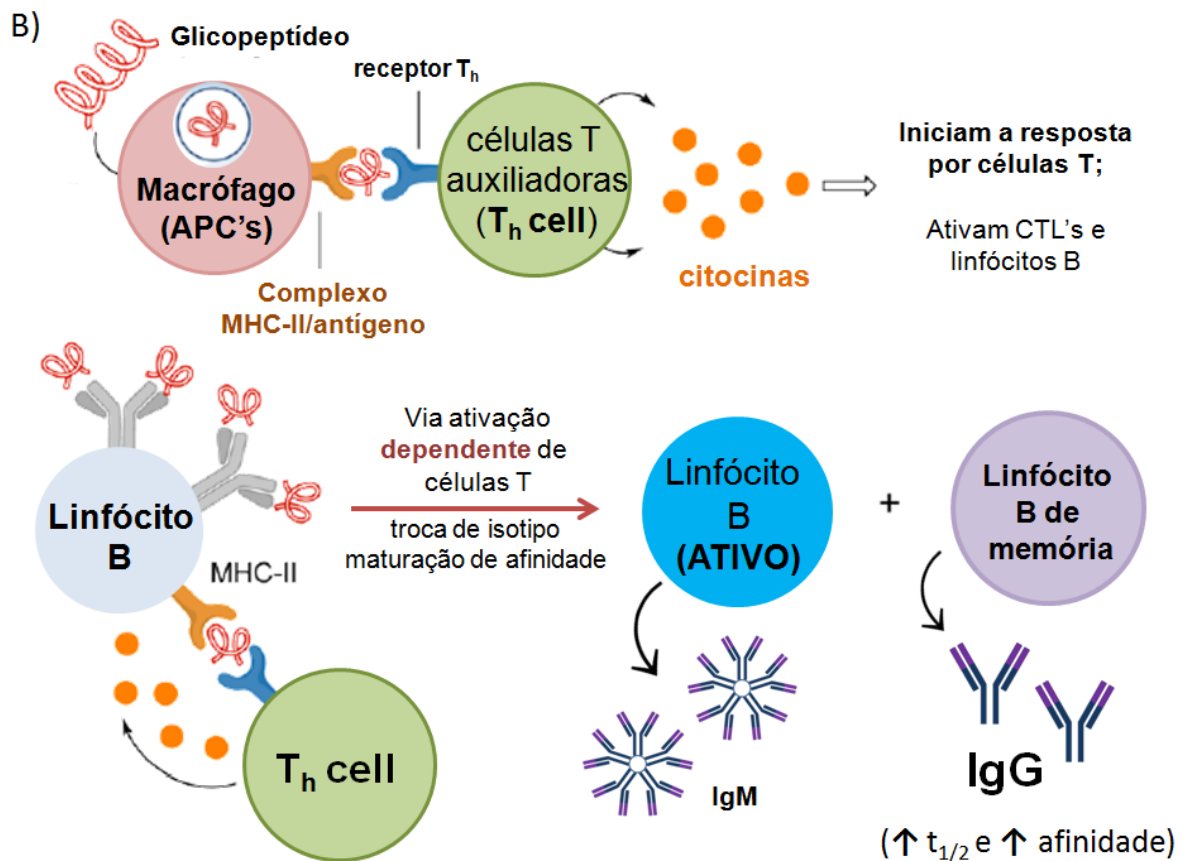
### 1.2.2 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTITUMORAIS SINTÉTICAS A PARTIR DE ANÁLOGOS DE TACAS

Por mais de um século, o emprego de técnicas de imunização tem contribuído significativamente para a saúde humana. No Brasil, há vacinas contra diversas doenças como Caxumba, Sarampo, Rubéola (tríplice viral), Poliomielite, Coqueluche, Influenza, Hepatites A e B, Tétano, Febre Amarela, de forma que representa um dos tratamentos médicos mais bem sucedidos já desenvolvidos (ANVISA, 2018). A vacinação consiste em ativar o sistema imunológico para produzir anticorpos contra determinado(s) antígeno(s), de forma que, quando o sistema imune do paciente entra em contato novamente com este(s), a resposta gerada será mais eficaz, evitando reinfecção e/ou desenvolvimento de sintomas. Fundamentando-se nesse conceito, a vacinação tornou-se uma das abordagens imunoterápicas mais almejadas no tratamento do câncer.

Os primeiros esforços na utilização de carboidratos isolados como antígenos mostrou apenas a ativação da resposta imune independente de células T por meio da ativação direta de linfócitos B, resultando na produção de imunoglobulinas unicamente da classe das IgM, com

baixa vida útil e afinidade, sendo portanto, insuficiente para o ataque direcionado à células cancerígenas (CHANG-CHENG, 2012) (Figura 6A). Desse modo, para viabilizar sua aplicação como possíveis vacinas, haptenos sacarídicos tiveram sua complexidade estrutural aumentada ao serem conjugados a peptídeos ou proteínas carreadores imunogênicos como BSA (*Bovine Serum Albumin*) e/ou KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), favorecendo a estimulação dos linfócitos T, os quais são sensibilizados por fragmentos peptídicos antigênicos processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC's), como macrófagos, monócitos e células B via MHC de classe II (*Major Histocompatibility Complex*) (XU et al, 2005, FRANCO, 2005; CHANG-CHENG & YE 2012; MARTINÉZ-SÁEZ, PEREGRINA, CORZANA, 2017). Ao complexo "antígeno/MHC-II" formado ligam-se células T auxiliaadoras (*Helper T-Th cell*) as quais liberam citocinas que promovem a ativação de células T citotóxicas (*CTL's*) além de iniciar a resposta por células T. Além disso, a associação de células *Th* ativadas a células B é crucial para ativação completa destas e promover a maturação de afinidade das imunoglobulinas produzidas, resultando na troca de isotipo de IgM em imunoglobulinas da classe IgG, de alta afinidade e tempo de meia vida. Essa completa ativação também promove a maturação de células B em células B de memória (*memory B cells*) que permanecem ativas mesmo após o término da resposta imune e, no caso de uma reinfecção, têm capacidade de gerar uma resposta mais rápida e secretar anticorpos de maior afinidade (IgG), sendo assim uma resposta imunológica efetiva e duradoura (Figura 6B), (WILSON & DANISHEFSKY, 2013). Como resultado, linfócitos T citotóxicos e anticorpos direcionados contra antígenos tumorais sintéticos devem ser capazes de reconhecer os correspondentes epítomos nativos em células malignas circulantes e metastáticas, promovendo a erradicação das mesmas e protegendo contra crescimento e recorrência tumoral, comprovando o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para o combate ao câncer.



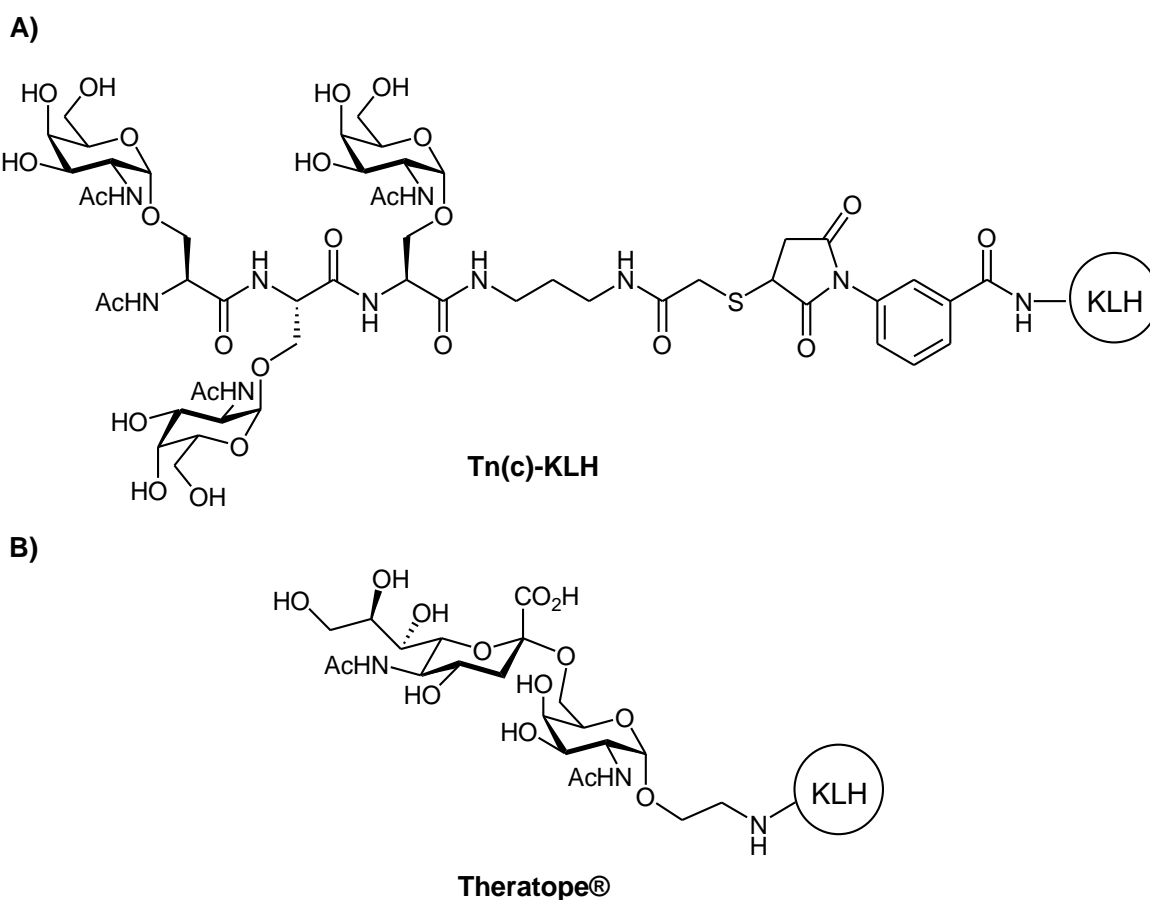


**Figura 6.** Representação comparativa da resposta imune quando utilizando: **A)** TACAS isolados: desencadeamento de uma resposta células T-independente, ativando somente linfócitos B, com produção de anticorpos do tipo IgM. **B)** TACAS conjugados: desencadeamento de uma resposta imune células T-dependente, com produção de anticorpos do tipo IgG (Adaptado de WILSON & DANISHEFSKY, 2013)

Ensaio clínico já atestaram o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para a terapia do câncer, como a Tn(c)-KLH, que atualmente encontra-se em ensaio clínico de Fase II e em sua estrutura possui uma seqüência de três antígenos Tn ( $\alpha$ GalNAc-Thr) ligados seqüencialmente como trímero e conjugados com a proteína carreadora KLH através de um linker (Figura 7A). Em ensaio clínico de fase I, pacientes com câncer de próstata bioquimicamente com recidiva foram imunizados com a TN(c)-KLH na presença do adjuvante imunológico QS-21. A diminuição dos níveis de PSA (marcador bioquímico para câncer de próstata) por vários meses após término das vacinações, em comparação com o período de pré-tratamento, pôde ser correlacionado com possível retardo da progressão tumoral (SLOVIN et al, 2003).

Tal abordagem foi corroborada quando uma vacina anti-tumoral constituída pelo antígeno natural STn conjugado a proteína carreadora KLH, Theratope®, (Figura 7B), direcionada para o tratamento do câncer de mama, foi sintetizada e testada clinicamente

(1996-2003), conseguindo passar com sucesso em ensaios clínicos de fase I e II. No entanto, a Theratope® falhou em estágios clínicos de fase III, tendo sua pesquisa descontinuada. Anos depois, notou-se que a falta de seleção dos pacientes foi uma possível explicação na falha da Theratope®, visto que o STn é expresso em cerca de 50% dos tumores de mama e não foi avaliada a expressão deste antígeno na população de pacientes. Apesar disso, os resultados globais coletados foram úteis ao levantar questões sobre como melhorar uma abordagem imunoterápica antitumoral a partir de TACAs (JULIEN; VIDEIRA; DELANNOY, 2012).

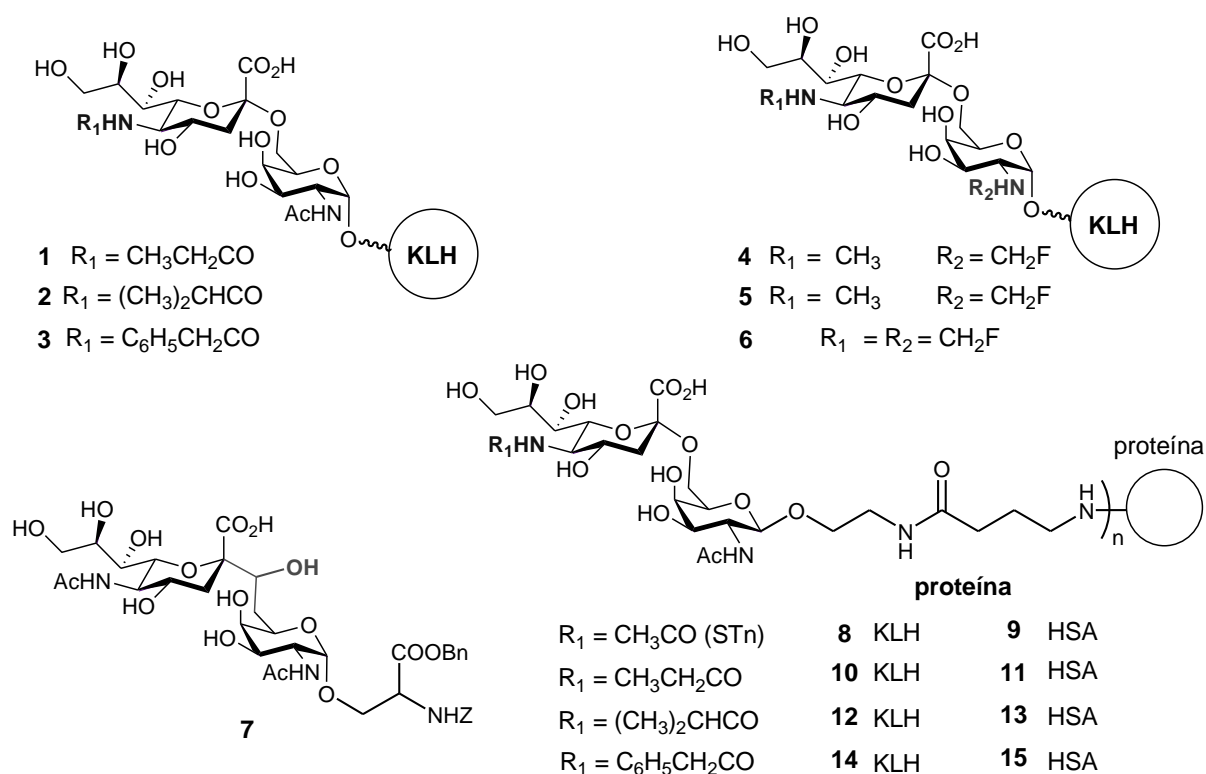


**Figura 7.** Representação estrutural de vacinas sintéticas. **A)** Cluster com três antígenos Tn ligados a proteína KLH por um linker. **B)** Theratope®, visando uma abordagem imunoterápica anti-STn.

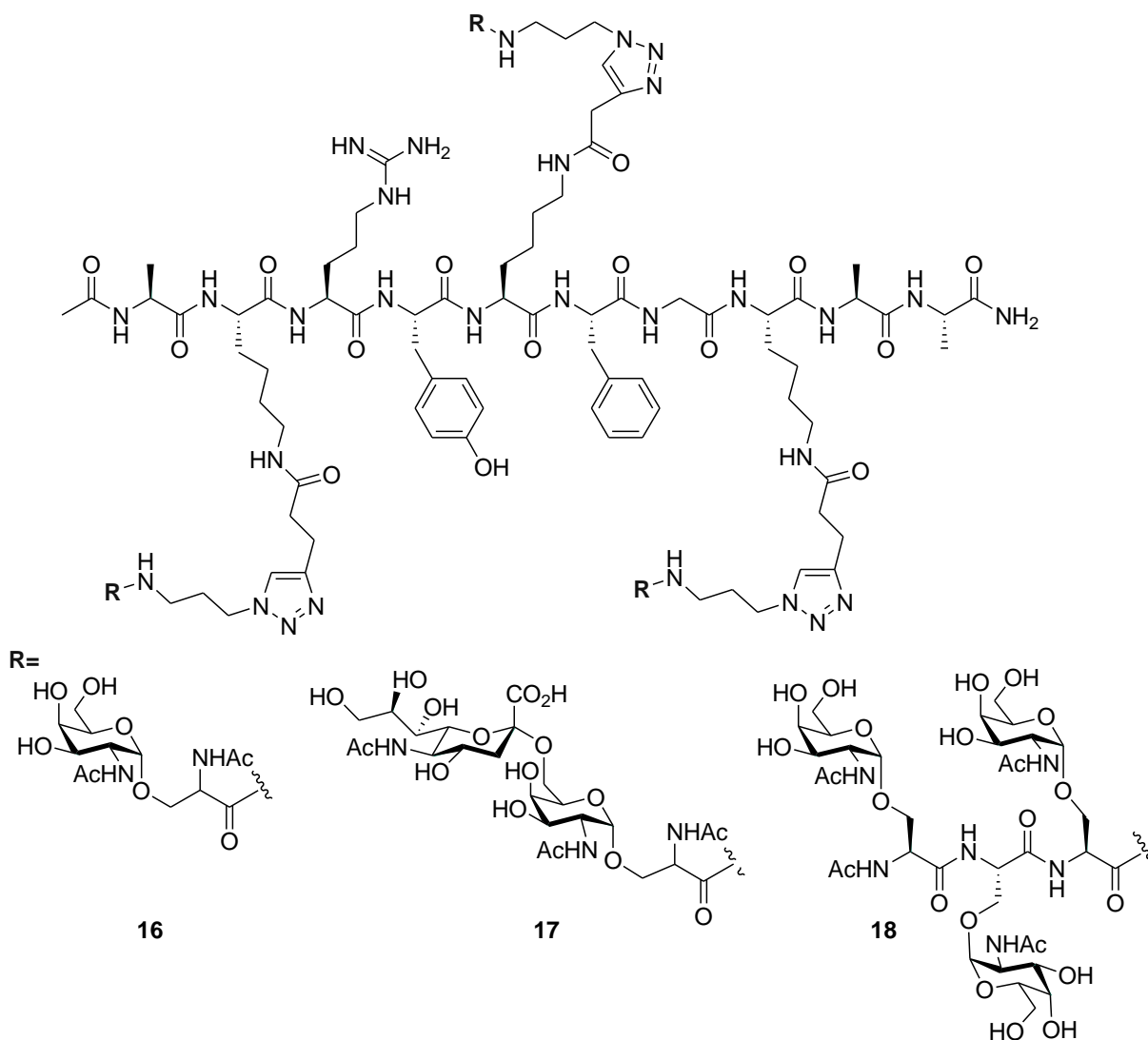
Uma potencialização da resposta imunológica pode ser alcançada através da co-administração com adjuvantes imunológicos, tais como hidróxido de alumínio, saponina QS-21, algumas citocinas como IL-2 e IL-12. Contudo, a ocorrência da tolerância imunológica que o organismo possui para com suas biomoléculas dificulta a utilização de TACAs para desencadear um efeito terapêutico desejado de relevância clínica, visto que estes são formados por substâncias endógenas (WANG & GUO, 2012 ; WU & GUO, 2006 ; LOUREIRO et al, 2015). Desta forma, para contornar tal obstáculo, novas estratégias para a imunoterapia contra



o câncer foram desenvolvidas, como a utilização de análogos de TACAs. O interesse de vários grupos de pesquisa em sintetizá-los provém da possibilidade de manter a capacidade de reconhecimento do antígeno natural e aumentar expressivamente a imunogenicidade do composto final, uma vez que TACAs modificados podem ser considerados exógenos pelo sistema imune e, assim, estimular uma resposta mais efetiva do que os naturais, quebrando a tolerância imune (KUBERAN et al, 2003). Dentre os análogos já sintetizados, vemos que há um maior foco em mimetizar os antígenos Tn e STn. No último caso, as principais modificações observadas foram na função amida (-NHAc) do ácido siálico **1-3** (WU & GUO, 2006; CHANG-CHENG & YE, 2012; WANG & GUO, 2012) ou no açúcar  $\alpha$ GalNAc **4-6** (WU & GUO, 2006), na ligação  $\alpha$ 2-6 entre estas porções glicosídicas, gerando análogos C-glicosídicos **7** (KUBERAN, 2003), além da conjugação com diferentes proteínas carreadoras por meio de linker **8-15** (LOUREIRO, 2015) (Figura 8). Ademais, observa-se a utilização do grupo triazol como linker entre os antígenos tumorais e uma porção peptídica, gerando novos glicoconjugados **16-18** (WITCZAK & BIELSKI, 2013), sendo estes análogos representados na Figura 9.



**Figura 8.** Representação geral de estruturas de análogos de Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (“TACAs”) já descritos na literatura, focando em análogos do antígeno STn.



**Figura 9.** Representação geral de glicopeptídeos que exploraram a utilização do grupo triazol como parte de um linker entre os TACAs e a cadeia peptídica

Desse modo, tendo em vista a importância dos Antígenos de Carboidratos Associados a Tumor (TACAs) como marcadores tumorais de relevância clínica, aliada à presença constante destes em mucinas tumorais, tal como MUC1, anticorpos contra os antígenos Tn e/ou STn podem ser utilizados para direcionar o sistema imune contra células tumorais ou com potencial de malignização. No entanto, mesmo com o grande avanço no desenvolvimento de anticorpos contra estes antígenos nas últimas décadas, a utilização destes para uso em ensaios clínicos obteve sucesso limitado até o presente momento, o que nos estimula a procurar novos antígenos como imunógenos para o desenvolvimento de vacinas e obtenção de anticorpos monoclonais anti-TACAs.

Por fim, merece destaque as principais vantagens que as vacinas sintéticas apresentam quando comparadas com os outros tipos de vacinas (exs, de microrganismos vivos atenuados, inativos, de DNA, de subunidades ou de vetores recombinantes), como a alta homogeneidade estrutural, o que implica em menor probabilidade de efeitos colaterais, além da não necessidade de armazenamento sob refrigeração (MCGEARY; JABLONKAI; TOTH, 2002).

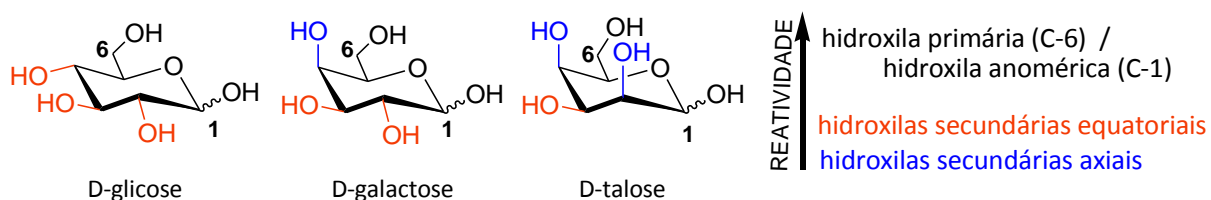
### 1.3. ASPECTOS GERAIS DA QUÍMICA DE CARBOIDRATOS

A síntese de derivados sacarídicos e/ou glicoconjugados envolve, freqüentemente, dois pontos essenciais:

- I. A manipulação rigorosa e diferenciação de hidroxilas que possuem reatividade similar, exigindo o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas e ortogonais. Geralmente, tal fato conduz ao aumento do número de etapas da rota sintética;
- II. A obtenção de produtos régios e estereosseletivos, uma vez que a cada glicosilação é gerado um novo centro estereogênico (SEEBERGER & HAASE, 2000).

#### 1.3.1 ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÕES SELETIVAS EM CARBOIDRATOS

Apesar de não haver uma regra geral para discriminar a reatividade das hidroxilas de piranoses, uma vez que esta é dependente de sua configuração no anel e das condições reacionais, sabe-se que as hidroxilas primária (C-6) e anomérica (C-1) são mais reativas que as secundárias (C-2, C-3, C-4). Além disso, as em posição equatorial possuem menor impedimento estérico em relação às axiais, sendo, portanto, mais acessíveis e tendem a reagir mais rapidamente (Figura 10) (FERRIER & COLLINS, 1996).

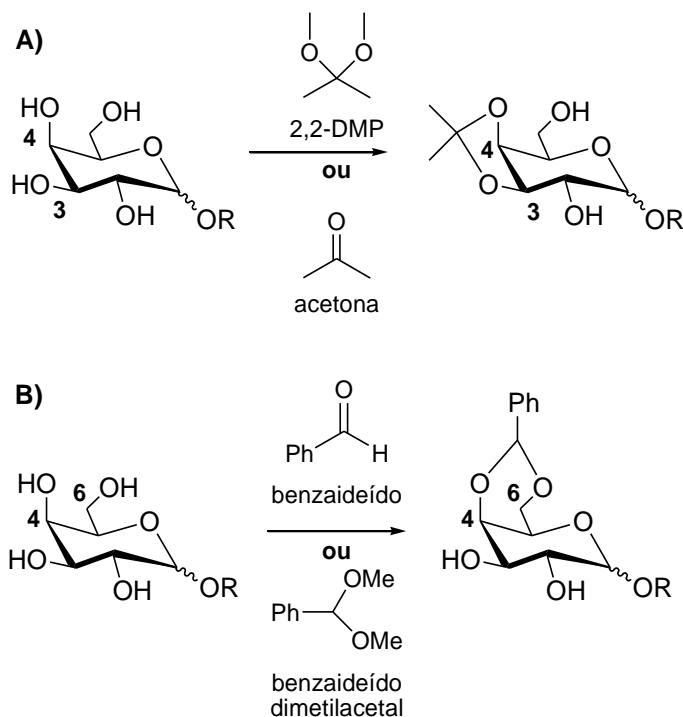


**Figura 10.** Estruturas químicas de glicose e seus epímeros, evidenciando as diferenças de configuração de algumas ligações e reatividade de suas hidroxilas.

Desse modo, a utilização de grupos protetores e condições reacionais para introduzi-los ou removê-los seletivamente é fundamental para que as reações com carboidratos sejam régio e estereosseletivas. As classes de grupos protetores mais comuns utilizados na química de carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres

(benzila, tritila e alila), éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila - TBDPS) e estanilenos (óxido de dibutilestanho - DBTO) (PÉTURSSON, 1997; PEI et al., 2007).

Geralmente, grupos protetores mais volumosos, como TBDPS, TBDMS, tritila e tosila, protegem de forma regiosseletiva a hidroxila primária (C-6), com menor impedimento estérico. Já em relação às hidroxilas secundárias de piranosídeos, a proteção com (a)cetais baseia-se na proteção simultânea, seletiva e com altos rendimentos de hidroxilas adjacentes (das posições 1,2, 3,4 ou 4,6) pela formação de anéis de 5 (isopropilideno - Esquema 1A) ou 6 membros (benzilideno - Esquema 1B). Para isso, utiliza-se 2,2 dimetoxipropano (2,2-DMP) ou acetona, e benzaldeído ou benzaldeído dimetil acetal, respectivamente. A remoção desses grupos, por sua vez, pode ser realizada por hidrólise ácida com ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH), ácido acético sob aquecimento ou com ácido trifluoroacético a 0 °C (PÉTURSSON, 1997).

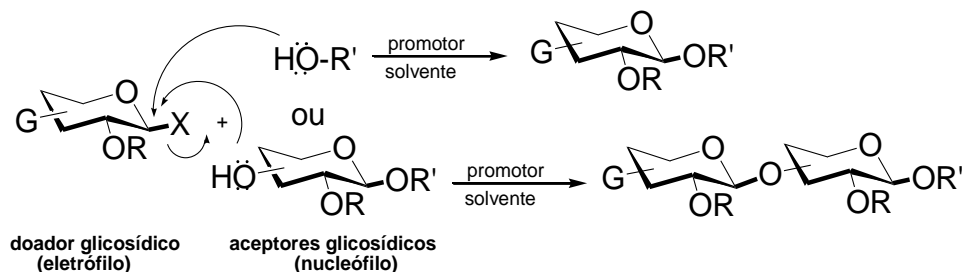


**Esquema 1.** Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (A) e 4,6 (B) de D-galactose através da formação de acetais.

### 1.3.2 A ESTEREOSELETIVIDADE NA SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS

Uma ligação *O*-glicosídica é formada pela substituição nucleofílica de um grupo abandonador (X) ligado à posição anomérica da molécula de açúcar por um álcool ROH ou por um grupo OH de outra molécula, podendo ser um açúcar parcialmente protegido ou até mesmo aminoácidos como treonina (Thr) ou serina (Ser) (Esquema 2). Denomina-se o composto que

“fornece” a unidade glicosídica de *doador glicosídico*, e o que a recebe de *acceptor glicosídico*. Essa reação geralmente é realizada na presença de um promotor, cuja função é favorecer a saída do grupo abandonador, sendo normalmente empregado em quantidade catalítica, embora possa ser utilizado estequiometricamente em alguns casos (BONGAT & DEMCHENKO, 2007).



**Esquema 2.** Representação de formação da ligação *O*-glicosídica.

Uma das estratégias mais frequentes para a obtenção de glicoaminoácidos é a utilização de reações de *Koenigs-Knorr* envolvendo o uso de haletos glicosídicos como cloreto, brometo e iodeto, juntamente com o emprego de catalisadores como sais de mercúrio ( $\text{HgBr}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ), sais de prata ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{AgClO}_4$ ,  $\text{AgOTf}$ ), triflato de trimetilsilil ( $\text{TMSOTf}$ ) e triflato de dimetil(metil)sulfônio ( $\text{DMTST}$ ). Tais catalisadores aumentam a velocidade da reação, pois são efetivos em promover a saída de grupos haletos abandonadores por complexação (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).

Tratando-se da obtenção estereosseletiva de glicoaminoácidos de glicose e galactose com configurações  $\alpha$  (1,2-*cis*-glicosídeos) ou  $\beta$  (1,2-*trans*-glicosídeos), é necessária a utilização de doadores glicosídicos adequados, uma vez que a determinação de sua configuração dependerá da influência de dois principais fatores: o '*efeito anomérico*' e '*assistência anquimérica*' (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).

### 1.3.2.1 O EFEITO ANOMÉRICO

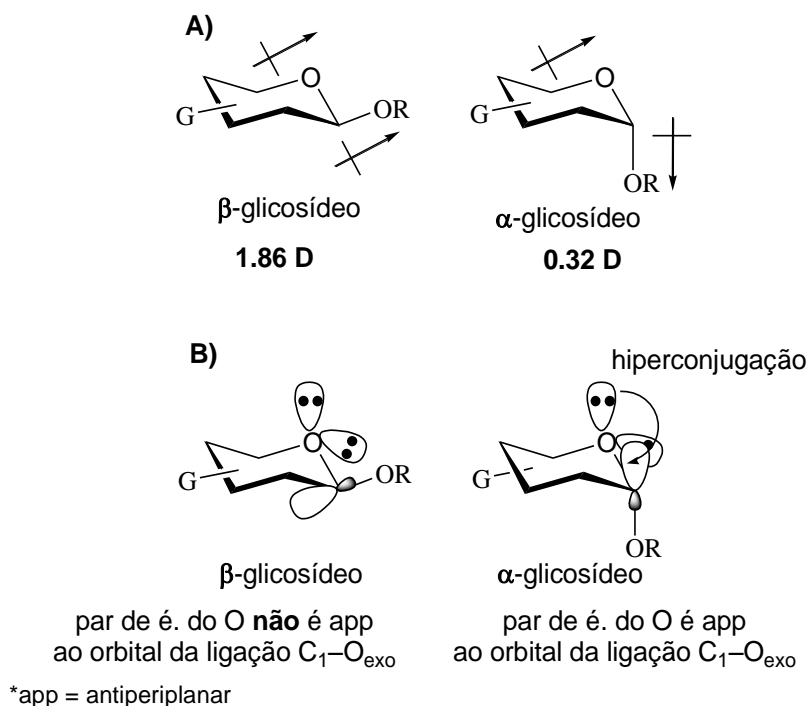
O efeito anomérico, descreve a tendência do substituinte em C-1 em adotar orientação axial ( $\alpha$ ) ao invés da equatorial ( $\beta$ ) e pode ser explicado como a soma de dois outros efeitos, um de caráter eletrostático e outro da ação de orbitais moleculares (CAREY & SUNDBERG, 2007).

O efeito de origem eletrostática surge da repulsão entre os pares de elétrons isolados dos átomos de oxigênio endo e exocíclico. Assim, caso o aceitador glicosídico se ligue equatorialmente ao doador haverá o alinhamento entre dois vetores de dipolos, o que gera um maior momento dipolo molecular na estrutura (1.82 D). Isto acarreta em uma maior separação

de cargas o que é energeticamente desfavorável para o sistema em solventes com baixa constante dielétrica. Em contra partida, os dipolos ficam 'opostos' no caso do substituinte estar na posição axial (em  $\alpha$ ), existindo, assim, menor momento dipolo molecular na estrutura (0.32 D) representando um sistema energeticamente mais estável (Figura 11A) (CAREY & SUNDBERG, 2007 ; VAN VRANKEN, 2012).

O outro componente do efeito anomérico envolve uma possível estabilização eletrônica adicional promovida pelo fenômeno de hiperconjugação entre um dos pares de elétrons isolados do átomo de oxigênio endocíclico (orbitais antiligantes preenchidos) com o orbital sigma anti-ligante  $\sigma^*$  vazio da ligação C<sub>1</sub>-O exocíclico axial. Esta deslocalização eletrônica, por sua vez, só é possível quando o par de elétrons estiver em posição antiperiplanar ao orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) da ligação C<sub>1</sub>-O anomérico, o que ocorre apenas quando esta encontra-se na posição axial (Figura 11B).

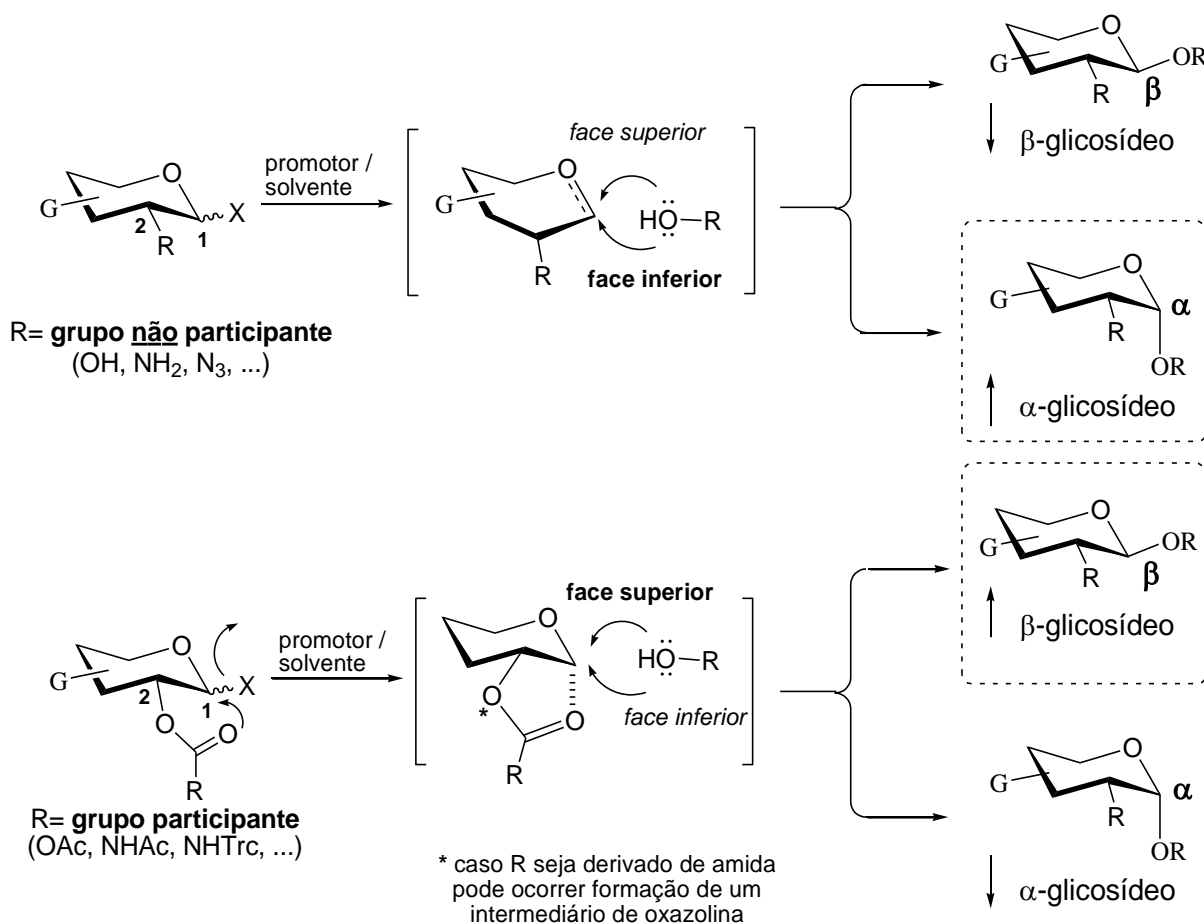
Ademais, vale ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente (CAREY & SUNDBERG, 2007; VAN VRANKEN, 2012).



**Figura 11.** Representação dos constituintes do efeito anomérico. **A)** Influência dos dipolos presentes na estrutura para determinar a orientação do substituinte na posição anomérica. **B)** Representação da deslocalização de um par de elétrons isolado do oxigênio endocíclico para o orbital sigma antiligante ( $\sigma^*$ ) da ligação C<sub>1</sub>-O<sub>exo</sub>, favorecida no confôrmero axial.

### 1.3.2.2 A ASSISTÊNCIA ANQUIMÉRICA

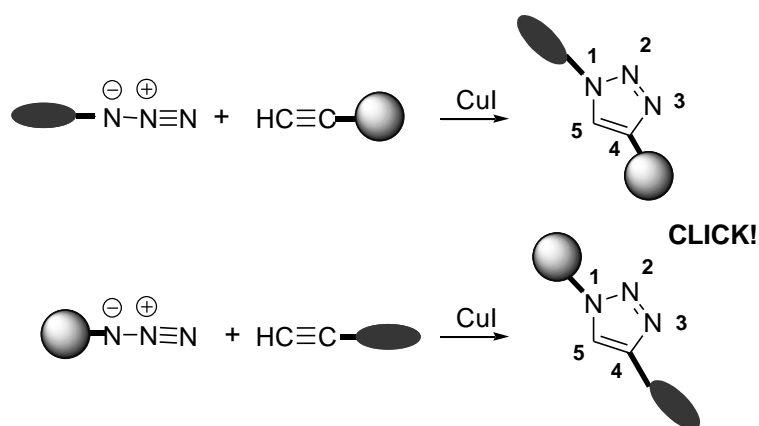
Já a assistência anquimérica, também conhecida por “participação de grupo vizinho”, é definida pela capacidade de grupos ligados no carbono 2 do anel pirano de influenciar a face de ataque do aceptor glicosídico (nucleófilo). Assim, para a síntese de  $\beta$ -glicosídeos, doadores contendo grupos participantes em C-2, como OAc, NHAc e *N*-Troc (*N*-tricloroetoxicarbonil) devem ser utilizados, uma vez que, o oxigênio carbonílico presente no grupo em C-2 é capaz de interagir ou até atacar o carbono anomérico, dificultando o ataque do aceptor pela face inferior e favorecendo a formação do produto  $\beta$ -substituído. Já a preparação de  $\alpha$ -glicosídeos exige o emprego de doadores com grupo substituinte não participante em C-2, tal como grupo azido ( $N_3$ ), os quais favorecem a obtenção do produto  $\alpha$ -substituído (Esquema 3) (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006; WELL; KARKKAINEN; KARTHA, 2006).



**Esquema 3.** Representação do efeito da *assistência anquimérica* na formação da ligação *O*-glicosídica. Cada quadro pontilhado representa o anômero formado em maior proporção na reação de glicosilação.

#### 1.4. A ESTRATÉGIA DE “CLICK CHEMISTRY”

A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar (“*click chemistry*”) catalisada por Cu(I) - CuAAC foi descrita de forma independente pelos grupos de Sharpless e Meldal (2002), e emprega um alcino terminal e um grupo azido para fornecer, de maneira rápida e regioseletiva, o produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (ARAGÃO-LEONETI et al, 2010). Outra vantagem dessa estratégia reside na possibilidade de inversão dos grupos azido e alcino nos blocos construtores, alterando, assim, a posição dos substituintes no anel triazólico formado (Esquema 4).

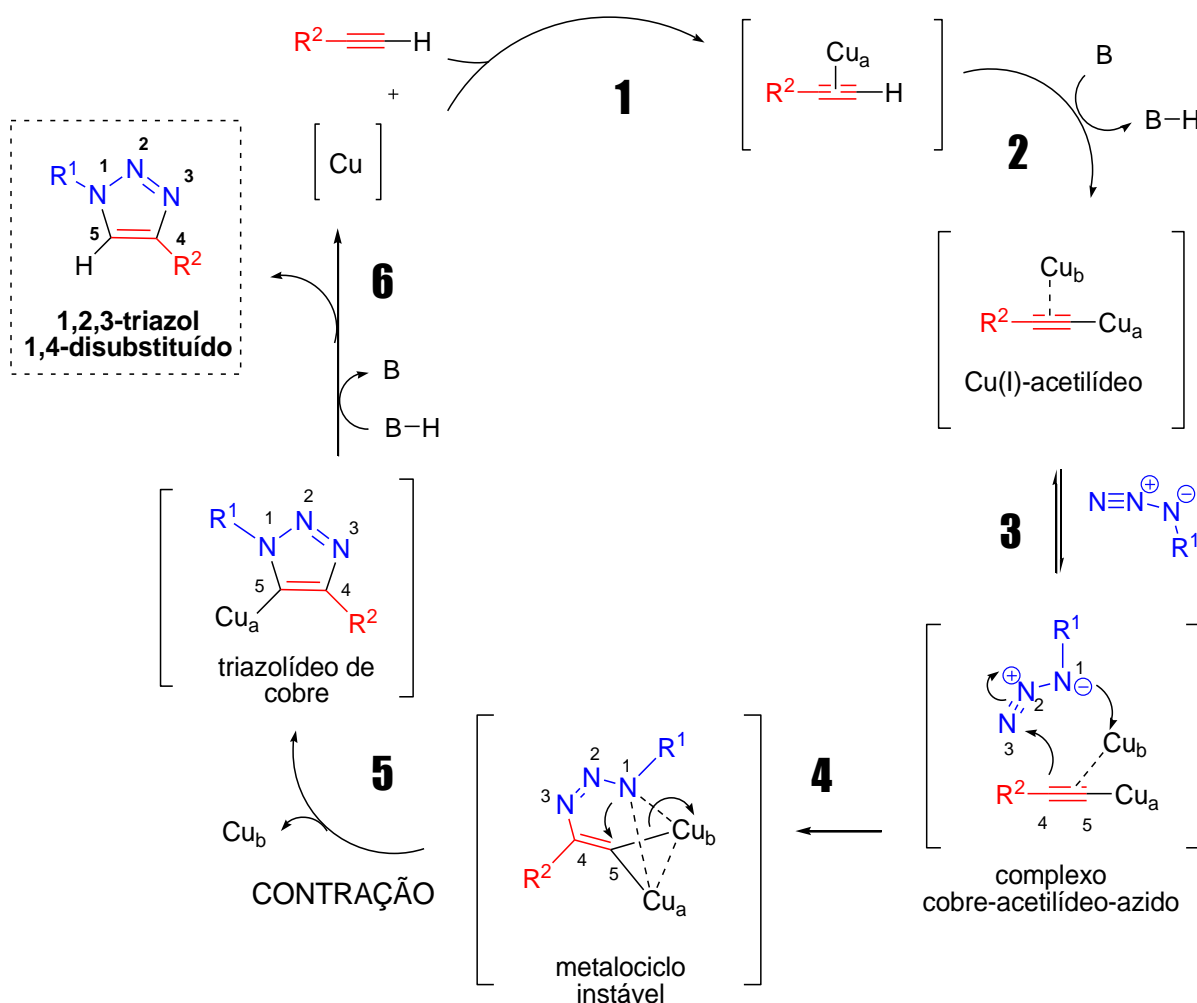


**Esquema 4.** Representação esquemática da reação de “CuAAC” resultando em um composto 1,4-triazólico.

O mecanismo pelo qual a reação ocorre foi primeiro proposto pelo grupo de Sharpless, em 2002, e desde então revisado com a inclusão de diferentes metalocíclicos. A proposta aqui detalhada foi apresentada por BOCK e colaboradores (2016) e sugere a participação de dois átomos de cobre. No primeiro momento (etapa 1), há a formação de uma estrutura de Cu(I)-acetilídeo através de um complexo  $\pi$  entre Cu(I) e o alcino terminal; a participação do segundo átomo de cobre parece estar relacionada a ativação do grupo azido, todavia a espécie de Cu(I)-acetilídeo poderia também se complexar a outro átomo de cobre, sendo difícil a proposição de apenas uma estrutura (etapa 2). Na seqüência, ocorre a aproximação do grupo azido formando o complexo cobre-acetilídeo-azido, com dois átomos de cobre (etapa 3). Isto permite que o grupo azido fique mais susceptível ao ataque nucleofílico do carbono C-4 do alcino ao nitrogênio terminal N-3, gerando um metalociclo (etapa 4). Este metalociclo posiciona o azido de forma que o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio N-1 se associe ao orbital  $\pi^*$  (antiligante) do carbono C-5, promovendo contração do ciclo, liberando um átomo de Cu e formando uma espécie triazolídeo de cobre mais estável (etapa 5). Por fim, a protonação da espécie de triazolídeo de cobre, seguida de dissociação, leva ao produto 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador (etapa 6). Estas etapas estão



representadas no Esquema 5 (BOCK, HIEMSTRA & VAN MAARSEVEEN, 2006; TIWARI et al, 2016).

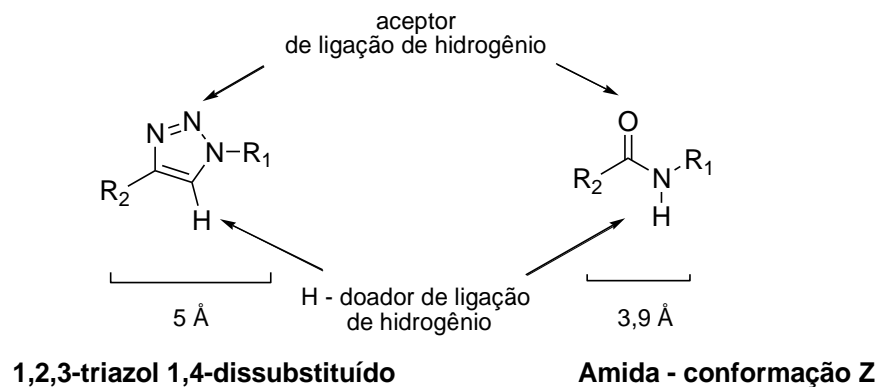


**Esquema 5.** Mecanismo proposto para a reação de CuAAC (Adaptado de BOCK, HIEMSTRA & VAN MAARSEVEEN, 2006).

A fonte de sais de Cu (I) mais utilizada envolve a redução de sulfato de cobre (II) por ascorbato de sódio, embora outras condições igualmente eficientes sejam descritas, tais como complexos orgânicos, sais e derivados estabilizados de Cu (I), nanoclusters e também fio de cobre (GIL et al., 2007).

Neste contexto, há de considerar as vantajosas propriedades físico-químicas do anel triazólico se comparada à ligação *O*-glicosídica ou a uma ligação amida, de forma que a unidade triazol mantém os átomos de carbono ligados nas posições 1,4 a uma distância de 5 Å mimetizando a ligação amida (em que a distância é 3,9 Å), e diferentemente desta, não pode ser oxidada, reduzida ou clivada por hidrólise química ácida ou básica. No meio biológico, o anel 1,2,3-triazol é estável a degradação metabólica e atua como acceptor e/ou doador de ligações de hidrogênio, podendo ainda estabelecer ligações adicionais do tipo dipolo-dipolo e

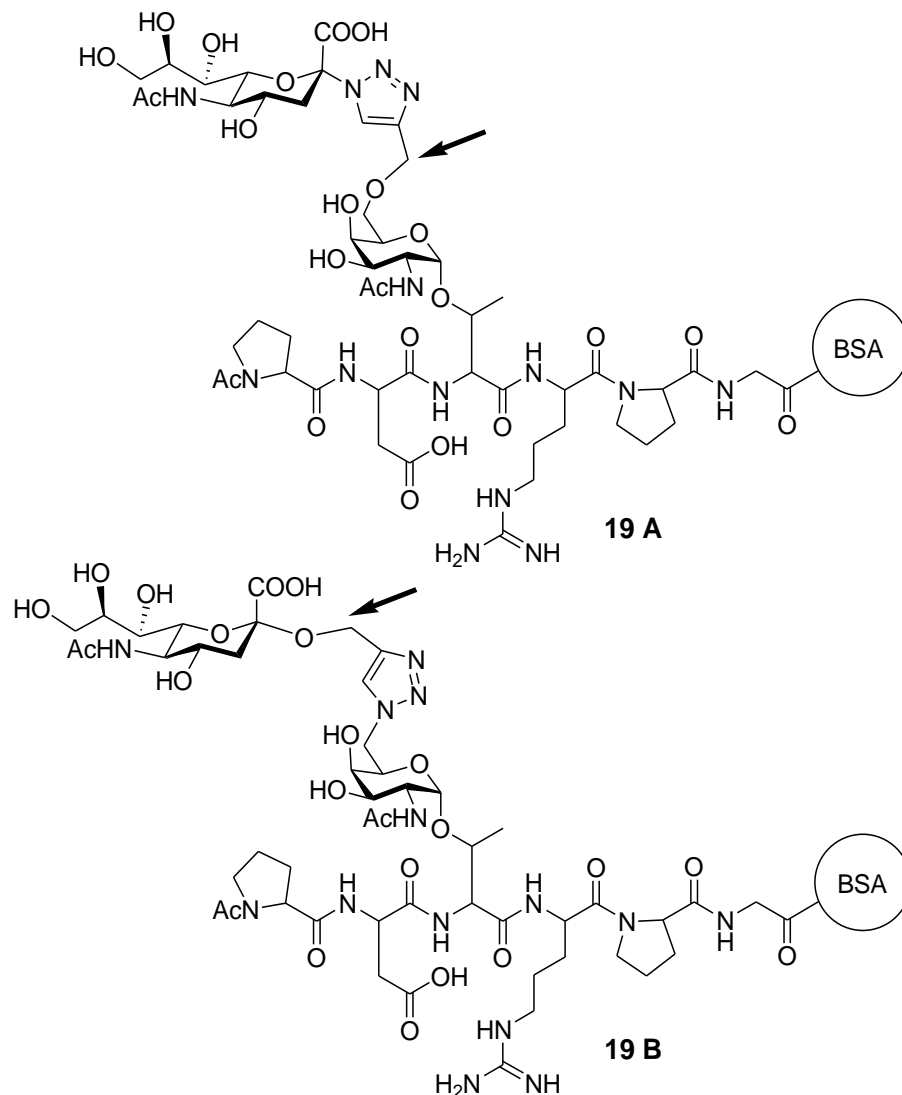
$\pi$  stacking (Figura 12). Tais propriedades bem como sua inerente rigidez estrutural instigam a síntese de neoglicopeptídeos triazólicos como potenciais imunógenos contra tumores (ARAGÃO-LEONETI et al, 2010).



**Figura 12.** Similaridade estrutural entre uma ligação amida e anel 1,2,3-triazol.

## 2. OBJETIVOS

Considerando a importância dos TACAs e das mucinas tumorais como marcadores clínicos para diferentes tipos de tumores, a síntese de glicopeptídeos que mimetizem seqüências peptídicas do tipo MUC1 ligadas covalentemente a análogos de TACAs apresentam elevado potencial para o desenvolvimento de vacinas antitumorais. Portanto, este trabalho tem como objetivo geral a síntese e avaliação do potencial imunoterapêutico do glicopeptídeo inédito **19A**, mimético do epítipo imunogênico da MUC1 (PDTRP) e contendo análogo triazólico do antígeno STn (Figura 13). É válido ressaltar a possibilidade de inversão na funcionalização dos blocos azido e alcino terminal, como descrito no Esquema 4, alterando apenas a posição do grupo *O*-metileno na estrutura final, assim, viabilizando a obtenção de outro glicopeptídeo contendo análogo triazólico do STn **19B** (Figura 13).



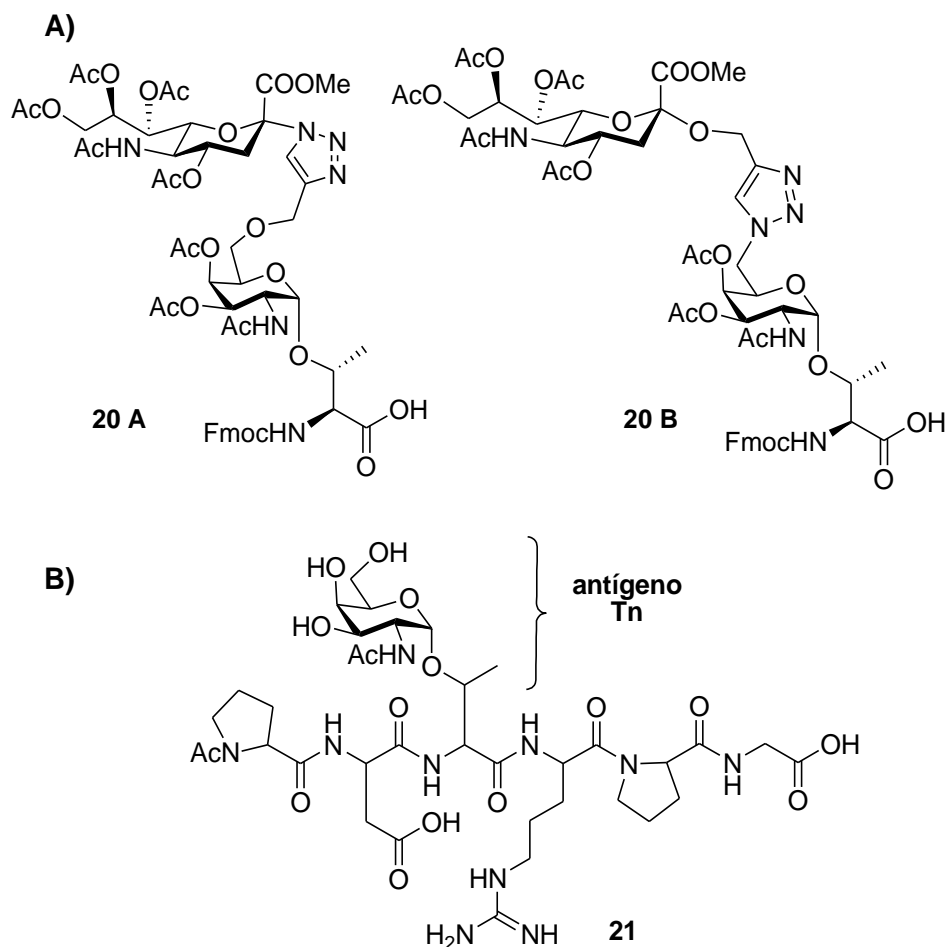
**Figura 13.** Estruturas químicas dos glicopeptídeos contendo análogos triazólicos do antígeno STn **19A** ou **19B**. As posições do grupo *O*-metileno ligado ao anel triazólico foram destacadas para evidenciar a diferença estrutural entre **19A** e **19B**.

Assim, pode-se citar como objetivos específicos desse trabalho:

1. Síntese do glicoaminoácido triazólico análogo do antígeno STn Neu5Ac $\alpha$ 2-triazol-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOH **20A** ou **20B**, o qual contém um grupo triazol entre as unidades de  $\alpha$ GalNAc e ácido siálico (Figura 14A).
2. Síntese do glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[Neu5Ac $\alpha$ 2-triazol-6 $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **19A/19B** por estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida (*SPPS*) (Figura 13).

Tendo em vista a importância de se obter um glicopeptídeo modelo de MUC-1 para posterior avaliação comparativa de imunogenicidade com o glicopeptídeo triazólico proposto **19A** ou **19B**, foi proposta a síntese de outro glicopeptídeo contendo a mesma sequência, porém com o antígeno natural Tn. Desse modo, também se fez necessária:

3. Síntese do antígeno natural Tn para posterior obtenção do glicopeptídeo modelo de mucina MUC1 NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21** (Figura 14 B).
4. Avaliação do potencial imunogênico dos glicopeptídeos **19A** e/ou **19B** e **21** por ensaios de imunização de modelos murinos, ELISA e Citometria de Fluxo.



**Figura 14.** A) Estruturas químicas dos glicoaminoácidos triazólicos Neu5Ac- $\alpha$ 2-triazol-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOH **20A/20B**. B) Estrutura química do glicopeptídeo modelo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc-Thr]-Arg-Pro-GlyOH **21** contendo antígeno natural Tn.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### **Aparelhagem analítica:**

- Espectrômetros Bruker Avance DPX-300 (300 MHz), DRX-400 (400 MHz) e DRX-500 (500 MHz) da Universidade de São Paulo foram empregados na obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS). O número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= simpleto, d= duplete, t= triplete, dd= duplo duplete, m= multiplete) e a constante de acoplamento ( $J$ ), dada em Hertz (Hz). As atribuições descritas foram realizadas com o auxílio das análises bidimensionais de  $g\text{COSY}$  e  $g\text{HMQC}$ .
- As análises de espectrometria de massas por ESI-MS (Ionização por Electrospray) foram realizadas em aparelho Bruker Daltonics UltrOTOFTOF-Q-ESI-TOF (USP), utilizando modo positivo de ionização por electrospray (ESI-MS) e analisadores de quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF).
- Espectrômetro de Infravermelho IVFT Nicollet Modelo protege 460.
- As purificações de glicopeptídeos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu SCL-10AVP e o software Class-VP 5.0

##### **Aparelhagem laboratorial:**

- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Reator de Microondas CEM<sup>®</sup> e forno Discover

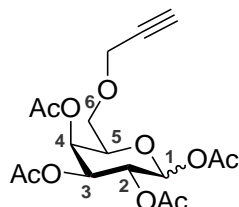
##### **Solventes, reagentes e outros materiais:**

- Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram purificados conforme métodos descritos na literatura (PERRIN, 1980).
- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF254 da MERCK<sup>®</sup>, e as purificações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas utilizando sílica gel tipo "Flash" (40-63 $\mu\text{m}$ ).

### 3.2 MÉTODOS SINTÉTICOS

#### 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetil-6-propinil-D-galactopiranosídeo 26

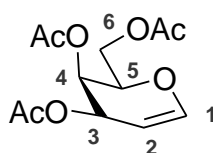
(CAMPO et al, 2015)



Galactose desprotegida e funcionalizada em C-6 com o grupo prop-2-inil **32** (2,20 g; 10,12 mmol) foi tratada com piridina (22 mL) e anidrido acético (12,4 mL) sendo mantida sob agitação à temperatura ambiente por 18 horas. Após confirmar o consumo do material de partida por CCD, os solventes foram removidos por pressão reduzida e a mistura purificada por CCC (AcOEt/Hex 1:1 v/v → AcOEt/Hex 7:3 v/v). O produto **26** foi isolado como óleo âmbar com 71% de rendimento (2,79 g; 7,24 mmol) em mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  0,2 : 1,0. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) **anômero  $\beta$**   $\delta_{\text{H}}$ : 5,74 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8,0 Hz, H-1), 5,52 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,3 Hz,  $J_{4,5}$  1,6 Hz, H-4), 5,38 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  8,0 Hz,  $J_{2,3}$  10,0 Hz, H-2), 5,14 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,3 Hz,  $J_{2,3}$  10,0 Hz, H-3), 4,22 (m, 2H,  $\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ), 3,72 (dd, 2H,  $J_{4,5}$  1,6 Hz,  $J_{5,6a}$  6,1 Hz, H-5, H-6a), 3,67 (d, 1H,  $J_{5,6b}$  6,0 Hz, H-6b), 2,57 (t, 1H,  $J$  2,4 Hz,  $\text{HC}\equiv\text{C}$ ), 2,31; 2,26; 2,19; 2,15 (4x s, 12H, 4xCOCH<sub>3</sub>) (**Anexo 1**).

#### 3,4,6-Tri-*O*-acetil-D-galactal **39**

(CAMPO et al, 2007 ; CAMPO & CARVALHO, 2008)

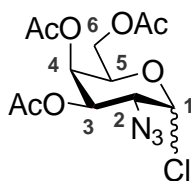


Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila (11,4 g; 27,75 mmol; 1,0 eq) foi solubilizado em mistura previamente preparada de ácido acético/água 4:6 v/v (60 mL) e acetato de sódio (9,12 g; 111,2 mmol; 4,0 eq) e então tratado com zinco metálico em pó (5,45 g; 83,4 mmol; 3,0 eq) e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (293,3 mg; 1,86 mmol; 0,067 eq). A agitação ocorreu em temperatura ambiente, com balão tampado com algodão, uma vez que se observou efervescência do meio reacional após 10 minutos de agitação. Após 3 horas sob agitação, a mistura reacional foi filtrada em funil de Buchner para remoção do Zn, e o sólido lavado com AcOEt. A fase orgânica foi particionada com mistura de solução  $\text{NaHCO}_3$  5% e gelo picado, seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto **39** foi isolado como um óleo amarelo viscoso após purificação por coluna cromatográfica (DCM/acetona 94:6

v/v), com 86,6% de rendimento (6,61 g, 24,3 mmol). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6,28 (dd, 1H,  $J_{1,3}$  1,7 Hz,  $J_{1,2}$  6,3 Hz, H-1), 5,41-5,37 (m, 1H, H-4), 5,27-5,24 (m, 1H, H-3), 4,60-4,58 (m, 1H, H-2), 4,24 (d largo, 1 H,  $J_{5,6b}$  6,2 Hz, H-6b), 4,11 (dd, 2H,  $J_{4,5}$  1,8 Hz,  $J_{5,6a}$  6,2 Hz, H-5, H-6a), 2,06; 2,02; 1,96 (9 H, 3s,  $3\times\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 2**).

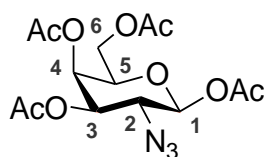
### Cloreto de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosila **28**

(CAMPO et al, 2007 ; CAMPO & CARVALHO, 2008)



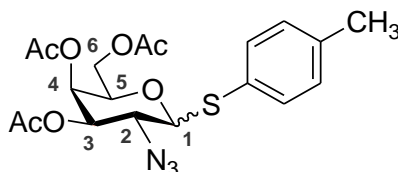
Uma solução de 3,4,6-Tri-*O*-acetil-D-galactal (8,93 g; 32,83 mmol 1,0 eq) em acetonitrila (140 mL) foi tratada lentamente com nitrato cérico de amônio (CAN) (22,1 g; 49,5 mmol; 1,5 eq) e  $\text{NaN}_3$  (3,0 g; 46,2 mmol; 1,4 eq). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e 30 minutos e, a seguir, diluída com  $\text{AcOEt}$ , particionada com  $\text{H}_2\text{O}$ , seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Após purificação por coluna cromatográfica ( $\text{AcOEt}$ /hexano 4:6 v/v), o produto azidonitrato foi isolado como um óleo amarelo com 25,2% de rendimento (2,98 g, 8,28 mmol). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6,27 (d, 1H,  $J$  4,3 Hz, H-1), 5,43 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  1,3 Hz,  $J_{4,3}$  3,1 Hz, H-4), 5,18 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,1 Hz,  $J_{3,2}$  11,2 Hz, H-3), 4,32-4,27 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  7,6 Hz,  $J_{5,6b}$  6,2 Hz, H-5), 4,13-4,05 (m, 3H, H-2, H-6a, H-6b), 2,11; 2,01; 1,98 (9 H, 3s,  $3\times\text{CH}_3\text{CO}$ ). O produto de azidonitração (2,98 g, 8,28 mmol, 1,0 eq) foi dissolvido em acetonitrila (60 mL) e então tratado com cloreto de tetraetilamônio (2,2 g; 12,42 mmol; 1,5 eq). A mistura foi aquecida à  $60^\circ\text{C}$  e agitada por 1 hora. O meio reacional foi diluído com  $\text{H}_2\text{O}$  e extraído com tolueno. A fase orgânica foi seca ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto azido clorado **28** foi isolado sem necessidade de posterior purificação como mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  1,0 : 0,5, com 86,7% de rendimento (6,62 g; 7,18 mmol). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) **anômero  $\alpha$**   $\delta_{\text{H}}$ : 6,28 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,6 Hz, H-1), 5,44 (d, 1H,  $J_{4,3}$  3,1 Hz, H-4), 5,18 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,1 Hz,  $J_{2,3}$  10,9 Hz, H-3), 4,89 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  3,6 Hz,  $J_{2,3}$  10,9 Hz, H-2), 4,30 (t, 1H,  $J_{5,6a/6b}$  6,0 Hz, H-5), 4,05-4,03 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2,11; 2,01; 1,97 (3 s, 9H,  $3\times\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 3**).

**1,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\beta$ -D-galactopiranosose 44**  
(MARCHIORI et al, 2015).



Primeiramente, foi realizada a preparação “*in situ*” do reagente TfN<sub>3</sub>. Assim, NaN<sub>3</sub> (598,5 mg, 9,2 mmol, 9,9 eq) foi solubilizada em água (1,5 mL), com agitação do sistema em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado DCM (2,5 mL) e gotejado Tf<sub>2</sub>O (0,433 mL, 2,56 mmol, 2,75 eq), mantendo a mistura sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. A fase orgânica foi então separada da aquosa, sendo neutralizada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Uma vez obtido o reagente TfN<sub>3</sub> foi realizada a dissolução do cloridrato de galactosamina (200 mg, 0,93 mmol, 1,0 eq) em água (3,0 ml) e posteriormente tratada com solução de CuSO<sub>4</sub> 1M (2,71 mg, 0,017 mmol, 0,018 eq), solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (231,3 mg, 1,67 mmol, 1,8 eq), metanol (3,0 mL) e toda a solução de TfN<sub>3</sub> em DCM. A mistura obtida foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 21 horas e concentrada sob pressão reduzida. O produto 2-N<sub>3</sub>-GalOH **43** (190,7 mg, 0,93 mmol) foi obtido com rendimento quantitativo sem purificação prévia. A seguir, **43** foi dissolvido em piridina (3,0 mL) e tratado com anidrido acético (2,5 mL), permanecendo sob agitação à temperatura ambiente por 5 horas e 30 minutos. Após remoção dos solventes sob pressão reduzida a purificação da mistura foi feita por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt: Hexano 7:3 v:v → AcOEt 100%), fornecendo apenas o anômero  $\beta$  **44** (275,2 mg, 0,77 mmol) como um óleo âmbar em rendimento de 82,4%. Uma análise de infra-vermelho (IV) do produto foi realizada, sendo possível observar uma banda em 2100 cm<sup>-1</sup>, característica do grupamento azido. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5,55 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8,5 Hz, H-1), 5,39 (d, 1H,  $J_{3,4}$  3,2 Hz, H-4), 4,96 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,2 Hz,  $J_{2,3}$  10,8 Hz, H-3), 4,13 (dd, 2H,  $J_{5,6a}$  6,8 Hz,  $J_{5,6b}$  4,3 Hz, H-6a, H-6b), 4,03 (d, 1H,  $J_{5,6a}$  6,8 Hz, H-5), 3,85 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  8,5 Hz,  $J_{2,3}$  10,8 Hz, H-2), 2,22; 2,18; 2,08; 2,05 (4x s, 12H, 4x COCH<sub>3</sub>) (**Anexo 4**).

**3,4,6-Tri-*O*-acetil-2-azido-2-didesóxi-1-tio- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosídeo de tolila 45**  
(LUO et al, 2013)

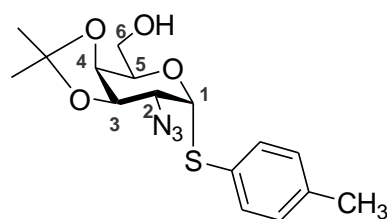




Uma solução de 2-desóxi-2-azido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosila **44** (334,2 mg; 0,93 mmol; 1,0 eq) em DCM anidro (2,5 mL) foi adicionada de mistura de 4-mercapto tolueno (*p*-tiocresol) (115,5 mg; 0,93mmol, 1,0 eq) também em DCM anidro (2,5 mL) e, posteriormente, de BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (345 μL; 2,79 mmol; 3,0 eq). A reação foi agitada por 20 horas à temperatura ambiente, acompanhada por CCD, e então neutralizada com adição de Et<sub>3</sub>N. Após remoção dos solventes e purificação por coluna cromatográfica (tolueno/AcOEt 8:2 v/v) o produto **45** foi isolado como um líquido viscoso amarelado com 56,7% de rendimento (280,5 mg; 0,64 mmol) em mistura de anômeros α/β na proporção 1:0,7. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub> : 7,50 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>8,1 Hz, *CH* STol arom.), 7,40 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>8,1 Hz, *CH* STol arom.), 7,14 (t, 4H, *J* 7,6 Hz, *CH* STol arom.), 5,61 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5,5 Hz, H-1α), 5,48 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,9 Hz, H-4α), 5,34 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,1 Hz, H-4β), 5,17 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,1 Hz, H-3α), 4,85 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,1 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10,3 Hz, H-3β), 4,77 (t, 1H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,5 Hz, H-5α), 4,46 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 10,1 Hz, H-1β), 4,29 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5,5 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,1 Hz, H-2α), 4,13 (dd, 2H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,6 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 10,1 Hz, H-6a, H-6b), 4,08 (d, 2H, *J*<sub>5,6a</sub> 6,5 Hz, H-6a, H-6b), 3,86 (t, 1H, *J*<sub>5,6</sub> 6,5 Hz, H-5β), 3,63 (t, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 10,1 Hz, H-2β), 2,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,15; 2,09; 2,06; 2,04; 2,03; 2,01 (6 s, 12H, 6xCH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 5**).

### 2-Azido-2-desóxi-3,4-*O*-isopropilideno-1-tio-α-D-galactopiranosídeo de tolila **46**

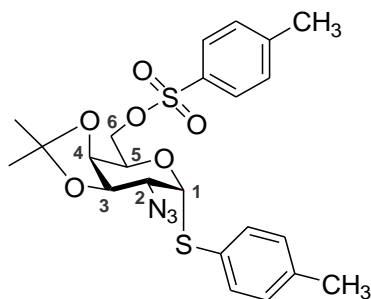
(WU & GUO, 2006; FERNÁNDEZ et al, 2016)



Primeiramente, foi realizada a desproteção de **45** utilizando solução de NaOMe em MeOH até pH básico (9~10). Após agitação da mistura por 6 horas o meio foi neutralizado com resina ácida Dowex 50X8-100 e filtrado para remoção da resina. Em seqüência, o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura purificada por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt/Hex 1:1 → AcOEt/MeOH 4:1). O produto desacetilado foi obtido com 54,7% de rendimento (44,3 mg, 0,14 mmol). A seguir, o produto obtido foi tratado com 2,2-dimetóxiopropano (2,2-DMP) (4,0 mL) e ácido *para*-toluenosulfônico (*p*-TsOH) (1,6 mg, 0,084 mmol, 0,056 eq) até pH 4,0. Após 20 horas sob agitação à temperatura ambiente o meio reacional foi neutralizado com Et<sub>3</sub>N e concentrado sob pressão reduzida. Apenas o anômero α **46** foi isolado após purificação por coluna clássica com sílica Flash (tolueno/AcOEt 7:3 v/v)

com 30,3% de rendimento (14,9 mg, 0,042 mmol). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7,34 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  7,8 Hz), 7,10 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  7,8 Hz), 5,70 (d, 1H,  $J_{1,2}$  5,1 Hz, H-1), 4,36 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,9 Hz, H-4), 4,26-4,19 (m, 3H, H-2, H-3 e H-5), 4,06 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,5 Hz, H-6a), 3,95 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  1,8 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,5 Hz, H-6b), 2,47 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -tiocresol), 1,68; 1,66 (2x s, 2x 3H, 2x $\text{CH}_3$ -DMP) (**Anexo 6**).

**2-Azido-2-desóxi-3,4-O-isopropilideno-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de tola 50**  
(CARVALHO et al, 2010)



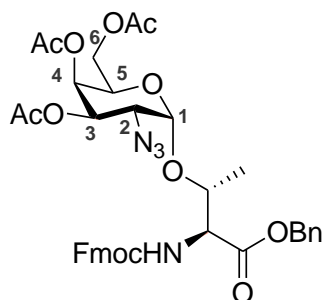
Uma mistura de 2-azido-2-desóxi-3,4-O-isopropilideno-1-tio- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **46** (37 mg; 0,11 mmol; 1,0 eq) em piridina anidra (2,0 mL) foi tratado com cloreto de tosila (TsCl) (50 mg; 0,26 mmol; 2,5 eq). Após agitação à 0°C por 5 horas a mistura foi aquecida até temperatura ambiente e ficou sob agitação por mais 40 horas. Uma vez não observada mudanças da CCD, foi realizada remoção do solvente sob pressão reduzida. A purificação da mistura por coluna clássica com sílica Flash (Hex 100%  $\rightarrow$  Hex/AcOEt 8:2 v/v), forneceu apenas o anômero  $\alpha$  **50** (8,0 mg, 0,016 mmol) com rendimento de 15%. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7,76 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,0 Hz), 7,37 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,0 Hz), 7,31 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,0 Hz), 7,11 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,0 Hz), 5,35 (d, 1H,  $J_{1,2}$  5,2 Hz, H-1), 4,78 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,8 Hz, H-4), 4,30-4,25 (m, 2H, H-3, H-5), 4,05-3,98 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2,44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -tosil), 2,34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -tiocresol), 1,46; 1,31 (2x s, 2x 3H, 2x  $\text{CH}_3$ -DMP) (**Anexo 7**).

**Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **27****

(CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008)

&

(LUO et al, 2013)

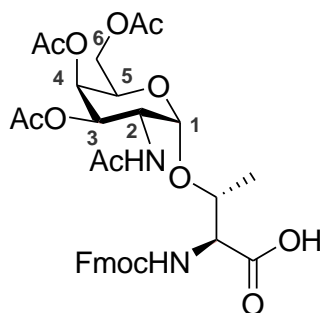


**Método A:** O aminoácido FmocThrOBn **29** (708 mg; 1,65 mmol; 0,5 eq) e o açúcar  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>Cl **28** (1,2 g; 3,29 mmol; 1,0 eq) foram solubilizados em 1,2-DCE (18 mL) e tratados com HgBr<sub>2</sub> (1,19 g; 3,29 mmol, 1,0 eq). A mistura foi mantida sob agitação e refluxo à 90°C por 24 horas com acompanhamento por CCD, sendo, a seguir, concentrada sob pressão reduzida e purificada por CCC com sílica Flash (AcOEt/tolueno 2:8 v/v). O glicoaminoácido **27** (852,4 mg; 1,15 mmol; 69,4%) foi obtido como óleo âmbar.

**Método B:** O aminoácido FmocThrOBn **29** (59 mg; 0,137 mmol; 1,0 eq), o açúcar 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub> **45** (66 mg; 0,151 mmol; 1,1eq) e NIS (46,2 mg; 0,21 mmol; 1,5 eq) foram dissolvidos em DCM anidro (2 mL) e tratados com TMSOTf (0,04 mmol; 7,5  $\mu$ L; 0,3 eq). Após 2 horas sob agitação à temperatura ambiente, com acompanhamento por CCD, foi feita extração da fase orgânica com solução de NaHCO<sub>3</sub> 5% e solução de tiosulfato de sódio 10%. Após remoção do solvente sob pressão reduzida foi realizada a purificação da mistura por coluna clássica com sílica Flash (tolueno 100%  $\rightarrow$  AcOEt/tolueno 8:2 v/v), sendo o glicoaminoácido **27** (70,4 mg; 0,09 mmol, 63%) obtido como óleo âmbar. RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ <sub>H</sub>: 7,80 (dd, 2H, *J* 7,5 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,65 (d, 2H, *J* 7,7 Hz, *CH* Fmoc arom.), 7,45-7,34 (m, 9 H, *CH* Fmoc arom, *CHO*Bn arom), 5,72 (d, 1H, *J* 9,6 Hz, *NH*Thr), 5,47 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,1 Hz, H-4), 5,33-5,20 (m, 3H, *CH*<sub>2</sub>OBn, H-3), 4,92 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,5 Hz, H-1), 4,52-4,37 (m, 4H, *CH*<sub>2</sub> Fmoc, *CH* $\alpha$ Thr, *CH* $\beta$ Thr), 4,31-4,23 (m, 2H, *CH* Fmoc, H-5), 4,10 (d, 2H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,3 Hz, H-6a, H-6b), 3,61 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,5 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-2), 2,18; 2,10; 2,06 (3x s, 9H, 3xCOCH<sub>3</sub>), 1,37 (d, 3H, *J* 6,3 Hz, *CH*<sub>3</sub>Thr) (**Anexo 8**).

***N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **52****

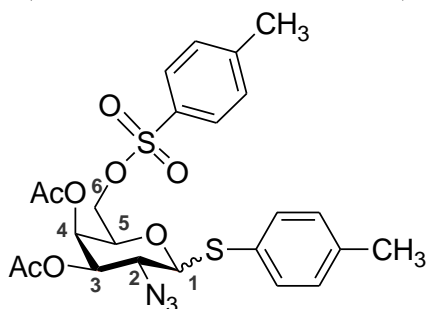
(CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008)



Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **27** (852,4 mg, 1,15 mmol) foi solubilizado em uma mistura de solventes THF/Ac<sub>2</sub>O/AcOH 3:2:1 v/v/v (11,0 mL) e tratado com Zn (647,7 mg; 9,89 mmol; 8,6 eq) e solução de CuSO<sub>4</sub> 1M (1,6 ml) para conversão do grupo azido em acetamido. Após agitação por 50 minutos, o produto  $\alpha$ GalNAc-ThrOBn foi obtido com 37% de rendimento (322 mg ; 0,43 mmol). A seguir, este produto foi solubilizado em MeOH (10 mL) e tratado com ácido acético glacial (1,0 mL) e Pd/C 10% (300 mg) para desproteção do grupo *O*-benzil. A mistura reacional foi agitada sob borbulhamento de H<sub>2</sub> (~1,5 atm) por 1 hora, sendo então filtrada em Celite, concentrada e purificada por coluna cromatográfica (DCM: MeOH 9:1 v/v). O produto **52** foi obtido com 44,6% de rendimento (163,8 mg, 0,19 mmol). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ <sub>H</sub>: 7,75 (t, 2H, *J* 7,2 Hz, CH Fmoc arom.), 7,62 (d, 2H, *J* 7,3 Hz, CH Fmoc arom.), 7,40-7,30 (m, 4H, CH Fmoc arom.), 6,07 (d, 1H, *J* 9,6 Hz, NH-Thr), 5,92 (d, 1H, *J* 8,6 Hz, NH), 5,39 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, H-4), 5,14 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,5 Hz, H-3), 5,05 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,5 Hz, H-1), 4,55-4,44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr), 4,27-4,17 (m, 3H, CH-Fmoc, H-5, H-2), 4,10 (dd, 2H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 5,0 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 14,3 Hz, H-6a, H-6b), 2,18 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 2,06; 1,99; 1,88 (3x s, 9H, 3x COCH<sub>3</sub>), 1,30 (d, 3H, *J* 6,1 Hz, CH<sub>3</sub>Thr) (Anexo 9).

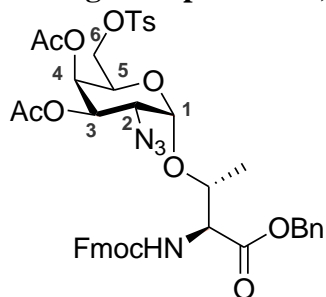
**3,4-Di-O-acetil-2-azido-2-desóxi-1-tio-6-p-tolueno sulfonil- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosídeo de tolila **58****

(MARCOTULLIO et al, 2006)



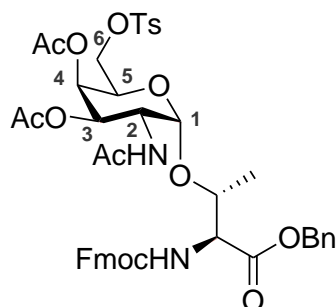
2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub>STol **44** (500 mg; 2,29 mmol; 1,0 eq) foi solubilizado em MeOH e tratado com solução 1M de NaOMe até pH básico (9~10). Após 3 horas sob agitação o meio foi neutralizado por adição de resina de troca ácida Dowex® 50X8-100 e a mistura filtrada e concentrada, sendo obtido o produto desacetilado. Este foi então adicionado, sem purificação prévia, de DCM anidro, e tratado com TsCl (2,5 eq) e Et<sub>3</sub>N (5,0 eq) após a mistura estar a 0°C. Após agitação por 2 horas, foi feita remoção do solvente sob pressão reduzida e purificação por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt: tolueno 8:2 v/v → AcOEt: tolueno 1:1 v/v), sendo o produto 2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal-STol **57** obtido como mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  na proporção 0,5: 1,0 (634,5 mg, 1,36 mmol, 64%). A seguir, **57** foi peracetilado pelo tratamento com piridina (9,0 mL) e anidrido acético (8,0 mL) após agitação à temperatura ambiente por 4 horas. Por fim, após remoção dos solventes sob pressão reduzida e purificação por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt: tolueno 2:8 v/v → AcOEt/ tolueno 1:1 v/v), fornecendo o produto **58** como mistura de anômeros  $\alpha/\beta$ , na proporção 1: 0,9 (746,8 mg; 1,36 mmol; 100%) como um óleo âmbar. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7,79 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  7,8 Hz, CH arom), 7,73 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,2 Hz, CH arom), 7,47 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  8,2 Hz, CH arom), 7,41-7,27 (m, 5H, CH arom), 7,20-7,14 (m, 5H, CH arom), 5,54 (d, 1H,  $J_{1,2}$  5,5 Hz, H-1 $\alpha$ ), 5,46 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,3 Hz, H-4 $\alpha$ ), 5,34 (d, 1H,  $J_{3,4}$  3,0 Hz, H-4 $\beta$ ), 5,13 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2,3 Hz,  $J_{2,3}$  11,1 Hz, H-3 $\alpha$ ), 4,84 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,1 Hz,  $J_{2,3}$  10,3 Hz, H-3 $\beta$ ), 4,79 (t, 1H,  $J_{5,6}$  6,1 Hz, H-5 $\alpha$ ), 4,44 (d, 1H,  $J_{1,2}$  10,1 Hz, H-1 $\beta$ ), 4,26 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  5,5 Hz,  $J_{2,3}$  11,1 Hz, H-2 $\alpha$ ), 4,13 (dd, 2H,  $J_{5,6a/6b}$  6,8 Hz,  $J_{6a,6b}$  10,1 Hz, H-6a, H-6b), 4,05 (d, 2H,  $J_{5,6a/6b}$  6,1 Hz, H-6a, H-6b), 3,87 (t, 1H,  $J_{5,6}$  6,1 Hz, H-5 $\beta$ ), 3,60 (t, 1H,  $J_{2,3}$  10,1 Hz, H-2 $\beta$ ), 2,45, 2,44 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>-tosil), 2,37 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>- tiocresol), 2,09; 2,06; 2,03; 2,00 (4 s, 12H, 4xCH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 10**).

**Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **59****



O aminoácido FmocThrOBn **29** (357 mg; 0,83 mmol; 1,0 eq), o açúcar 3,4-di-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-1-tio-6-*p*-toluenosulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **58** (454,6 mg; 0,83 mmol; 1,0 eq) e N-iodosuccinimida (NIS) (280 mg, 1,25 mmol, 1,5 eq) foram solubilizados em DCM anidro e tratados com TMSOTf (0,4 eq; 0,33 mmol; 44  $\mu$ L). Após 3 horas sob agitação à temperatura ambiente foi feita extração da fase orgânica com solução de NaHCO<sub>3</sub> 5% e solução de tiosulfato de sódio 10%, seguida de remoção do solvente por pressão reduzida e purificação por coluna clássica com sílica Flash (tolueno 100%  $\rightarrow$  AcOEt/tolueno 8:2 v/v). O aminoácido glicosilado **59** (490,9 mg; 0,57 mmol, 69%) foi obtido como um sólido âmbar. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ <sub>H</sub>: 7,78 (dd, 4H, *J* 4,5 Hz, *J* 7,7 Hz, CH Fmoc arom e CH tosíl arom.), 7,63 (d, 2H, *J* 7,4 Hz, CH Fmoc arom.), 7,44-7,31 (m, 11 H, CH Fmoc arom., CH tosíl arom. e CHOBn arom.), 5,68 (d, 1H, *J* 9,5 Hz, NHThr), 5,40 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,4 Hz, H-4), 5,28-5,18 (2xd, 2H, *J* 12,0 Hz, CH<sub>2</sub>OBn), 4,85 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,7 Hz, H-1), 4,46 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,4 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-3), 4,48-4,37 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Fmoc, CH<sub>2</sub> Fmoc, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr), 4,28-4,18 (m, 2H, CH Fmoc, H-5), 4,03 (dd, 2H, *J*<sub>5,6</sub> 6,2 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 15,7 Hz, H-6, H-6'), 3,55 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,7 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-2), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosil), 2,09; 2,07 (2x s, 6H, 2x COCH<sub>3</sub>), 1,27 (d, 3H, *J* 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>Thr) (**Anexo 11A**). ESI-MS: calcd. para C<sub>43</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>S[M+H]<sup>+</sup>: 857,2698, encontrado 857,2697 (**Anexo 11B**).

**Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **56****

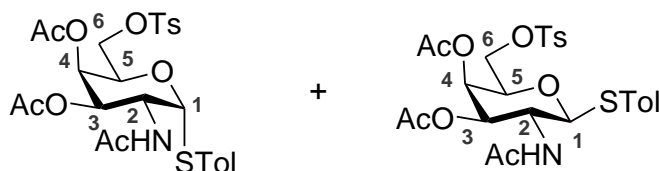


Solução de THF/Ac<sub>2</sub>O/AcOH 3:2:1 v/v/v (15 mL) foi adicionada ao composto **59** (698,70 mg; 0,82 mmol; 1,0 eq), seguida de zinco em pó (1,39 g; 21,22 mol; 26 eq) e solução de CuSO<sub>4</sub> 10% (135 µl). Após 35 minutos de agitação à temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em Celite e concentrada sob pressão reduzida. A purificação foi feita por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt/tolueno 3:7 v/v → AcOEt/tolueno 1:1 v/v), sendo o produto **56** (602,06 mg; 0,69 mmol) obtido como um sólido levemente amarelado com 84,6% de rendimento. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,78 (dd, 4H, *J* 8,1 Hz, *J* 10,6 Hz, *CHFmoc* arom e *CH* tosil arom.), 7,65 (d, 2H, *J* 7,7 Hz, *CHFmoc* arom.), 7,45-7,31 (m, 11 H, *CHFmoc* arom., *CH* tosil arom. e *CHOBn* arom.), 5,99 (d, 1H, *J* 9,6 Hz, *NHThr*), 5,85 (d, 1H, *J* 9,5 Hz, *NHCO*), 5,33 (s largo, 1H, Hz, H-4), 5,19 (d, 1H, *J* 11,9 Hz, *CH<sub>2a</sub>OBn*), 5,09-5,02 (m, 2H, *CH<sub>2b</sub>OBn*, H-3), 4,75 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,4 Hz, H-1), 4,51-4,39 (m, 4H, *CH<sub>2</sub>Fmoc*, *CH<sub>α</sub>Thr*, *CH<sub>β</sub>Thr*), 4,29-4,12 (m, 3H, *CHFmoc*, H-5, H-2), 4,05-3,98 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2,43 (s, 3H, *CH<sub>3</sub>-tosil*), 2,07 (s, 3H, *NHCOCH<sub>3</sub>*), 2,00; 1,96 (s, 6H, 2x*COCH<sub>3</sub>*), 1,23 (d, 3H, *J* 6,2 Hz, *CH<sub>3</sub>Thr*) (**Anexo 12A**). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ<sub>C</sub>: 178,2 (*CO* benzil); 170,8; 170,6; 170,5 (*COCH<sub>3</sub>*), 170,1 (*COCH<sub>2</sub>Ph*), 156,5 (*CO* Fmoc), 145,2; 143,8; 143,7; 141,4 (*C* quat. Fmoc Ph), 137,8 (*C* quat.tosil), 134,5 (*C* quat.OCH<sub>2</sub>Ph), 132,6 (*C*quat.tosil), 129,9; 129,0; 128,7; 128,6; 128,2; 128,0; 127,8; 127,1; 125,3; 125,1 (*CH* Ph), 99,6 (*C*-1), 76,3 (*C*-3), 68,3 (*C*-5), 67,8 (*OCH<sub>2</sub>Ph*), 67,3 (*CH<sub>2</sub>Fmoc*), 67,2 (*C*-4), 67,0 (*C*-6), 58,6 (*CHThr*), 47,4 (*C*-2), 47,3 (*CH* Fmoc), 23,1 (*CH<sub>3</sub>-tosil*), 21,6; 20,7; 20,6 (*COCH<sub>3</sub>*), 18,2 (*CH<sub>3</sub>Thr*) (**Anexo 12 B**). ESI-MS: calcd. para C<sub>45</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>SNa<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: 895,2718, encontrado 895,2723 (**Anexo 12 C**).

**2-Acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desóxi-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil-α-D-galactopiranosídeo de tolila 62α**

e

**2-Acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desóxi-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil-β-D-galactopiranosídeo de tolila 62β**



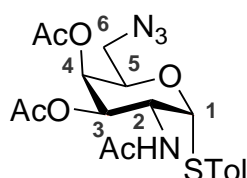
Uma solução de STol-2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal(OAc)<sub>2</sub> **58** (340 mg; 0,62 mmol; 1,0 eq) em uma mistura de solventes THF/Ac<sub>2</sub>O/AcOH 3:2:1 v/v/v (15 mL) foi tratada com Zn (1,046 g; 16,09 mmol; 26 eq) e solução de CuSO<sub>4</sub> 10% (280 µL) para conversão do grupo azido em acetamido. A mistura ficou sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos, sendo posteriormente filtrada em Celite, concentrada sob pressão reduzida e purificada por coluna

cromatográfica com sílica Flash (tolueno/AcOEt 8:2 → tolueno/AcOEt 1:1 v/v). Os produtos **62α** e **62β** foram obtidos com 46,7% (163,7 mg; 0,29 mmol) e 26,5% (92,7 mg; 0,16 mmol) de rendimento, respectivamente.

**62α** – RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,70 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>8,3 Hz, CH arom), 7,33 (dd, 4H, *J* 4,5 Hz, *J* 10,9 Hz, CH arom), 7,11 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub> 7,1 Hz, CH arom), 6,02 (d, 1H, *J* 8,7 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,61 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5,6 Hz, H-1), 5,42 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, H-4), 5,09 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,9 Hz, H-3), 4,83-4,74 (m, 2H, H-2, H-5), 4,06 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 5,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 9,5 Hz, H-6a), 4,01 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 6,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 9,5 Hz, H-6b), 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosil), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,06 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,01 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 14**).

**62β** – RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,77 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>7,8 Hz, CH arom), 7,73 (t, 4H, *J*8,4 Hz, CH arom), 7,11 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>7,9 Hz, CH arom), 5,51 (d, 1H, *J* 9,2 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,35 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,0 Hz, H-4), 5,14 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,0 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,3 Hz, H-3), 4,80 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 10,4 Hz, H-1), 4,19 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8 Hz, H-6a), 4,11 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,9 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8 Hz, H-6b), 4,02 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 10,4 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,3 Hz, H-2), 3,94 (t, 1H, *J*<sub>5,6a/6b</sub> 6,2 Hz, H-5), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosil), 2,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,03 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 1,98; 1,99 (s largo, 6H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 15**).

**2-Acetamido-3,4-di-O-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-1-tio-α-D-galactopiranosídeo de tola 63α**  
(CARVALHO et al, 2010).



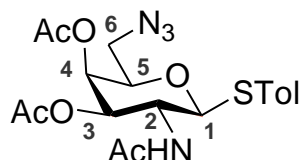
Uma solução de 6-OTs-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **62α** (163 mg; 0,29 mmol; 1,0 eq) em DMF anidro (4,0 mL) foi adicionada de azida de sódio (151 mg; 2,32 mmol; 8,0 eq) e deixada sob agitação à 75°C por 44 horas. A seguir, o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura reacional purificada por coluna cromatográfica (tolueno:AcOEt 7:3 → tolueno/AcOEt 1:1 v/v), sendo o produto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **63α** obtido com rendimento quantitativo (126,6 mg; 0,29 mmol). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,41 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub> 8,1 Hz, CH arom STol), 7,15 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub>8,1 Hz, CH arom STol), 6,29 (d, 1H, *J* 8,7 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,75 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5,2 Hz, H-1), 5,42 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, H-4), 5,18 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,5 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,9 Hz, H-3), 4,88 (ddd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5,2 Hz, *J*<sub>2,NH</sub> 8,7 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,9 Hz, H-2), 4,70 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,1 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> 4,5 Hz, H-5), 3,44 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8 Hz, H-6a), 3,16 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 4,5 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8



Hz, H-6b), 2,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,19 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,04 (s largo, 6H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (Anexo 16).

**2-Acetamido-3,4-di-O-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-1-tio-β-D-galactopiranosídeo de *p*-tolila 63β**

(CARVALHO et al, 2010).



Uma solução de 6-OTs-βGalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **62β** (92,7 mg; 0,16 mmol; 1,0 eq) em DMF anidra (3,0 mL) foi adicionada de azida de sódio (85,3 mg; 1,32 mmol; 8,0 eq) e deixada sob agitação a 75°C por 41 horas. A seguir, o solvente foi removido por pressão reduzida e a mistura reacional purificada por coluna cromatográfica (tolueno:AcOEt 7:3 → tolueno/AcOEt 1:1 v/v), sendo o produto 6-N<sub>3</sub>-βGalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **63β** obtido com rendimento quantitativo (76,4 mg; 0,16 mmol). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,30 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub> 8,0 Hz, CH arom STol), 7,13 (d, 2H, *J*<sub>orto</sub> 8,0 Hz, CH arom STol), 5,71 (d, 1H, *J* 9,1 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,15 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,0 Hz, H-4), 5,18 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,0 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-3), 4,67 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 9,1 Hz, H-1), 4,05 (dt, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 9,1 Hz = *J*<sub>2,NH</sub> 9,1 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-2), 3,75 (t, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> = *J*<sub>5,6b</sub> 6,5 Hz, H-5), 3,15 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 6,5 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 14,0 Hz, H-6a), 2,91 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 6,5 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 14,0 Hz, H-6b), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tiocresol), 2,15 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,01; 1,97 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (Anexo 17).

**2-Acetamido-3,4-di-O-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-α-D-galactopiranosose 64**

e

**2-Acetamido-4-O-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-α-D-galactopiranosose 65**

(CAI et al, 2009 b)



O composto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **63α** (140,5 mg; 0,32 mmol; 1,0 eq) foi solubilizado em uma mistura de acetona/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v (4,0 mL) e adicionado de N-bromosuccinamida (NBS) (170, 9 mg; 0,96 mmol; 3,0 eq). A mistura reacional ficou sob agitação por 35 minutos à temperatura ambiente, sendo então neutralizada por adição de Et<sub>3</sub>N. Após remoção dos solventes sob pressão reduzida, a mistura reacional foi purificada por

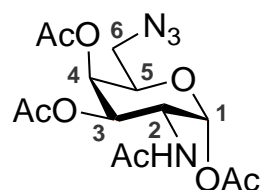
coluna cromatográfica com sílica Flash (tolueno:AcOEt 1:1 → AcOEt), sendo os produtos 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **64** (53,9 mg; 0,16 mmol) e 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc) **65** (18,4 mg; 0,064 mmol) obtidos com 50% e 20% de rendimento, respectivamente.

**64** - RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 5,96 (d, 1H, *J* 9,4 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,34 (d, 2H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>1,2</sub> 3,2 Hz, H-1, H-4), 5,26 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,2 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 11,2 Hz, H-3), 4,57-4,50 (m, 2H, H-2, OH), 4,35 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,2 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> 4,5 Hz, H-5), 3,44 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,2 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8 Hz, H-6a), 3,22 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 4,5 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,8 Hz, H-6b), 2,19 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,02; 2,00 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 18**).

**65** - RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ<sub>H</sub>: 5,96 (d, 1H, *J* 9,4 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,36 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 3,6 Hz, H-1), 5,28 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,2 Hz, H-4), 4,38-4,30 (m, 1H, H-2), 4,26 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,5 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> 3,9 Hz, H-5), 4,01 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3,2 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10,8 Hz, H-3), 3,40 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 8,5 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,9 Hz, H-6a), 3,30 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 3,9 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,9 Hz, H-6b), 2,22 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 19**).

### 2-Acetamido-1,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-α-D-galactopirranose **66**

(CARVALHO et al, 2010 - método B).

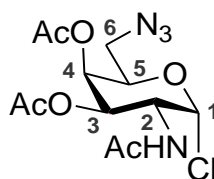


**Método A:** Os glicosídeos 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **64** (20 mg, 0,06 mmol) ou 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc) **65** (17,3 mg, 0,06 mmol) foram separadamente solubilizados em piridina (1,0 mL) e adicionados de anidrido acético (1,0 mL). As misturas reacionais ficaram sob agitação à temperatura ambiente por 4 horas, sendo purificadas por colunas cromatográficas em sílica Flash (AcOEt: hexano 2:8 v/v). Ambas reações forneceram o mesmo produto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** em rendimentos quantitativos (22,3 mg; 0,06 mmol).

**Método B:** O composto 6-OTs-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **73** (45 mg; 0,09 mmol, 1,0 eq) foi solubilizado em DMF anidro (2,0 mL) e tratado com NaN<sub>3</sub> (45,8 mg; 0,7 mmol; 8,0 eq). A mistura ficou sob agitação à 75°C por 22 horas, sendo o solvente removido por pressão reduzida e a mistura reacional purificada por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt/Hex 8:2 v/v → AcOEt). O produto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** foi isolado com 66,5% de rendimento (21,8 mg; 0,058 mmol).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6,24 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,6 Hz, H-1), 5,59 (d, 1H,  $J$  9,1 Hz,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 5,41 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,6 Hz, H-4), 5,22 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2,6 Hz,  $J_{2,3}$  11,6 Hz, H-3), 4,73 (ddd, 1H,  $J_{1,2}$  3,6 Hz,  $J_{2,\text{NH}}$  9,1 Hz,  $J_{2,3}$  11,6 Hz, H-2), 4,11 (t largo, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  6,4 Hz, H-5), 3,44 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  7,3 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,8 Hz, H-6a), 3,22 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  5,7 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,8 Hz, H-6b), 2,20 (s, 3H,  $\text{NHCH}_3\text{CO}$ ), 2,19; 2,04; 1,95 (3x s, 3x 3H, 3x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 20 A**). ESI-MScaled. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 395,1172, encontrado: 395,1173 (**Anexo 20 B**).

**Cloreto de 2-acetamido-6-azido-2,6-didesóxi-3,4-di-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila 67**  
(CAMPO et al, 2017)

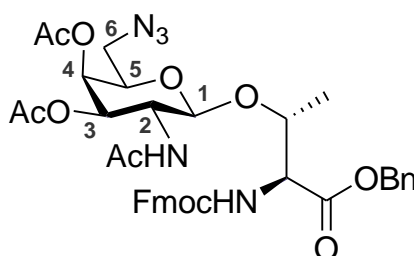


Uma solução do composto 6- $\text{N}_3$ - $\alpha$ GalNAc(OAc) $_3$  **66** (70 mg; 0,19 mmol) em AcCl (4,0 mL) foi resfriada a  $-30^\circ\text{C}$  e então borbulhada com HCl(g) por 1 hora e 30 minutos. A seguir, a mistura reacional foi conduzida à temperatura ambiente e mantida sob agitação por mais 23 horas, sendo, por fim, coevaporada repetidas vezes com tolueno. Após duas purificações por coluna cromatográfica com sílica Flash (tolueno  $\rightarrow$  tolueno/AcOEt 1:1 v/v), o produto  $\alpha$  clorado **67** foi obtido com 23,4% de rendimento (14,1 mg; 0,04 mmol). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6,28 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz, H-1), 5,72 (d, 1H,  $J$  8,9 Hz,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 5,43 (d, 1H,  $J_{3,4}$  3,2 Hz, H-4), 5,28 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,2 Hz,  $J_{2,3}$  11,3 Hz, H-3), 4,79 (ddd, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz,  $J_{2,\text{NH}}$  8,9 Hz,  $J_{2,3}$  11,3 Hz, H-2), 4,37 (t, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  6,4 Hz, H-5), 3,48 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  7,4 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,9 Hz, H-6a), 3,28 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  5,3 Hz,  $J_{6a,6b}$  12,9 Hz, H-6b), 2,19 (s, 3H,  $\text{NHCH}_3\text{CO}$ ), 2,03; 2,00 (2x s, 2x 3H, 2x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 21**).

**Éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina 68**

(CAMPO et al, 2017 - método A)

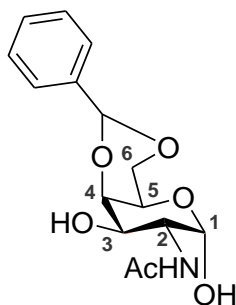
(HUANG; WANG; HUANG, 2004; NIKSERESHT, 2016 - método B)



**Método A:** Uma solução de cloreto 6-N<sub>3</sub>-GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **67** (35 mg; 0,10 mmol; 1,0 eq) e FmocThrOBn **29** (22,5 mg; 55 μmol; 0,5 eq) em 1,2-DCE (4,0 mL) foi tratada com HgBr<sub>2</sub> (37,9 mg; 0,11 mmol; 1,0 eq) e deixada sob agitação à 75°C por 44 horas. A seguir, o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura reacional purificada por coluna cromatográfica (Hexano 100% → AcOEt/Hex 7:3 v/v). O aminoácido glicosilado β **68** foi obtido como óleo levemente amarelado com 16,2% de rendimento (10,7 mg; 0,015 mmol).

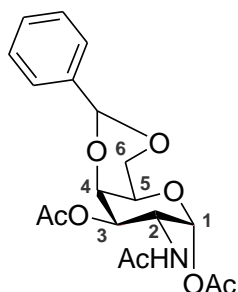
**Método B:** Uma solução de 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** (25 mg; 0,067 mmol; 1,0 eq) e FmocThrOBn **29** (34,7 mg; 0,08 mmol; 1,2 eq) em DCM anidro (2,0 mL) foi tratada com SnCl<sub>4</sub> (5,5 μL; 0,047 mmol; 0,7 eq) e deixada sob agitação por 7 horas à 55°C e 11 horas à temperatura ambiente. A seguir, foi feita partição do meio reacional com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e DCM. Após remoção do solvente sob pressão reduzida, a mistura reacional foi purificada por coluna cromatográfica com sílica Flash (Hexano → AcOEt/Hex 3:7 v/v), sendo o aminoácido glicosilado **68** obtido com 19,3% de rendimento (9,6 mg; 12 μmol). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ<sub>H</sub>: 7,78 (d, 2H, *J* 7,3 Hz, *Harom*), 7,67 (d, 2H, *J* 7,3 Hz, *Harom*), 7,44-7,30 (m, 9H, *Harom*), 5,84 (d, 1H, *J* 9,2 Hz, *NHCOCH<sub>3</sub>*), 5,64 (d, 1H, *J* 8,4 Hz, *NHCOCH<sub>3</sub>*), 5,31-5,20 (m, 4H, H-3, H-4, CH<sub>2</sub>OBn), 4,66 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8,3 Hz, H-1), 4,51-4,36 (m, 4H, CH<sub>α</sub>-Thr, CH<sub>β</sub>-Thr, CH<sub>2</sub>Fmoc), 4,26 (t, 1H, *J* 7,1 Hz, CHFmoc), 3,87 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8,3 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10,8 Hz, H-2), 3,58-3,54 (m, 1H, H-5), 3,33 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 7,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,7 Hz, H-6a), 3,12 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 5,7 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,7 Hz, H-6b), 2,15 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,02, 1,95 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>CO), 1,23 (d, 1H, *J* 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>-Thr) (**Anexo 22 A**). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ<sub>C</sub>: 170,7 (CO benzil); 170,6; 170,2 ;170,1 (COCH<sub>3</sub>), 156,9 (CO Fmoc), 144,1; 143,8; 141,4 (C quat. Fmoc Ph), 135,6 (C quat.OCH<sub>2</sub>Ph), 128,7; 128,4; 128,2; 127,7; 127,2; 125,3; 125,2; 120,0 (CH Ph), 99,7 (C-1), 74,2 (C-3), 72,1 (C-5), 69,5 (C-4), 67,3 (OCH<sub>2</sub> Ph), 67,2 (OCH<sub>2</sub> Fmoc) 58,8 (CH<sub>β</sub>Thr), 51,7 (C-2), 50,3 (C-6), 47,3 (CH Fmoc), 29,7 (CH<sub>α</sub>Thr), 23,5; 20,70; 20,72 (COCH<sub>3</sub>), 16,9 (CH<sub>3</sub>Thr) (**Anexo 22 B**). ESI-MScald. para C<sub>38</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: 766,2695, encontrado: 766,2695 (**Anexo 22 C**).

**2-Acetamido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosose 69**  
(PANCHADHAYEE & MISRA, 2008)



Solução de NHAc-galactosamina (750 mg; 3,4 mmol; 1,0 eq) em MeCN (15 mL) foi tratada com benzaldeído dimetilacetal (560  $\mu$ L; 3,73 mmol; 1,1 eq) e  $I_2$  (86 mg; 0,34 mmol; 0,1 eq). A mistura reacional foi mantida sob agitação à 40°C por 22 horas, sendo posteriormente purificada por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt/MeOH 9:1 v/v  $\rightarrow$  AcOEt/MeOH 7:3 v/v). O produto 4,6-protégido **69** foi isolado como sólido branco com 74,5% de rendimento (783,8 mg; 2,53 mmol). RMN  $^1H$  (MeOD, 300 MHz)  $\delta_H$ : 7,57-7,53 (m, 2H, CH arom.), 7,35-7,32 (m, 3H, CH arom.), 5,62 (s, 1H, H-benzilideno), 5,21 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,3 Hz, H-1), 4,30 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3,1 Hz,  $J_{2,3}$  11,1 Hz, H-3), 5,25 (d, 1H,  $J_{3,4}$  3,1 Hz, H-4), 4,14-4,12 (m, 1H, H-5), 3,98 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  3,3 Hz,  $J_{2,3}$  11,1 Hz, H-2), 3,93 (s largo, 1H, H-6a), 1,98 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO) (Anexo 23).

**2-Acetamido-1,3-di-*O*-acetil-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosose 70**

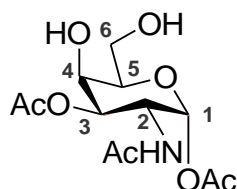


O composto 4,6-benzilideno- $\alpha$ GalNAc **69** (783,8 mg; 2,53 mmol) foi solubilizado em piridina (5,0 mL) e tratado com anidrido acético (5,0 mL). A mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas e 40 minutos, e após consumo do material de partida, acompanhado por CCD, foi realizada remoção do solvente sob pressão reduzida e purificação por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt/Hex 1:1 v/v  $\rightarrow$  AcOEt 100%). O produto  $\alpha$  acetilado **70** foi isolado como óleo amarelado com 80,8% de rendimento (803,9 mg; 2,04 mmol). RMN  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_H$ : 7,45 (s largo, 2H, CH arom.), 7,32 (s largo, 3H, CH arom.), 6,26 (s largo, 1H, H-1), 5,56 (d, 1H,  $J$  8,5 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,48 (s, 1H, H-benzilideno), 5,18 (d, 1H,  $J_{2,3}$  10,1 Hz, H-3), 4,83 (t, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  10,1 Hz, H-5), 4,28 (s largo, 1H, H-4), 4,20 (d, 1H,

$J_{6a/6b}$  12,3 Hz, H-6a), 3,96 (d, 1H,  $J_{6a/6b}$  12,3 Hz, H-6b), 3,74 (s largo, 1H, H-2), 2,04 (s, 3H,  $\text{NHCH}_3\text{CO}$ ), 2,09; 1,87 (2x s, 2x 3H, 2x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 24**).

### 2-Acetamido-1,3-di-O-acetil-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosose 71

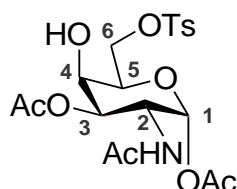
(PADRÓN; MORALES; VÁZQUES, 1998)



4,6-benzilideno- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **70** (803,9 mg; 2,04 mmol) foi tratado com mistura de AcOH/H<sub>2</sub>O 8:2 v/v (30 mL) e deixado sob agitação à 60°C por 1 hora. A seguir, o meio reacional foi coevaporado com tolueno diversas vezes e, após remoção dos solventes sob pressão reduzida, foi purificado por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt 100% → AcOEt/MeOH 9:1 v/v). O produto desprotegido nas posições 4 e 6  $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **71** foi obtido com 46% de rendimento (369,2 mg; 0,94 mmol). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 6,17 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz, H-1), 5,05 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2,4 Hz,  $J_{2,3}$  11,6 Hz, H-3), 4,70 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz,  $J_{2,3}$  11,6 Hz, H-2), 4,17 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,4 Hz, H-4), 3,97 (t, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  6,1 Hz, H-5), 3,70 (d, 2H,  $J_{5,6a/6b}$  6,1 Hz, H-6a, H-6b), 2,10 (s, 3H,  $\text{NHCH}_3\text{CO}$ ), 2,16, 1,93 (2x s, 2x 3H, 2x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) (**Anexo 25**).

### 2-Acetamido-1,3-di-O-acetil-2-desóxi-6-p-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila 72

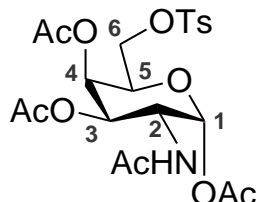
(MARCOTULLIO et al, 2006)



O composto  $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **71** (369,2 mg; 0,94 mmol, 1,0 eq) foi tratado com DCM anidro (25 mL) e, posteriormente, com solução de TsCl (306 mg; 1,61 mmol; 1,5 eq) em DCM anidro (2,0 mL) e Et<sub>3</sub>N (745  $\mu$ L; 5,35 mmol; 5,0 eq). A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 19 horas, sendo então realizada a remoção do solvente sob pressão reduzida e purificação por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt/Hex 7:3 v/v → AcOEt 100%). O produto tosilado 6-OTs-1,3- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **72** foi obtido com 70% de rendimento (342,2 mmol; 0,75 mmol) como óleo amarelado. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7,76 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  7,7 Hz, CH arom. tosil), 7,34 (d, 2H,  $J_{\text{orto}}$  7,7 Hz, CH arom. tosil), 6,09 (s largo, 1H, H-1), 5,71 (d, 1H,  $J$  9,1 Hz,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 5,13 (d, 1H,  $J_{2,3}$  11,0 Hz, H-3), 4,73 (t largo, 1H,  $J_{2,3}$  8,8 Hz, H-2), 4,26 (dd, 1H,  $J_{5/6a}$  7,1 Hz,  $J_{6a/6b}$  9,3 Hz, H-6a), 4,19-4,13 (m,

2H, H-4, H-5), 4,05 (dd, 1H,  $J_{5/6b}$  6,3 Hz,  $J_{6a/6b}$  9,3 Hz, H-6b), 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosil), 2,10 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,15; 1,91 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 26**).

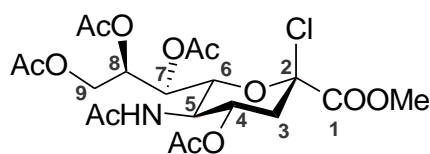
### 2-Acetamido-1,3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila **73**



Uma mistura de 6-OTs-1,3- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **72** (442,9 mg; 0,96 mmol) em piridina (3,5 mL) foi tratada com anidrido acético (3,0 mL), permanecendo sob agitação à temperatura ambiente por 4 horas. Após remoção do solvente sob pressão reduzida e purificação a mistura por coluna cromatográfica com sílica Flash (AcOEt/Hex 7:3 v/v), o produto acetilado em C-4 6-OTs- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>3</sub> **73** foi obtido com 83,7% de rendimento (410,5 mg; 0,80 mmol). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_H$ : 7,72 (d, 2H,  $J_{orto}$  8,3 Hz, CH arom. tosil), 7,33 (d, 2H,  $J_{orto}$  8,3 Hz, CH arom. tosil), 6,14 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,6 Hz, H-1), 5,62 (d, 1H,  $J$  9,1 Hz, NHCOCH<sub>3</sub>), 5,41 (d, 1H,  $J_{3,4}$  2,7 Hz, H-4), 5,17 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2,7 Hz,  $J_{2,3}$  11,6 Hz, H-3), 4,67-4,59 (m, 1H, H-2), 4,27 (t, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  6,4 Hz, H-5), 3,98-3,96 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosil), 2,04 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>CO), 2,14; 1,99; 1,92 (3x s, 3x 3H, 3x CH<sub>3</sub>CO) (**Anexo 27**).

### Metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetil-2-cloro-2,3,5-trideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosonato **76**

(WEIWER et al, 2009; YANG et al, 2012)



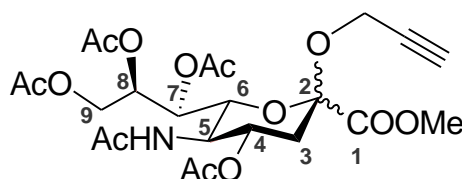
Mistura de éster metílico de ácido siálico peracetilado **75** (400 mg; 0,75 mmol; 1,0 eq) em AcCl (8,0 mL) foi resfriada a -30°C e, a seguir, borbulhada com HCl(g) por cerca de 1 hora e 30 minutos até saturar o meio. A mistura foi então retornada à temperatura ambiente e mantida sob agitação por mais 24 h. Após término da reação, a mistura foi concentrada a vácuo e co-evaporada com tolueno por várias vezes, sendo obtido apenas o anômero  $\beta$  do produto clorado **76** como um sólido branco amorfo (221 mg; 0,43 mmol; 57%) sem necessidade de purificação. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta_H$ : 5,49-5,46 (m, 2H, NH, H-7), 5,38 (dd,  $J_{3e,4}$  4,8 Hz,  $J_{4,5}$  10,5 Hz, H-4), 5,17 (td, 1H,  $J_{8,9b}$  2,6 Hz,  $J_{8,7}$  6,2 Hz, H-8), 4,42 (dd, 1H,  $J_{8,9b}$  2,6 Hz,  $J_{9a,b'}$  12,5 Hz, H-9b), 4,35 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  12,5 Hz,  $J_{6,7}$  2,3 Hz, H-6), 4,20 (d,

1H,  $J_{4,5}$  10,5 Hz, H-5), 4,06 (dd, 1H,  $J_{8,9a}$  5,8 Hz,  $J_{9a,9b}$  12,5 Hz, H-9a), 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2,78 (dd, 1H,  $J_{3e,4}$  4,8 Hz,  $J_{3a,3e}$  13,9 Hz, H-3e), 2,35-2,23 (m, 1H, H-3a), 2,10; 2,07; 2,05; 2,05 (4x s, 4 x 3H, 4xCOCH<sub>3</sub>), 1,91 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) (**Anexo 29**).

**Metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-2-propargil-2,3,5-trideoxi-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato 24  $\alpha/\beta$**

(WU & GUO, 2006)

(WEIWER et al, 2009; YANG et al, 2012)



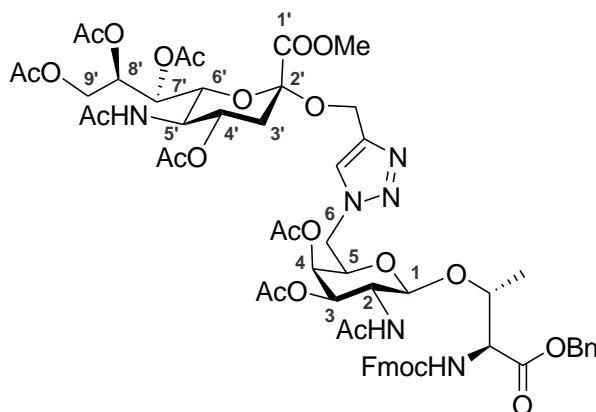
**Método A:** Solução de éster metílico de  $\alpha,\beta$ -2,4,7,8,9-penta-*O*-acetil-*N*-acetilneurâmico **75** (200 mg; 0,38 mmol; 1,0 eq) em DCM anidro (5,0 mL) foi resfriada a 0°C e tratada com álcool propargílico (33  $\mu$ L; 0,56 mmol; 1,5 eq) e BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O (92  $\mu$ L; 0,75 mmol; 2,0 eq). Após 17 horas sob agitação à temperatura ambiente a mistura reacional foi neutralizada com adição de Et<sub>3</sub>N e concentrada sob pressão reduzida. A purificação foi realizada por coluna clássica com sílica Flash (AcOEt/hexano 1:1 v/v  $\rightarrow$  AcOEt 100%), fornecendo o derivado funcionalizado com o grupo alcino **24  $\alpha/\beta$**  como mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  na proporção 0,25:0,75 (151,9 mg; 0,29 mmol, 75,5%) como um sólido branco. **Anômero  $\beta$**  RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ <sub>H</sub>: 5,96 (d, 1H,  $J_{NH,5}$  9,5 Hz, NHCO), 5,37 (dd, 1H,  $J_{6,7}$  5,1 Hz,  $J_{7,8}$  6,7 Hz, H-7), 5,29-5,20 (m, 2H, H-8, H-4), 4,81 (dd, 1H,  $J_{9a,9b}$  2,1 Hz,  $J_{8,9b}$  12,3 Hz, H-9b), 4,19 (m, 2H, HC≡CCH<sub>2</sub>), 4,09-4,02 (m, 3H, H-5, H-6, H-9a), 3,77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2,53 (t, 1H,  $J$  2,1 Hz, HC≡C), 2,44 (dd, 1H,  $J_{3e,4}$  5,2 Hz,  $J_{3a,3e}$  12,4 Hz, H-3e), 2,10; 2,05; 2,01; 1,99 (4 s, 4x 3H, 4x COCH<sub>3</sub>), 1,91 (d, 1H,  $J$  12,4 Hz, H-3a), 1,84 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) (**Anexo 28 A**). ESI-MS: calcd. para C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>13</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: 552,1688, encontrado 552,1689 (**Anexo 28 B**).

**Método B:**  $\beta$ -cloreto de ácido siálico **76** (221 mg; 0,43 mmol; 1,0 eq) e peneira molecular de 4 Å (200 mg) foram adicionados de DCM anidro (5 mL) e álcool propargílico (0,86 mmol, 50  $\mu$ L). A seguir, essa mistura foi resfriada a -20 °C sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>(g) e agitada durante 1 hora antes de ser tratada com AgOTf (132,6 mg, 0,52 mmol) em tolueno seco (1 mL). Após adição do catalisador, a reação foi aquecida até a temperatura ambiente e permaneceu sob agitação por mais 4 horas. A seguir, o meio reacional foi neutralizado pela adição de Et<sub>3</sub>N, filtrado através de Celite e concentrado sob pressão reduzida, sendo então a



mistura purificada por coluna cromatografia clássica com sílica Flash (EtOAc/hexano 7:3 v:v). O produto **24**  $\alpha/\beta$  foi obtido como mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  0,45:0,55 com 66% de rendimento (150,3 mg, 0,28 mmol). **Anômero  $\alpha$**  - RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5,46-5,40 (m, 2H, NH, H-7), 5,33-5,24 (m, 2H, H-8, H-4), 4,83 (dd, 1H,  $J_{\text{CH2a/C}\equiv\text{CH}}$  2,4 Hz,  $J_{\text{CH2a/CH2b}}$  12,5 Hz,  $\text{C}\equiv\text{CCH}_{2\text{a}}$ ), 4,06 (dd, 1H,  $J_{8,9\text{b}}$  2,5 Hz,  $J_{9,9'}$  15,7 Hz, H-9b), 4,30 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  12,5 Hz,  $J_{6,7}$  2,7 Hz, H-6), 4,22 (dd, 1H,  $J_{\text{CH2b/C}\equiv\text{CH}}$  2,4 Hz,  $J_{\text{CH2a/CH2b}}$  12,5 Hz,  $\text{C}\equiv\text{CCH}_{2\text{b}}$ ), 4,14-4,06 (m, 2H, H-5, H-9a), 3,82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,65 (dd, 1H,  $J_{3\text{e},4}$  4,4 Hz,  $J_{3\text{a},3\text{e}}$  12,8 Hz, H-3e), 2,45 (t, 1H,  $J$  2,4 Hz,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ) 2,15; 2,10; 2,05; 2,03 (4x s, 4x 3H, 4x  $\text{COCH}_3$ ), 1,97 (d, 1H,  $J_{3\text{a},3\text{e}}$  12,8 Hz, H-3a), 1,89 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ) (**Anexo 30**).

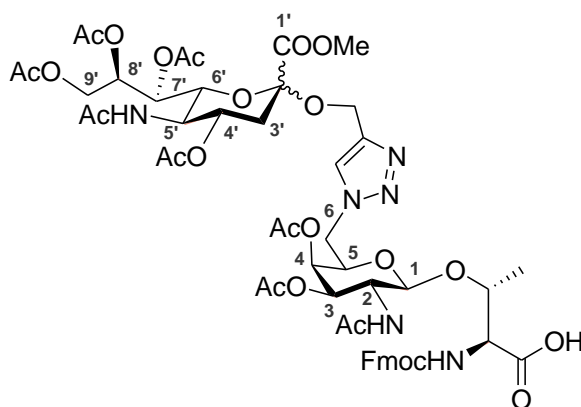
**(Metil-5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-{(éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina)} **77 $\alpha$****



Solução de  $\text{N}_3$ -6- $\beta$ GalNAc-Thr **68** (27,6 mg; 0,029 mmol; 1,0 eq) e o derivado de ácido siálico com grupo alcino na proporção  $\alpha/\beta$  0,45:0,55 **24**  $\alpha/\beta$  (22,6 mg ; 0,043 mmol; 1,1 eq) em DMF foi transferida para tubo de microondas e, a seguir, tratada com ascorbato de sódio (3,9 mg; 0,019 mmol; 0,5 eq) e sol. 10%  $\text{CuSO}_4$  (18  $\mu\text{l}$ ). Após irradiação à 70°C (150W) por 10 minutos e transferência para balão de fundo redondo, os solventes foram removidos sob pressão reduzida e a mistura reacional purificada por coluna cromatográfica com sílica Flash (Hex 100%  $\rightarrow$  AcOEt/Hex 1:1 v/v). O produto obtido como mistura de isômeros  $\alpha/\beta$  0,45:0,55 **77**  $\alpha/\beta$  foi obtido com 61,4% de rendimento (30,5 mg; 0,024 mmol). A fim de se obter o anômero  $\alpha$  puro, 10 mg da mistura **77**  $\alpha/\beta$  (7,0  $\mu\text{mol}$ ) foi purificada por equipamento de CLAE Shimadzu Shim-PaK utilizando coluna C18 de fase reversa, Shim-PaK CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm), sob condições de gradiente (A: 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ , B: MeCN, 0-70% B), a um fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , com detecção UV (263 nm). Nestas

condições, o tempo de retenção para o produto **77 $\alpha$**  foi de 30,7 min (2,0 mg; 1,4  $\mu$ mol; 20%) e 31,8 min para o produto **77 $\beta$**  (2,5 mg; 1,8  $\mu$ mol; 25%). **Anômero  $\alpha$**  - RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 7,77 (s largo, 2H, *H* arom), 7,67 (d, 2H, *J* 6,7 Hz, *H* arom), 7,52 (s, 1H, H-triazol), 7,45-7,32 (m, 9 H, *H* arom), 5,79 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, *NHCOCH*<sub>3</sub>), 5,48 (s largo, 1H, H-7'), 5,42 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, *NHCOCH*<sub>3</sub>), 5,36 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, *NHCOCH*<sub>3</sub>), 4,31-4,25 (m, 3H, H-3, H-4, H-8'), 5,15 (d, 2H, *J* 9,7 Hz, *CH*<sub>2</sub>OBn), 4,92 (d, 2H, *J*<sub>4',5'</sub> = *J*<sub>9'a,9'b</sub> 11,3 Hz, H-4', H-9'a), 4,55-4,52 (m, 3H, H-1, H-5', H-9'b), 4,43-4,34 (m, 5H, *CH* $\alpha$ -Thr, *CH* $\beta$ Thr, *CH*<sub>2</sub>-Fmoc, *CH*-Fmoc), 4,26-4,10 (m, 6H, H-5, H-6a, H-6b, *CH*<sub>2</sub>-triazol, H-6'), 3,97 (d, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10,0 Hz, H-2), 3,83 (s, 3H, *OCH*<sub>3</sub>), 2,64 (d, 1H, *J*<sub>3a,3e</sub> 14,2 Hz, H-3e), 2,19-1,91 (m, 25H, 6x *CH*<sub>3</sub>CO, H-3a), 1,16 (s largo, 3H, *CH*<sub>3</sub>-Thr) (**Anexo 31 A**).  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 172,1 (CO benzil), 171,1 (C-1'), 171,1; 170,8; 170,6; 170,5; 170,3; 170,2; 168,1; 167,5 (COCH<sub>3</sub>), 156,9 (CO Fmoc), 144,0 -141,2 (C quat. Fmoc Ph), 136,0 (C quat. *OCH*<sub>2</sub>Ph), 128,9-120,1 (CH Ph), 125,6 (C-triazol), 99,5 (C-1), 99,4 (C-2'), 76,0 (*CH*<sub>2</sub>-triazol), 74,6 (C-3), 72,4 (C-6'), 71,7 (C-5), 70,7 (C-8'), 69,7 (C-4), 69,4 (C-4'), 68,7 (C-7'), 67,7 (*OCH*<sub>2</sub>-Ph), 67,2 (*OCH*<sub>2</sub> Fmoc), 67,1 (CH $\square$ Thr), 62,6 (C-9'), 57,3 (C-6), 52,5 (*OCH*<sub>3</sub>), 50,4 (C-2), 49,1 (C-5'), 48,3 (CH $\square$ Thr), 47,4 (CH Fmoc), 37,4 (C-3'), 22,0; 21,8; 21,7; 20,3; 20,1; 19,8; 19,7; 19,5 (COCH<sub>3</sub>), 15,1 (CH<sub>3</sub>Thr). ESI-MS: calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{O}_{24}\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1295,4490, encontrado 1295,4490. (**Anexo 31 B**).

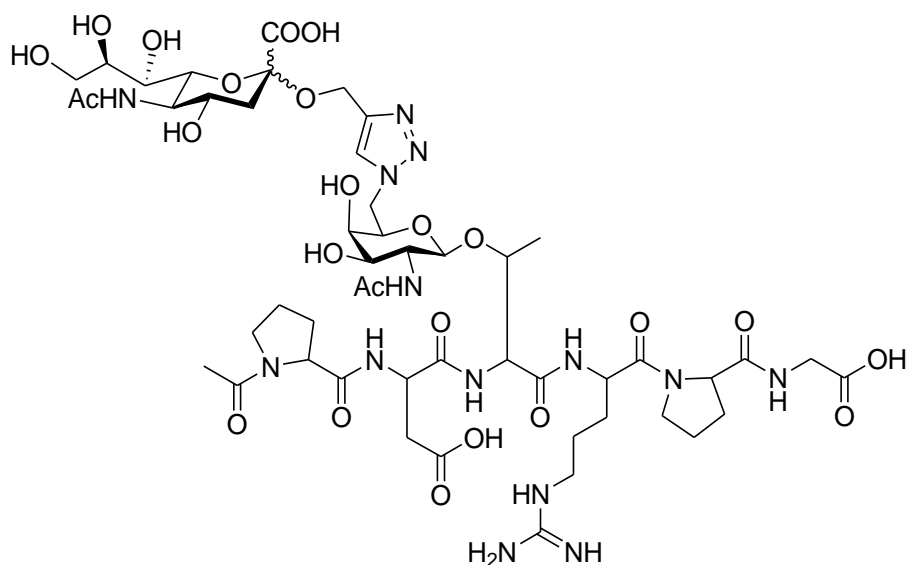
**(Metil-5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-{(N-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina)} 20B  $\alpha/\beta$**



Solução do produto **77  $\alpha/\beta$**  obtido após reação de CuAAC (19,4 mg; 15,2  $\mu$ mol) em MeOH (2,0 mL) foi tratado com ácido acético glacial (80  $\mu$ L) e Pd/C 10% (10 mg) para desproteção do grupo *O*-benzil. A mistura reacional foi agitada sob atmosfera de H<sub>2</sub> (~1,5 atm) por 1 hora e 20 minutos, depois filtrada em Celite, concentrada e purificada por coluna

cromatográfica com sílica Flash (AcOEt 100%), sendo o produto **20 B  $\alpha/\beta$**  obtido com 65,6% de rendimento (11,8 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 8,13 (s, 1H, H-triazol  $\beta$ ), 8,03 (s, 1H, H-triazol  $\alpha$ ), 7,70-7,67 (m, 2H, *H* arom Fmoc), 7,63-7,59 (d, 2H, *J* 6,7 Hz, *H* arom Fmoc), 7,30-7,19 (m, 4H, *H* arom Fmoc), 5,45 (dd, 1H, *J* 2,1 Hz, *J* 5,1 Hz, H-7'), 5,39-5,32 (m, 1H, H-4'), 5,26 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 2,6 Hz, H-4), 5,19-5,14 (m, 1H, H-3), 5,10-5,06 (m, 1H, H-8'), 4,75 (dd, 1H, *J*<sub>8',9'a</sub> 2,3 Hz, *J*<sub>9'a,9'b</sub> 12,5 Hz, H-9'a), 4,67-4,54 (m, 5H, H-1,  $\text{CH}_2$ -triazol, H-5', H-9'b), 4,39-4,23 (m, 5H,  $\text{CH}\alpha$ -Thr,  $\text{CH}\beta$ Thr,  $\text{CH}_2$ -Fmoc, CH-Fmoc), 4,11-4,06 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 4,00-3,94 (m, 1H, H-2), 3,81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$   $\beta$ ), 3,80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$   $\alpha$ ), 2,62 (dd, 1H, *J*<sub>3eq,3a</sub> 12,7 Hz, *J*<sub>3eq,4</sub> 4,7 Hz, H-3eq  $\alpha$ ), 2,43 (dd, 1H, *J*<sub>3eq,3a</sub> 12,9 Hz, *J*<sub>3eq,4</sub> 5,0 Hz, H-3eq  $\beta$ ), 2,13-1,81 (m, 25H, 6x  $\text{CH}_3\text{CO}$ , H-3a), 0,85 (d, 3H, *J* 7,5 Hz,  $\text{CH}_3$ -Thr  $\beta$ ), 0,82 (d, 3H, *J* 7,4 Hz,  $\text{CH}_3$ -Thr  $\alpha$ ) (**Anexo 32 A**).  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 175,3 (C-1'), 174,7; 172,1; 171,1; 170,8; 170,7; 170,5; 170,3; 170,2 ( $\text{COCH}_3$ ), 157,5 (CO Fmoc), 144,1-141,2 (C quat. Fmoc Ph), 131,0-119,5 (CH Fmoc), 126,8 (C-triazol  $\alpha/\beta$ ), 98,7 (C-1), 98,6 (C-2'), 76,1 ( $\text{CH}_2$ -triazol), 70,3 (C-3), 71,0 (C-4'), 70,8 (C-5), 69,0 (C-8'), 67,5 (C-6'), 67,3 (C-4), 68,1 (C-7'), 67,5 ( $\text{CH}\beta$ Thr), 66,5 ( $\text{OCH}_2$  Fmoc), 62,0 (C-9'), 59,9 (C-6), 52,0 ( $\text{OCH}_3$   $\alpha/\beta$ ), 50,2 (C-2), 49,9 (C-5'), 49,6 ( $\text{CH}\alpha$ Thr), 47,1 (CH Fmoc), 38,8 (C-3'  $\alpha$ ), 37,8 (C-3'  $\beta$ ), 22,6; 21,4; 21,3; 19,7; 19,4; 19,3; 19,1 ( $\text{COCH}_3$ ), 13,0 ( $\text{CH}_3$ Thr  $\beta$ ), 10,0 ( $\text{CH}_3$ Thr $\alpha$ ). ESI-MS: calcd. para  $\text{C}_{54}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_{24}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ : 1183,4201, encontrado 1183,4201 (**Anexo 32 B**).

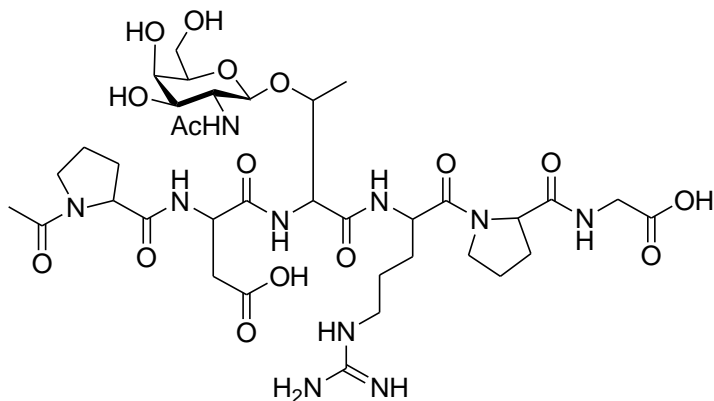
**Glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[(5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)}Thr-Arg-Pro-GlyOH 19 B  $\alpha/\beta$**



O glicopeptídeo **19**  $\alpha/\beta$  foi sintetizado manualmente utilizando frasco cilíndrico com borbulhamento de ar comprimido para uma mistura eficaz. A resina FmocGly-Wang (75 mg) foi intumescida com DCM durante 2 horas e depois lavada com DMF (3x). A desproteção do grupo N- $\alpha$ -Fmoc foi realizada utilizando 50% de morfolina/DMF seguida de filtração e lavagem com DMF (3x). As reações de acoplamento foram realizadas com 2,0 eq/mol de Fmoc-aminoácidos e reagentes de acoplamento (PyBOP e HOBt) dissolvidos em DMF, e a base DIPEA. Os tempos de acoplamento foram variáveis, variando de 24 horas para os aminoácidos e 48 horas para o glicoaminoácido **20B**  $\alpha/\beta$  (análogo triazólico do antígeno STn) (11,1 mg, 9  $\mu$ mol). As misturas reacionais foram filtradas após cada acoplamento e a resina lavada três vezes com DMF, DCM e MeOH. Após secagem sob pressão reduzida, pequenas alíquotas de resina (1 mg) foram tratadas com 50% de morfolina em DMF para remoção do grupo NFmoc e consequente geração de produto dibenzofulveno que absorve no UV (290 nm), oferecendo, assim, um método para monitorar cada reação de acoplamento através de leitura em espectrofotômetro. Após remoção do grupo NFmoc do último aminoácido (Pro), o glicopeptídeo foi N-acetilado pelo tratamento com piridina e Ac<sub>2</sub>O e sua remoção da resina foi realizada com concomitante desproteção do grupo Pbf do resíduo de arginina, na presença de mistura de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (tri-isopropilsilano) 90/5/5 v/v/v agitada sob borbulhamento por 3 horas, filtrada para um frasco coletor, concentrada e depois tratada com solução de NaOMe 1 M em MeOH para remoção dos grupos -OAc protetores do açúcar. O óleo obtido nas paredes do frasco foi tratado com éter etílico resfriado a 0°C para formação de um filme cristalino branco na sua superfície. A purificação do glicopeptídeo **19B**  $\alpha/\beta$  foi realizada em equipamento de CLAE Shimadzu Shim-PaK utilizando coluna C18 de fase reversa, Shim-PacK CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm), sob condições de gradiente (A: 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O, B: MeCN, 0-70% B), a um fluxo de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>, com detecção UV (224 nm). Nestas condições, o tempo de retenção para **19B**  $\alpha/\beta$  foi de 4,7 min, sendo obtido com 33% de rendimento (3,7 mg, 3  $\mu$ mol). RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 4,29-4,26 (m, 1H, H-8'), 3,94-3,82 (m, 5H, H-1, H-2, H-4', H-5', H $\alpha$ Thr), 3,74-3,64 (m, 4H, 2H $\alpha$ Pro, H $\alpha$ Arg, H $\beta$ Thr), 3,59-3,51 (m, 5H, H-3, H-6', H-7', H-9'a, H-9'b), 3,44 (d, 1H,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz, H-5), 3,42 (d, 1H,  $J_{3,4}$  1,7 Hz, H-4), 3,36-3,34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-triazol), 3,31-3,28 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,12-3,09 (m, 4H, 2H $\delta$ Arg, CH<sub>2</sub>Gly), 2,83 (dd, 1H,  $J$  5,4 Hz,  $J$  16,7 Hz, H $\beta_a$ Asp), 2,71 (dd, 1H,  $J$  7,8 Hz,  $J$  16,7 Hz, H $\beta_b$ Asp), 2,22-2,16 (m, 5H, 4H $\delta$ Pro, H-3'<sub>eq</sub>), 1,99 (s largo, 6H, 2x NHCOCH<sub>3</sub>), 1,92-1,73 (m, 12H, H-3'a, 4H $\beta$ Pro, 4H $\gamma$ Pro, NHCOCH<sub>3</sub>), 1,63-1,57 (m, 4H, 2H $\beta$ Arg, 2H $\gamma$ Arg), 1,30 (d,

3H,  $J$  6,7 Hz,  $CH_3$ Thr) (**Anexo 33 A**). ESI-MS: calcd. para  $C_{50}H_{78}N_{14}O_{23}Na^+$   $[M+Na]^+$ : 1265,5437, encontrado 1265,9557 (**Anexo 33 B**).

### Glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21**



O glicopeptídeo **21** foi sintetizado manualmente utilizando o mesmo procedimento descrito no glicopeptídeo **19B**  $\alpha/\beta$ , variando o aminoácido glicosilado, desta vez utilizando o antígeno natural Tn **52** (64,4 mg, 77  $\mu$ mol). A purificação de **21** também foi realizada em equipamento de CLAE Shimadzu Shim-PaK utilizando coluna C18 de fase reversa, Shim-PacK CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm), sob condições de gradiente (A: 0,1 % TFA/ $H_2O$ , B: MeCN, 0-70% B, dentro de 30 min), a um fluxo de 1,0 mL  $min^{-1}$ , com detecção UV (224 nm). Nestas condições, o tempo de retenção para este glicopeptídeo foi de 8,3 min, sendo obtido com 17,6% de rendimento (14,5 mg, 16,6  $\mu$ mol). RMN  $^1H$  ( $D_2O$ , 500 MHz)  $\delta_H$ : 4,73 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz, H-1), 4,50-4,45 (m, 1H,  $H_\beta$ Thr), 4,42 (d, 1H,  $J_{3,4}$  1,5 Hz, H-4), 4,33-4,25 (m, 3H,  $H_\alpha$ Pro,  $H_\alpha$ Arg, H-3), 3,98 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz,  $J_{2,3}$  11,0 Hz, H-2), 3,95-3,62 (m, 6H, H-6a, H-6b, H-5,  $H_\delta$ Pro,  $CH_2$ Gly), 3,56-3,51 (m, 3H,  $3H_\delta$ Pro), 3,11 (t, 1H,  $J$  5,7 Hz,  $H_\delta$ Arg), 2,88 (dd, 1H,  $J$  7,1 Hz,  $J$  17,0 Hz,  $H_{\beta a}$ Asp), 2,75 (dd, 1H,  $J$  7,1 Hz,  $J$  17,0 Hz,  $H_{\beta b}$ Asp), 2,23-2,17 (m, 3H,  $3H_{\beta}$ Pro), 2,01, 1,92 (2x s, 2x 3H, 2x  $NHCOCH_3$ ), 1,90-1,75 (m, 6H,  $2H_\beta$ Pro,  $4H_\gamma$ Pro), 1,58 (d, 4H,  $J$  5,7 Hz,  $2H_\beta$ Arg,  $2H_\gamma$ Arg), 1,12 (d, 3H,  $J$  6,3 Hz,  $CH_3$ Thr) (**Anexo 34 A**). ESI-MS: calcd. para  $C_{36}H_{58}N_{10}O_{16}Na^+$   $[M+Na]^+$ : 909,3924, encontrado 909,3917 (**Anexo 34 B**).

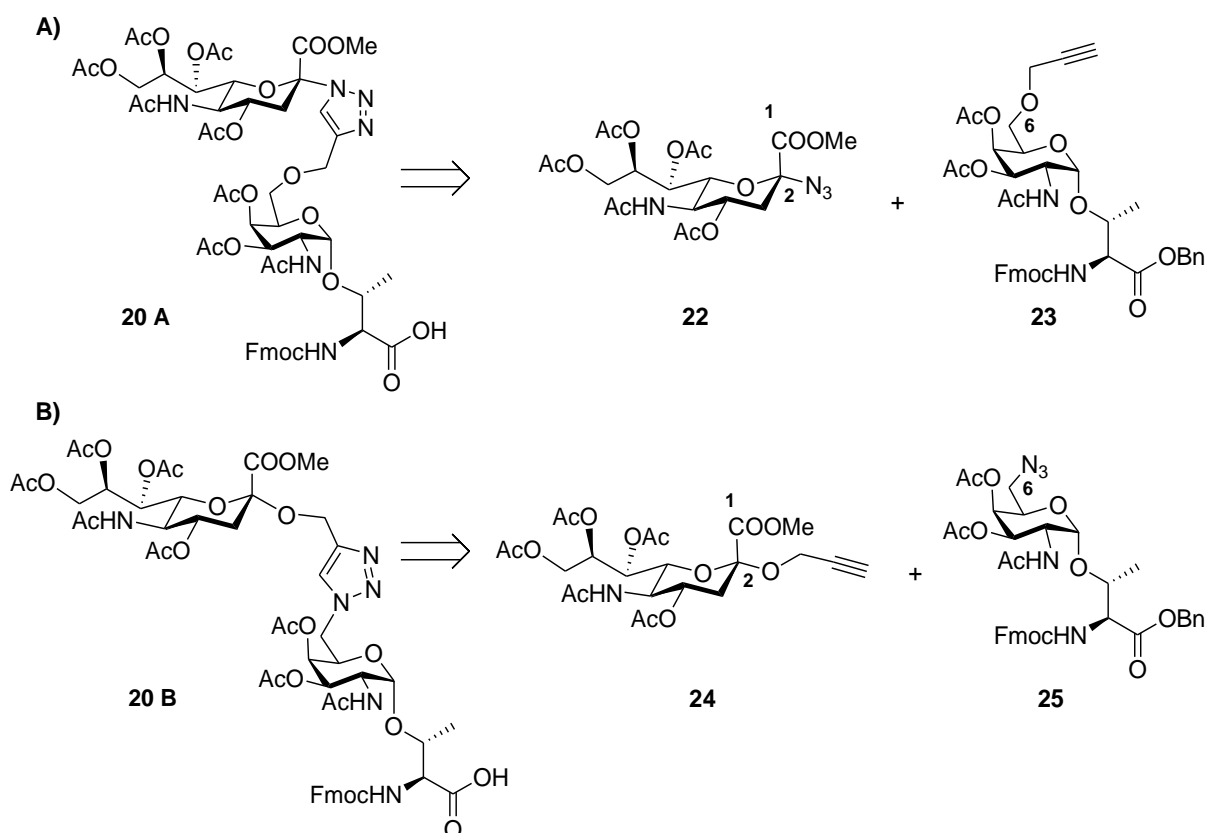
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE

Esta seção está dividida em três partes, sendo a primeira referente à preparação dos blocos de construção funcionalizados com os grupos azido ou alcino; a segunda é relativa à obtenção do glicoaminocido triazólico análogo do antígeno STn e; a última, à síntese dos glicopeptídeos propostos.

#### 4.1.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA DOS GLICOAMINOÁCIDOS TRIAZÓLICOS.

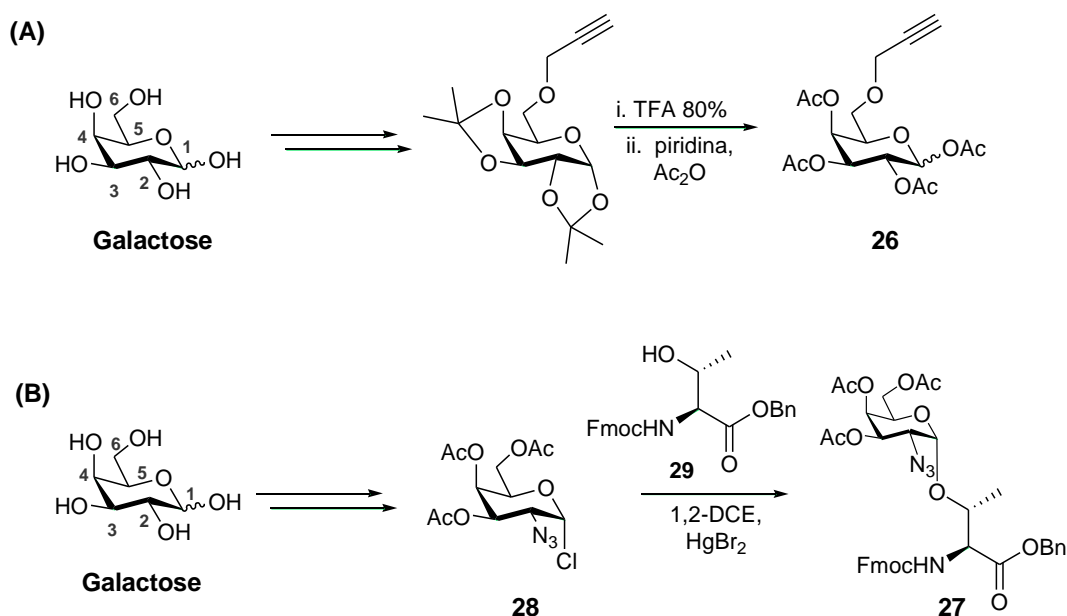
Tanto para síntese do glicoaminoácido triazólico **20A** como para **20B** por estratégia de *click chemistry* será necessária a obtenção prévia de dois blocos precursores, um contendo grupo azido e o outro alcino terminal. Assim, primeiramente foi planejada a funcionalização das unidades de ácido siálico (C-2) e  $\alpha$ GalNAc (C-6) com os grupos azido e alcino, respectivamente, o que forneceria os precursores Neu5Ac $\alpha$ 2-N<sub>3</sub> **22** e 3-prop-2-inil-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** para síntese de **20A** (Esquema 6A). Contudo, os precursores Neu5Ac $\alpha$ -2-3-prop-2-inil **24** e N<sub>3</sub>-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25** também foram considerados para possível obtenção do glicoaminoácido triazólico análogo **21B** (Esquema 6B).



**Esquema 6.** A) Retrossíntese proposta para obtenção de **20A** empregando-se os derivados Neu5Ac $\alpha$ 2-N<sub>3</sub> **22** e 3-prop-2-inil-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23**. B) Retrossíntese proposta para a obtenção de **20B** empregando-se os derivados Neu5Ac $\alpha$ -2-3-prop-2-inil **24** e N<sub>3</sub>-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25**.

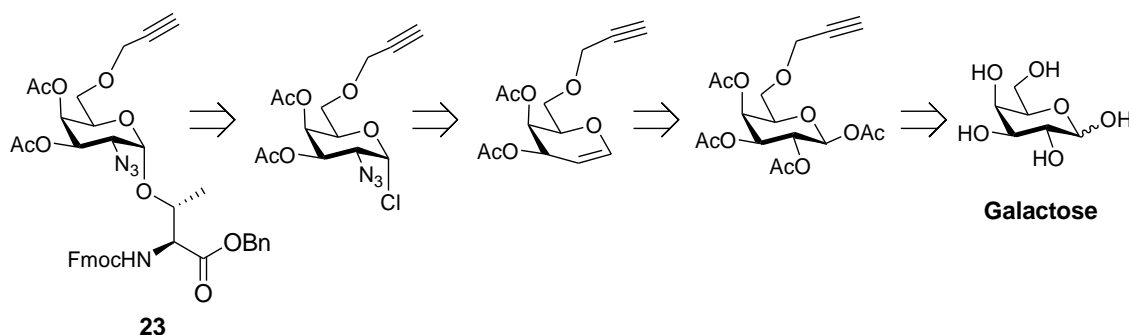
#### 4.1.2 SÍNTESE DOS PRECURSORES CONTENDO UNIDADE GalNAc.

A rota para síntese de 3-prop-2-ynil-6- $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** foi baseada em duas rotas já descritas na literatura. A primeira refere-se à obtenção do composto **26** (CAMPO et al, 2015), derivado da galactose funcionalizado com o grupo alcino na posição C-6 (Esquema 7A). Já a segunda, propõe a síntese de  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** por meio do doador  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>Cl **28** e o aminoácido protegido FmocThrOBn **29** (CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008) (Esquema 7B).



**Esquema 7.** A) Rota utilizada para funcionalização da posição C-6 da galactose com alcino terminal **26**. B) Síntese frequentemente utilizada para obtenção do glicoaminoácido **27** a partir da galactose.

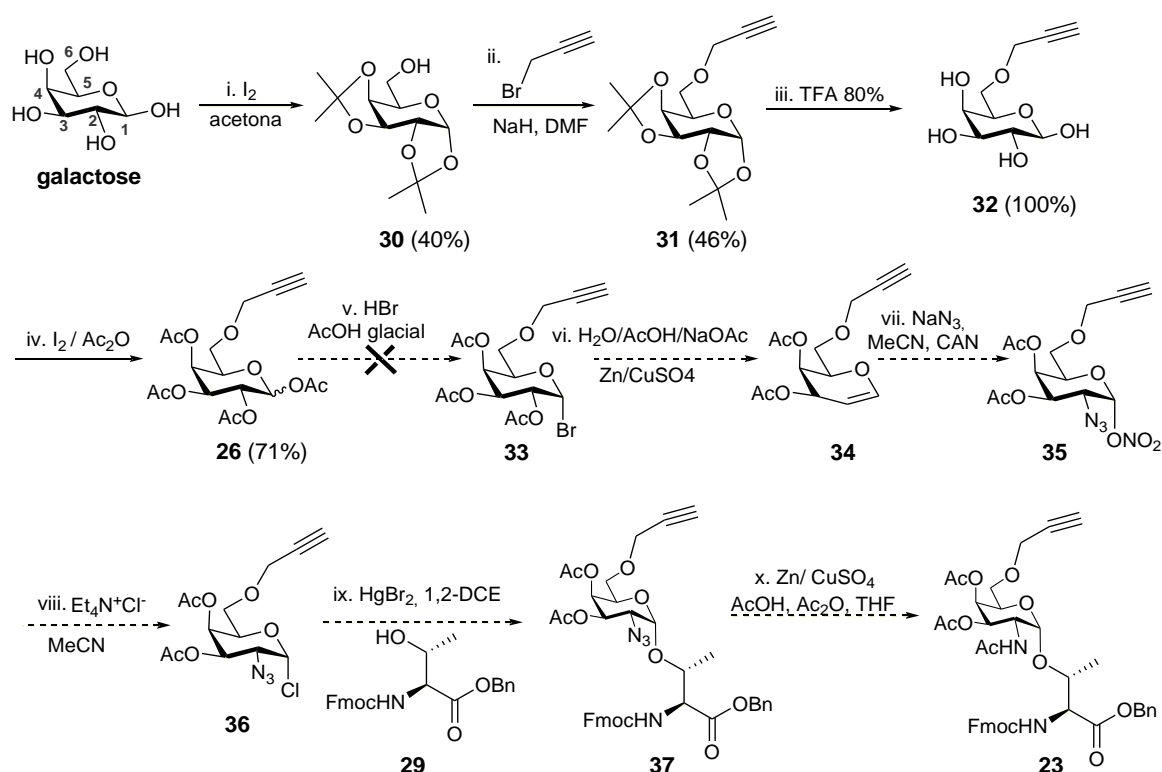
Desse modo, ao fazer a análise retróssintética de **23**, foi proposto primeiro a funcionalização de C-6 pelo grupo alcino para posteriormente realizar a etapa de glicosilação com o aminoácido FmocThrOBn **29**, como mostra o Esquema 8.



**Esquema 8.** Retrossíntese de **23** utilizando galactose como material de partida evidenciando, a funcionalização de C-6 previamente a etapa de glicosilação.

Inicialmente, a proteção das hidroxilas nas posições 1, 2, 3 e 4, foi proposta para viabilizar a funcionalização seletiva da posição 6. Desta forma, a primeira etapa envolveu as

proteções simultâneas das hidroxilas em C-1,C-2 e C-3,C-4 de galactose comercial através de seu tratamento com acetona e iodo. Assim, o composto **30**, possuindo dois grupos isopropilídeos, foi obtido com 40% de rendimento. A seguir, a hidroxila livre em C-6 de **30** foi funcionalizada com o grupo alcino pela adição dos reagentes NaH e brometo de propargila, o que forneceu o composto **31** (46%). Após **31** ter seus grupos protetores removidos por tratamento com solução aquosa de TFA 80%, fornecendo o derivado **32** (100%), este foi posteriormente tratado com piridina e Ac<sub>2</sub>O para acetilação de suas hidroxilas livres. Desse modo, o produto prop-2-inil-6-Gal(OAc)<sub>4</sub> **26** foi obtido com 71% de rendimento (Anexo 1), sendo então tratado com solução de HBr em ácido acético glacial (30% m/v) para sua conversão em 6-propinil-Gal(OAc)<sub>3</sub>Br **33** (CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008; CAMPO, et al, 2015). Contudo, a análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H do produto, obtido após esta última etapa, mostrou a ausência do tripleto característico do grupo C-H propargil na região de  $\delta$  2,5, indicando uma possível adição nucleofílica do halogênio à ligação tripla. Isto inviabilizou a obtenção do brometo **33** (Esquema 9).

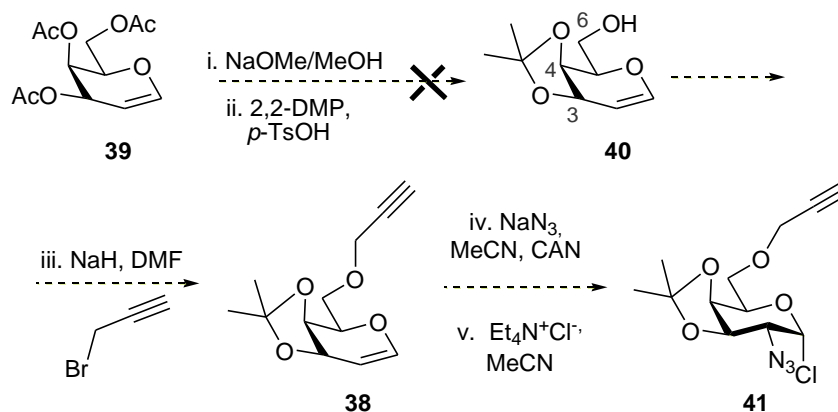


**Esquema 9.** Primeira rota sintética proposta para obtenção do bloco **23** a partir da galactose.

Alternativamente, tentativas de se obter o doador glicosídico **36** a partir de estratégias que não empregassem 6-propinil-Gal(OAc)<sub>3</sub>Br **33** foram testadas. A primeira alternativa envolveu a síntese do derivado de galactal contendo grupo alcino terminal em C-6 **38**. Para tanto, galactal peracetilado **39**, previamente sintetizado (CAMPO et al, 2007 ; CAMPO &

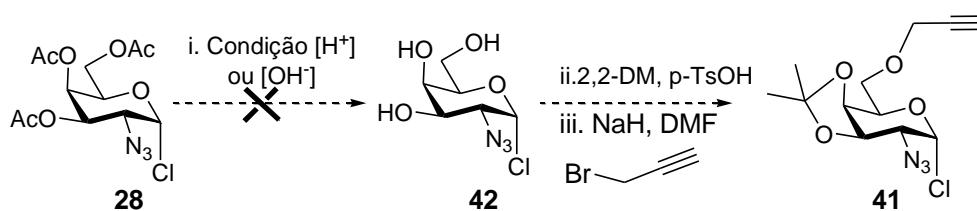


CARVALHO, 2008) (Anexo 2), foi desprotegido com solução 1M de NaOMe em MeOH e, subsequentemente, tratado com 2,2-dimetoxipropano (2,2-DMP) e ácido *para*-tolueno sulfônico (*p*-TsOH) na tentativa de se obter o composto **40**, análogo do doador **36**, com as posições 3 e 4 protegidas (WU & GUO, 2006). Todavia, essa etapa não foi bem sucedida e essa proposta foi descontinuada (Esquema 10).



**Esquema 10.** Proposta de síntese do doador **41**, análogo de **36**, a partir do galactal peracetilado **39**

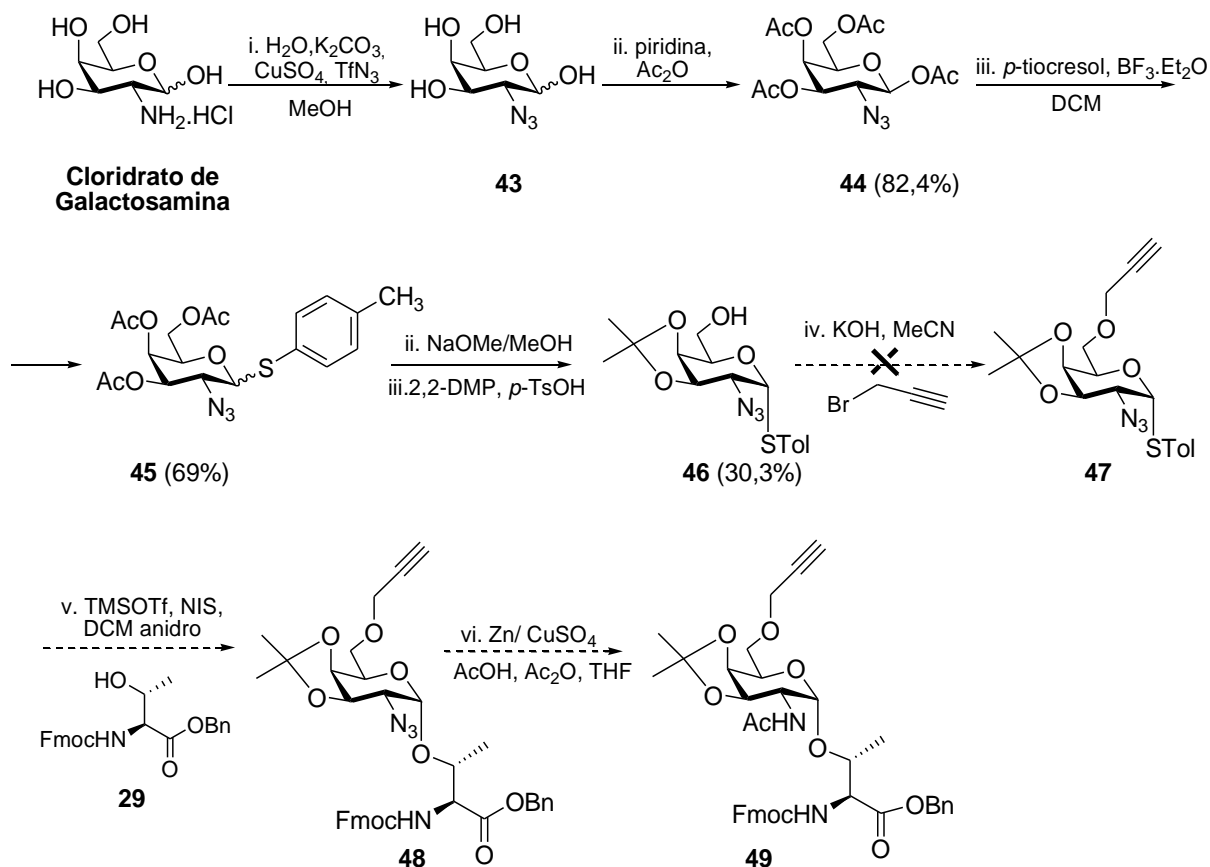
Ainda visando o doador **41**, optou-se por investigar sua obtenção partindo-se já do cloreto αGalN<sub>3</sub>Cl **28**, também previamente sintetizado (CAMPO et al, 2007 ; CAMPO & CARVALHO, 2008) (Anexo 3). No entanto, logo na primeira etapa de desproteção dos grupos acetila, envolvendo tanto meio básico (MeOH/NaOMe ou acetato de hidrazina), quanto em condições ácidas (MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou HCl), não houve formação do produto esperado 2-N<sub>3</sub>-GalCl **42**, também inviabilizando esta alternativa. A hipótese para tal é a alta reatividade que o doador com cloro em C-1 **28** possui, sendo então degradado rapidamente em condições clássicas de desacetilação (Esquema 11).



**Esquema 11.** Tentativa de síntese do doador **41** partindo de αGalN<sub>3</sub>Cl **28**.

Tendo em vista a ineficácia das estratégias utilizadas para obtenção dos doadores **36** e **41** supracitados, foram investigadas diferentes alternativas que envolvessem um grupo seletivo e estável para proteção da posição anomérica. Assim, o reagente 4-mercapto-tolueno (*p*-tiocresol) foi escolhido visto sua seletividade e capacidade de gerar produtos em altos rendimentos quando em condições reacionais específicas, além de possuir a vantagem de ser UV-visível, o

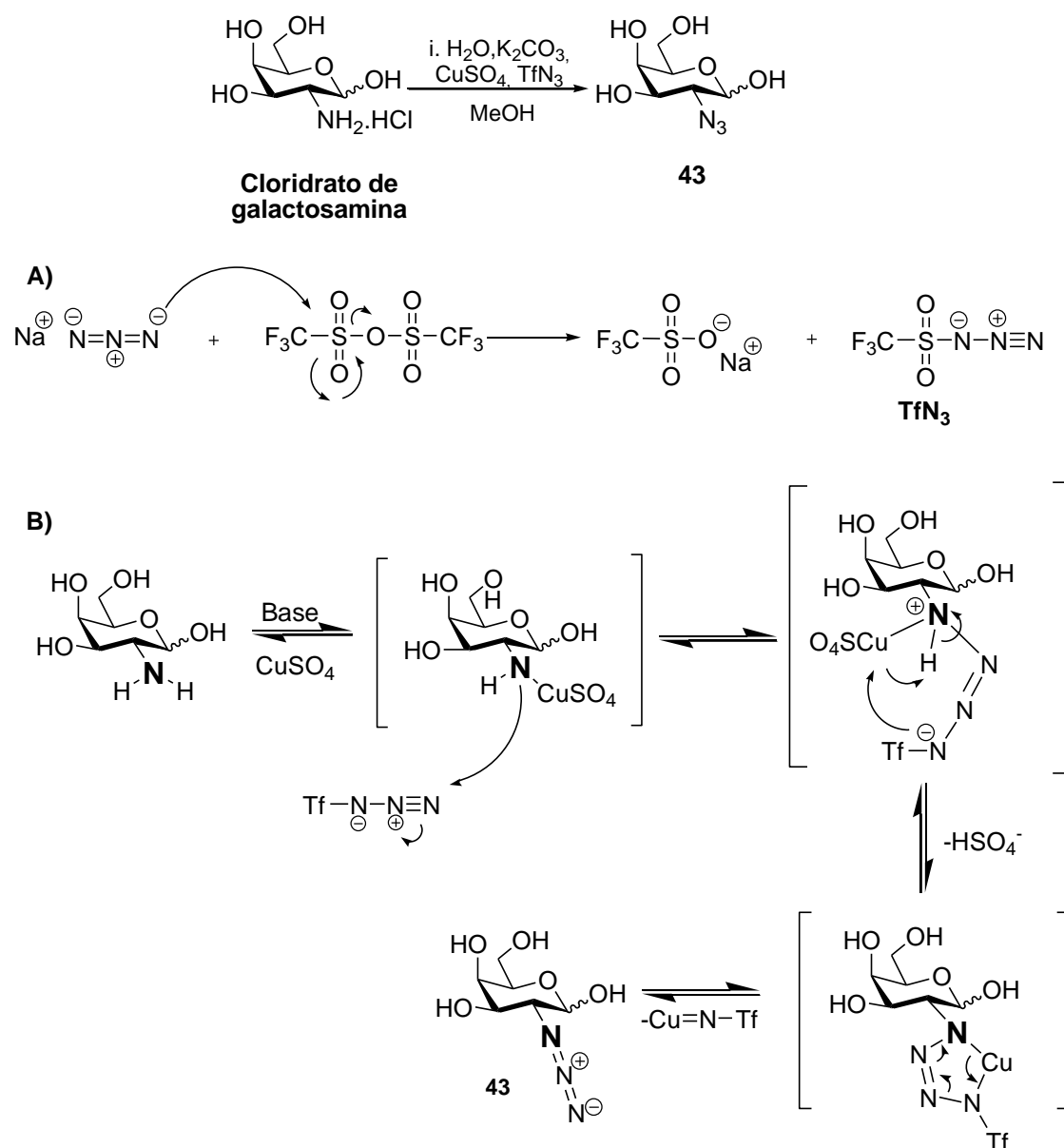
que facilitou o acompanhamento das reações por CCD (LUO, 2013). Assim, modificando totalmente a rota sintética proposta inicialmente, uma segunda rota para obtenção de um doador funcionalizado com grupo *p*-tiocresol em C-1 foi proposta (Esquema 12).



**Esquema 12.** Síntese proposta para obtenção de **49** a partir do cloridrato de galactosamina.

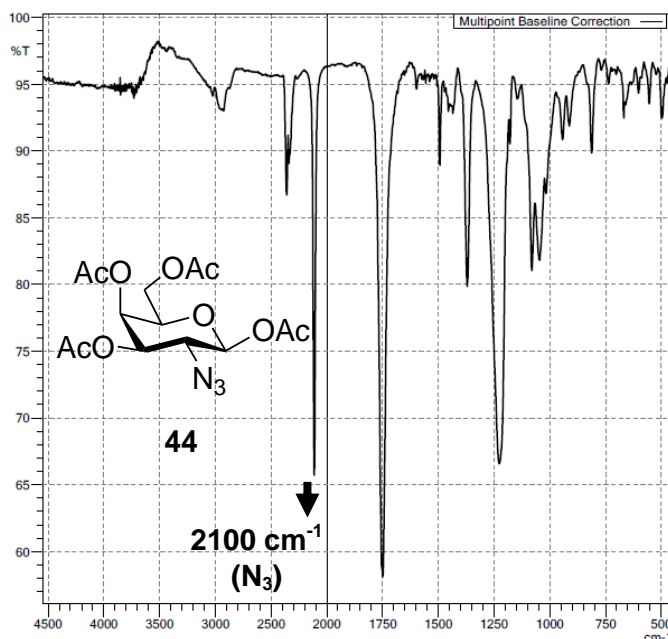
Desta forma, a primeira etapa dessa nova rota envolveu uma reação de diazotransferência a partir do tratamento do cloridrato de galactosamina comercial com  $K_2CO_3$ ,  $CuSO_4$  e o reagente gerado “in situ” trifil azida ( $TfN_3$ ) (MARCHIORI et al, 2015). O mecanismo proposto para formação da  $TfN_3$  envolve o ataque nucleofílico da azida de sódio ( $NaN_3$ ) a qualquer um dos grupos sulfona do anidrido trifílico ( $Tf_2O$ ) (Esquema 13 A). Já a etapa de diazotransferência necessita da base  $K_2CO_3$  para neutralizar o sal da galactosamina e desprotonar a amina em C-2, viabilizando sua complexação com Cu(I). Posteriormente, ao adicionar  $TfN_3$  ao meio, os pares de elétrons livres da amina atacam o nitrogênio eletrofílico terminal da trifil azida, formando um intermediário que cicliza após liberação de uma base fraca ( $HSO_4^-$ ), gerando um metalociclo tetrazólico de 5 membros instável. Por fim, este ciclo sofre um rearranjo e o produto 2- $N_3$ -GalOH **43** é liberado (Esquema 13 B) (NYFFELER et al, 2002; KUMAR, SARMA & SAMUELSON, 2014). Vale ressaltar que nessa reação há transferência de dois átomos de

nitrogênio da TfN<sub>3</sub> para o grupo amino da galactosamina, não ocorrendo inversão da configuração da ligação C-N do anel pirano, o que resultaria em um derivado 2-azido-talose.



**Esquema 13.** A) Formação 'in situ' do reagente TfN<sub>3</sub>. B) Mecanismo proposto para a reação de diazotransferência na obtenção do composto **43**.

A etapa seguinte envolveu a acetilação do derivado **43** (piridina/Ac<sub>2</sub>O) e, após purificação em CCC para remoção do cobre remanescente, 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>4</sub> **44** foi obtido (82,4%) apenas como anômero β (*J*<sub>1,2</sub> 8,5 Hz) (Anexo 4). A efetividade da diazotransferência foi confirmada por dados do RMN <sup>1</sup>H e por análise de infra-vermelho de **44**, sendo observada nesta última uma banda característica do grupamento azido em 2100 cm<sup>-1</sup> (Figura 15) (MARCHIORI et al, 2015).

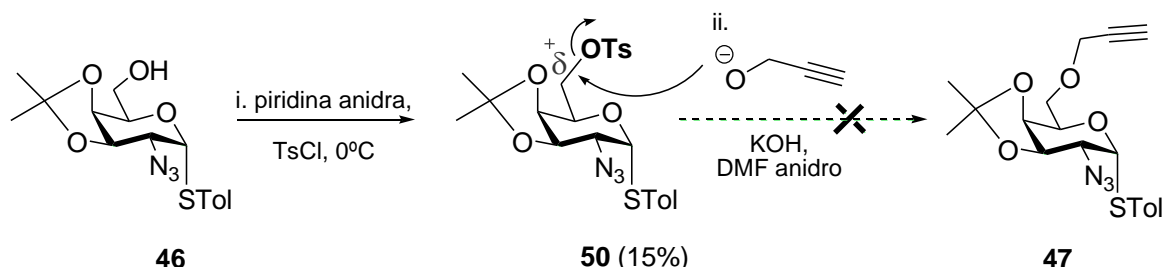


**Figura 15.** Análise de infra-vermelho (IV) do composto **44** indicando a presença do grupo  $N_3$  pela banda em  $2100\text{ cm}^{-1}$ .

Posteriormente, *p*-tiocresol e  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  foram adicionados à solução de 2- $N_3$ -Gal(OAc) $_4$  **44** em DCM anidro, o que forneceu o produto 2- $N_3$ -Gal(OAc) $_3$ STol **45** (69%) como uma mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  na proporção 1:0,7 (Anexo 5) (LUO et al, 2013). As posições 3, 4 e 6 do composto **45** foram desprotegidas por tratamento com solução 1M de NaOMe/MeOH, sendo, em seguida, seletivamente protegido nas posições 3 e 4 utilizando 2,2-DMP e *p*-TsOH (WU & GUO, 2006; FERNÁNDEZ et al, 2016). A reação, acompanhada por CCD, levou à formação de três manchas UV-ativas, sendo a de maior intensidade separada e identificada como o anômero  $\alpha$  do composto desejado 2- $N_3$ -3,4-DMP-Gal-STol **46** (30,3%) (Anexo 6). A seguir, o intermediário **46** foi submetido à reação de substituição em MeCN na presença de KOH e brometo de propargila para obtenção de 2- $N_3$ -3,4-DMP-6-propinil-Gal-STol **47** (KARKKAINEN et al, 2008; CAI et al, 2011), porém, não conduzindo ao produto esperado (Esquema 12).

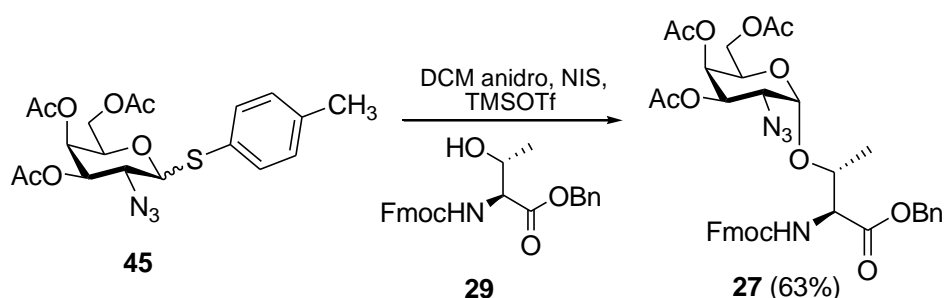
Como esta tentativa não gerou o doador **47**, foi proposta uma adaptação para essa etapa ao transformar a hidroxila de **46**, um nucleófilo, em um grupo abandonador, viabilizando seu deslocamento através do ataque de um novo reagente, o álcool propargílico (Esquema 14). Assim, **46** foi solubilizado em piridina anidra e, após resfriamento a  $0^\circ\text{C}$ , tratado com cloreto de toсила (TsCl) (CARVALHO et al, 2010), o que forneceu o derivado 2- $N_3$ -3,4-DMP-6-OTs-Gal-STol **50** com apenas 15% de rendimento mesmo após 2 dias sob agitação (Anexo 7). A seguir, solução de **50** em DMF anidro foi resfriada e gotejada em uma mistura de álcool propargílico e KOH também em DMF anidro a  $0^\circ\text{C}$ . Após 8 horas sob agitação à  $0^\circ\text{C}$  nenhuma mudança foi

observada na CCD, e, por isso, a reação foi mantida a temperatura ambiente. Mesmo após 4 dias sob agitação não houve mudança no perfil cromatográfico reacional, de modo que não foi possível prosseguir para a etapa de glicosilação entre o doador **47** e o aminoácido protegido FmocThrOBn **29** (ROJAS-OCÁRIZ et al, 2016).



**Esquema 14.** Etapa de adaptação da rota proposta na tentativa de obtenção de **47** a partir de **50**.

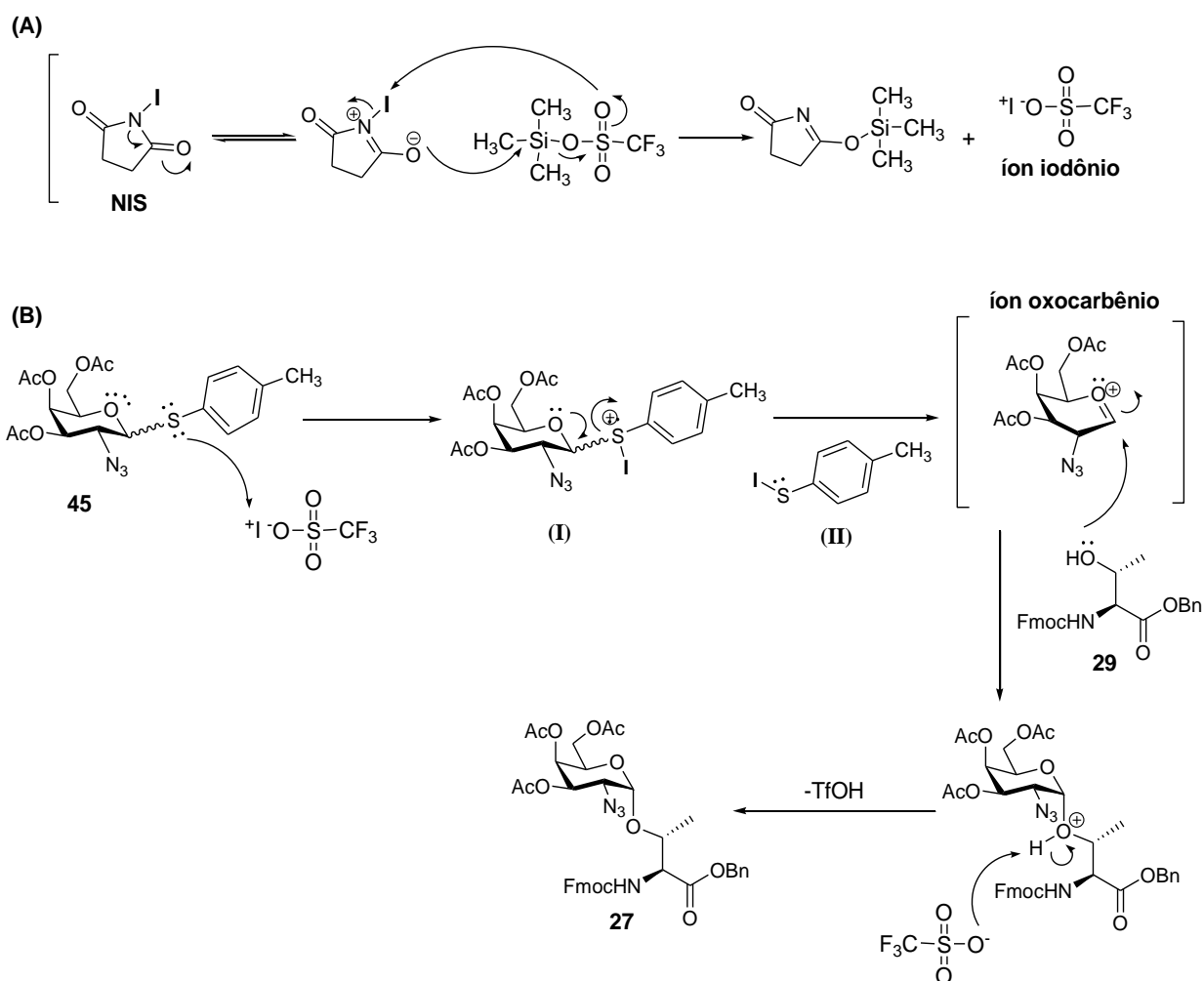
Tendo em vista o baixo rendimento na obtenção do derivado tosilado 2-N<sub>3</sub>-3,4-DMP-6-OTs-Gal-STol **50**, a efetividade das reações de glicosilação partindo de compostos com grupo STol em C-1 (LUO et al, 2013) foi verificada usando condições clássicas. Desse modo, o doador já sintetizado 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub>-STol **45** e o aminoácido protegido FmocThrOBn **29** foram empregados para reação de glicosilação utilizando DCM anidro e N-iodosuccinimida (NIS)/ trifluorometanossulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) como sistema catalítico (Esquema 15). O glicoaminoácido precursor do antígeno Tn  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** foi obtido com 63% de rendimento, sendo seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Anexo 8) idêntico ao mesmo composto sintetizado pela rota clássica, utilizando o doador  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>Cl **28** (CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008).



**Esquema 15.** Síntese do glicoaminoácido  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** a partir do derivado **45**, provando a eficácia do sistema catalítico NIS/TMSOTf na reação de glicosilação.

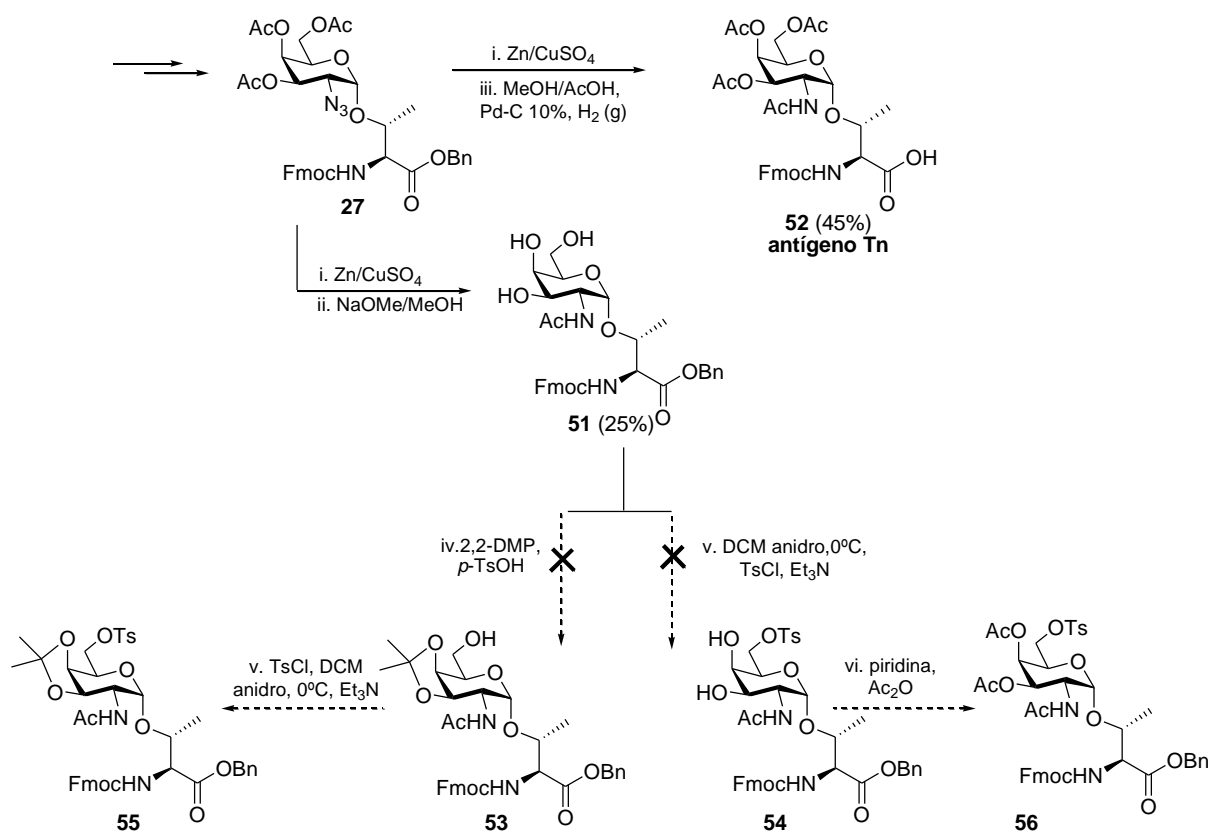
O mecanismo proposto catalisado por um ácido de Lewis (TMSOTf) envolve, primeiramente, a formação do íon iodônio a partir do NIS (Esquema 16A). Uma vez formado esse íon, ocorre o ataque nucleofílico do átomo de enxofre, presente no derivado **45**, gerando um intermediário com carga positiva (I). A seguir, há liberação de iodo-STol (II) além da formação do estado de transição contendo íon oxocarbênio após compartilhamento dos pares de

elétrons livres do oxigênio do anel pirano. Posteriormente, há o ataque da hidroxila do aminoácido FmocThrOBn **29** ao íon oxocarbênio, com formação do produto  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** após abstração de próton pelo triflato, gerando TfOH no meio (Esquema 16B). Quando se usa apenas halo-succinimidas, sem um ácido de Lewis, essa reação é muito lenta e requer horas ou dias para seu término. (JACOBSSON; MALMERG; ELLERVIK, 2006).



O êxito em sintetizar  $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **27** impulsionou a tentativa de funcionalizar a posição C-6 com o grupo OTs após reação de glicosilação. Assim, atentos à possibilidade de tosilção indesejada em outras posições, a proteção prévia com 2,2-DMP também foi considerada a fim de direcionar ao produto monosubstituído em C-6. Portanto, foram realizadas as reações subsequentes de acetilação redutiva (Zn/CuSO<sub>4</sub>) e desacetilação (NaOMe/MeOH) de **27**, com formação do composto  $\alpha$ GalNAcFmocThrOBn **51** (25%). Esse produto foi tratado

com 2,2-DMP e *p*-TsOH, conforme procedimento previamente descrito, todavia, obteve-se uma mistura bastante complexa e de difícil purificação, o que inviabilizou a confirmação da obtenção de 2-N<sub>3</sub>-3,4-DMP- $\alpha$ GalNAcFmocThrOBn **53**. Alternativamente, foi averiguada a tosilatação seletiva de C-6 apenas pelo controle da temperatura, sem a proteção prévia com 2,2-DMP. Desse modo, uma solução do produto desprotegido **51** em DCM anidro a 0°C foi tratada com TsCl e Et<sub>3</sub>N (MARCOTULLIO et al, 2006), porém, não conduzindo ao produto tosilado 6-OTs- $\alpha$ GalNAcFmocThrOBn **54** (Esquema 17). Vale ressaltar que a partir do derivado **27**, após reações subseqüentes de acetilação reductiva (THF:Ac<sub>2</sub>O:AcOH, Zn e CuSO<sub>4</sub>) e hidrogenólise (MeOH/AcOH, Pd-C 10%, H<sub>2</sub>), o antígeno Tn ( $\alpha$ GalNAcFmocThrOH) **52** foi obtido com 45% de rendimento (Esquema 17, Anexo 9) (CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008).



**Esquema 17.** Rota sintética proposta para síntese dos glicoaminoácidos tosilados **55** e **56** via intermediários comuns **51** e **27**. Obtenção do antígeno Tn **52** via composto **27**.

Considerando os problemas de reatividade do glicoaminoácido **51**, possivelmente devido à sua maior complexidade estrutural, foi investigada a possível tosilatação seletiva de seu precursor estruturalmente mais simples, o doador glicosídico 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub>-STol **45** (Esquema 18). Desse modo, **45** foi desacetilado (NaOMe/MeOH) e tratado com DCM anidro, TsCl e Et<sub>3</sub>N, o que resultou no composto 2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal-STol **57** (64%). Posteriormente, foi realizada a acetilação das posições 3 e 4 de **57** (piridina/Ac<sub>2</sub>O), fornecendo o derivado 2-N<sub>3</sub>-6-

OTs-Gal(OAc)<sub>2</sub>-STol **58** em rendimento quantitativo (Esquema 16, Anexo 10). Subseqüentemente, **58** foi submetido à reação de glicosilação com FmocThrOBn **29**, utilizando o sistema catalítico NIS/TMSOTf, com formação do glicoaminoácido inédito 6-OTs- $\alpha$ GalN<sub>3</sub>-FmocThrOBn **59** (69%). A estrutura de **59** foi confirmada por análises de <sup>1</sup>H RMN e massas de alta resolução (ESI-MS). O espectro de <sup>1</sup>H RMN apresentou sinais característicos da unidade sacarídica, como H-1 em  $\delta$  4,85 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz) e H-2 em  $\delta$  3,55 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  3,7 Hz;  $J_{2,3}$  11,2 Hz), e também da unidade derivada de aminoácido, como CH<sub>3</sub>-Thr em  $\delta$  1,27 (d, 3H,  $J$  6,2 Hz) (Anexo 11 A). O espectro de massas, por sua vez, confirmou a formação de adutos característicos [M+H]<sup>+</sup> 857,2697 e [M+Na]<sup>+</sup> 879,2520 (Anexo 11B).

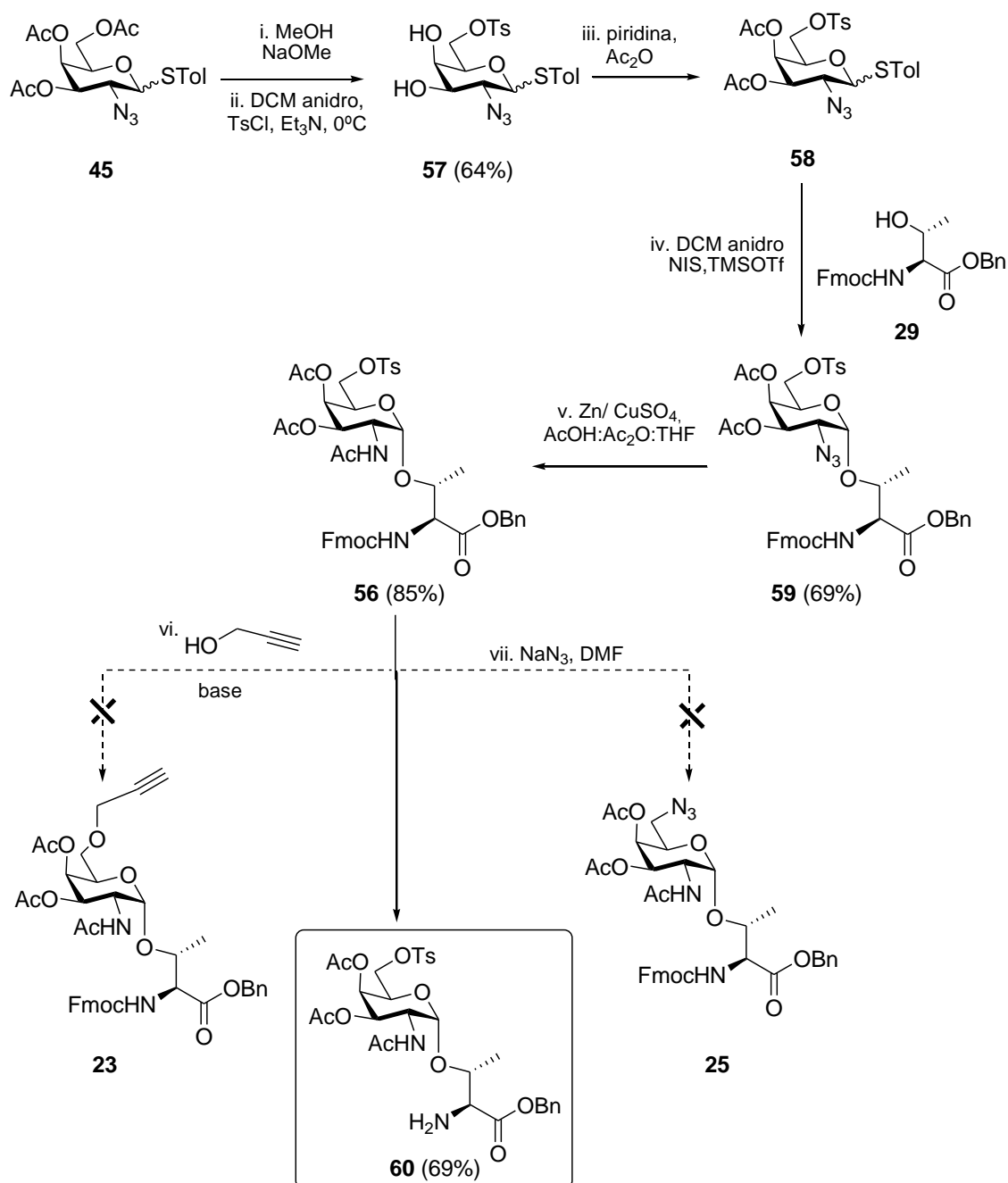
A próxima etapa envolveu a acetilação redutiva do grupo N<sub>3</sub> em C-2 de **59** (THF:Ac<sub>2</sub>O:AcOH, Zn e CuSO<sub>4</sub>), o que forneceu o derivado 6-OTs- $\alpha$ GalNAc-FmocThrOBn **56** (84,6%), outro derivado inédito que foi estruturalmente confirmado por análise de RMN <sup>1</sup>H e ESI-MS. O espectro de <sup>1</sup>H RMN apresentou sinais característicos do produto como NHCO em  $\delta$  5,85 (d,  $J$  9,5 Hz) além do deslocamento do H-2, antes em  $\delta$  3,55, para uma região de menor blindagem, na faixa de  $\delta$  4,29-4,12, condizente com a conversão do grupo N<sub>3</sub> em NHAc (Anexo 12 A). O espectro de massas confirmou a formação de íons moleculares característicos de adutos sodiado [M+Na]<sup>+</sup> 895,2718 e com potássio [M+K]<sup>+</sup> 911,2508 (Esquema 18) (Anexo 12C).

Todavia, a última etapa envolvendo o ataque do álcool propargílico ao grupo tosil para enfim obtenção de 3-prop-2-inil-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** não foi bem sucedida quando utilizada uma base fraca (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à temperatura ambiente, havendo apenas recuperação do material de partida **56**. Tentativas posteriores com aquecimento ou uso de base forte (NaH) (CAMPO et al, 2015) conduziram à remoção do grupo amino protetor de **56**, fato evidenciado pelo espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto isolado, o qual mostrou perda dos sinais característicos do grupo Fmoc (8 hidrogênios aromáticos, CH-Fmoc e CH<sub>2</sub>-Fmoc) (Anexo 13), assim, conduzindo ao composto 6-OTs- $\alpha$ GalNAc-NH<sub>2</sub>ThrOBn **60** (69%). Essa desproteção é possível de ser explicada visto que o procedimento padrão para remoção deste grupo protetor ocorre em condição alcalina (Esquema 18).

As dificuldades encontradas até então para funcionalizar C-6 com o grupo propinil estimularam a busca por procedimentos que resultassem no derivado com azido nesta posição, ou seja, o composto N<sub>3</sub>-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25**. Assim, foi proposta a substituição do grupo tosil por azido utilizando NaN<sub>3</sub> (WELL et al, 2006). Contudo, tal estratégia também mostrou sucesso limitado, mesmo avaliando diversas condições, tais como aquecimento (convencional e microondas), aumento do número de equivalentes de azida de sódio (4, 8 e 16 eq), bem como o



uso de promotor, como o éter de coroa 18-crown-6 (CAI et al, 2009a; CAI et al, 2009b). Curiosamente, notou-se a formação de **60** em todas as condições testadas logo após algumas horas de reação, mesmo à temperatura ambiente (Esquema 18). A necessidade do grupo Fmoc para posterior etapa de conjugação do glicoaminoácido à cadeia peptídica por estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS - *Solid Phase Peptide Synthesis*) impossibilitou continuar a rota visando obter os glicoaminoácidos 3-prop-2-inil-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** ou N<sub>3</sub>-6 $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25** a partir do composto **60**.



**Esquema 18.** Rota sintética proposta para obtenção de **23** e/ou **25** via intermediário **56** seletivamente tosilado em C-6.

Considerando a maior viabilidade de obtenção do derivado de ácido siálico funcionalizado com o grupo alcino Neu5Ac $\alpha$ 2-3-prop-2-inil **24**, a alternativa de funcionalizar C-6 da GalNAcThr com grupo azido antes da etapa de glicosilação foi priorizada. Assim, uma nova abordagem foi considerada utilizando o precursor já sintetizado 2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal(OAc)<sub>2</sub>-STol **58** (Esquema 19).

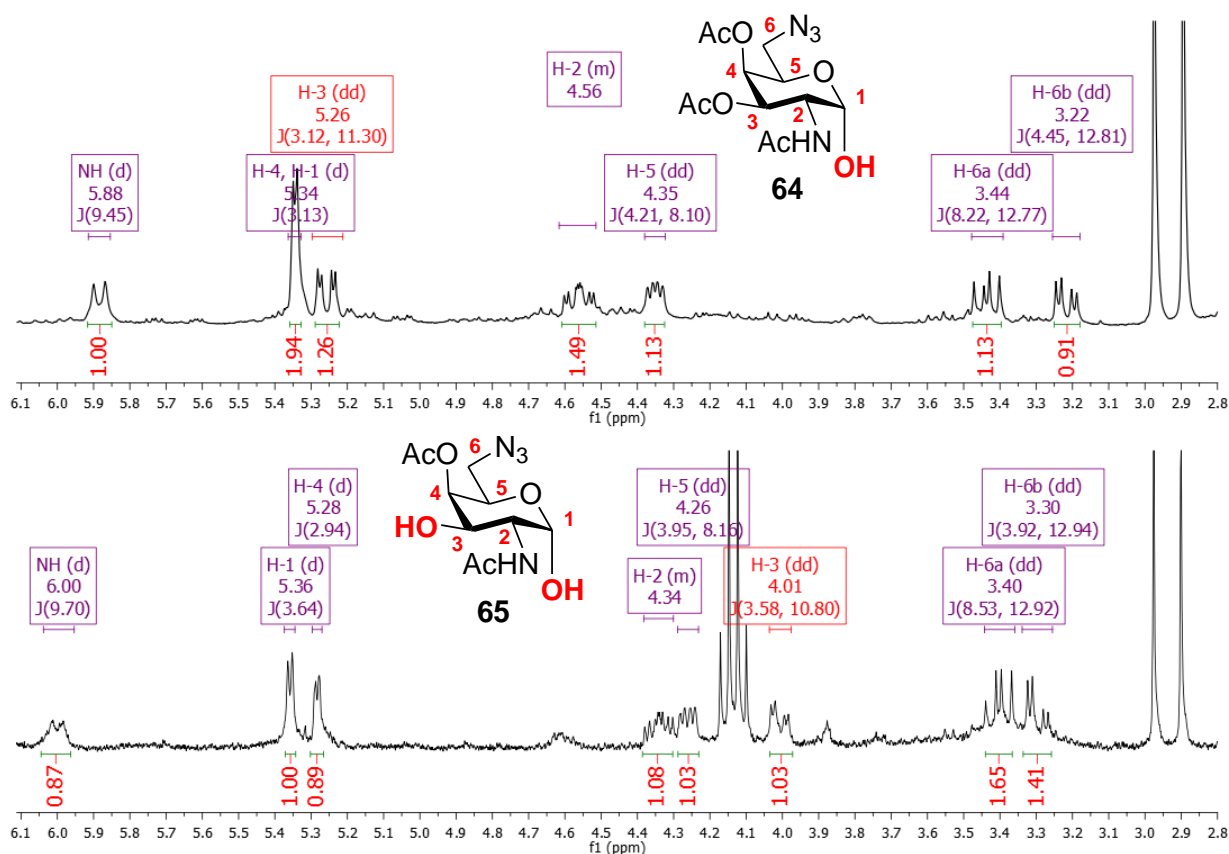
De modo geral, as seis primeiras etapas para obtenção de **58** já foram descritas previamente e resumidamente envolveram:

1. Diazotransferência a partir de cloridrato de galactosamina utilizando-se dos reagentes triflil azida (TfN<sub>3</sub>), gerado “in situ”, da base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e Cu(I) (MARCHIORI et al, 2015);
2. Acetilação do produto sem purificação prévia (piridina/Ac<sub>2</sub>O) para obtenção de 2-N<sub>3</sub>- $\beta$ Gal(OAc)<sub>4</sub> **44** (82,4%.)
3. Tratamento de **44** com *p*-tioresol e BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O com formação do produto STol-2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub> **45** (69%) como uma mistura de anômeros na proporção  $\alpha/\beta$  1:0,7. (LUO et al, 2013);
4. Desacetilação de **45** (NaOMe/MeOH), fornecendo 2-N<sub>3</sub>-Gal(OH)STol **61**;
5. Tosilação seletiva em C-6 sem purificação prévia de **61** pelo uso de TsCl e Et<sub>3</sub>N a 0°C, obtendo-se o composto 2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal-STol **57** (64%) (MARCOTULLIO et al, 2006).
6. Acetilação das posições 3 e 4 de **57** (piridina/Ac<sub>2</sub>O) fornecendo o derivado STol-2-N<sub>3</sub>-6-OTs-Gal(OAc)<sub>2</sub> **58** em rendimento quantitativo (Esquema 19A).

Observando a estrutura de **58** nota-se que a substituição do grupo OTs por N<sub>3</sub> não seria viável como etapa seguinte visto que o produto obtido teria dois grupos azidos (em C-2 e em C-6), perdendo, assim, a seletividade para reagir apenas na posição desejada (C-6). Desse modo, a próxima etapa envolveu a conversão do N<sub>3</sub> de **58** em NHAc por meio de acetilação redutiva (THF:Ac<sub>2</sub>O:AcOH, Zn e CuSO<sub>4</sub>), o que forneceu os anômeros  $\alpha$  ( $J_{1,2}$  5,6 Hz) 6-OTs- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **62 $\alpha$**  e  $\beta$  ( $J_{1,2}$  10,4 Hz) 6-OTs- $\beta$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **62 $\beta$** , possíveis de separação via coluna cromatográfica, com 46,7% e 26,5% de rendimento, respectivamente (Esquema 19) (Anexos 14 e 15). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H de ambos compostos apresentaram dupletos integrando para 1H próximos de  $\delta$  5,5-6,0, evidenciando o grupo amida formado além de simpletos em torno de  $\delta$  2,04, condizentes com o grupo *N*-acetil (3H). Uma vez com o grupo NHAc em C-2, o produto da glicosilação seria  $\beta$ -substituído, e não mais  $\alpha$  como proposto inicialmente. Contudo, tal modificação não comprometeria a atividade da estrutura do composto final, visto que estudos prévios mostraram que o açúcar  $\beta$ GalNAc ligado a Thr

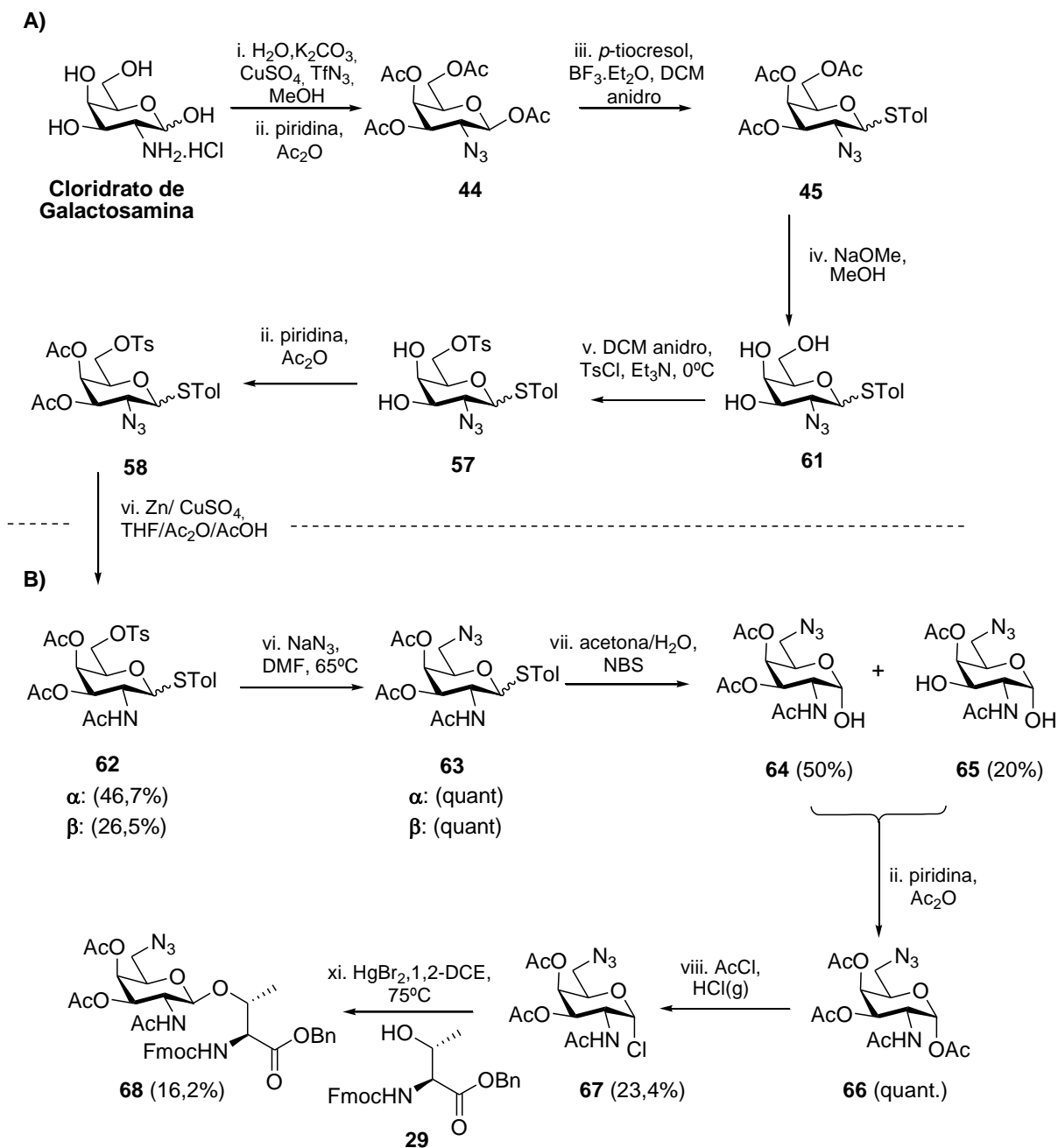
( $\beta$ GalNAcThr) apresentou maior imunogenicidade quando comparado ao antígeno Tn natural ( $\alpha$ GalNAc-Thr) (CAMPO et al, 2017).

Assim, a substituição do grupo tosil por azido de **62 $\alpha$**  e **62 $\beta$**  utilizando azida de sódio em DMF à 75°C resultou na obtenção de 6-N<sub>3</sub>- $\alpha$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **63 $\alpha$**  e de 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub> **63 $\beta$** , respectivamente, ambos em rendimentos quantitativos (CARVALHO et al, 2010). As análises de RMN <sup>1</sup>H de **63 $\alpha$**  e **63 $\beta$**  mostraram a perda dos hidrogênios aromáticos e da metila referentes ao grupo toсила, além de alteração de deslocamento químico (blindagem) dos hidrogênios H-6a e H-6b devido à presença do grupo N<sub>3</sub> (Anexos 16 e 17). Subseqüentemente, a remoção do grupo *p*-tiocresol, ocorreu pelo tratamento de **63 $\alpha$**  com *N*-bromosuccinamida em acetona/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v (CAI et al, 2009b), o que forneceu tanto o hemiacetal **64** (50%) (Anexo 18), quanto o inesperado hemiacetal com a posição C-3 desacetilada **65** em 20% de rendimento (Anexo 19). A diferença entre estes compostos pôde ser observada, além dos Rf's em CCD, por seus espectros de RMN <sup>1</sup>H, onde o H-3 de **64**, por estar ligado a um carbono contendo grupo OAc, encontra-se em uma região de maior desblindagem ( $\delta$  5,26) em relação ao H-3 de **65** ( $\delta$  4,01), que se encontra ligado a um carbono com hidroxila livre (Figura 16, Esquema 19).



**Figura 16.** Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de **64** e **65**, evidenciando a diferença de deslocamento dos H-3 em vermelho.

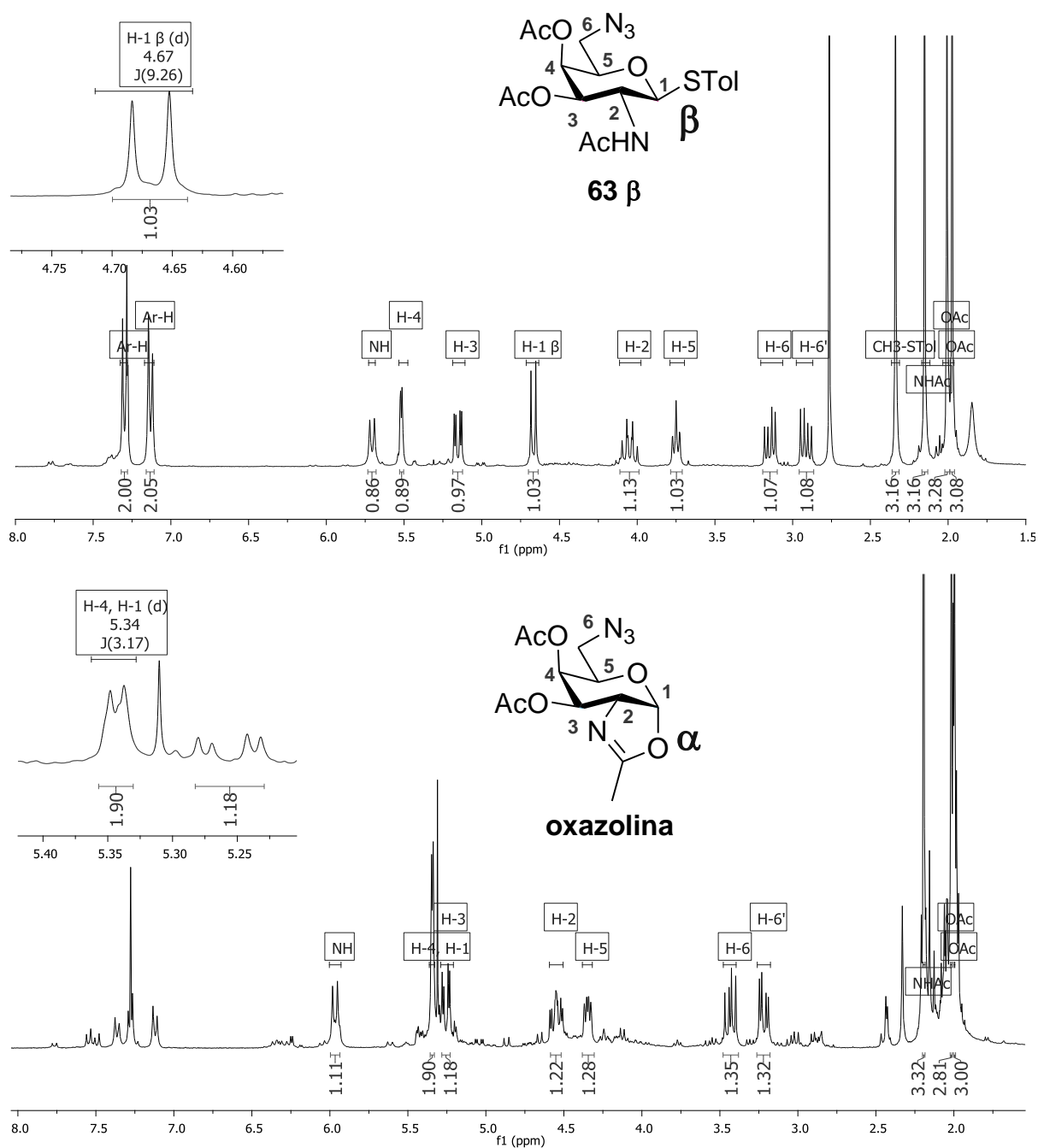
A décima etapa desta rota envolveu a acetilação de C-1 de **64** e das posições C-1/C-3 de **65** (piridina/Ac<sub>2</sub>O), sendo que em ambos os casos houve formação do mesmo composto inédito 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** em rendimentos quantitativos. A estrutura de **66** foi confirmada por análise de RMN <sup>1</sup>H (Anexo 20A) e por ESI-MS, sendo encontrado picos referentes aos adutos sodiado [M+Na<sup>+</sup>] 395,1172 e com potássio [M+K<sup>+</sup>] 411,0894 (Anexo 20B). Por fim, **66** foi submetido à reação de cloração de C-1 utilizando cloreto de acetila como solvente e HCl(g) como reagente (WEIWER et al, 2009; YANG et al, 2012) o que forneceu o α-cloreto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub>Cl **67** com 23,4% de rendimento. A análise de RMN <sup>1</sup>H de **67** mostrou os mesmos sinais do material de partida **66**, porém, com ausência de um simpleto em torno de δ 2,20, caracterizando a perda do grupo OAc em C-1 (Anexo 21). Assim, uma vez obtido o doador **67**, a etapa de glicosilação com o aminoácido protegido FmocThrOBn **29** envolveu o uso do catalisador HgBr<sub>2</sub> em 1,2-DCE à 75°C (CAMPO et al, 2007; CAMPO & CARVALHO, 2008). Após quase 2 dias sob agitação, o glicoaminoácido inédito 6-N<sub>3</sub>-βGalNAc-ThrOBn **68** foi obtido com 16,2% de rendimento (Esquema 19B) e sua estrutura confirmada por RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e ESI-MS. O espectro de <sup>1</sup>H de **68** mostrou sinais da unidade sacarídica, como H-2 em δ 3,82 (dd, *J*<sub>1,2</sub> 8,3 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 10,8 Hz), H-6a em δ 3,33 dd, (*J*<sub>5,6a</sub> 7,1 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,7 Hz) e H-6b em δ 3,31 (dd, *J*<sub>5,6b</sub> 5,7 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 12,7 Hz), além da unidade de aminoácido, como hidrogênios aromáticos em torno de δ 7,8-7,30 e o CH<sub>3</sub>-Thr em δ 1,23 (Anexo 22 A). Ademais, foram notadas mudanças na conformação e no deslocamento químico do H-1, sendo modificado de α (*J*<sub>1,2</sub> 3,7 Hz) em δ 6,28 no material de partida **67**, para um sinal β em δ 4,66 em **68** (*J*<sub>1,2</sub> 8,3 Hz). Já pelo espectro de massas, foi verificada a presença de três íons majoritários, sendo estes referentes aos adutos característicos [M+H<sup>+</sup>] 744,2853, [M+Na<sup>+</sup>] 766,2695 e [M+K<sup>+</sup>] 782,2431 (Anexo 22 C).



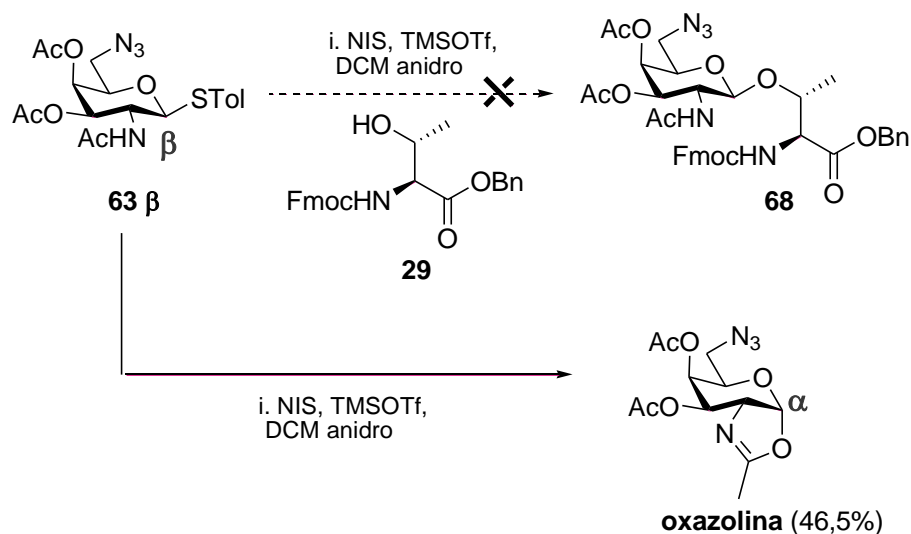
**Esquema 19.** Rota sintética adaptada para obtenção do azido-glicoaminoácido **68**. **A)** Mesmas etapas aplicadas anteriormente para obtenção de **58**. **B)** Novas etapas propostas na síntese de **68**.

Em vista do baixo rendimento na síntese do azido-glicoaminoácido **68** pelo método do cloreto **67**, somado ao elevado número de etapas realizadas, possíveis alternativas visando otimizar a obtenção de **68** foram analisadas. A primeira tentativa envolveria a glicosilação entre um doador com o grupo *p*-ti cresol **63 $\alpha$**  / **63 $\beta$**  e o aminoácido protegido FmocThrOBn **29** através do procedimento com NIS/TMSOTf em condições anidras (LUO et al, 2013). Assim, o composto 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **63 $\beta$**  foi submetido às condições supracitadas e, ao acompanhar a reação por CCD, observou-se a formação de um produto não UV-visível com Rf menor que o material de partida. Este composto, ao ser isolado e caracterizado por RMN <sup>1</sup>H não

apresentou sinais típicos do grupo *p*-tiocresol, mas também não mostrou sinais referentes ao aminoácido **29**, o que inferiu a não obtenção do azido-glicoaminoácido desejado **68**. O H-1 do material de partida **63β**, antes em  $\delta$  4,67 com  $J_{1,2}$  9,1 Hz, foi encontrado em  $\delta$  5,34 com  $J_{1,2}$  3,2 Hz, característico de anômero  $\alpha$ . Desse modo, foi suposto que o produto obtido decorreu do ataque do grupo NHAc presente em C-2 ao carbono anomérico, o que liberou o grupo STol e gerou um derivado oxazolina (46,5%), invertendo a configuração do substituinte em C-1 (Figura 17, Esquema 20).



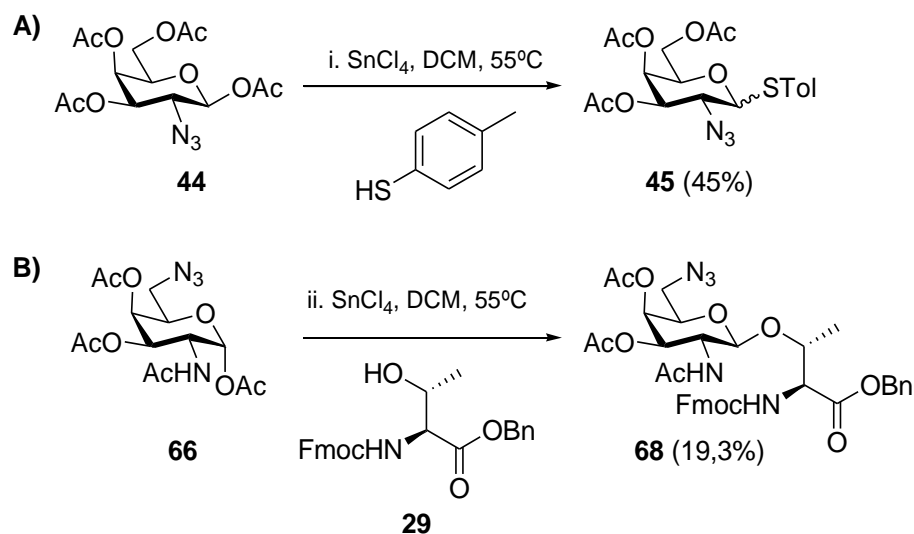
**Figura 17.** Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) do material de partida **63β** e da oxazolina formada, evidenciando a diferença na constante de acoplamento de H-1 entre os compostos.



**Esquema 20.** Tentativa de obtenção do glicoaminoácido **68** a partir do doador com STol em C-1 **63** $\beta$  utilizando sistema catalítico NIS/TMSOTf, porém, obtendo-se apenas oxazolidina.

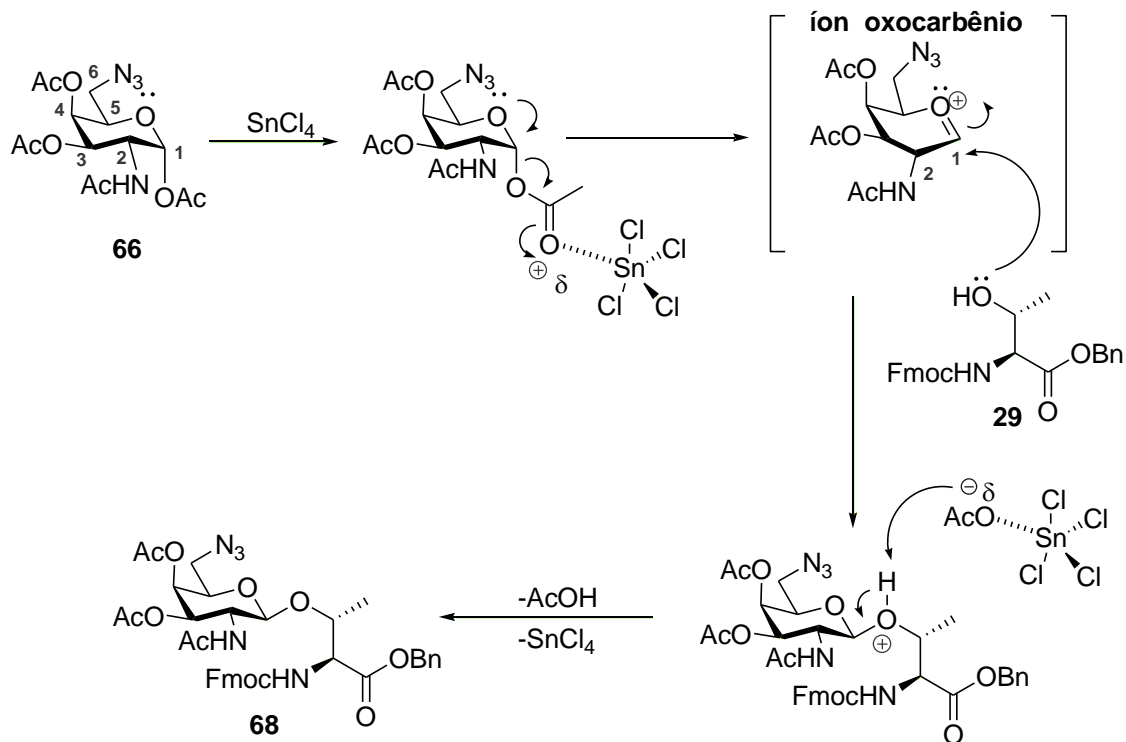
Tentativas posteriores de utilizar a oxazolina como doador glicosídico também foram avaliadas (BRISTER et al, 2014), porém sem êxito. Desta forma, dando continuidade à busca por alternativas de doadores/promotores glicosídicos, foi considerada a possível reação de glicosilação entre o aminoácido **29** e um doador contendo grupo *O*-acetil em C-1, como o composto 6-N<sub>3</sub>- $\alpha$ -GalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66**, na presença do promotor tetracloreto de estanho (SnCl<sub>4</sub>) (HUANG; WANG; HUANG, 2004; NIKSERESHT, 2016).

Primeiramente, foi testada a condição descrita na literatura para obtenção de tioaçúcares (HUANG; WANG; HUANG, 2004) usando o intermediário 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>4</sub> **44** como modelo. Assim, solução de **44** em DCM anidro foi tratada com *p*-tiocresol e SnCl<sub>4</sub>, o que levou à obtenção do produto 2-N<sub>3</sub>-Gal(OAc)<sub>3</sub>STol **45** (45%) após agitação *overnight* a 55°C (Esquema 21A). Uma vez validada, esta metodologia foi empregada na reação de glicosilação entre o doador **66** e o aceptor FmocThrOBn **29**, os quais foram solubilizados em DCM anidro e tratados com SnCl<sub>4</sub>, com agitação da mistura reacional a 55°C por 20h. Após purificação por CCC, o produto 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ -GalNAc-ThrOBn **68** foi obtido com rendimento de 19,3% (Esquema 21B).



**Esquema 21.** Reações de glicosilação empregando o promotor  $\text{SnCl}_4$ . **A)** Síntese de tio-açúcar modelo 2- $\text{N}_3\text{Gal}(\text{OAc})_3\text{STol}$  **45** para validação da metodologia com  $\text{SnCl}_4$ . **B)** Obtenção do  $\beta$  azido-glicoaminoácido **68** a partir do doador com OAc em C-1 **66**.

O mecanismo proposto para esta reação envolve o estanho atuando como ácido de Lewis, sendo capaz de interagir com o oxigênio do grupo OAc em C-1, o que favorece o deslocamento de um dos pares de elétrons livres do oxigênio do anel, formando o íon oxocarbênio. O estado de transição contendo o íon oxocarbênio sofre ataque nucleofílico em C-1 pela hidroxila de FmocThrOH **29** e, por fim, o acetato liberado abstrai o próton, gerando AcOH, restaurando o promotor  $\text{SnCl}_4$  e formando o produto **70**, como descrito no Esquema 22.



**Esquema 22.** Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **68** a partir de **66** utilizando  $\text{SnCl}_4$  como promotor.



#### 4.1.2.1 OTIMIZAÇÃO DE ROTA PARA OBTENÇÃO DO BLOCO 6-N<sub>3</sub>-βGalNAc-ThrOBn **68**.

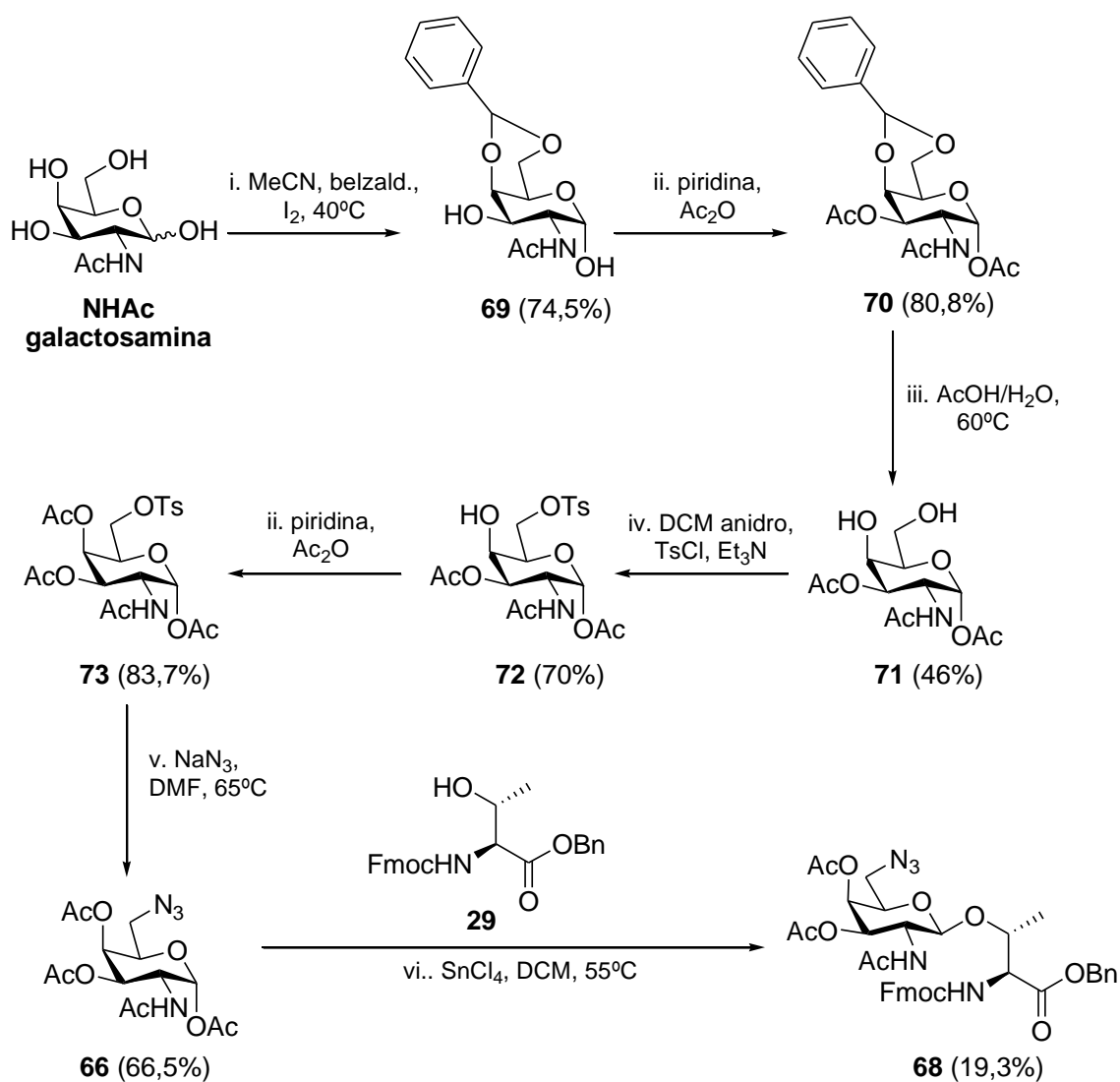
Uma otimização da rota descrita no Esquema 19 foi proposta visando diminuir o número total de etapas e, conseqüentemente, aumentar o rendimento global para síntese de **68**. Dessa maneira, considerando a *N*-acetil galactosamina comercial como material de partida, foi proposta uma rota a qual o doador 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** seria obtido após apenas seis etapas (Esquema 23). Optou-se por não envolver a obtenção do cloreto αGalNAc(OAc)<sub>2</sub>Cl **67** nessa rota visto os baixos rendimentos previamente alcançados tanto na sua síntese (23,4%) bem como na sua utilização como doador na etapa de glicosilação (16,2%).

Desse modo, a primeira etapa envolveu a proteção seletiva das posições C-4 e C-6 de GalNAc pelo seu tratamento com benzaldeído dimetilacetal e iodo (PANCHADHAYEE & MISRA, 2008), o que forneceu o composto 4,6-benzilideno-αGalNAc **69** (74,5%). Este apresentou maior R<sub>f</sub> que o material de partida em CCD e sinais característicos do grupo benzilideno após análise de RMN <sup>1</sup>H, como hidrogênios aromáticos na faixa de δ 7,57-7,32 e um simpleto em δ 5,62, referente ao hidrogênio benzílico (Anexo 23). Em seguida, **69** teve as posições C-1 e C-3 acetiladas (piridina/Ac<sub>2</sub>O), com obtenção do derivado 4,6-benzilideno-1,3-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **70** com 80,3% de rendimento (Anexo 24). O grupo benzilideno foi então removido pelo tratamento de **70** com AcOH/H<sub>2</sub>O 8:2 v/v à 60°C por 1 hora (PADRÓN; MORALES; VÁZQUES, 1998), o que resultou no composto desprotegido em C-4 e C-6 αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **71** (46%) (Anexo 25). Posteriormente, a tosilção de C-6 de **71** foi realizada utilizando o mesmo procedimento previamente descrito, com TsCl e Et<sub>3</sub>N em DCM anidro (LUO et al, 2013), o que gerou um produto UV-visível com maior R<sub>f</sub> que **71**. Após purificação, 6-OTs-αGalNAc(OAc)<sub>2</sub> **72** foi isolado com 70% de rendimento e seu espectro de RMN <sup>1</sup>H apresentou dois dupletos em δ 7,76 e δ 7,34 integrando para 2H cada, além de um simpleto em δ 2,44 com integral de 3H, o que confirmou a introdução do grupo tosil na estrutura (Anexo 26). A posição C-4 livre de **72** foi acetilada (piridina/Ac<sub>2</sub>O), fornecendo o derivado 6-OTs-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **73** com 83,7% de rendimento (Anexo 27). Por fim, a substituição do grupo OTs por N<sub>3</sub> foi realizada segundo protocolo utilizado na obtenção de 6-N<sub>3</sub>-GalNAc(OAc)<sub>2</sub>STol **63α/63β** (Esquema 19B). Assim, **73** foi convertido no produto 6-N<sub>3</sub>-αGalNAc(OAc)<sub>3</sub> **66** (66,5%) (Esquema 23) (CARVALHO et al, 2010).

Foi interessante notar que o rendimento obtido nessa última etapa descrita (66,5%) foi menor que o obtido anteriormente (quant.), mesmo após tentativas de otimização de variáveis como tempo reacional (6, 12, 24 e 36h), quantidade de equivalentes de NaN<sub>3</sub> (8.0, 10 e 16 eq)

e temperatura (T. amb., 50, 75, 85 e 100°C). Foi observado que abaixo de 75°C a reação de substituição de OTs por N<sub>3</sub> ocorria de forma muito lenta, porém, a 85°C ou 100°C ocorria degradação do material de partida. Tal fato também foi observado ao aumentar o número de equivalentes de NaN<sub>3</sub> para 10 eq ou 16 eq. Tais resultados podem ser devidos a maior estabilidade de **62α**/**62β** se comparados ao composto **73**, visto que estes suportaram condições reacionais mais drásticas. Tal característica advém da proteção de C-1 pelo grupo STol, que por reagir apenas em condições específicas é mais resistente a sofrer degradação.

Por fim, conforme descrito previamente, o doador **66** foi utilizado para reação de glicosilação com o acceptor FmocThrOBn **29** utilizando o protocolo com SnCl<sub>4</sub>. O produto 6-N<sub>3</sub>-βGalNAc-ThrOBn **68** foi obtido com rendimento equivalente ao anterior (19,3%) (Esquema 21B). Esta rota, com 6 etapas a menos que a anterior, reduziu o tempo gasto além de economizar reagentes.

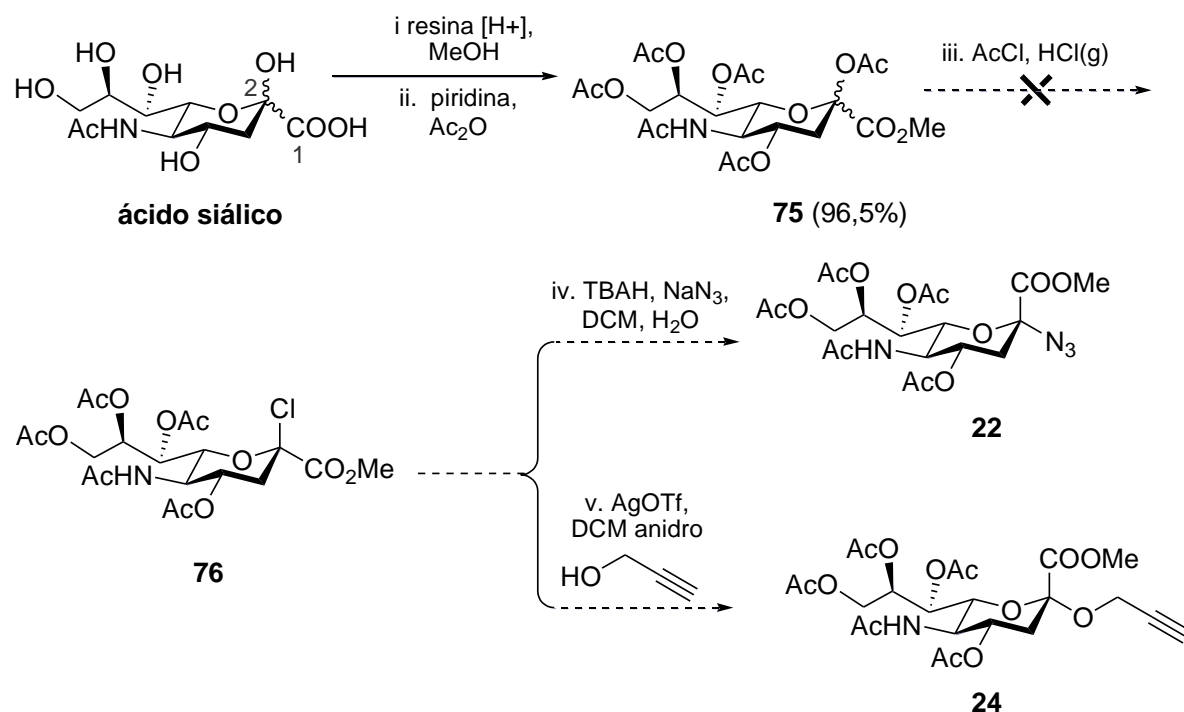


**Esquema 23.** Otimização da rota sintética para obtenção do doador com OAc em C-1 **66** e o bloco de construção desejado 6-N<sub>3</sub>-βGalNAcThr **68**.

#### 4.1.3. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE ÁCIDO SIÁLICO.

Outra parte fundamental deste projeto refere-se à obtenção do bloco derivado do ácido siálico Neu5Ac $\alpha$ 2-N<sub>3</sub> **22** ou Neu5Ac $\alpha$ 2-3-prop-2-inil **24** (Esquema 6). A rota sintética proposta para a obtenção de ambas as estruturas foi baseada em reações clássicas descritas na literatura como mostra o Esquema 24 (WEIWER et al, 2009; YANG et al, 2012).

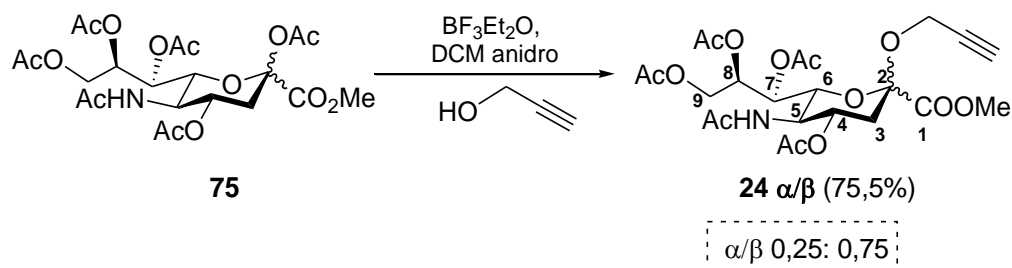
A primeira etapa envolveu a esterificação do grupo COOH do ácido siálico comercial através do seu tratamento com resina de troca ácida (Dowex 50WX8-200) em MeOH. A seguir, foi realizada a acetilação das hidroxilas livres (piridina/Ac<sub>2</sub>O), o que forneceu o derivado protegido **75** (96,5%), sendo este submetido à reação de cloração utilizando cloreto de acetila e HCl(g) como solvente e reagente à temperatura ambiente. Ao contrário do esperado, o composto clorado **76** não foi obtido, o que impossibilitou a última etapa de substituição do cloro por um grupo azido na presença de azida de sódio e hidróxido de tetrabutylamônio (TBAH). Esta rota também havia sido planejada visando possível obtenção do derivado Neu5Ac $\alpha$ 2-3-prop-2-inil **24**, uma vez que o cloro é um bom grupo abandonador e possibilitaria uma substituição pelo álcool propargílico. Desta forma, a obtenção do derivado **24** a partir do cloreto **76** também foi impossibilitada (Esquema 24).



**Esquema 24.** Rota sintética proposta para obtenção dos blocos **22** e **24** a partir do cloreto de ácido siálico **76**.

Sendo assim, uma estratégia simplificada e baseada exclusivamente na obtenção de Neu5Ac $\alpha$ 2-3-prop-2-inil **24** foi considerada, utilizando-se BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O, promotor clássico para reações de glicosilação com doadores protegidos com o grupo OAc na posição anomérica (WU & GUO, 2006). Logo, ácido siálico esterificado e acetilado **75** foi solubilizado em DCM anidro e tratado com álcool propargílico e BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O, sendo o derivado Neu5Ac $\alpha$ / $\beta$ 2-3-propinil **24**  $\alpha/\beta$  obtido como mistura de anômeros predominantemente  $\beta$  ( $\alpha/\beta$  0,25:0,75) com 75,5% de rendimento (Esquema 25). A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H de **24**  $\alpha/\beta$  mostrou a existência de sinais duplicados, como sinais característicos do hidrogênio metínico (C $\equiv$ CH) em  $\delta$  2,54 (t, *J* 2,1 Hz) e em  $\delta$  2,44 (t, *J* 2,0 Hz), além de H-3 equatoriais (H-3<sub>eq</sub>) em  $\delta$  2,46 (dd, *J*<sub>3e,4</sub> 4,6 Hz, *J*<sub>3a,3e</sub> 12,8 Hz) e em  $\delta$  2,46 (dd, *J*<sub>3e,4</sub> 5,2 Hz, *J*<sub>3a,3e</sub> 12,7 Hz), indicando a ocorrência de mistura de anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  do substituinte propinil em C-2 (Anexo 28 A). A análise de ESI-MS de **24**  $\alpha/\beta$ , por sua vez, apresentou íons moleculares característicos de adutos sodiado [M+Na]<sup>+</sup> 552,1689 e com potássio [M+K<sup>+</sup>] 568,1429 (Anexo 28 B).

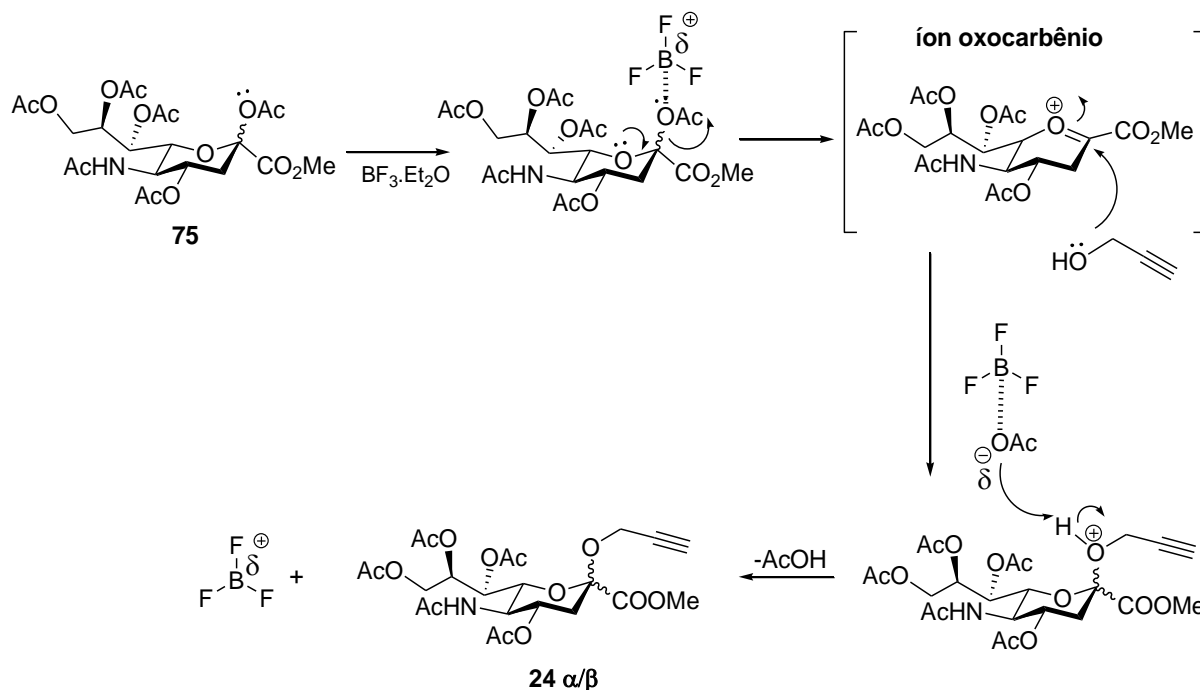
Vale ressaltar que, embora não exista hidrogênio anomérico, a configuração dos substituintes em C-2 de derivados do ácido siálico é inferida com base no deslocamento químico do hidrogênio equatorial da posição C-3 (H-3<sub>eq</sub>), sendo que o anômero  $\alpha$  apresenta sinal de H-3<sub>eq</sub> em região mais desblindada que o anômero  $\beta$  (WU & GUO, 2006; TROPPEL et al, 1991; WEIWER et al, 2009).



**Esquema 25.** Rota sintética utilizada na obtenção do bloco **24**  $\alpha/\beta$  a partir do ácido siálico esterificado e peracetilado **75**.

O mecanismo proposto em reações de glicosilação envolvendo o promotor BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O e doadores glicosídicos contendo grupo OAc na posição anomérica (C-1) resulta da interação do átomo de oxigênio com o átomo de boro do BF<sub>3</sub>, um ácido de Lewis. Após essa interação, ocorre o compartilhamento dos pares de elétrons livres do oxigênio do anel pirano e subsequente formação do estado de transição contendo íon oxocarbênio, como descrito previamente. Este, por sua vez, sofre ataque do álcool propargílico sendo então desprotonado,

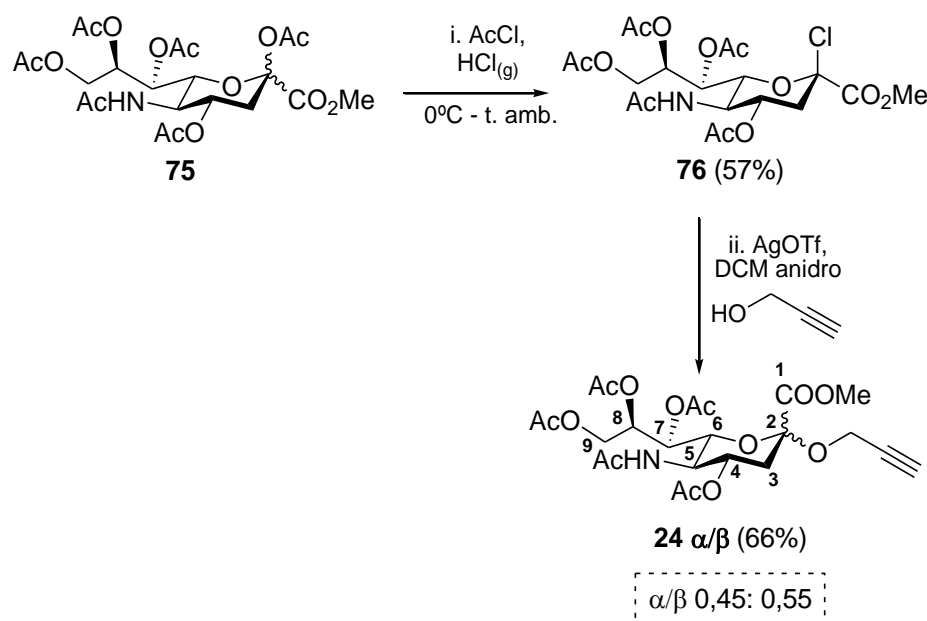
o que gera o produto Neu5Ac $\alpha/\beta$ 2-3-prop-2-inil **24**  $\alpha/\beta$  e restaura o trifluoreto de boro (Esquema 26) (WU & GUO, 2006).



**Esquema 26.** Mecanismo proposto para obtenção do derivado de ácido siálico com grupo alcino **24**  $\alpha/\beta$  a partir do composto **75** e utilizando-se o promotor  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .

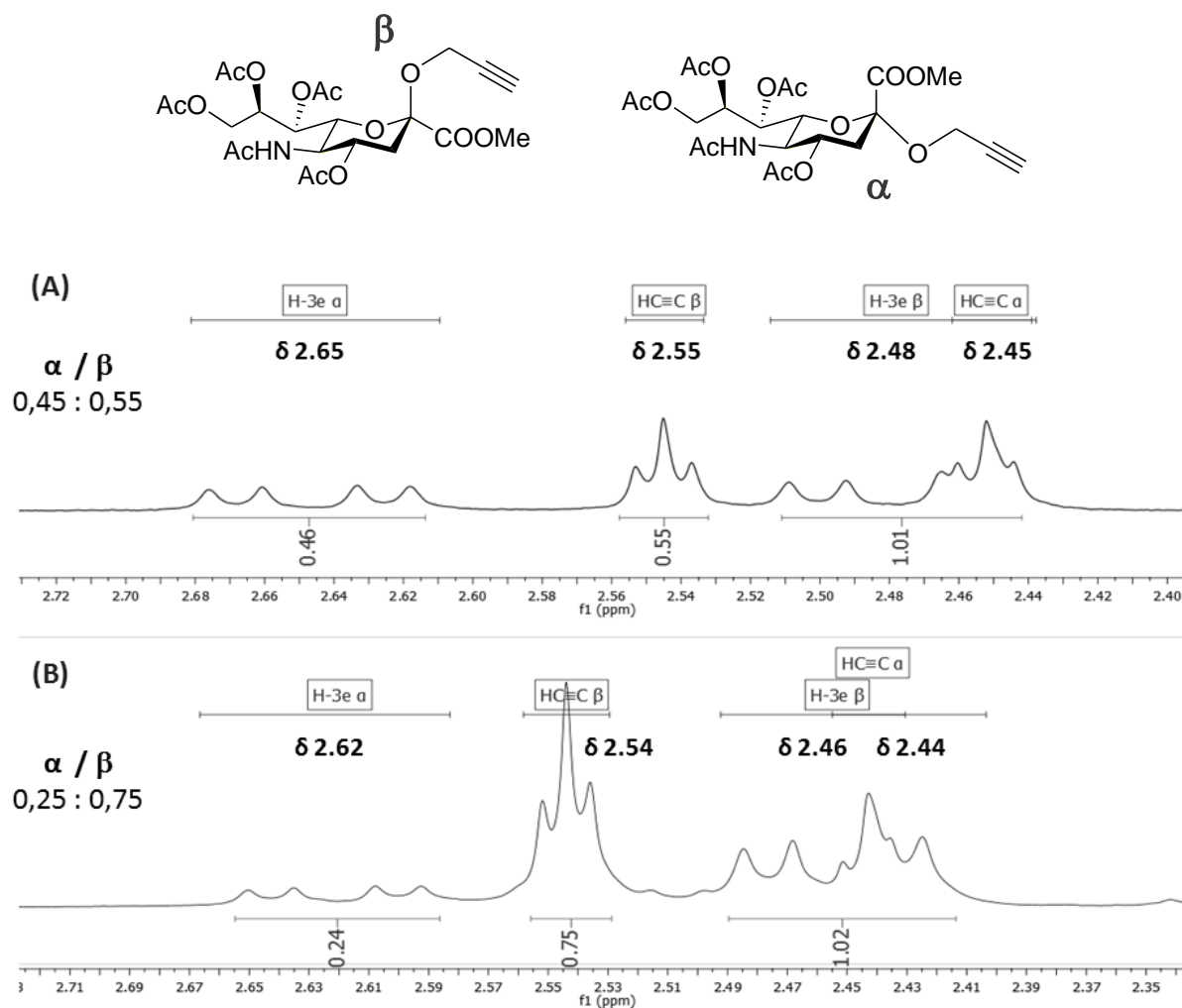
Como o derivado **24** proposto inicialmente possui o grupo propinil na configuração  $\alpha$ , a estratégia inicial descrita no Esquema 24 para obtê-lo, a partir do cloreto **76**, foi novamente testada (WEIWER et al, 2009; YANG et al, 2012). Desse modo, ácido siálico protegido e acetilado **75** foi submetido à reação de cloração utilizando cloreto de acetila e  $\text{HCl}(\text{g})$ . Após permanecer inicialmente resfriada a  $-20^\circ\text{C}$  (30 min. iniciais), a reação foi então conduzida à temperatura ambiente por mais 24 h, fornecendo o  $\beta$ -cloreto de ácido siálico **76** com 57% de rendimento. Sua estrutura foi confirmada por análise de RMN  $^1\text{H}$ , a qual mostrou sinais característicos do produto, como três duplo-dupletos em  $\delta$  5,38,  $\delta$  4,06 e  $\delta$  2,78 relativos à H-7 ( $J$  2,0 Hz,  $J$  6,8 Hz), H-9 ( $J$  3 5,8 Hz,  $J$  12,5 Hz) e H-3 $_{\text{eq}}$  ( $J_{3\text{eq},4,6}$  Hz,  $J_{3\text{ax}/3\text{eq}}$  13,9 Hz), um simpleto do grupo éster em  $\delta$  3,87 e cinco simpletos entre  $\delta$  2,12-2,05 e  $\delta$  1,91, referentes aos grupos acetila ( $\text{COCH}_3$ ) e acetamido ( $\text{NHCOCH}_3$ ), respectivamente (Anexo 29). A seguir, a reação do cloreto **76** com álcool propargílico foi realizada na presença de triflato de prata ( $\text{AgOTf}$ ) como catalisador e DCM anidro como solvente. A mistura foi inicialmente resfriada a  $-20^\circ\text{C}$ , seguida da adição de  $\text{AgOTf}$  em tolueno anidro e agitação por 2h à temperatura ambiente (Esquema 27). Desta forma, foi também obtido o produto **24**  $\alpha/\beta$ , porém como

mistura de isômeros  $\alpha/\beta$  0,45:0,55 com 66% de rendimento após purificação por cromatografia flash (Anexo 30, Esquema 27).



**Esquema 27.** Síntese da mistura  $\alpha/\beta$  de 2-propinil-ácido siálico **24**  $\alpha/\beta$  utilizando  $\text{AgOTf}$  como catalisador e o cloreto **76** como precursor.

A confirmação das atribuições e identificação dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  foi estabelecida com base na comparação dos deslocamentos químicos e integrais dos sinais  $\text{H-3}_{\text{eq}}$  e hidrogênio metínico nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos produtos **24**  $\alpha/\beta$  obtidos na proporção  $\alpha/\beta$  0,25:0,75 e 0,45:0,55. Foi observado que no derivado  $\alpha$ , o sinal referente ao  $\text{H-3}_{\text{eq}}$  ocorre em torno de  $\delta$  2,62, sendo mais desblindado que o sinal característico do alcino terminal (triplete), em torno de  $\delta$  2,44. Por outro lado, no anômero  $\beta$ , o  $\text{H-3}_{\text{eq}}$  encontra-se próximo de  $\delta$  2,46, dessa vez mais blindado que o sinal do alcino em torno de  $\delta$  2,54 (Figura 18).



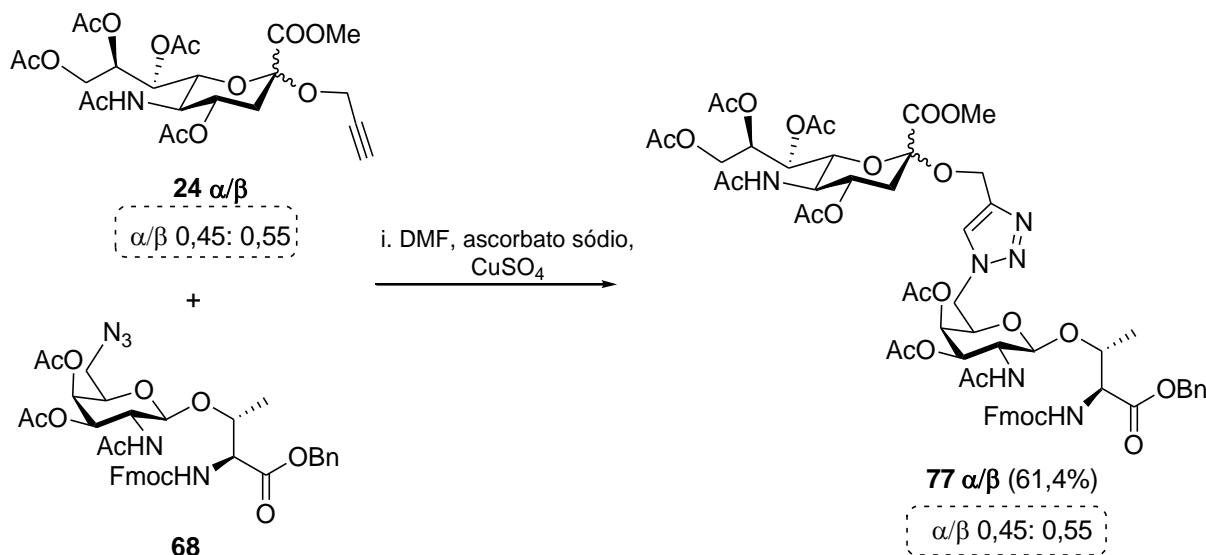
**Figura 18.** Expansão do espectro de  $^1\text{H}$  RMN da mistura de **24**  $\alpha/\beta$  evidenciando as diferenças no deslocamento químico dos hidrogênios referentes aos H-3<sub>eq</sub> e do grupo propinil entre os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ .

Apesar das diversas tentativas, não foi possível realizar a separação cromatográfica dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  de **24**  $\alpha/\beta$  e, por esta razão, o produto em mistura com maior proporção do anômero  $\alpha$  ( $\alpha/\beta$  0,45 : 0,55) foi utilizado na etapa seguinte de formação do anel triazólico 1,2,3-1,4-dissubstituído via estratégia de 'click chemistry'.

#### 4.1.4 SÍNTESE DO GLICOAMINOÁCIDO TRIAZÓLICO ANÁLOGO DO ANTÍGENO STn

Uma vez obtidos os precursores contendo azido 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** e alcino Neu5Ac $\alpha/\beta$ 2-3-propinil **24**  $\alpha/\beta$ , foi realizada reação de ciclo-adição 1,3-dipolar ("click chemistry") catalisada por Cu(I) - CuAAC. Assim, os blocos de **68** e **24**  $\alpha/\beta$  foram solubilizados em DMF e transferidos para tubo de microondas, sendo então tratados com o agente redutor ascorbato de sódio e solução 10% CuSO<sub>4</sub> para reação de ciclo-adição-1,3-dipolar

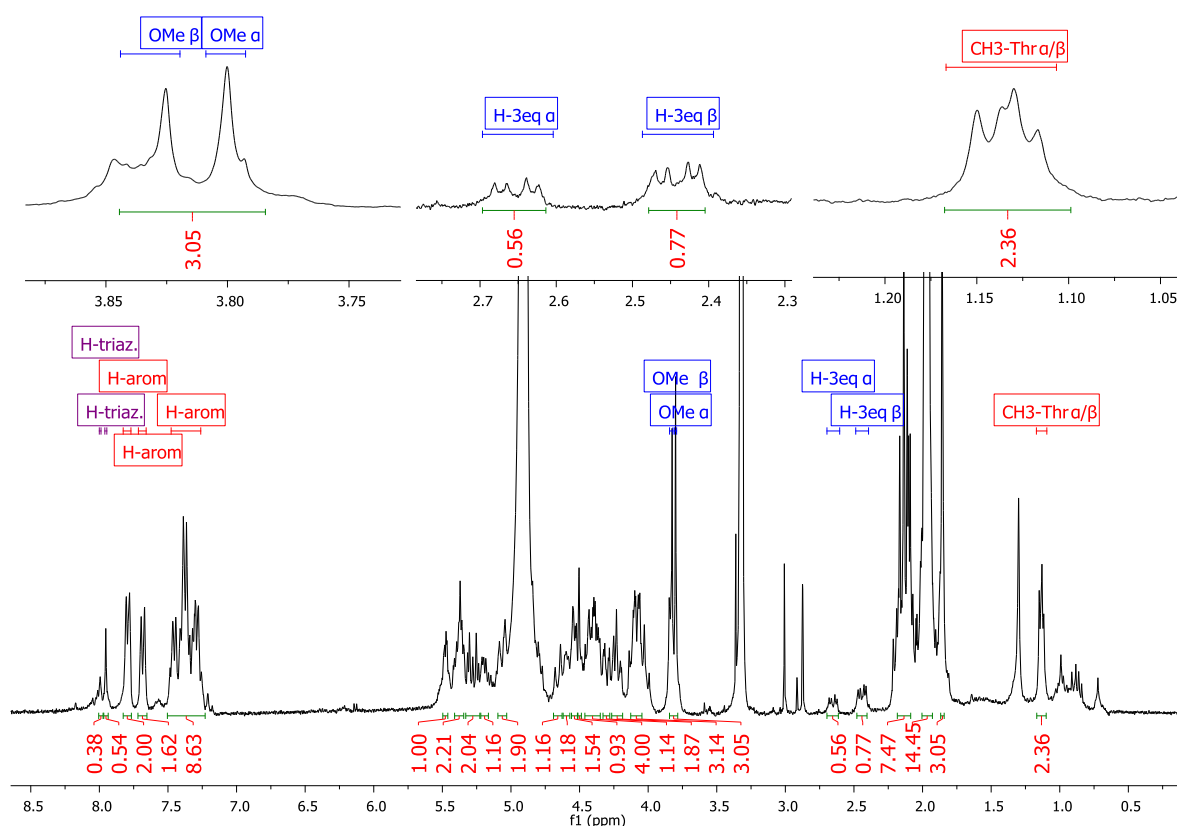
catalisada por Cu(I) (ARAGÃO-LEONETI et al, 2010). Após irradiação à 70°C (150 W) por 10 min, o composto **77**  $\alpha/\beta$  foi obtido com 61,4% de rendimento como mistura de anômeros na porção siálica, mantendo a proporção  $\alpha/\beta$  0,45:0,55 (Esquema 28).



**Esquema 28.** Reação de ciclo-adição-1,3-dipolar catalisada por Cu(I) realizada para obtenção do derivado triazólico-1,4-dissubstituído **77**  $\alpha/\beta$ .

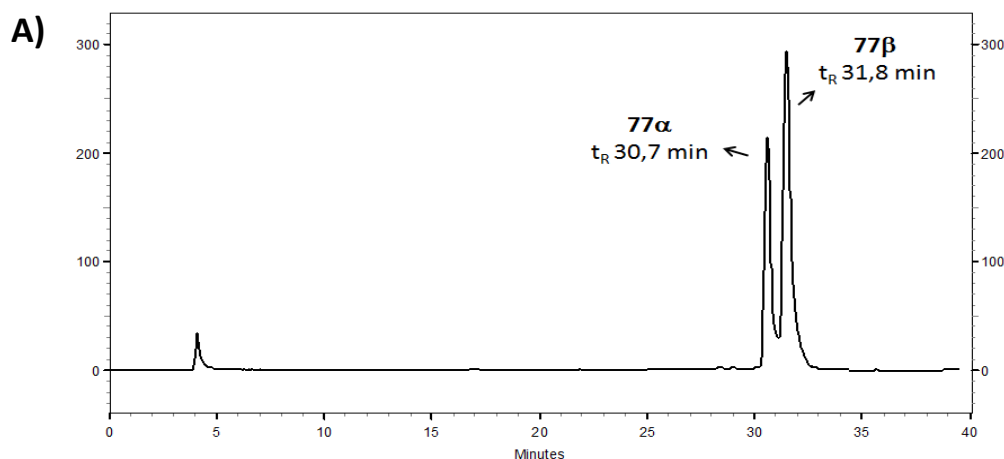
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **77**  $\alpha/\beta$  apresentou sinais condizentes com a formação do produto, como o simpleto em  $\delta$  7,95, referente ao H-triazólico, bem como o deslocamento para região de menor blindagem dos H-6a/H-6b, previsto pela conversão do grupo azido em C-6 de **68** no grupo 1,2,3-triazol. Adicionalmente, foram observados sinais típicos tanto da unidade do glicoaminoácido (sinais aromáticos e do  $\text{CH}_3$ -Thr - em vermelho) bem como do ácido siálico (metoxila e H-3eq - azul), sendo ainda notória a presença de sinais duplicados de OMe, H-3eq e  $\text{CH}_3$ -Thr, o que indicou a obtenção do produto **77**  $\alpha/\beta$  na forma de mistura  $\alpha/\beta$  (unidade siálica) (Figura 19). A estrutura do composto **77**  $\alpha/\beta$  também foi confirmada por análise de ESI-MS, sendo evidenciada a formação de três adutos característicos  $[\text{M}+\text{H}^+]$  1273,4670 (calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{73}\text{N}_6\text{O}_{24}^+$ : 1273,4671),  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1295,4490 (calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{O}_{24}\text{Na}^+$ : 1295,4490) e  $[\text{M}+\text{K}^+]$  1311,4229 (calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_6\text{O}_{24}\text{K}^+$ : 1311,4230) (Anexo 31 B).

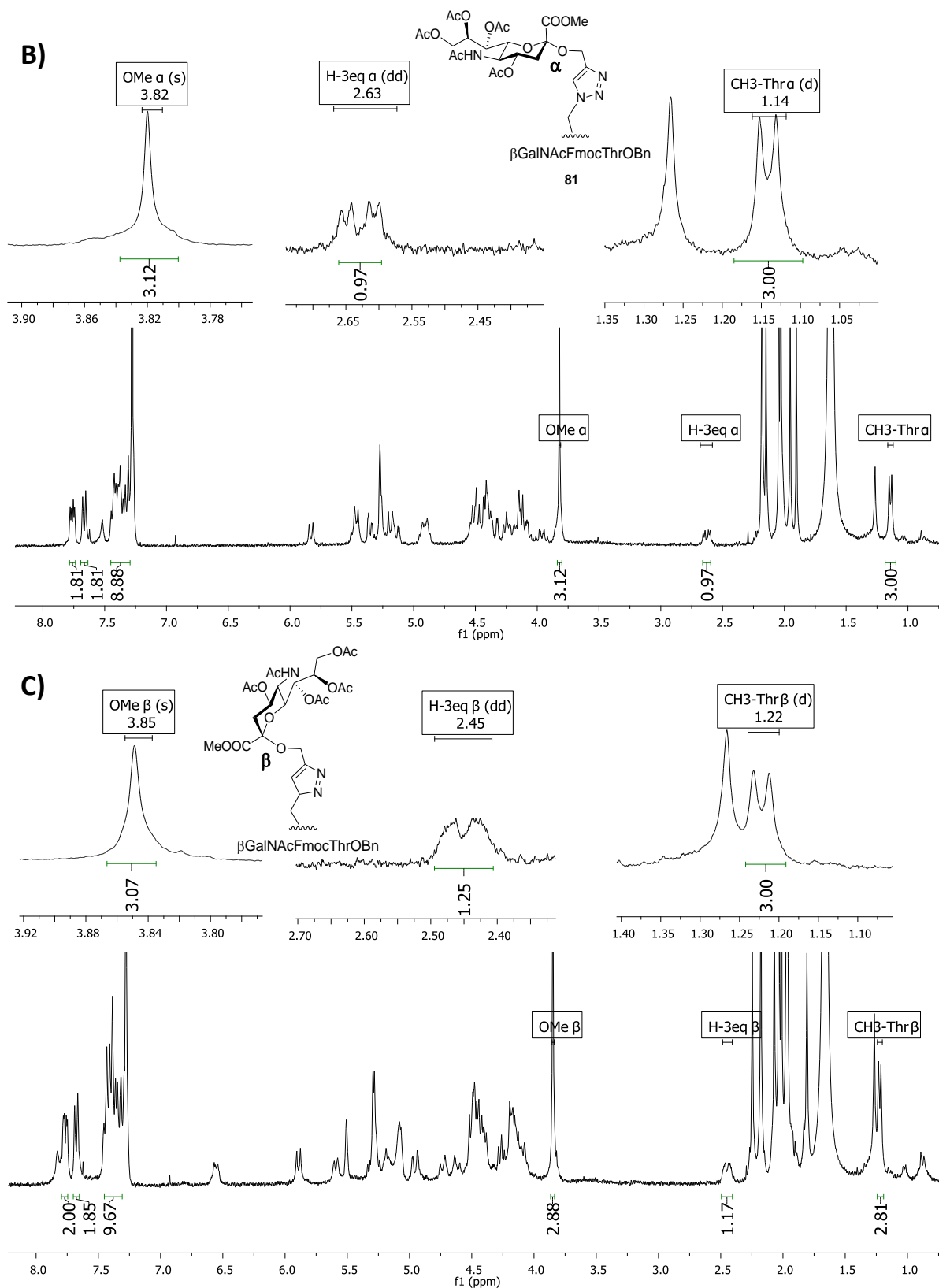




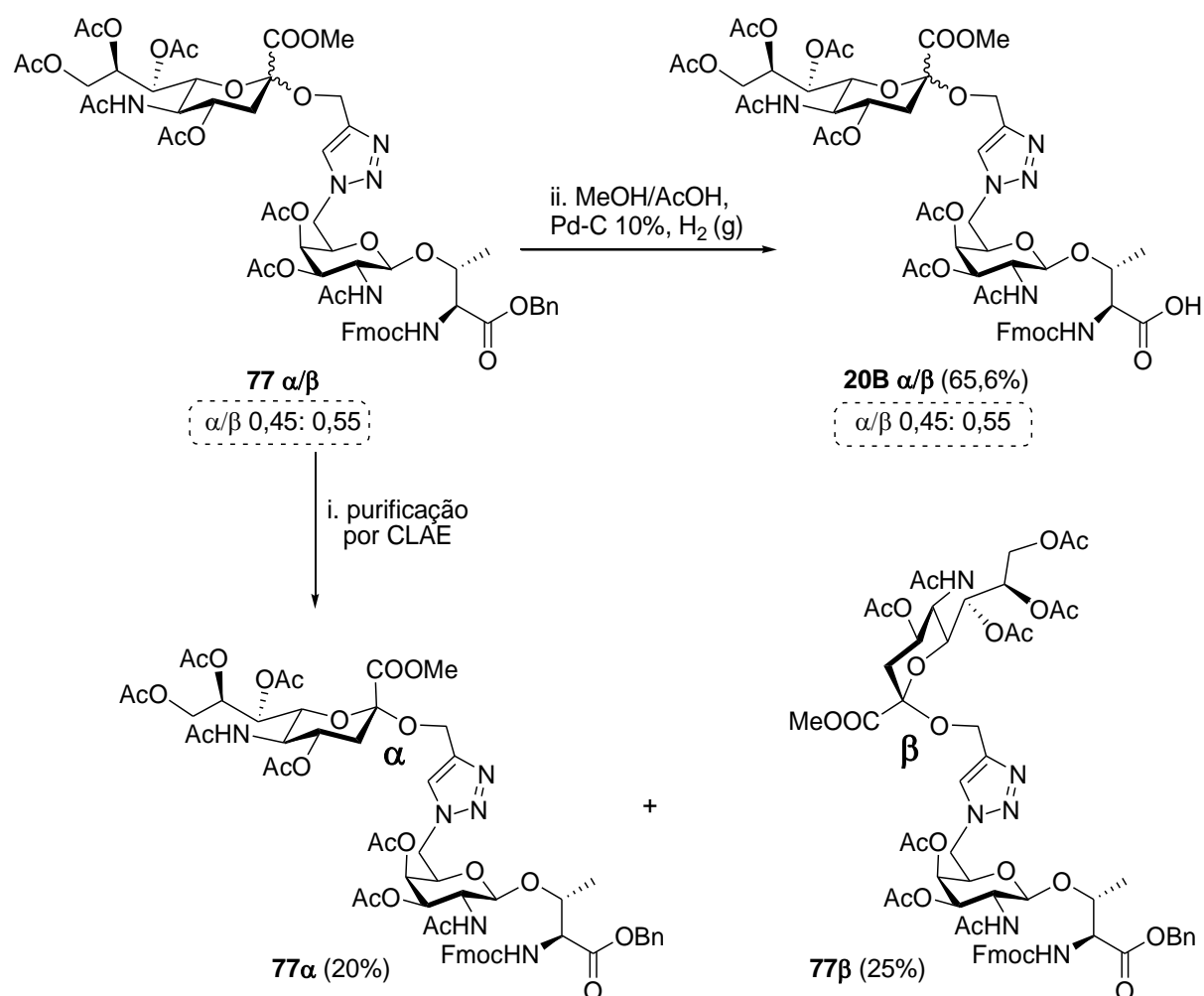
**Figura 19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto isolado **77**  $\alpha/\beta$  após reação de CuAAC evidenciando sinais característicos: H-triazólico (roxo), da unidade ácido siálico (azul) e  $\beta\text{GalNAcThr}$  (vermelho), bem como os sinais duplicados OMe, H-3eq e  $\text{CH}_3\text{-Thr}$ .

Assim, a fim de se obter o anômero puro na conformação  $\alpha$ , uma parte da mistura **77**  $\alpha/\beta$  foi purificada por CLAE, empregando-se o equipamento ShimadzuShim-PaK e coluna C18 de fase reversa. Após otimização das condições cromatográficas, os produtos  $\alpha$  **77** $\alpha$  (30,7 min ; Anexo 31 A) e  $\beta$  **77** $\beta$  (31,8 min) foram separados e obtidos com rendimentos de 20% e 25%, respectivamente (Esquema 29). O cromatograma obtido e os espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **77** $\alpha$  e **77** $\beta$  mostrados nas Figuras 20 A-C confirmam a eficiência de purificação destes produtos.





Visto a baixa massa obtida do produto **77 $\alpha$** , o qual mimetiza o antígeno STn, após purificação por CLAE (2,0 mg), a etapa seguinte de hidrogenólise não foi viável, impossibilitando seu uso para síntese do glicopeptídeo **19B**. Assim, fez-se necessária a utilização da mistura **77  $\alpha/\beta$**  para posterior emprego em *SPPS*, o que envolveu a remoção prévia do grupo éster benzílico da unidade de aminoácido por reação de hidrogenólise (MeOH/AcOH, Pd-C 10%, H<sub>2</sub>) fornecendo o produto **20B** como mistura  $\alpha/\beta$  na unidade siálica **20B  $\alpha/\beta$**  com 65,6% de rendimento (Esquema 29). Sua estrutura foi confirmada por análises de RMN de <sup>1</sup>H e ESI-MS. O espectro de <sup>1</sup>H RMN de **20B  $\alpha/\beta$**  apresentou 8 hidrogênios aromáticos e ausência do sinal relativo ao metileno do grupo OBn o que indicou a formação do produto esperado (Anexo 32A). O espectro de massas de **20B  $\alpha/\beta$** , por sua vez, exibiu como picos majoritários íons referentes aos adutos protonado [M+H<sup>+</sup>] 1183,4201 (calcd. para C<sub>54</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>24</sub><sup>+</sup>:1183,4201) e sodiado [M+Na<sup>+</sup>] 1205,4013 (calcd. para C<sub>54</sub>H<sub>66</sub>NaN<sub>6</sub>O<sub>24</sub><sup>+</sup>:1205,4321) do produto desejado (Anexo 32B)



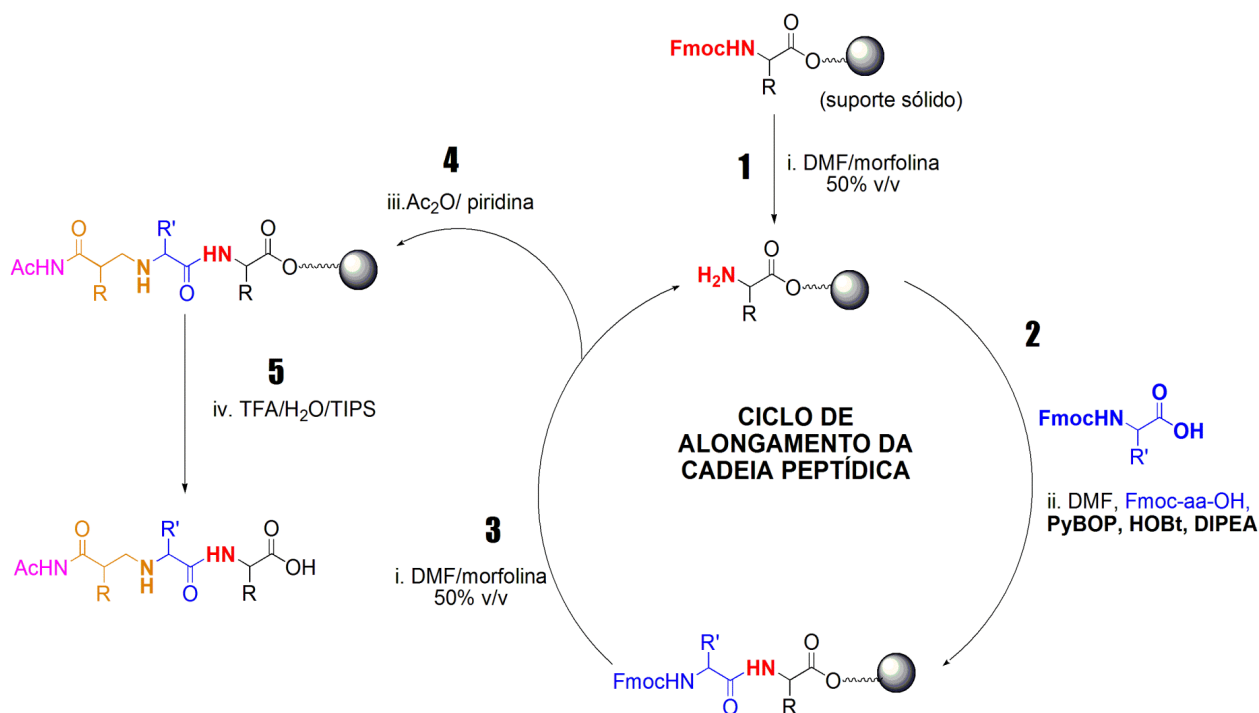
**Esquema 29.** Etapas de purificação por CLAE do composto em mistura **77  $\alpha/\beta$** , resultando nos anomeros puros **77 $\alpha$**  e **77 $\beta$**  e remoção do grupo metileno do éster benzílico de **77  $\alpha/\beta$**  por reação de hidrogenólise, fornecendo o derivado desprotegido **20B  $\alpha/\beta$** .

#### 4.1.5. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA PARA OBTENÇÃO DE GLICOPEPTÍDEOS.

Em posse dos blocos de glicoaminoácidos **20B**  $\alpha/\beta$  (Neu-5Ac-2- $\alpha$ triazol-6- $\beta$ GalNAcThrOH - análogo STn) e **52** ( $\alpha$ GalNAcThrOH - Tn), foi iniciada a síntese dos glicopeptídeos em fase sólida (SPPS), a qual apresenta uma série de vantagens sobre os métodos em solução, dentre as quais destaca-se:

- i. a utilização de grande excesso dos reagentes, forçando a obtenção do produto;
- ii. a facilidade de remoção de reagentes e sub-produtos da reação através de sucessivas lavagens da resina, não necessitando de métodos cromatográficos de purificação após cada acoplamento;
- iii. as mínimas perdas do produto devido à sua ligação à resina durante toda a síntese;
- iv. a preparação de compostos análogos em série, como em síntese combinatória (CHAN & WHITE, 2000).

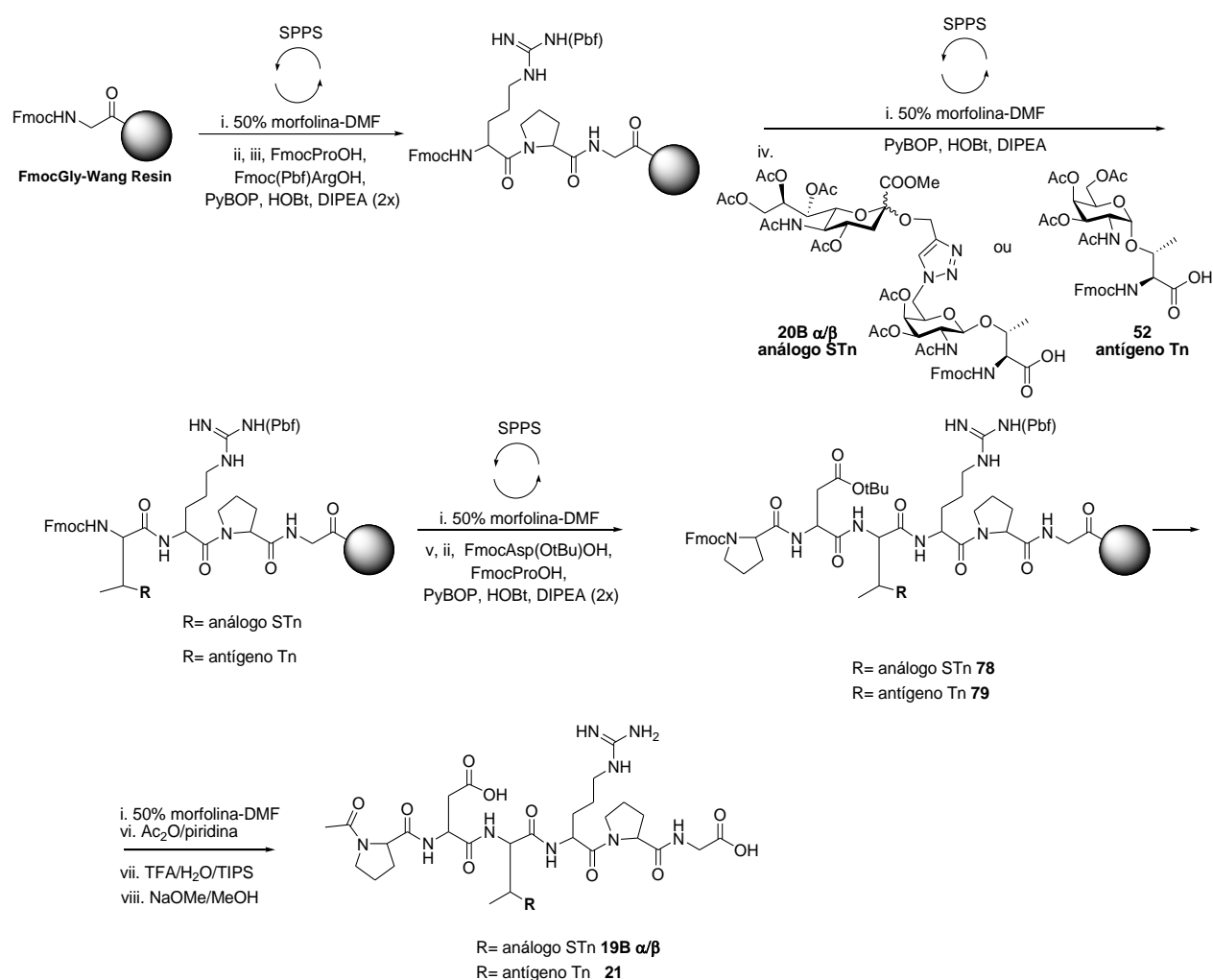
As reações de acoplamento foram realizadas em frasco cilíndrico com placa sinterizada para filtração em torneira de três saídas na parte inferior para agitação da mistura reacional através do borbulhamento de ar comprimido. O suporte sólido utilizado para dar início ao acoplamento de aminoácidos foi a resina FmocGly-Wang, escolhida pela sua disponibilidade bem como sua alta capacidade de ligação (0,65 mmol de aminoácido por grama de resina). Os acoplamentos dos aminoácidos e glicoaminoácido foram efetuados em DMF, na presença dos reagentes de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidíniofosfônio), HOBt (1-hidroxibenzotriazol) e a base DIPEA (diisopropiletilamina), sendo este um protocolo usual de SPPS (Esquema 30) (CHAN & WHITE, 2000; CAMPO et al, 2017).



**Esquema 30.** Representação do ciclo de alongamento da cadeia peptídica evidenciando as etapas-chave e os reagentes utilizados.

Assim, o primeiro passo na obtenção de ambos glicopeptídeos **19B**  $\alpha/\beta$  e **21** envolveu o procedimento clássico de remoção do grupo *N*-Fmoc da resina por tratamento com morfolina 50% em DMF v/v (etapa 1). Após sucessivas lavagens com DMF e DCM, o aminoácido comercial Fmoc-ProOH foi adicionado ao frasco cilíndrico junto dos reagentes de acoplamento. Os tempos de acoplamento foram de 24 horas, para a incorporação de aminoácidos individuais, e de 48-72 horas para incorporação dos glicaminoácidos **52** ou **20B**  $\alpha/\beta$  (etapa 2). As reações de acoplamento foram monitoradas a partir de amostras de resina, pelo teste qualitativo de Kaiser, o qual é capaz de avaliar colorimetricamente a existência de grupo amino livre, e em espectrofotômetro UV (290 nm), pela liberação do grupo dibenzofulveno resultante de desproteção do grupo *N*-Fmoc após tratamento do aminoácido ou aminoácido glicosilado com morfolina 50% em DMF v/v. Este ciclo foi repetido cinco vezes com sequencial incorporação de Fmoc-ProOH, Fmoc-Arg(Pbf)OH, Neu-5Ac-2- $\alpha$ triazol-6- $\beta$ GalNAcThrOH **20B**  $\alpha/\beta$  ou  $\alpha$ GalNAc-ThrOH **52**, Fmoc-Asp(OtBu)OH e Fmoc-ProOH (etapa 3). A partir dos testes em espectrofotômetro foram obtidos valores de acoplamento variando entre 0,35 e 0,65 mmol/g de resina, o que indicou boa taxa de incorporação. Subseqüentemente, os glicopeptídeos **78** e **79** foram *N*-acetilados (piridina/ $\text{Ac}_2\text{O}$ ) a fim de proteger o grupo  $\alpha$ -amino terminal (etapa 4) e então clivados da resina por tratamento com solução de TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS 90:5:5 v/v/v, com concomitante

remoção dos grupos protetores da Arg (Pbf) e Asp (OtBu) (etapa 5) (Esquemas 30 e 31) (CHAN & WHITE, 2000 ; CAMPO et al, 2014).



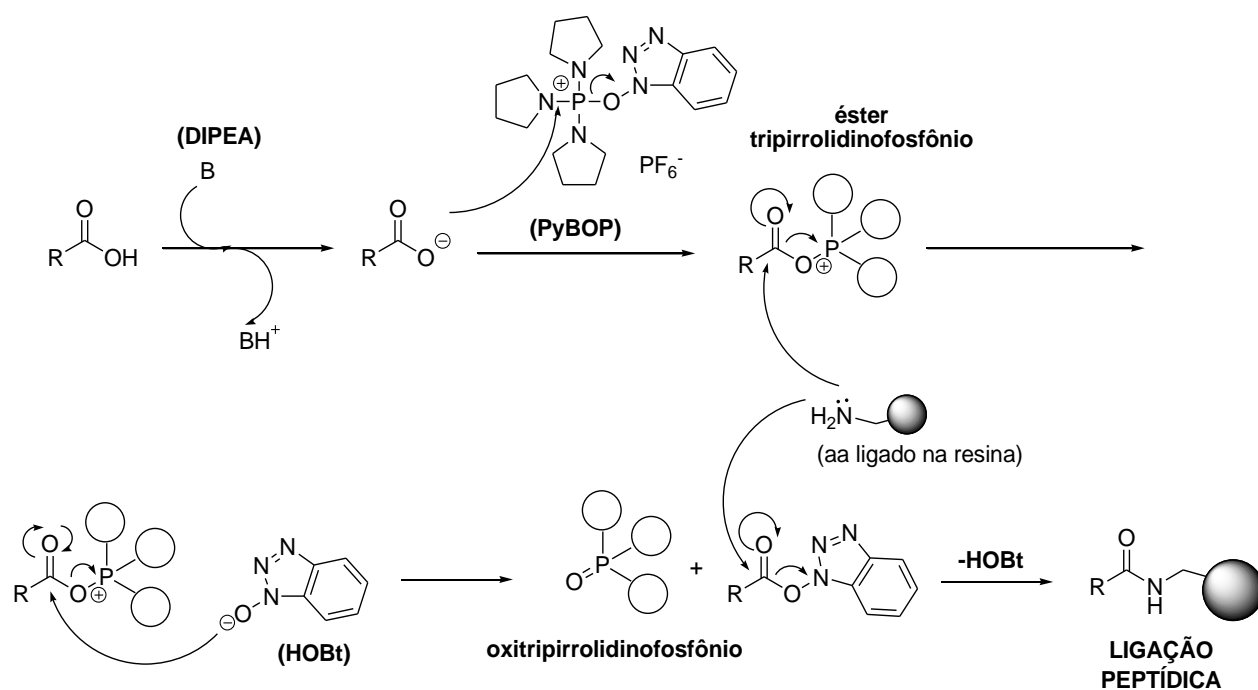
**Esquema 31.** Síntese em fase sólida dos glicopeptídeos **19B**  $\alpha/\beta$  e **21**, miméticos de MUC1 contendo análogo do antígeno STn e o antígeno natural Tn, respectivamente.

Como última etapa foi realizada a remoção dos grupos acetila das unidades sacarídicas de **78** e **79** (NaOMe/MeOH), fornecendo os glicopeptídeos **19B**  $\alpha/\beta$  e **21** brutos, os quais foram analisados e purificados por CLAE em fase reversa (C18). Enquanto o tempo de retenção do glicopeptídeo **21** foi de 8,3 min (17,6%) o do glicopeptídeo **19B**  $\alpha/\beta$  foi de 4,7 min. O menor tempo de retenção de **19B**  $\alpha/\beta$  foi devido à sua maior polaridade pela presença do anel triazólico e de outro açúcar desprotegido em sua estrutura. Assim, mesmo utilizando uma fase móvel fraca (H<sub>2</sub>O:TFA 0,01%/ MeCN 90:10 v/v em C-18), tal fato impossibilitou a purificação total do glicopeptídeo **19B**  $\alpha/\beta$  por CLAE.

Apesar disso, o espectro de RMN <sup>1</sup>H de **19B**  $\alpha/\beta$  apresentou sinais característicos do produto, como da unidade de ácido siálico em  $\delta$  4,29-4,26 (m, H-8') e em  $\delta$  2,22-2,16 (onde o

sinal do H-3eq encontra-se encoberto por sinais do resíduo de prolina), dos hidrogênios H-4 ( $\delta$  3,42, d,  $J_{3,4}$  1,7 Hz) e H-5 ( $\delta$  3,44, d,  $J_{5,6a}$  6,5 Hz) da unidade  $\beta$ GalNAc, além dos dois grupos NHAc das unidades sacarídicas em  $\delta$  1,99 (s largo, 6H, 2x NHAc), de Asp em  $\delta$  2,83 (dd,  $J$  5,4 Hz,  $J$  16,7 Hz,  $H_{\beta a Asp}$ ) e em  $\delta$  2,71 (dd,  $J$  7,8 Hz,  $J$  16,7 Hz,  $H_{\beta a Asp}$  e  $H_{\beta b Asp}$ ) e de Thr em  $\delta$  1,30 (d,  $J$  6,7 Hz,  $CH_3 Thr$ ) (Anexo 33A). A análise de ESI-MS de **19B**  $\alpha/\beta$  também indicou a presença do aduto sodiado característico  $[M+Na]^+$ : 1265,9557 (calcd. para  $C_{50}H_{78}N_{14}O_{23}Na^+$ : 1265,5256) (Anexo 33B). Já no espectro de RMN  $^1H$  de **21**, foram observado sinais característicos do açúcar  $\alpha$ GalNAc em  $\delta$  4,73 (d,  $J_{1,2}$  3,7 Hz, H-1) e em  $\delta$  3,98 (dd,  $J_{1,2}$  3,7 Hz,  $J_{2,3}$  11,0 Hz, H-2), além de sinais dos resíduos de Asp em  $\delta$  2,88 e 2,75 (dd,  $J$  7,1 Hz,  $J$  17,0 Hz,  $H_{\beta a Asp}$  e  $H_{\beta b Asp}$ ) e de Thr em  $\delta$  1,12 (d,  $J$  6,3 Hz,  $CH_3 Thr$ ) (Anexo 34A). A análise de ESI-MS de **21**, por sua vez, apresentou a formação dos adutos protonado  $[M+H]^+$  887,4090 (calcd. para  $C_{36}H_{59}N_{10}O_{16}^+$ : 887,4105) e sodiado  $[M+Na]^+$ : 909,3917 (calcd. para  $C_{36}H_{58}N_{10}O_{16}Na^+$ : 909,3924) característicos (Anexo 34B).

O mecanismo proposto para as reações de acoplamento envolve a desprotonação pela base DIPEA do resíduo -COOH do aminoácido/glicoaminoácido a ser incorporado na cadeia peptídica. A seguir, o carboxilato gerado ( $-COO^-$ ) atua como nucleófilo e ataca o átomo de fósforo da molécula de PyBOP, um eletrófilo forte (íon fosfônio). O éster tripirrolidíniofosfônio é gerado concomitantemente à liberação do grupo hidróxi-benzotriazol (HOBt). O caráter nucleofílico do grupo HOBt favorece seu ataque à carbonila do aminoácido/glicoaminoácido do éster tripirrolidíniofosfônio, deslocando o grupo oxitripirrolidíniofosfônio. O éster resultante contém o grupo abandonador necessário para viabilizar o ataque nucleofílico do grupo  $\alpha$ -amino terminal livre do aminoácido ligado à resina, com formação da ligação peptídica e consequente alongamento da cadeia. O ataque do grupo  $\alpha$ -amino terminal livre também pode ocorrer diretamente na carbonila do éster tripirrolidíniofosfônio, também gerando a ligação peptídica (Esquema 32) (CHAN & WHITE, 2000).



**Esquema 32.** Mecanismo proposto para formação da ligação peptídica utilizando os reagentes de acoplamento DIPEA, PyBOP e HOBT.

Para posterior utilização em ensaios de imunização, os glicopeptídeos **19B**  $\alpha/\beta$  e **21** deverão ser conjugados à proteína carreadora BSA em tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,0), na presença dos reagentes cloridrato de etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (CAMPO et al, 2017).



## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados descritos, cerca de 30 compostos relativos a carboidratos, glicoaminoácidos e glicopeptídeos foram sintetizados e devidamente caracterizados. Dentre estes, 7 são compostos inéditos na literatura (**59**, **56**, **60**, **68**, **77 $\alpha/\beta$** , **20B  $\alpha/\beta$** , **19B  $\alpha/\beta$** ).

Os blocos de construção inicialmente propostos (Neu5Ac $\alpha$ 2-N<sub>3</sub> **22**, 3-prop-2-inil-6- $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **23** e 6-N<sub>3</sub>- $\alpha$ GalNAc-ThrOBn **25**) não foram possíveis de serem obtidos via as estratégias empregadas, sendo que durante as investigações para síntese de **23** e **25**, o antígeno natural Tn ( $\alpha$ GalNAcThr) **52** foi sintetizado por duas rotas distintas. Após reproduções de algumas rotas já descritas, bem como realizando modificações de metodologias sempre que necessário, o bloco 6-N<sub>3</sub>- $\beta$ GalNAc-ThrOBn **68** foi obtido por uma rota de 12 etapas em baixo rendimento. Assim, esta foi otimizada, sendo o derivado polifuncionalizado **68** obtido após apenas 6 etapas, poupando tempo e economizando reagentes. Já o bloco Neu5Ac $\alpha$ -2-3-prop-2-inil **24** foi sintetizado por duas rotas distintas, porém ambas resultaram em mistura de anômeros  $\alpha/\beta$  (**24  $\alpha/\beta$** ) em proporções de 0,25:0,75 e 0,45:0,55.

O acoplamento azido-alcino por meio de reação CuAAC foi efetivo e o glicoaminoácido triazólico protegido **77 $\alpha/\beta$**  obtido em bom rendimento (61,4%). A purificação dessa mistura por CLAE foi realizada empregando o equipamento Shimadzu Shim-PaK e coluna C18 de fase reversa, o que forneceu os anômeros puros  $\alpha$  **77 $\alpha$**  e  $\beta$  **77 $\beta$** , mas em baixa quantidade. Assim, fez-se necessária a utilização da mistura **77  $\alpha/\beta$**  para obtenção do bloco **20B  $\alpha/\beta$**  e posterior emprego em *SPPS*.

Finalmente, os glicopeptídeos NHAcPro-Asp-[(5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)}Thr-Arg-Pro-GlyOH **19B  $\alpha/\beta$**  e NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21** foram obtidos após sequenciais etapas de acoplamento com aminoácidos e glicoaminoácidos (**20B  $\alpha/\beta$**  e **52**) usando síntese em fase sólida e purificação por CLAE.

Visto o laborioso trabalho envolvendo a realização e otimização de inúmeras rotas sintéticas, além do tempo despendido durante esse período, não foi possível realizar as conjugações de **19B  $\alpha/\beta$**  e **21** à proteína carreadora BSA. Desse modo, esta última etapa e os posteriores ensaios biológicos de imunogenicidade serão realizados futuramente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Bulário eletrônico. Disponível em : [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp) [acessado em 01 de junho de 2018]

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. *Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases*. **Biochim Biophys Acta**, v.1765(2), p. 189-222, 2006.

ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V.L.; GOMES, A.S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. *Application of copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) “click chemistry” in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis*. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

BEST, D.; CHAIRATANA, P.; GLAWAR, A. F. G.; CRABTREE, E.; BUTTERS, T. D.; WILSON, F. X.; YU, C-Y.; WANG, W-B.; JIA, Y-M.; ADACHI, I.; KATO, A.; FLEET, G. W. J. *Synthesis of 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galacto-nojirimycin [DGJNAc] from D-glucuronolactone: the first sub-micromolar inhibitor of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidases*. **Tetrah. Lett.**, v. 51, p. 2222-2224, 2010.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. *CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective*. **Eur. J. Org. Chem.** p.51-68, 2006.

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

BRISTER, M. A.; PANDEY, A. K.; BIELSKA, A. A.; ZONDLO, N. J. *OGlcNAcylation and Phosphorylation Have Opposing Structural Effects in tau: Phosphothreonine Induces Particular Conformational Order*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.136, p. 3803-3816, 2014.

BROCKE, C.; KUNZ, H. *Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens*. **Bio. Med. Chem.**, v. 10, p. 3085-3112, 2002.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; Di NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity*. **Nature Rev. Microbiol.**, v.4, p. 229-236, 2006.

CAI, L.; GUAN, W.; WANG, W.; ZHAO, W.; KITAOKA, M.; SHEN, J.; O'NEIL, C.; WANG, P. G. *Substrate specificity of N-acetylhexosamine kinase towards N-acetylgalactosamine derivatives*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p.5433–5435, 2009a.

CAI, L.; GUAN, W.; KITAOKA, M.; SHEN, J.; XIA, C.; CHENA, W.; WANG, P. G. *A chemoenzymatic route to N-acetylglucosamine-1-phosphate analogues: substrate specificity investigations of N-acetylhexosamine 1-kinase*. **Chem. Commun.**, v. 20, p. 2944–2946, 2009b.

CAI, H.; HUANG, Z-H; SHI, L.; ZOU, P.; ZHAO, Y-F; KUNZ, H.; LI, Y-M. *Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 glycopeptide BSA conjugates and their evaluation as vaccines*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 3685-3689, 2011.

CAMPO, V. L. ; RIUL, T. B. ; BORTOT, L. O.; MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; MARCHIORI, M. F.; IACCARINO, E.; RUVO, M.; DIAS-BARUFFI, M.; CARVALHO, I. *A Synthetic MUC1 Glycopeptide Bearing GalNAc-Thr as a Tn Antigen Isomer Induces the Production of Antibodies against Tumor Cells.* **Chem. Bio. Chem.**, v. 18, p. 527-538, 2017.

CAMPO, V. L., RIUL, T. B., CARVALHO, I., BARUFFI, M. D. *Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect Trypanosoma cruzi Cell Invasion and Tumor Cell Viability.* **Chem. Bio. Chem.**, v. 15, p. 1495-1507, 2014.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. *Synthesis of glycosyl-amino acids of biological interest.* **Química Nova**, v. 31, p. 1027-1033, 2008.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; ALLMAN, S.; DAVIS, B.G.; FIELD, R. A. *Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to Trypanosoma cruzi mucins.* **Org. Biomol. Chem.**, v. 16, pp. 2645-2657, 2007.

CAMPO, V. L.; IVANOVA, I. M.; CARVALHO, I.; LOPES, C. D.; CARNEIRO, Z. A.; SAALBACH, G.; SCHENKMAN, S.; DA SILVA, J. S.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. *Click chemistry oligomerisation of azido-alkyne-functionalised galactose accesses triazole-linked linear oligomers and macrocycles that inhibit Trypanosoma cruzi macrophage invasion.* **Tetrahedron**. v.71, p. 7344-7353, 2015.

CAREY, Francis A.; SUNDBERG, Richard J. *Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms*. 5ª edição, Springer Science & Business Media, 2007.

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.* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 2412–242, 2010.

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

CHANG-CHENG, L.; YE X-S. *Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets.* **Glycoconj. J.**, v. 29, p. 259–271, 2012.

DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. *Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates.* **Chem. Eur. J.**, v. 12, n. 3, p. 656-665, 2006.

DZIADEK, S.; KOWALCZYK, D.; KUNZ, H. *Synthetic vaccines consisting of tumor-associated MUC1 glycopeptide antigens and bovine serum albumin.* **Angew. Chem. Int. Ed.**, v.44, p. 7624-7630, 2005.

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

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. . *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2015.

FERNÁNDEZ, E. M. S., NAVO, C. D.; MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; RITA GONÇALVES-PEREIRA, R.; SOMOVILLA, V. J.; AVENOZA, A.; BUSTO, J. H.; BERNARDES, G. J. L.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; CORZANA, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; MELLET, C. O.; PEREGRINA, J. M. *Tn Antigen Mimics Based on sp<sup>2</sup>-Iminosugars with Affinity for an anti-MUC1 Antibody*. **Org. Lett.**, v. 18, p. 3890–3893, 2016.

FRANCO, A. *Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for cancer prevention*. **Scand. J. Immunol.**, v. 61, p. 391-39, 2005.

GIL, M. V.; AREVALO, M. J.; LOPEZ, O. *Click Chemistry — What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond*. **Synthesis**. v. 11, p. 1589-1620, 2007.

GAIDZIK, N.; WESTERLIND, U.; KUNZ, H. *The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens*. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 4421–4442. 2013.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. *Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.15, n. 6, p. 615-622, 2004.

HUANG, L.; WANG, Z.; HUANG, X. *One-Pot Oligosaccharide Synthesis: Reactivity Tuning by Post-Synthetic Modification of Aglycon*. **Chem. Commun.**, v. 17, p. 1960-1961, 2004.

JACOBSSON, M.; MALMERG, J.; ELLERVIK, U. *Aromatic O-glycosylation*. **Carbohydr. Res.** v. 341, p. 1266-1281, 2006.

JULIEN, S.; VIDEIRA, P. A.; DELANNOY, P. *Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target?* **Biomolecules**, v. 2, p. 435-466, 2012.

KÄRKKÄINEN, T. S.; KARTHA, K. P. R.; MACMILLAN, D.; FIELD, R. A. *Iodine-mediated glycosylation en route to mucin-related glyco-aminoacids and glycopeptides*. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 1830-1834, 2008.

KUBERAN, B.; SIKKANDER, S. A.; TOMIYAMA, H.; LINHARDT, R. J. *Synthesis of a C-glycoside analogue of sTn: an HIV- and tumor-associated antigen*. **Angew. Chem.**, v. 42, p. 2073-2075, 2003.

KUMAR, A. P.; SARMA, S. P.; SAMUELSON, A. G. *Mechanistic Studies on the Diazo Transfer Reaction*. **Tetrahedron Lett.** v. 55, p. 2917-2920, 2014.

LOUREIRO, L. R.; CARRASCAL, M. A.; BARBAS A.; RAMALHO, J. S.; NOVO, C.; DELANNOY, P.; VIDEIRA, P. A. *Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens*. **Biomolecules**, v. 5, p. 1783-1809, 2015.

- LUO, X.; SUGIURA, T.; NAKASHIMA, R.; KITADE, Y. *Synthesis of oligonucleotides with glucosamine at the 3'-position and evaluation of their biological activity.* **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 4157-4161, 2013.
- MARCHIORI, M. F.; SOUTO, D. E.; BORTOT, L. O.; PEREIRA, J. F.; KUBOTA, L. T.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUFFI, M.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L. *Synthetic 1,2,3-triazole-linked glycoconjugates bind with high affinity to human galectin-3.* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, p. 414-3425, 2015.
- MARCOTULLIO, M. C.; CAMPAGNA, V.; STERNATIVO, S.; CONSTANTINO, F.; CURINI, M. A. *New, Simple Synthesis of N-Tosyl Pyrrolidines and Piperidines.* **Synthesis**, v. 16, p. 2760-2766, 2006.
- MARTÍNEZ-SÁEZ, N.; PEREGRINA, J.M.; CORZANA, F. *Principles of mucin structure: implications for the rational design of cancer vaccines derived from MUC1-glycopeptides.* **Chem Soc Rev.**, 27;46(23),7154-7175, 2017.
- McDONALD, D. M.; BYRNE, S. N.; PAYNE, R. J. *Synthetic self-adjuvanting glycopeptide cancer vaccines.* **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1-8, 2015.
- McGEARY, R. P.; JABLONKAI, I.; TOTH, I. *Towards synthetic vaccines built on carbohydrate cores.* **Lett. Pep. Sci.**, v. 8, p. 273-276, 2002.
- NIKSERESHT, A. *SnCl4: An Efficient and Inexpensive Promoter for Synthesis of  $\omega$ -Functionalized Alkyl 1,2-trans-Glycosides from 1-O-Pivaloyl Donor.* **Russian Journal of General Chemistry**, v. 86, p. 167-172, 2016.
- NYFFELER, P. T.; LIANG, C-H.; KOELLER, K. M.; WONG, C-H. *The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction.* **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p.10773-10778, 2002.
- OSINAGA, E. *Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites.* **IUBMBLife**, v. 59, p. 269-273, 2007.
- PADRÓN, J. I.; MORALES, E. Q.; VÁZQUES, J. T. *Alkyl Galactopyranosides: Rotational Population Dependence of the Hydroxymethyl Group on the Aglycon and Its Absolute Configuration and on the Anomeric Configuration.* **J. Org. Chem.**, v. 63, p. 8247-8258, 1998.
- PANCHADHAYEE, R.; MISRA, A. K.. *Efficient Iodine-Catalyzed Preparation of BenzylideneAcetals of Carbohydrate Derivatives.* **J. Carb. Chem.**, v. 27, p. 148-155, 2008.
- PEI, Z.; DONG, H.; CARABALLO, R.; RAMSTRÖM, O. *Synthesis of positional thiol analogs of  $\beta$ -D galactopyranose.* **Eur. J. Org. Chem.** v. 29, p. 4927-4934, 2007.
- PÉTURSSON, S. *Protecting groups in carbohydrate chemistry.* **J. Chem. Educ**, v. 11, p. 1297-1303, 1997.

ROJAS-OCÁRIZ, V.; COMPAÑÓN, I.; AYDILLO, C.; CASTRO-LÓPEZ, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; HURTADO-GUERRERO, R.; AVENOZA, J.; ZURBANO, M. M.; PEREGRINA, J. M.; BUSTO, J. H.; CORZANA, F. *Design of  $\alpha$ -S-Neoglycopeptides Derived from MUC1 with a Flexible and Solvent-Exposed Sugar Moiety*. **J. Org. Chem.**, v. 81, p. 5929–5941, 2016.

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

SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. *Synthesis and medical applications of oligosaccharides*. **Nature**, v. 446, p. 1046-1051, 2007.

SILVA, J. A. G. *Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil*. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf> (Acesso: 03/04/2018).

SLOVIN, S. F.; RAGUPATHI, G.; MUSSELLI, C.; OLKIEWICZ, K.; VERBEL, D.; KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; SAMES, D.; DANISHEFSKY, S.; LIVINGSTON, P. O.; SCHER, H. I. *Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine*. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 4292-4298, 2003.

TROPPER, F. D.; ANDERSSON, F. O.; BRAUN, S.; ROY, R. *Phase transfer catalysis as a general and stereoselective entry into glycosylazides from glycosyl halides*. **Synthesis**, p. 618-620, 1991.

TIWARI, V. K.; MISHRA, B. B.; MISHRA, K. B.; MISHRA N.; SINGH, A. S.; CHEN, X. *Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry*. **Chem. Rev.**, v. 116, p. 3086-3240, 2016.

VAN VRANKEN, David; WEISS, Gregory. *Introduction to bioorganic chemistry and chemical biology*. Garland Science, 2012.

WANG, Q.; GUO, Z. *Synthetic and Immunological Studies of sTn Derivatives Carrying Substituted Phenylacetylsialic Acids as Cancer Vaccine Candidate*. **ACS Med. Chem. Lett.**, v.2,p. 373-378, 2012.

WEIWER, M.; CHEN, C.; KEMP, M. M.; LINHARDT, R. J. *Synthesis and Biological Evaluation of Non-Hydrolyzable 1,2,3-Triazole-Linked Sialic Acid Derivatives as Neuraminidase Inhibitors*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 2611–2620, 2009.

WELL, R. M. V.; KARKKAINEN, T. S.; KARTHA, K. P. R.; FIELD, R. A. *Contrasting reactivity of thioglucoside and selenoglucoside donors towards promoters: implications for glycosylation stereocontrol*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1391-1397, 2006.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. *A Vision for Vaccines Built from Fully Synthetic Tumor-Associated Antigens: From the Laboratory to the Clinic*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 135, p.14462–14472, 2013.

WINTERFELD, G. A.; KHODAIR, A. I.; SCHMIDT, R. R. *O-glycosyl amino acids by 2-nitrogalactal concatenation — synthesis of a mucin-type O-glycan*. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 6, p. 1009-1021, 2003.

WITCZAK, Z. J.; BIELSKI, R. *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies*. Publicado por: John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2010.

WITCZAK, Z. J.; BIELSKI, R. *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies*, Hoboken, New Jersey, Part IV, Chapter 13, 2013.

WONG, C-H. *Carbohydrate-based Drug Discovery*, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2003.

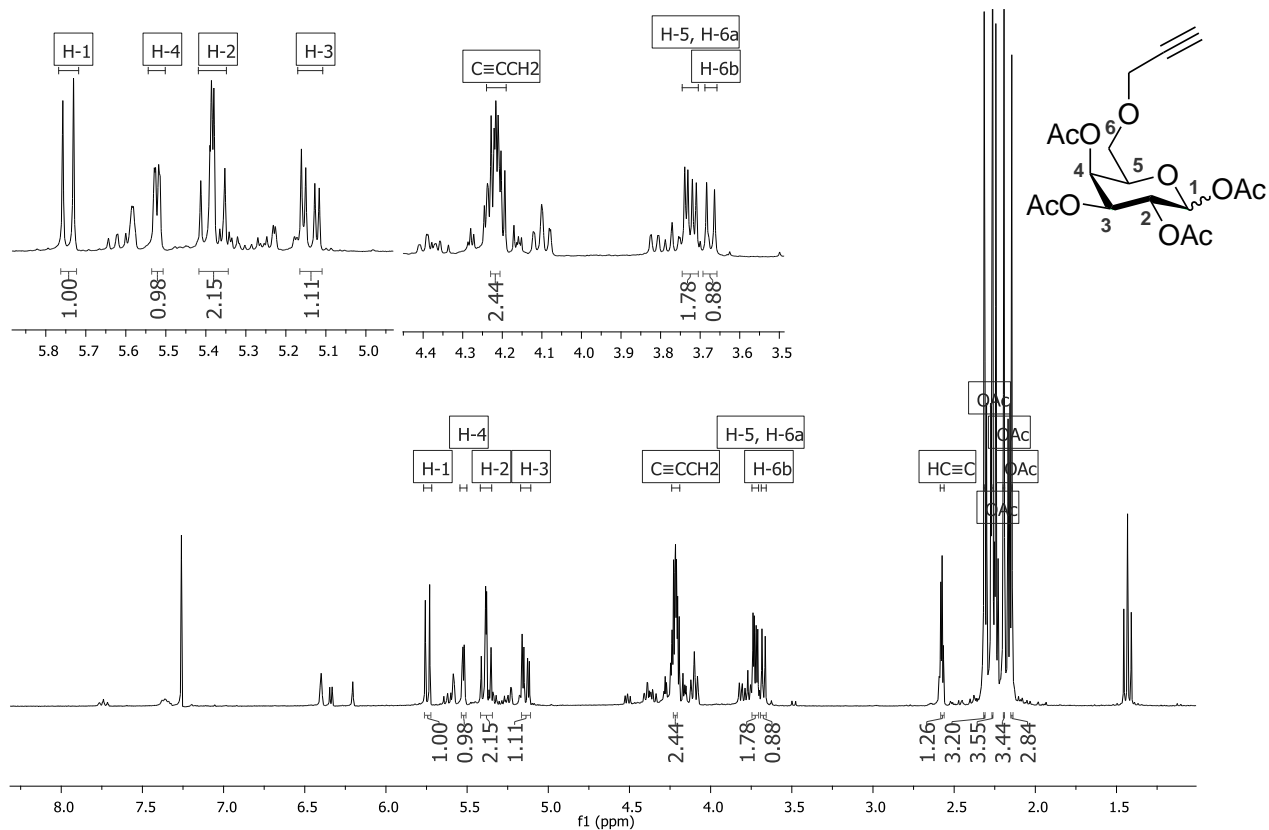
World Cancer Research Fund International. *Cancer statistics: worldwide*. Disponível em: [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php) (Acesso: 03/04/2018).

WU, J.; GUO, Z. *Improving the Antigenicity of STn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines*. **Bioconjug. Chem.**, v. 17, p. 1537–1544, 2006.

XU, Y.; SETTE, A.; SIDNEY, J.; GENDLER, S. J.; FRANCO, A. *Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for cancer prevention*. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, p. 440-448. 2005

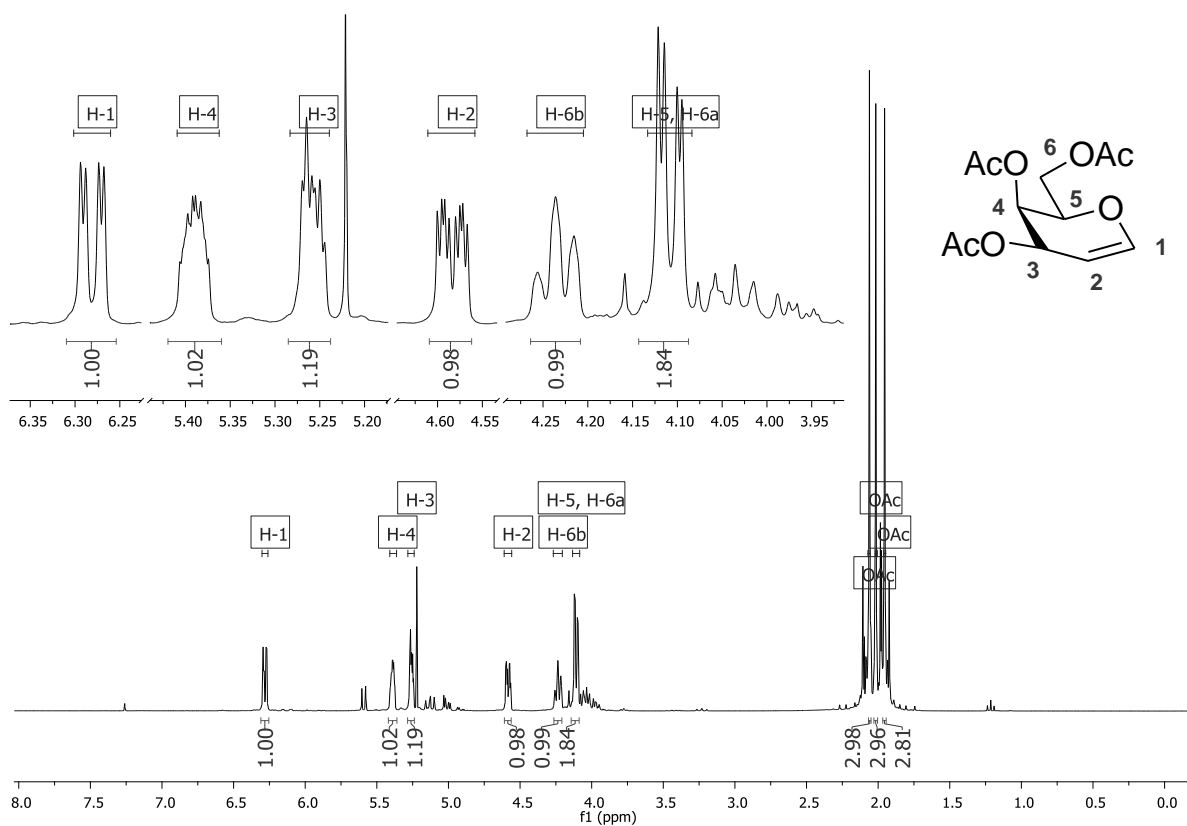
YANG, W.; LIU, X.; PENG, X.; LI, P.; WANG, T.; TAI, G.; LI, J.; ZHOU, Y. *Synthesis of novel N-acetylneuraminic acid derivatives as substrates for rapid detection of influenza virus neuraminidase*. **Carbohydr. Res.**, v. 359, p. 92–96, 2012.

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil-6-propinil-D-galactopiranosídeo 26

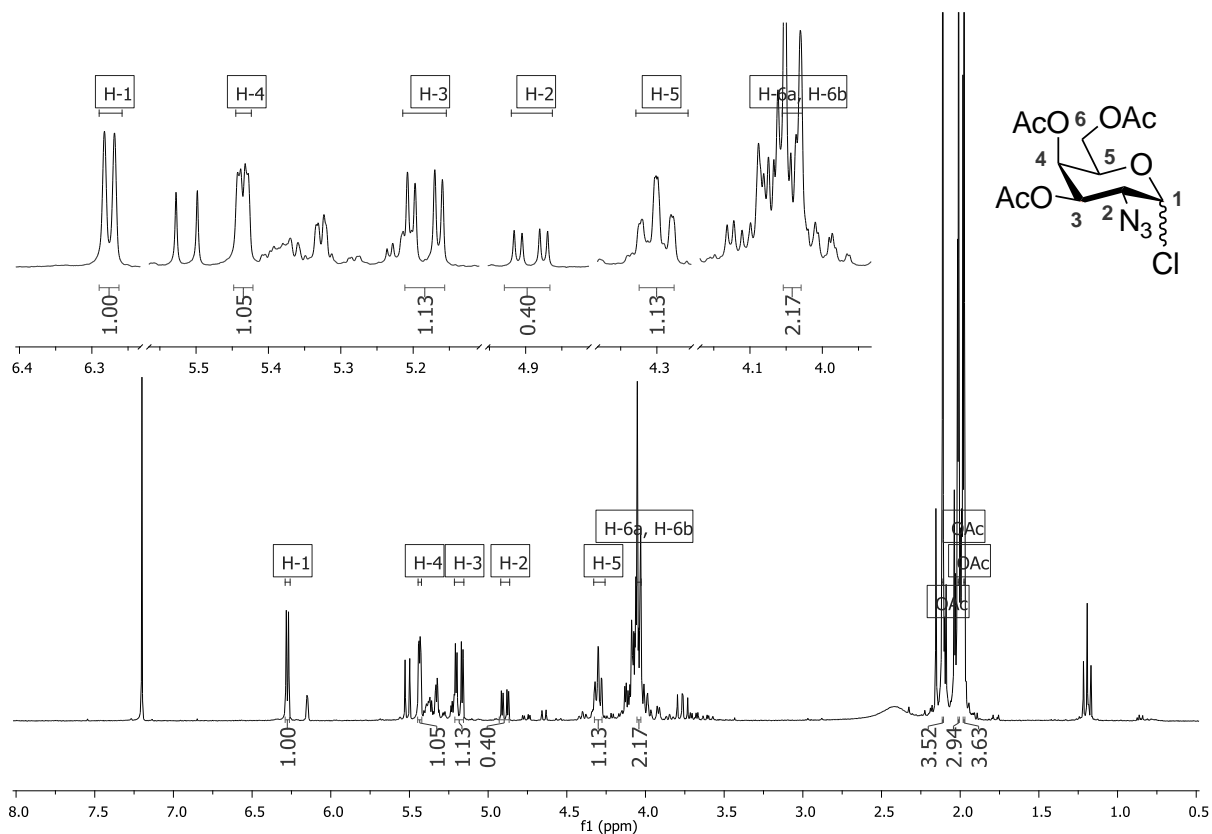
Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,74	1	d	$J_{1,2}$ 8,0
H-2	5,38	1	dd	$J_{1,2}$ 8,0 ; $J_{2,3}$ 10,0
H-3	5,14	1	dd	$J_{2,3}$ 10,0 ; $J_{3,4}$ 3,3
H-4	5,52	1	dd	$J_{3,4}$ 3,3 ; $J_{4,5}$ 1,6
H-5, H-6a	3,72	2	dd	$J_{4,5}$ 1,6 ; $J_{5,6a}$ 6,1
H-6b	3,67	1	d	$J_{5,6b}$ 6,1 ;
HC≡CCH <sub>2</sub>	4,22	2	m	-
HC≡C	2,57	1	t	$J$ 2,4
COCH <sub>3</sub>	2,31; 2,26; 2,19; 2,15	12	4x s	-





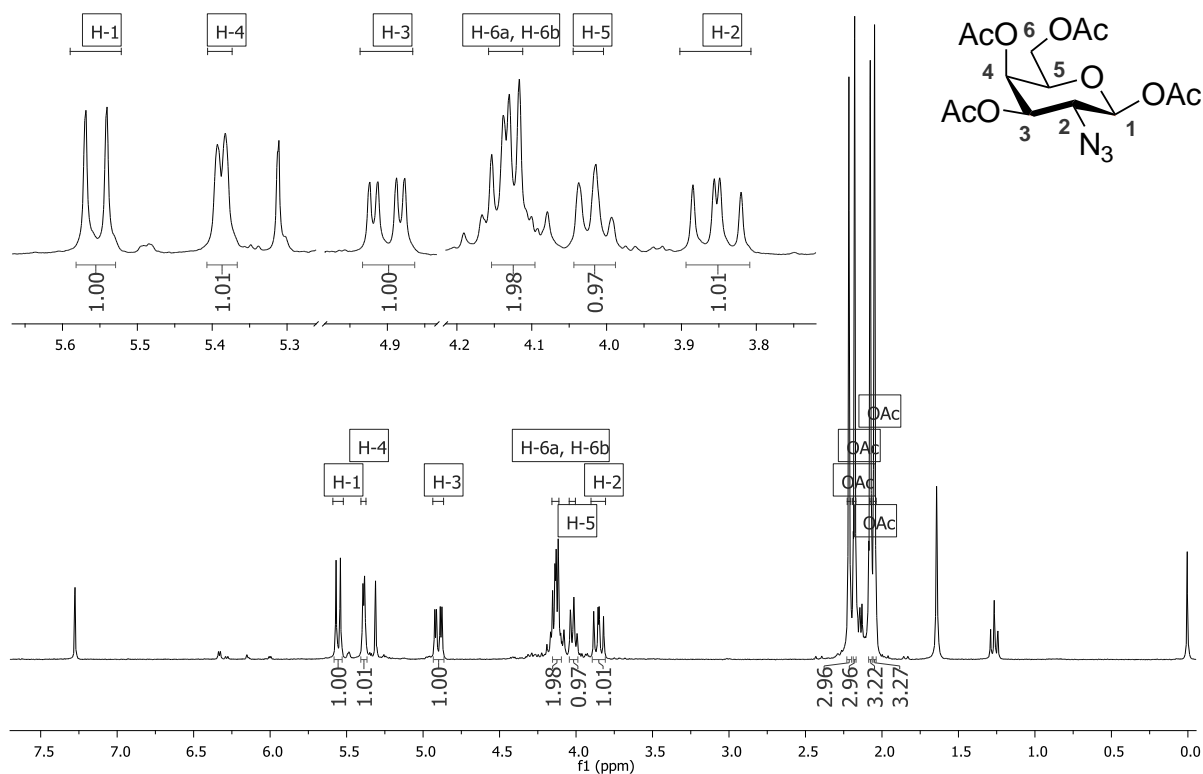
**Anexo 2.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-galactal **39**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidad	Constante de acoplamiento (Hz)
H-1	6,28	1	dd	$J_{1,2}$ 6,3 ; $J_{1,3}$ 1,7
H-2	4,60 - 4,58	1	m	-
H-3	5,27-5,24	1	m	-
H-4	5,41-5,37	1	m	-
H-5, H-6a	4,11	2	d largo	$J_{5,6a/6b}$ 6,2
H-6b	4,24-4,26	1	m	-
COCH <sub>3</sub>	2,06; 2,02; 1,96	9	3x s	-



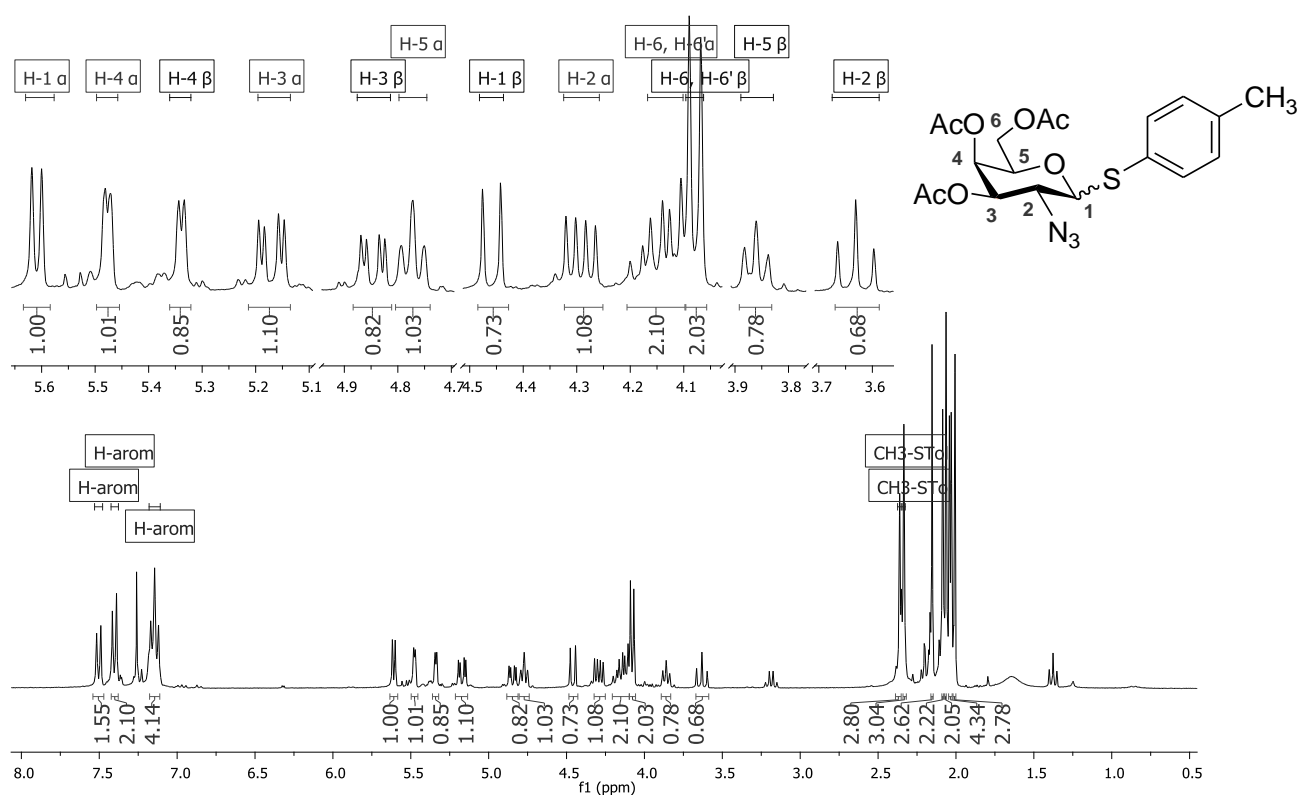
**Anexo 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloreto de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosila **28**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,28	1	d	$J_{1,2}$ 3,7
H-2	4,89	3	m	$J_{1,2}$ 3,7 ; $J_{2,3}$ 10,9
H-3	5,18	1	dd	$J_{3,4}$ 3,1 ; $J_{2,3}$ 10,9
H-4	5,44	1	d	$J_{3,4}$ 3,1
H-5	4,30	1	t	$J_{5,6a/6b}$ 6,0
H-6a, H-6b	4,05 - 4,03	2	m	-
$\text{COCH}_3$	2,11; 2,01; 1,97	9	3x s	-



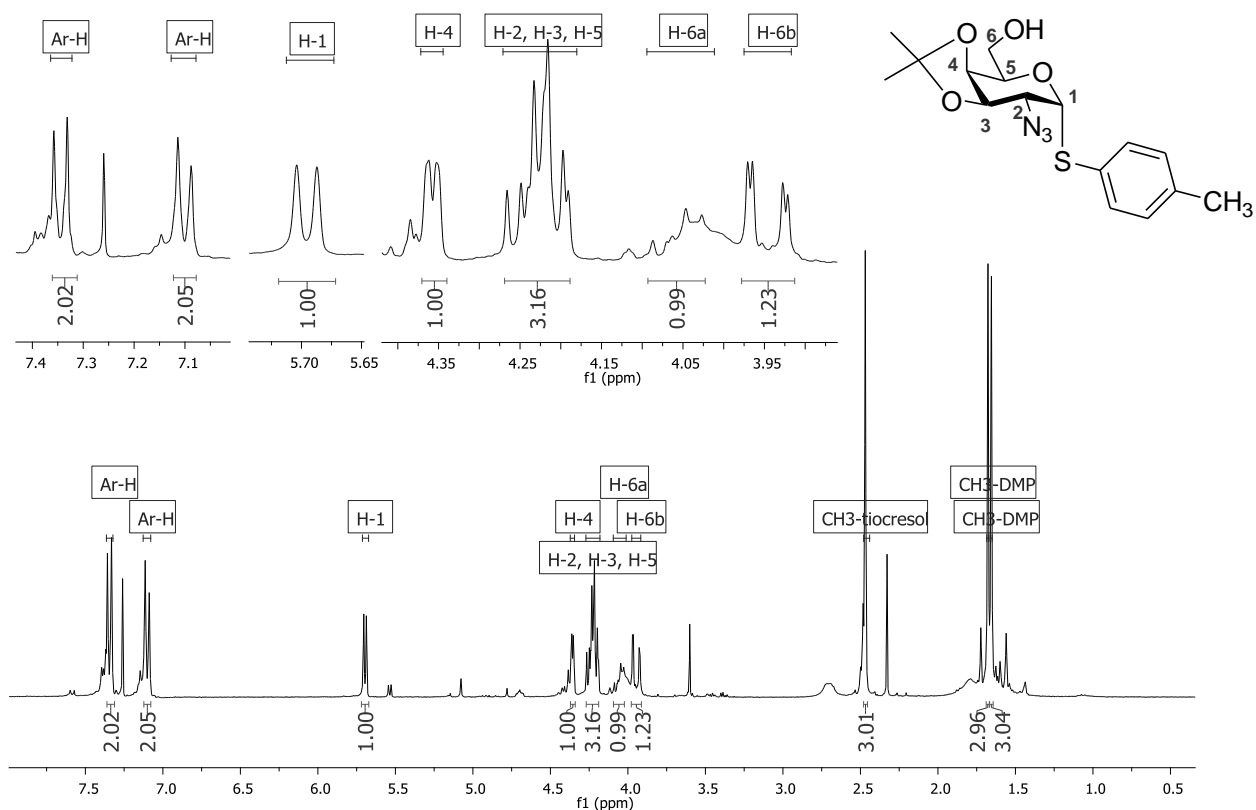
Anexo 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\beta$ -D-galactopiranosse **44**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,55	1	d	$J_{1,2}$ 8,5
H-2	3,85	1	dd	$J_{1,2}$ 8,5 ; $J_{2,3}$ 10,8
H-3	4,90	1	dd	$J_{2,3}$ 10,8 ; $J_{3,4}$ 3,2 ;
H-4	5,39	1	d	$J_{3,4}$ 3,2
H-5	4,03	1	t	$J_{5,6a}$ 6,8
H-6a, H-6b	4,13	2	dd	$J_{5,6a}$ 6,8 ; $J_{5,6b}$ 4,3
COCH <sub>3</sub>	2,22 ; 2,18; 2,08; 2,05	12	4x s	-



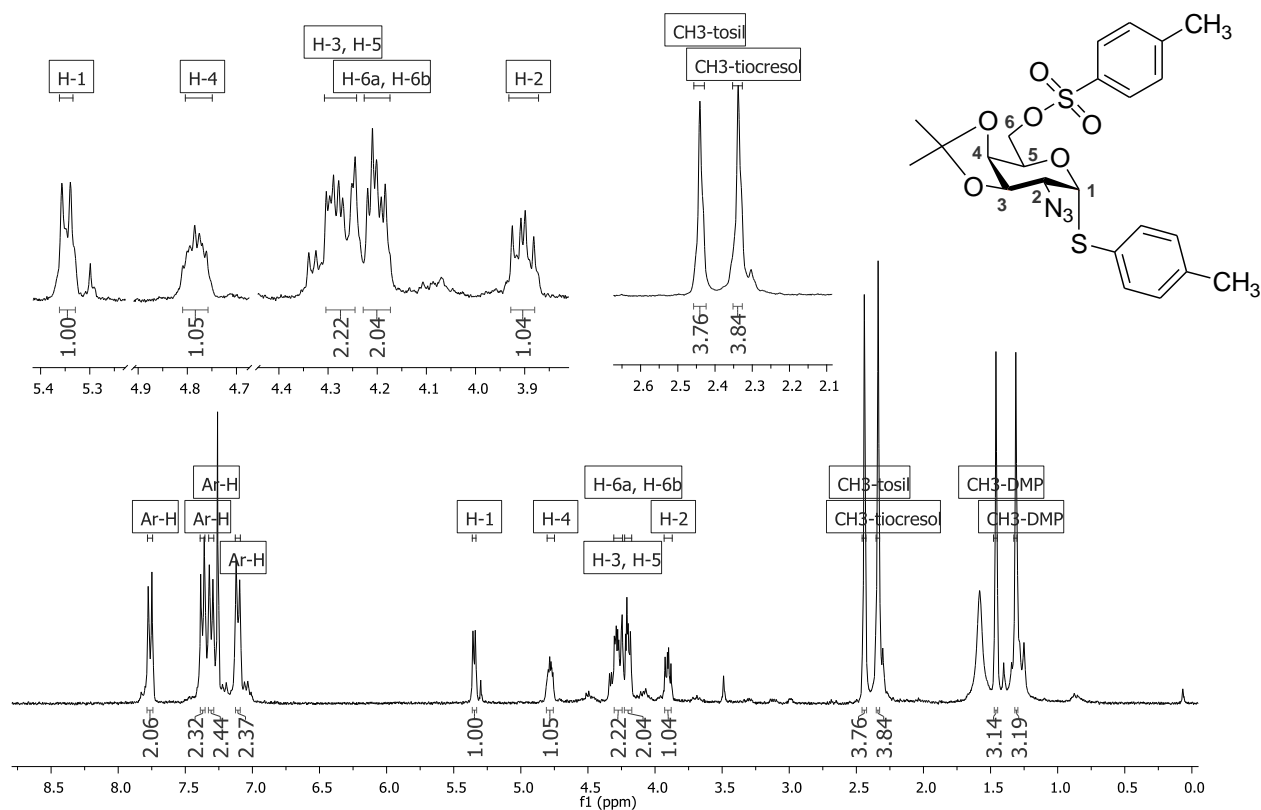
**Anexo 5.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-didesóxi-1-tio- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **45**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1 $\alpha$	5,61	1	d	$J_{1,2} 5,5$
H-2 $\alpha$	4,29	1	dd	$J_{1,2} 5,5 ; J_{2,3} 11,1$
H-3 $\alpha$	5,17	1	dd	$J_{3,4} 2,9 ; J_{2,3} 11,1$
H-4 $\alpha$	5,48	1	d	$J_{3,4} 2,9$
H-5 $\alpha$	4,77	1	t	$J_{5,6a/6b} 6,6$
H-6a, H-6b	4,13	2	dd	$J_{5,6a/6b} 6,6 ; J_{6a,6b} 10,1$
H-1 $\beta$	4,46	1	d	$J_{1,2} 10,1$
H-2 $\beta$	3,63	1	t	$J_{1,2} = J_{2,3} 10,1$
H-3 $\beta$	4,85	1	dd	$J_{3,4} 3,1 ; J_{2,3} 10,1$
H-4 $\beta$	5,34	1	d	$J_{3,4} 3,1$
H-5 $\beta$	3,86	1	t	$J_{5,6a/6b} 6,5$
H-6a, H-6b	4,08	2	t	$J_{5,6a/6b} 6,5$
H-STol arom.	7,50; 7,40; 7,14	8	2x d e 1x t	$J_{orto} 8,1 ; J_{orto} 7,6$
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,36	3	s	-
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,33	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,15- 2,01	18	6x s	-



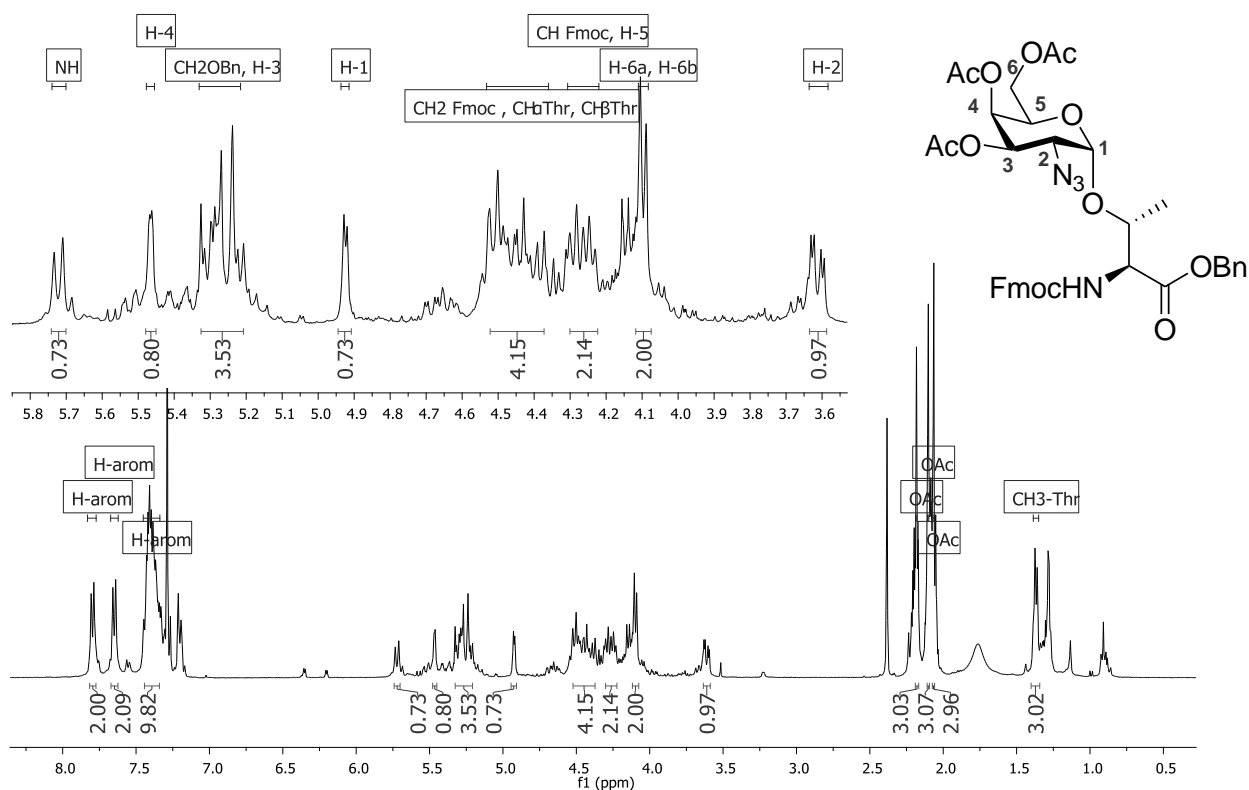
**Anexo 6.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-azido-2-desóxi-3,4-O-isopropilideno-1-tio- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **46**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,70	1	d	$J_{1,2}$ 5,1
H-2, H-3, H-5	4,26 - 4,19	3	m	-
H-4	4,36	1	d	$J_{3,4}$ 2,9
H-6a	4,06	1	dd	$J_{5,6a}$ 6,5 ; $J_{6a,6b}$ 12,5
H-6b	3,95	1	dd	$J_{5,6b}$ 1,8 ; $J_{6a,6b}$ 12,5
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,47	3	s	-
H-arom	7,34 ; 7,10	4	2x d	$J_{orto}$ 7,8
CH <sub>3</sub> -DMP	1,68 ; 1,66	6	2x s	-



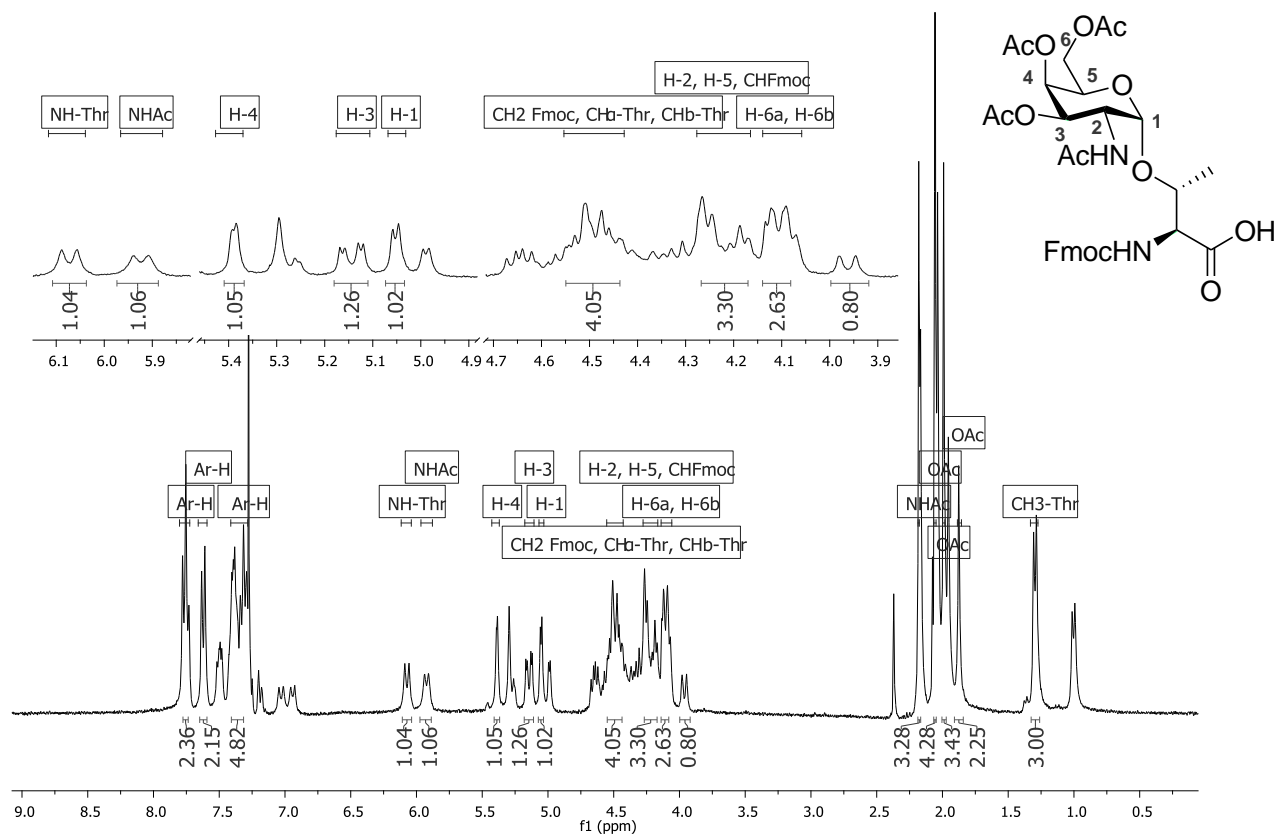
**Anexo 7.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-azido-2-desóxi-3,4-*O*-isopropilideno-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **50**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,35	1	d	$J_{1,2}$ 5,2
H-2	3,90	1	dd	$J_{1,2}$ 5,2 ; $J_{2,3}$ 7,9
H-3, H-5	4,30 - 4,25	2	m	-
H-4	4,78	1	d	$J_{3,4}$ 2,8
H-6a, H-6b	4,05 - 3,98	2	m	-
CH <sub>3</sub> -tosil	2,44	3	s	-
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,34	3	s	-
H-arom	7,76 ; 7,37 7,31; 7,11	8	4x d	4x $J_{\text{orto}}$ 8,0
CH <sub>3</sub> -DMP	1,46 ; 1,31	6	2x s	-



**Anexo 8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-*L*-treonina **27**.

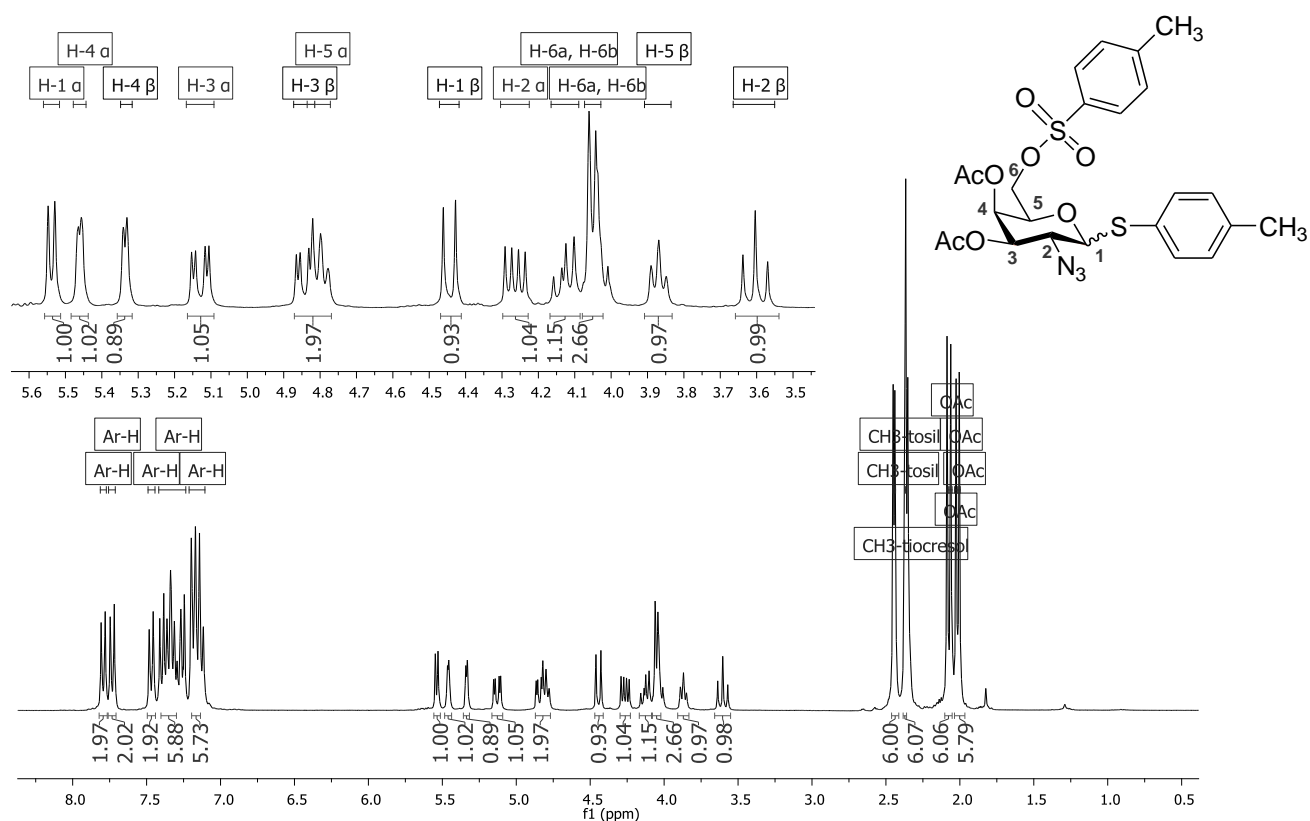
Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,92	1	d	$J_{1,2,3,5}$
H-2	3,61	1	dd	$J_{1,2,3,5}$ ; $J_{2,3}$ 11,2
H-3, CH <sub>2</sub> OBn	5,33 - 5,20	3	m	-
H-4	5,47	1	d	$J_{3,4}$ 2,1
H-5, CH Fmoc	4,31 - 4,23	2	m	-
H-6a, H-6b	4,1	2	d	$J_{5,6a/6b}$ 6,3
NHThr	5,72	1	d	$J$ 9,6
CH <sub>2</sub> Fmoc, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr	4,52 - 4,37	4	m	-
COCH <sub>3</sub>	2,18 ; 2,10; 2,06	9	3x s	-
CH <sub>3</sub> -Thr	1,37	3	s	-
H-arom	7,80 - 7,34	13	d ; d; m	$J$ 7,5 ; $J$ 7,7



**Anexo 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **52**.

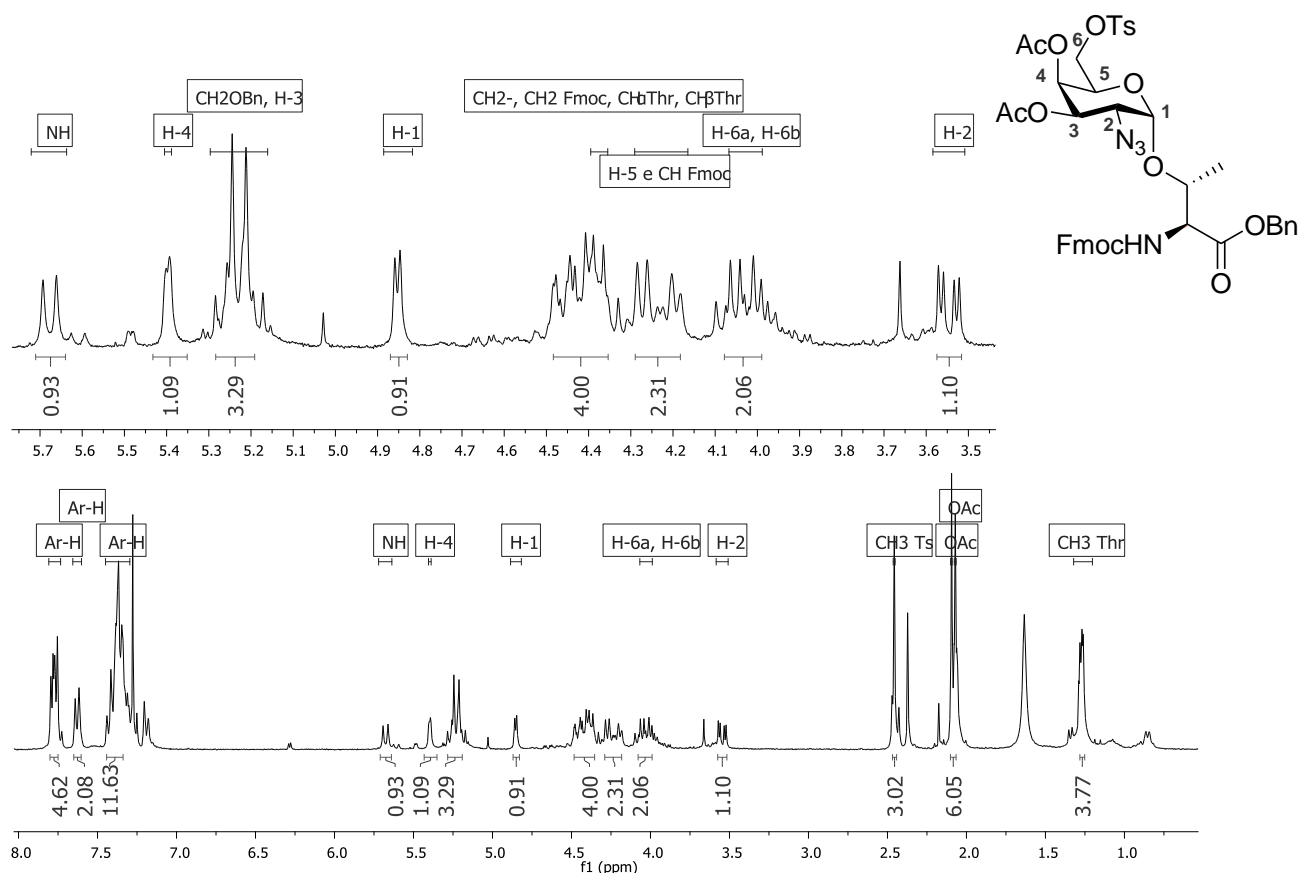
Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,05	1	d	$J_{1,2}$ 3,5
H-2, H-5, CHFmoc	4,27 - 4,17	3	m	-
H-3	5,14	1	dd	$J_{3,4}$ 2,5 ; $J_{2,3}$ 11,5
H-4	5,39	1	d	$J_{3,4}$ 2,5
H-6a, H-6b	4,1	2	dd	$J_{5,6a/6b}$ 5,0 ; $J_{6a,6b}$ 14,3
NHThr	6,07	1	d	$J$ 9,6
NHCO	5,92	1	d	$J$ 8,6
CH <sub>2</sub> Fmoc, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr	4,55 - 4,44	4	m	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,18	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	2,06 ; 1,99; 1,88	9	3x s	-
CH <sub>3</sub> -Thr	1,30	3	s	-
H-arom.	7,75 - 7,30	8	t, d, m	$J_{\text{trip.}}$ 7,2 ; $J_{\text{dup.}}$ 7,3 ; -





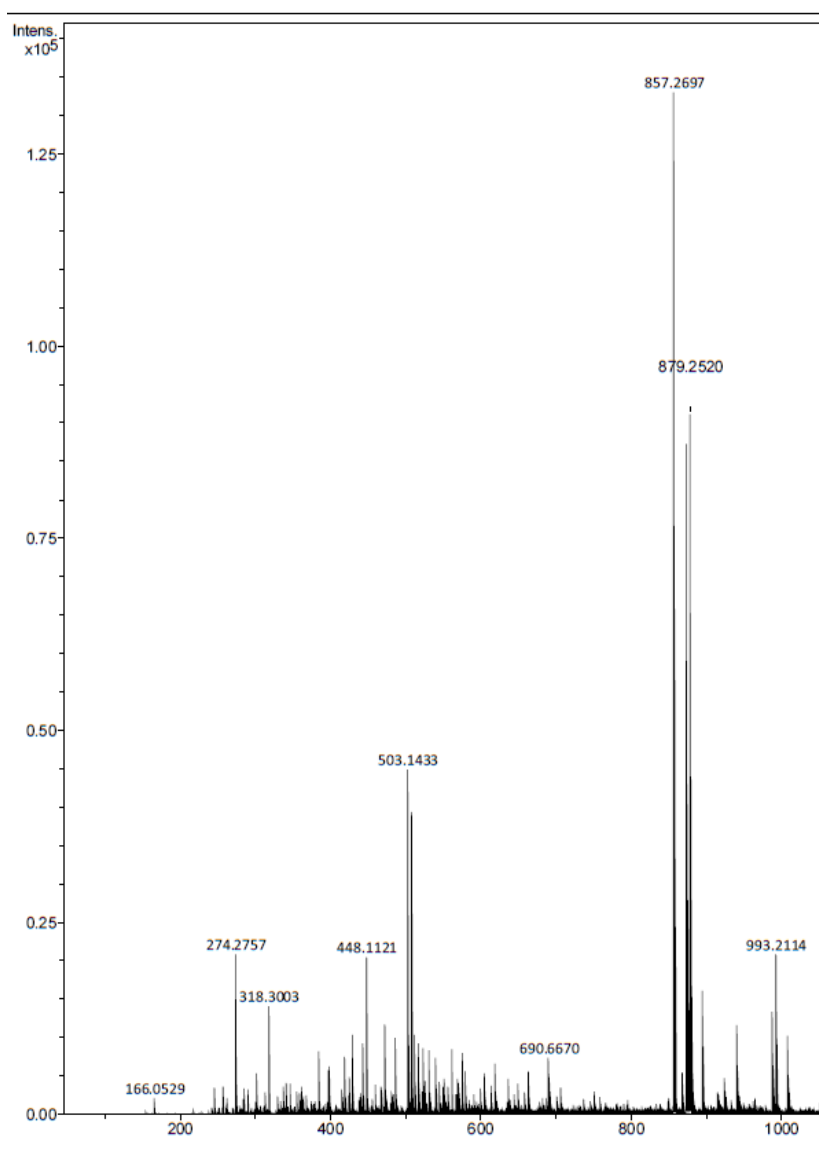
**Anexo 10.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3,4-Di-O-cetil-2-azido-2-desóxi-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **58**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1 $\alpha$	5,54	1	d	$J_{1,2}$ 5,5
H-2 $\alpha$	4,26	1	dd	$J_{1,2}$ 5,5 ; $J_{2,3}$ 11,1
H-3 $\alpha$	5,13	1	dd	$J_{2,3}$ 11,1 ; $J_{3,4}$ 2,3
H-4 $\alpha$	5,46	1	d	$J_{3,4}$ 2,3
H-5 $\alpha$	4,79	1	t	$J_{5,6a/6b}$ 6,5
H-6a, H-6b	4,13	2	dd	$J_{5,6a/6b}$ 6,5 ; $J_{6a,6b}$ 10,1
H-1 $\beta$	4,44	1	d	$J_{1,2}$ 10,1
H-2 $\beta$	3,6	1	t	$J_{1,2} = J_{2,3}$ 10,1
H-3 $\beta$	4,84	1	dd	$J_{2,3}$ 10,1 ; $J_{3,4}$ 3,0
H-4 $\beta$	5,34	1	d	$J_{3,4}$ 3,0
H-5 $\beta$	3,87	1	t	$J_{5,6a}$ 6,1
H-6a, H-6b	4,05	2	d	$J_{5,6a/6b}$ 6,1
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,37	6	2x s	-
CH <sub>3</sub> -tosil	2,45 ; 2,44	6	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,09 - 2,00	12	4x s	-
H-Ar	7,79 - 7,14	16	-	-

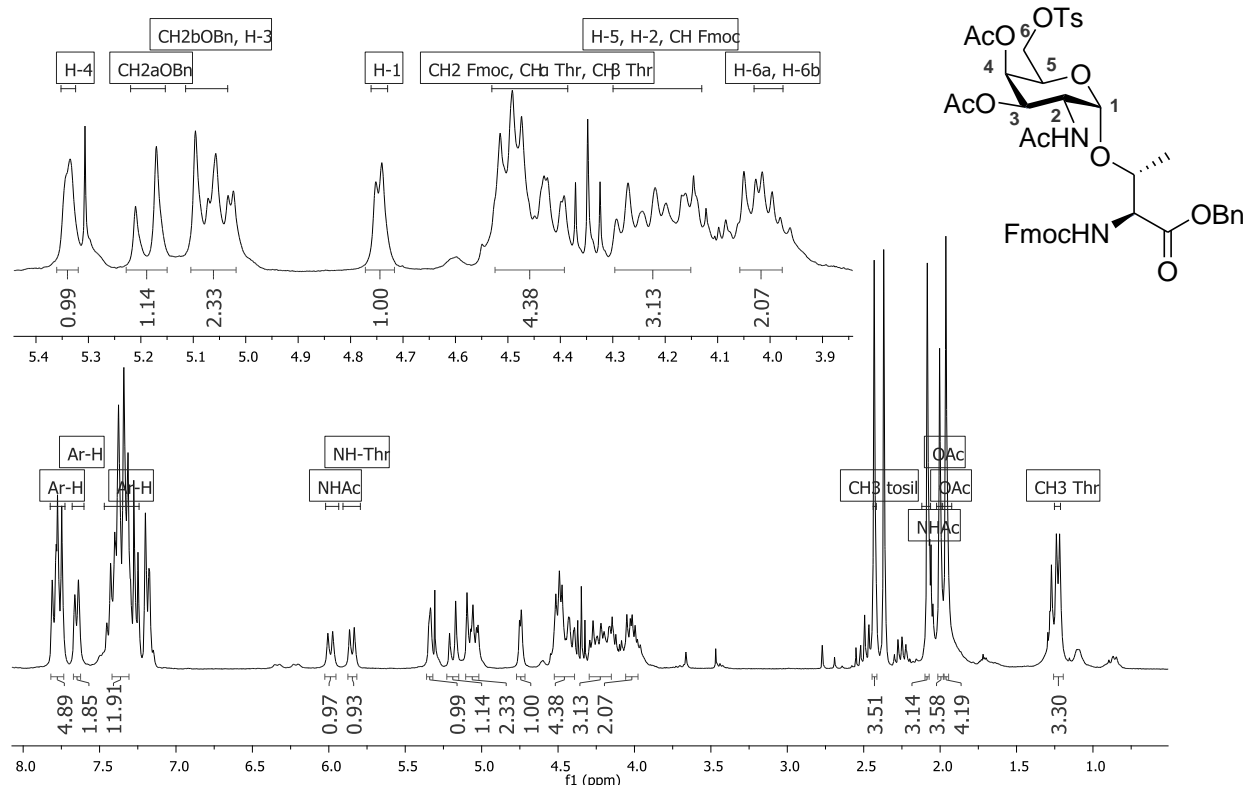


**Anexo 11 A.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **59**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,85	1	d	$J_{1,2}$ 3,7
H-2	3,55	1	dd	$J_{1,2}$ 3,7 ; $J_{2,3}$ 11,2
H-3	4,46	1	dd	$J_{2,3}$ 11,2 ; $J_{3,4}$ 2,4
H-4	5,4	1	d	$J_{3,4}$ 2,4
H-5, <i>CHFmoc</i>	4,28 - 4,18	2	m	-
H-6a, H-6b	4,03	2	dd	$J_{5,6a/6b}$ 6,2 ; $J_{6a,6b}$ 15,7
<i>NHThr</i>	5,68	1	d	$J$ 9,5
$\text{CH}_2\text{OBn}$	5,28-5,18	2	2x d	2x $J$ 12,0
$\text{CH}_2\text{Fmoc}$ , $\text{CH}_\alpha$ Thr, $\text{CH}_\beta$ Thr	4,38-4,37	4	m	-
$\text{CH}_3$ -tosil	2,46	3	s	-
$\text{COCH}_3$	2,09 ; 2,07	6	2x s	-
$\text{CH}_3$ -Thr	1,27	3	d	$J$ 6,2
H-arom.	7,78 - 7,31	17	dd, d, m	$J_{dd}$ 4,5, $J_{dd}$ 7,7 ; $J_d$ 7,4 ; -

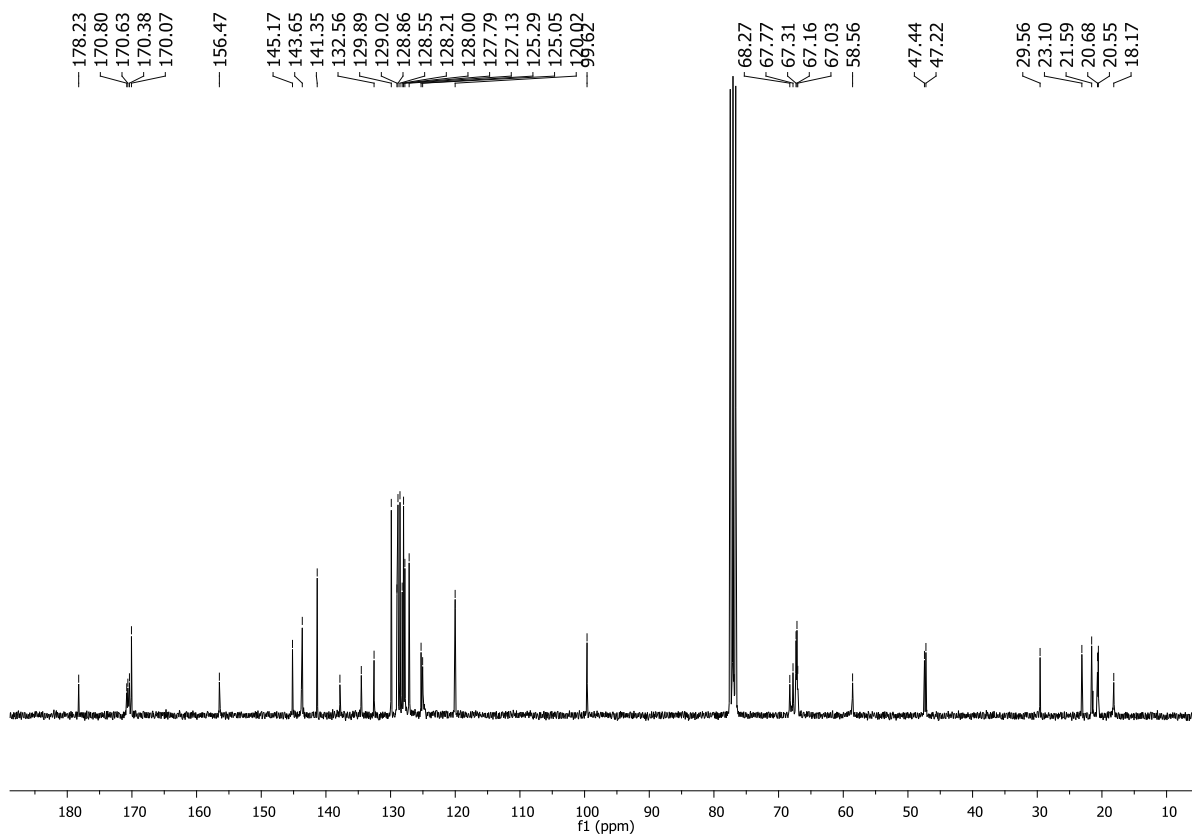


**Anexo 11 B.** Espectro de ESI-MS de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(3,4-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **59** (calcd. para  $C_{43}H_{45}N_4O_{13}S_+$   $[M+H]^+$ : 857,2698).

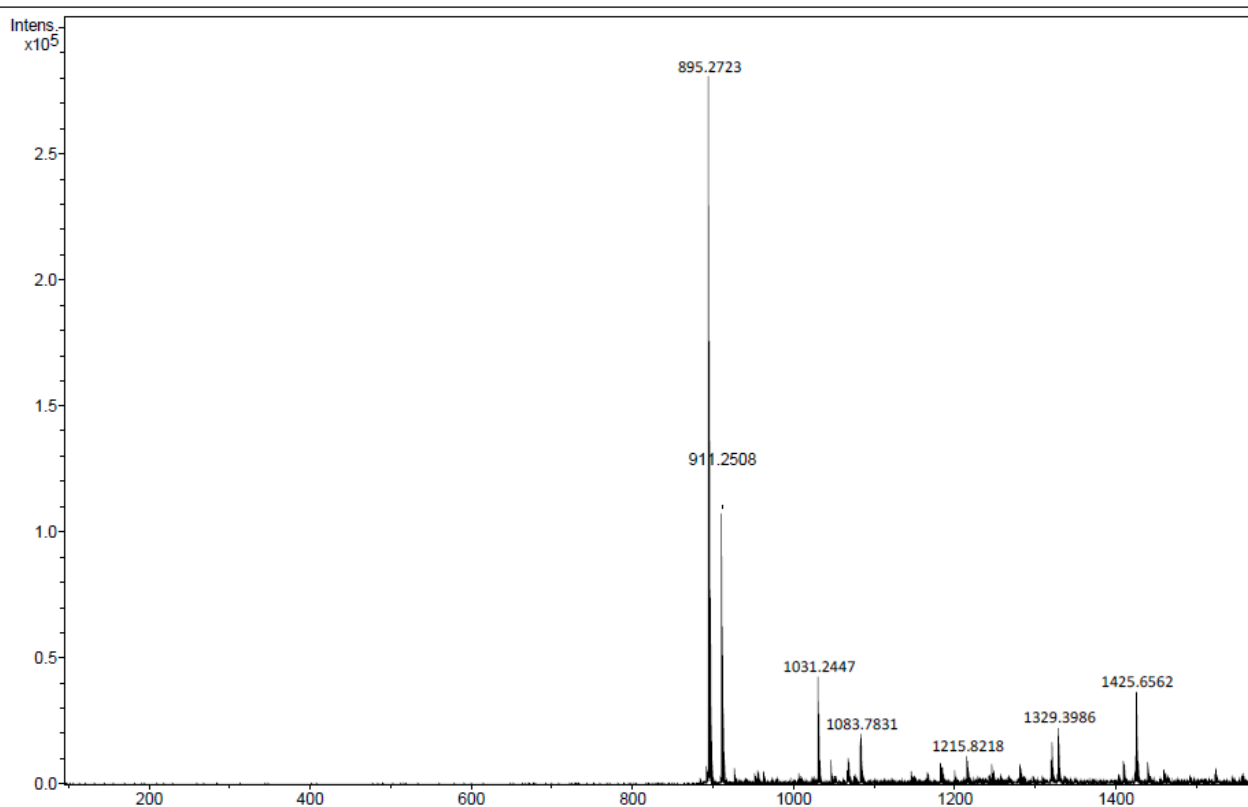


**Anexo 12A.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **56**.

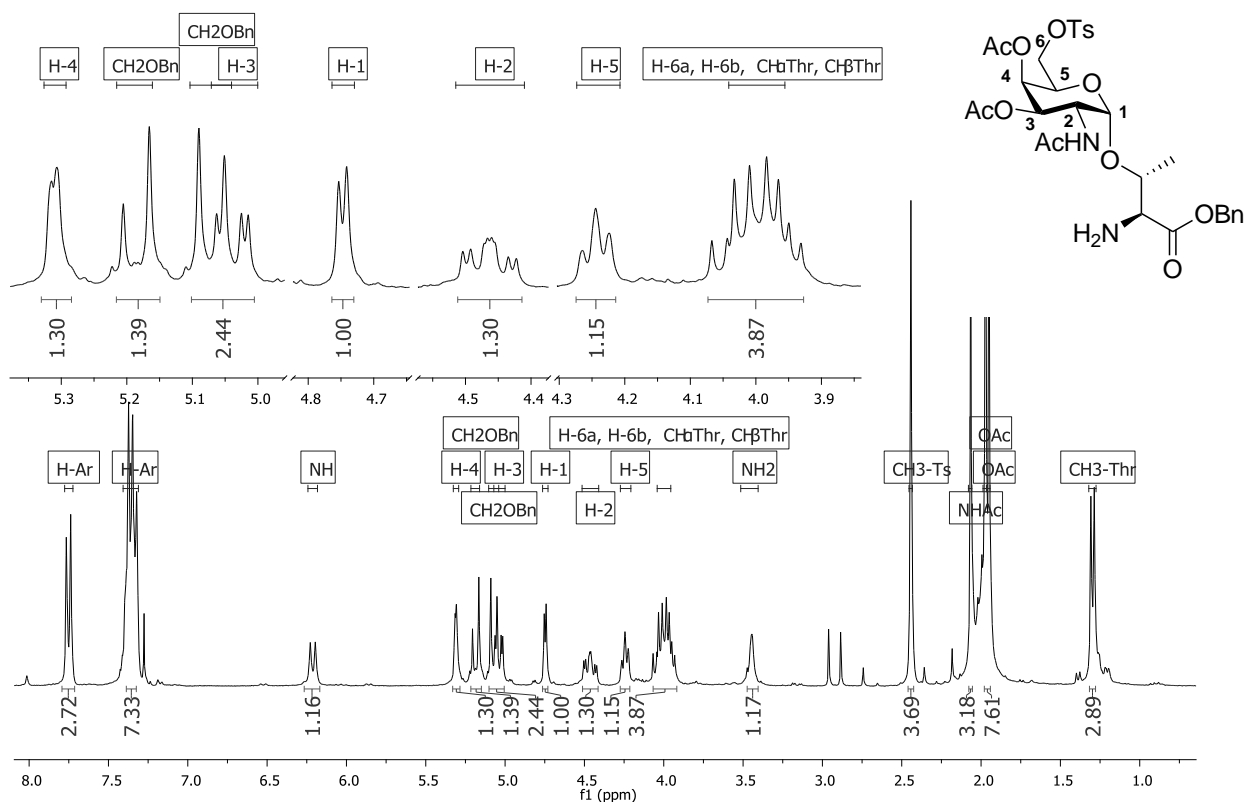
Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
H-1	4,75	1	d	$J_{1,2} 3,4$	99,6
H-2, H-5, CHFmoc	4,29 - 4,12	3	m	-	47,4; 68,3; 129,9 - 125,1
H-3, CH <sub>2a</sub> OBn	5,09 - 5,02	2	m	-	76,3 ; 67,8
H-4	5,33	1	s largo	-	67,2
H-6a, H-6b	4,05 - 3,98	2	m	-	67,0
NHThr	5,99	1	d	$J 9,6$	-
NHCO	5,85	1	d	$J 9,5$	170,8
CH <sub>2b</sub> OBn	5,19	1	d	$J 11,9$	67,8
CH <sub>2</sub> Fmoc, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr	4,51 - 4,39	4	m	-	67,3
CH <sub>3</sub> -tosil	2,43	3	s	-	21,6 ; 20,7
NHCOCH <sub>3</sub>	2,07	3	s	-	21,6
COCH <sub>3</sub>	2,00 ; 1,96	6	2x s	-	170,6; 170,5; 20,7; 20,6
CH <sub>3</sub> -Thr	1,23	3	S	-	18,2
H-arom	7,78 - 7,31	17	dd ; d ; m	$J_{dd} 8,1, J_{dd} 10,6 ;$ $J_d 7,7 ; -$	129,9 - 125,1



**Anexo 12B.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **56**.

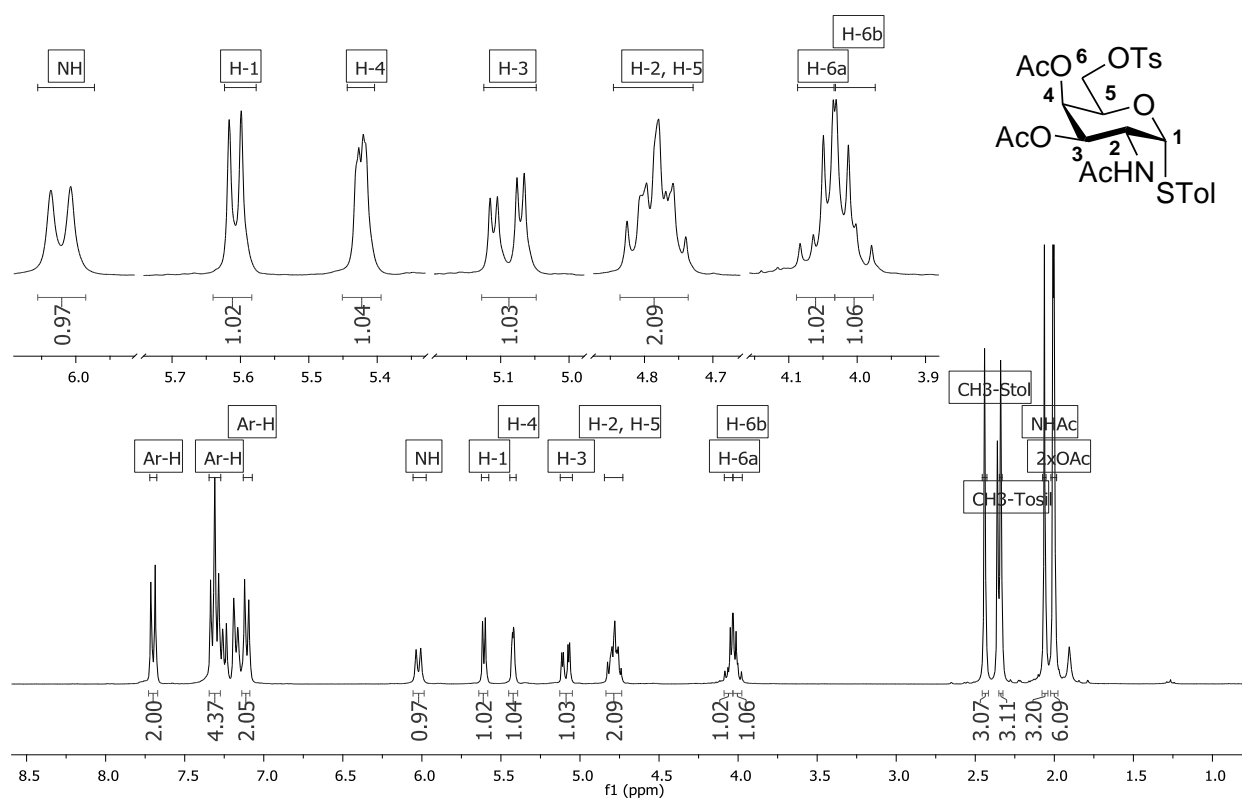


**Anexo 12C.** Espectro de ESI-MS de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **56** (calcd. para  $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{SNa}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 895,2718).



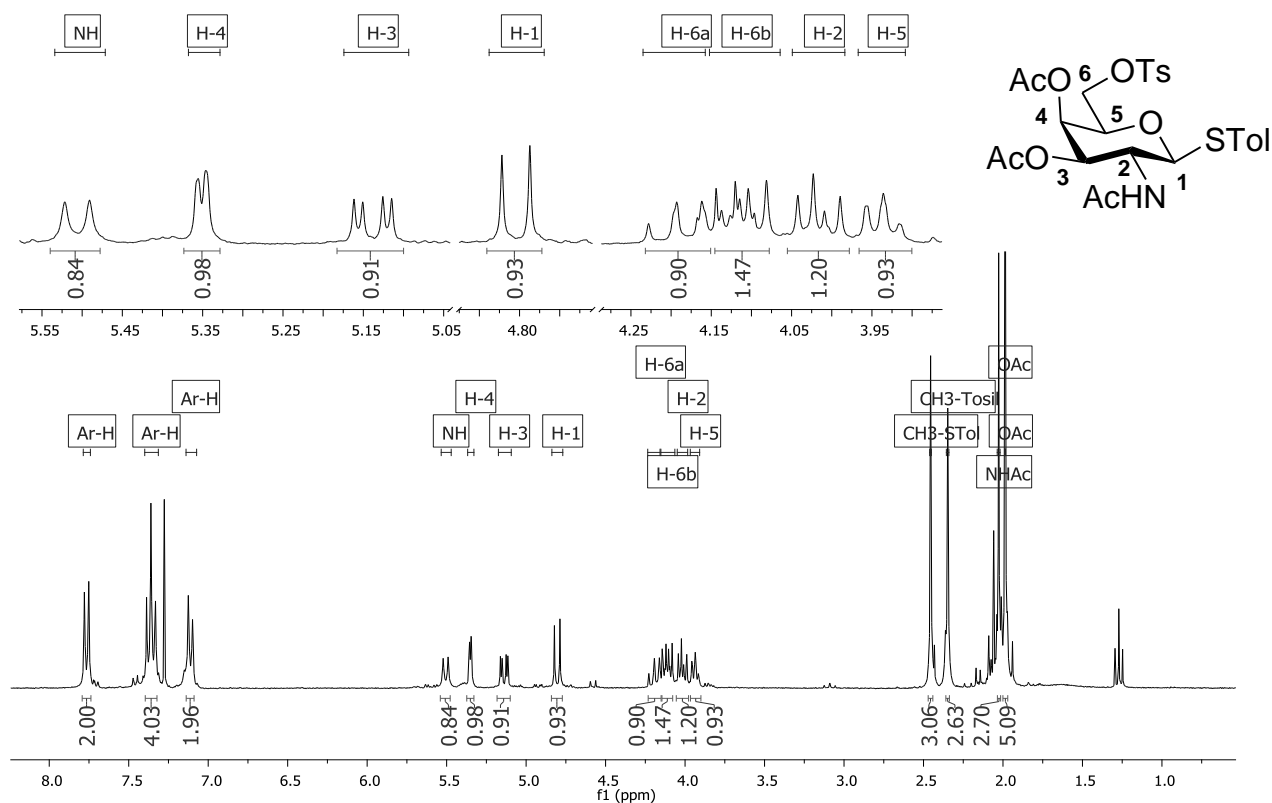
**Anexo 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de éster benzílico de (2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **60**.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,75	1	d	$J_{1,2,3,6}$
H-2	4,509 - 4,42	1	m	-
H-3, CH <sub>2b</sub> OBn	5,09 - 5,01	2	m	-
H-4	5,31	1	d	$J_{3,4,2,5}$
H-5	4,24	1	t	$J_{5,6a/6b,6,1}$
H-6a, H-6b, CH $\alpha$ Thr, CH $\beta$ Thr	4,07 - 3,93	4	m	-
NHCO	6,21	1	d	$J_{9,5}$
CH <sub>2a</sub> OBn	5,19	1	d	$J_{11,9}$
NH <sub>2</sub>	3,46	1	d	$J_{8,9}$
CH <sub>3</sub> -tosil	2,44	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,07	3	s	-
COCH <sub>3</sub>	1,97 ; 1,95	6	2x s	-
CH <sub>3</sub> -Thr	1,3	3	s	-
H-arom	7,75 - 7,32	9	d ; m	$J_{orto,8,3} ; -$



**Anexo 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2-desóxi-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **62 $\alpha$** .

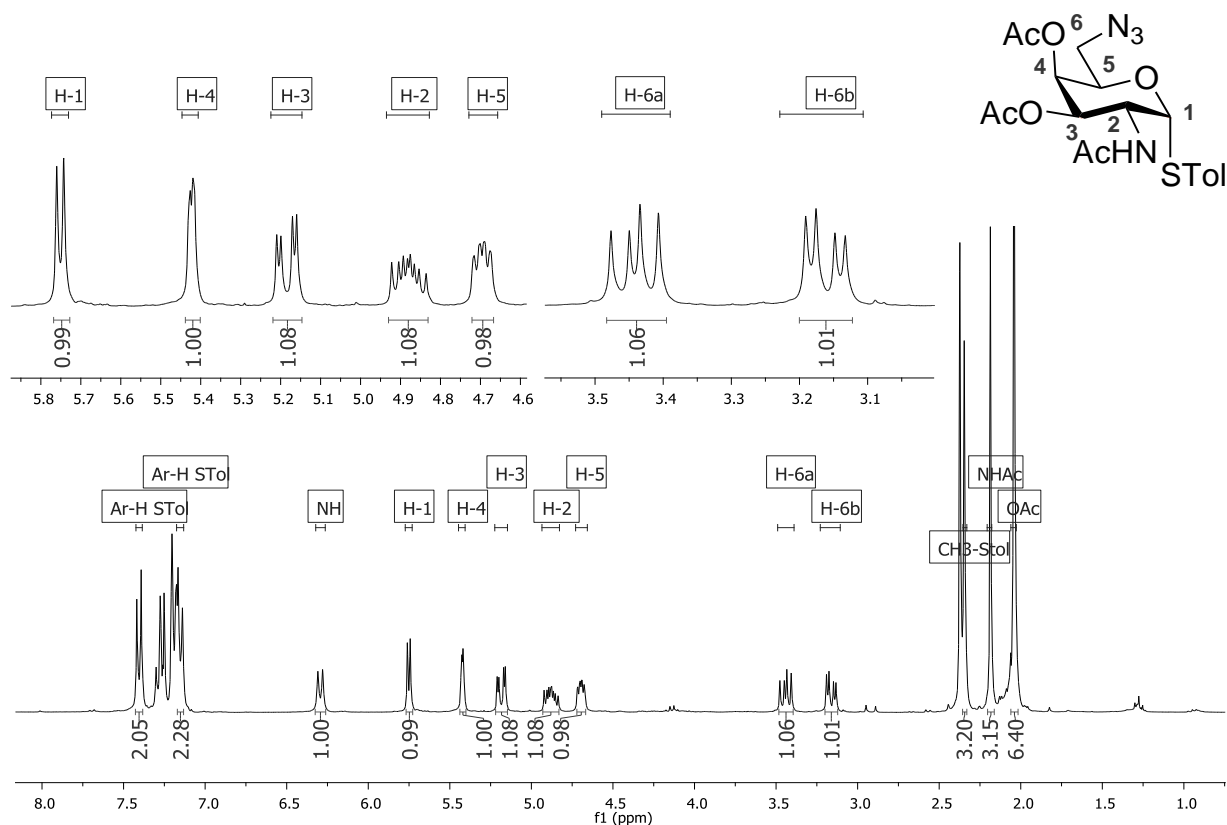
Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,61	1	d	$J_{1,2,5,6}$
H-2, H-5	4,83-4,74	2	m	-
H-3	5,09	1	dd	$J_{3,4,2,5}$ ; $J_{2,3,11,9}$
H-4	5,42	1	d	$J_{3,4,2,5}$
H-6a	4,06	1	dd	$J_{5,6a,5,1}$ ; $J_{6a,6b,9,5}$
H-6b	4,01	1	dd	$J_{5,6b,6,1}$ ; $J_{6a,6b,9,5}$
NH	6,02	1	d	$J_{8,7}$
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,34	3	s	-
CH <sub>3</sub> -tosil	2,44	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,06	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,01	6	s	-
H arom.	7,70	2	d	$J_{orto,8,3}$
H arom.	7,33	4	dd	$J_{4,5}$ ; $J_{10,9}$
H arom.	7,11	2	d	$J_{orto,7,1}$



**Anexo 15.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-acetamido-3,4-di-O-acetil-2-desóxi-1-tio-6-*p*-tolueno sulfonil-β-D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **62β**.

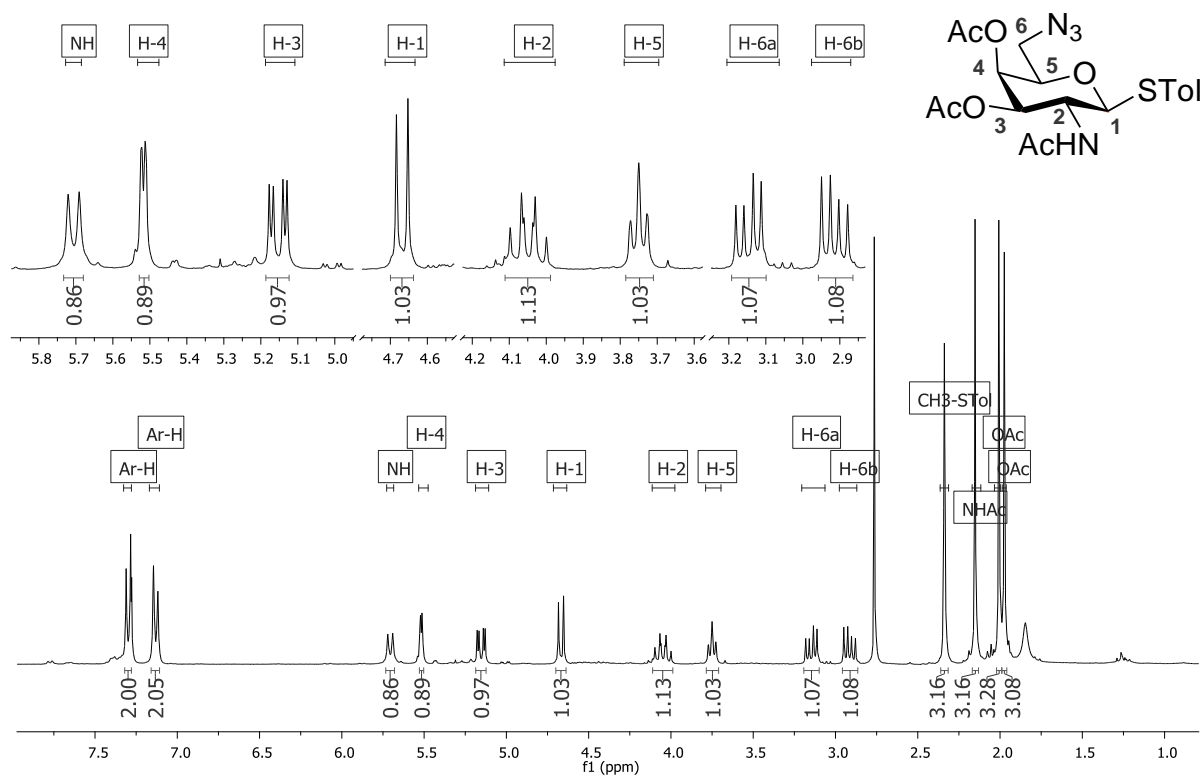
Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,80	1	d	$J_{1,2}$ 10,4
H-2	4,02	1	dd	$J_{1,2}$ 10,4 ; $J_{2,3}$ 11,3
H-3	5,14	1	dd	$J_{3,4}$ 3,0 ; $J_{2,3}$ 11,3
H-4	5,35	1	d	$J_{3,4}$ 3,0
H-5	3,94	1	t	$J_{5,6a/6b}$ 6,2
H-6a	4,19	1	dd	$J_{5,6a}$ 6,1 ; $J_{6a,6b}$ 12,8
H-6b	4,11	1	dd	$J_{5,6b}$ 6,9 ; $J_{6a,6b}$ 12,8
NH	5,51	1	d	$J$ 9,2
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,35	3	s	-
CH <sub>3</sub> -tosil	2,46	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,03	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	1,98 ; 1,99	2 x 3	2 x s	-
H arom.	7,77	2	d	$J_{orto}$ 7,8
H arom.	7,73	4	t	$J$ 8,4
H arom.	7,11	2	d	$J_{orto}$ 7,9





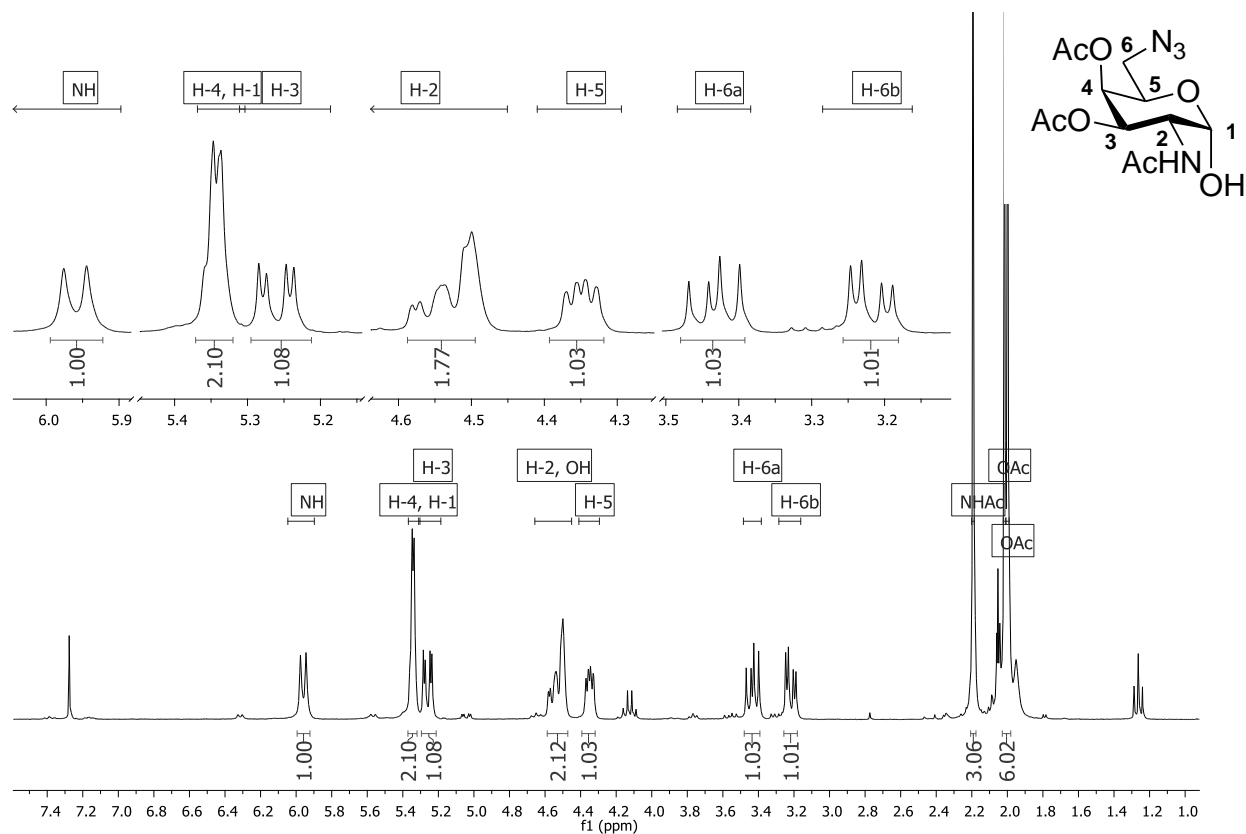
**Anexo 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-1-tio- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **63 $\alpha$** .

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,75	1	d	$J_{1,2} 5,2$
H-2	4,88	1	ddd	$J_{1,2} 5,2$ ; $J_{2,\text{NH}} 8,7$ ; $J_{2,3} 11,9$
H-3	5,18	1	dd	$J_{3,4} 2,5$ ; $J_{2,3} 11,9$
H-4	5,42	1	d	$J_{3,4} 2,5$
H-5	4,70	1	dd	$J_{5,6a} 8,1$ ; $J_{5,6b} 4,5$
H-6a	3,44	1	dd	$J_{5,6a} 8,1$ ; $J_{6a,6b} 12,8$
H-6b	3,16	1	dd	$J_{5,6b} 4,5$ ; $J_{6a,6b} 12,8$
NH	6,29	1	d	$J 8,7$
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,35	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,19	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,04	6	s largo	-
H arom.	7,41	2	d	$J_{orto} 8,1$
H arom.	7,15	2	d	$J_{orto} 8,1$



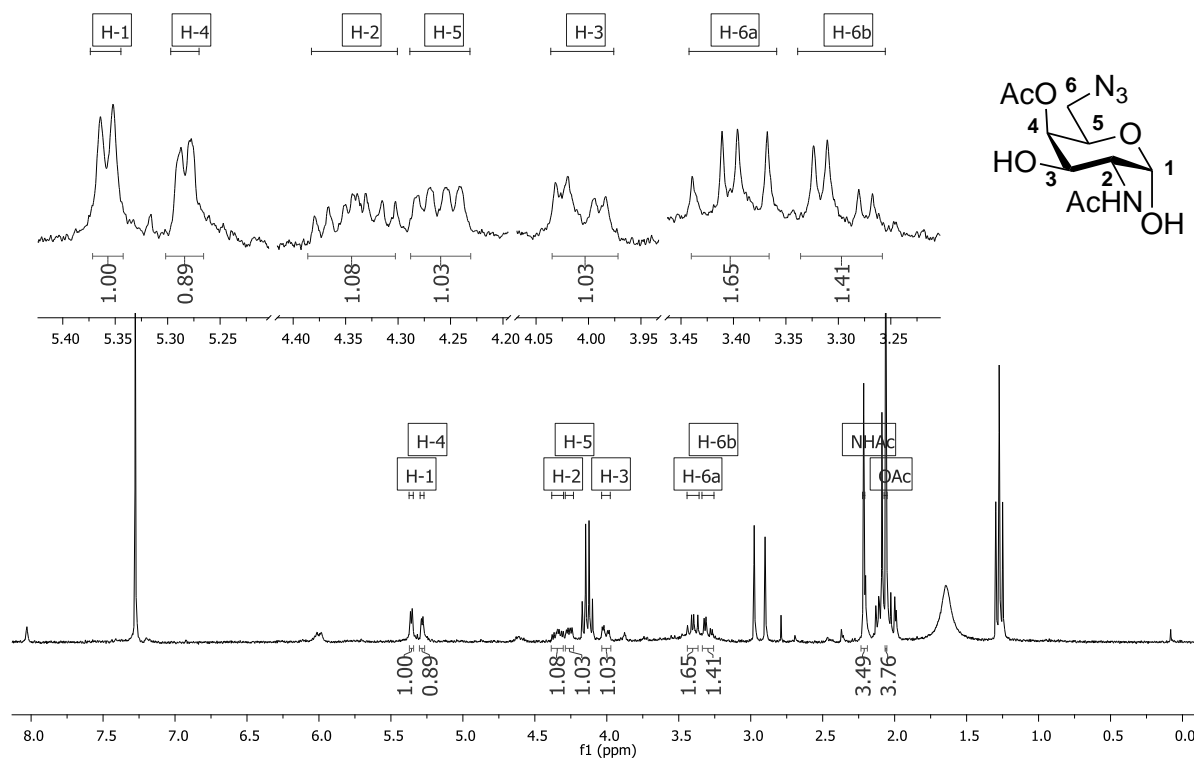
**Anexo 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-Acetamido-3,4-di-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo de *p*-tolila **63 $\beta$** .

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,67	1	d	$J_{1,2}$ 9,1
H-2	4,05	1	dt	$J_{1,2}=J_{2,\text{NH}}$ 9,1 ; $J_{2,3}$ 11,2
H-3	5,18	1	dd	$J_{3,4}$ 3,0 ; $J_{2,3}$ 11,2
H-4	5,15	1	d	$J_{3,4}$ 3,0
H-5	3,75	1	t	$J_{5,6a}=J_{5,6b}$ 6,5
H-6a	3,15	1	dd	$J_{5,6a}$ 6,5 ; $J_{6a,6b}$ 14,0
H-6b	2,91	1	dd	$J_{5,6b}$ 6,5 ; $J_{6a,6b}$ 14,0
NH	5,71	1	d	$J$ 9,1
CH <sub>3</sub> -tiocresol	2,33	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,15	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,01 ; 1,97	6	2 x s	-
H arom.	7,30	2	d	$J_{orto}$ 8,0
H arom.	7,13	2	d	$J_{orto}$ 8,0



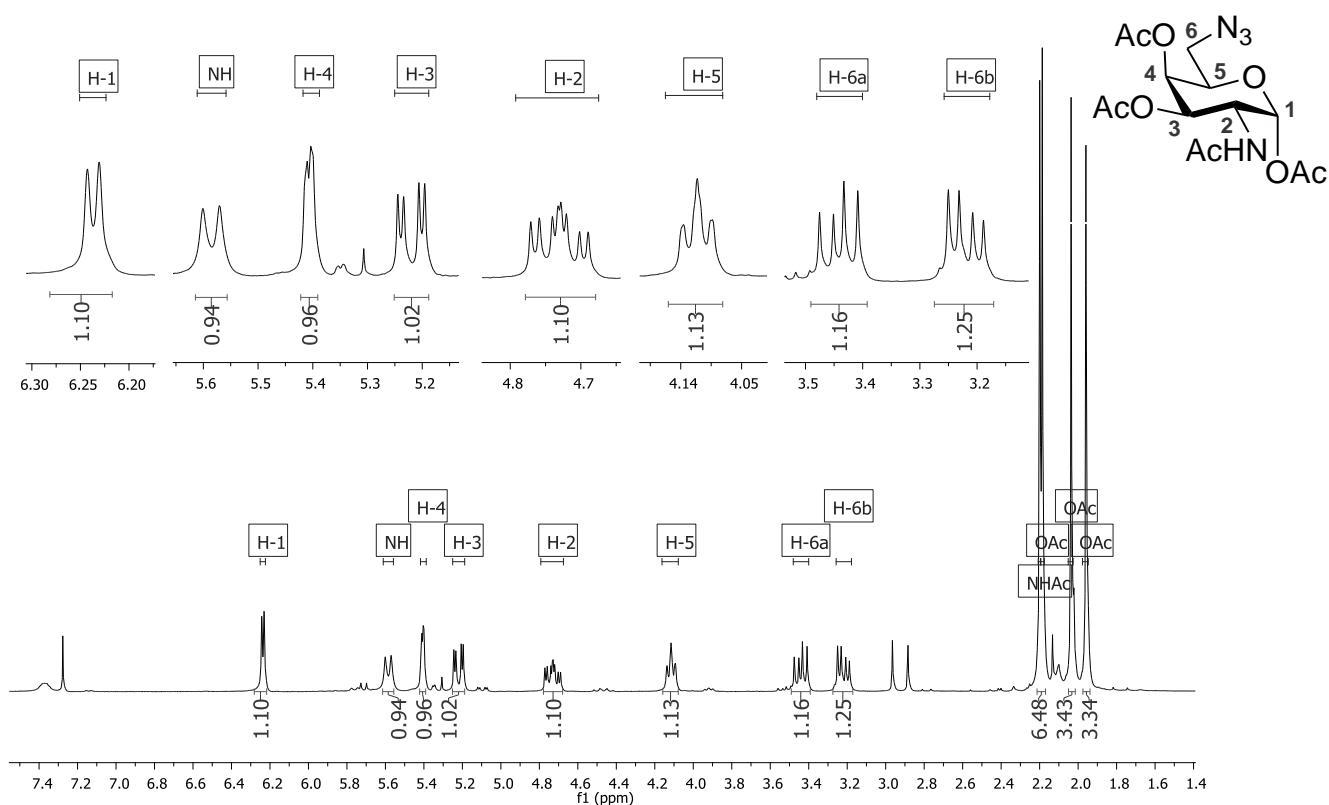
**Anexo 18.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-acetamido-3,4-di-O-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosse **64**.

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1, H-4	5,34	2	d	$J_{3,4} = J_{1,2} 3,2$
H-2, OH	4,57-4,50	2	m	-
H-3	5,26	1	dd	$J_{3,4} 3,2 ; J_{2,3} 11,2$
H-5	4,35	1	dd	$J_{5,6a} 8,2 ; J_{5,6b} 4,5$
H-6a	3,44	1	dd	$J_{5,6a} 8,2 ; J_{6a,6b} 12,8$
H-6b	3,22	1	dd	$J_{5,6b} 4,5 ; J_{6a,6b} 12,8$
NH	5,96	1	d	$J 9,4$
NHCOCH <sub>3</sub>	2,19	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,02 ; 2,00	2 x 3	2 x s	-



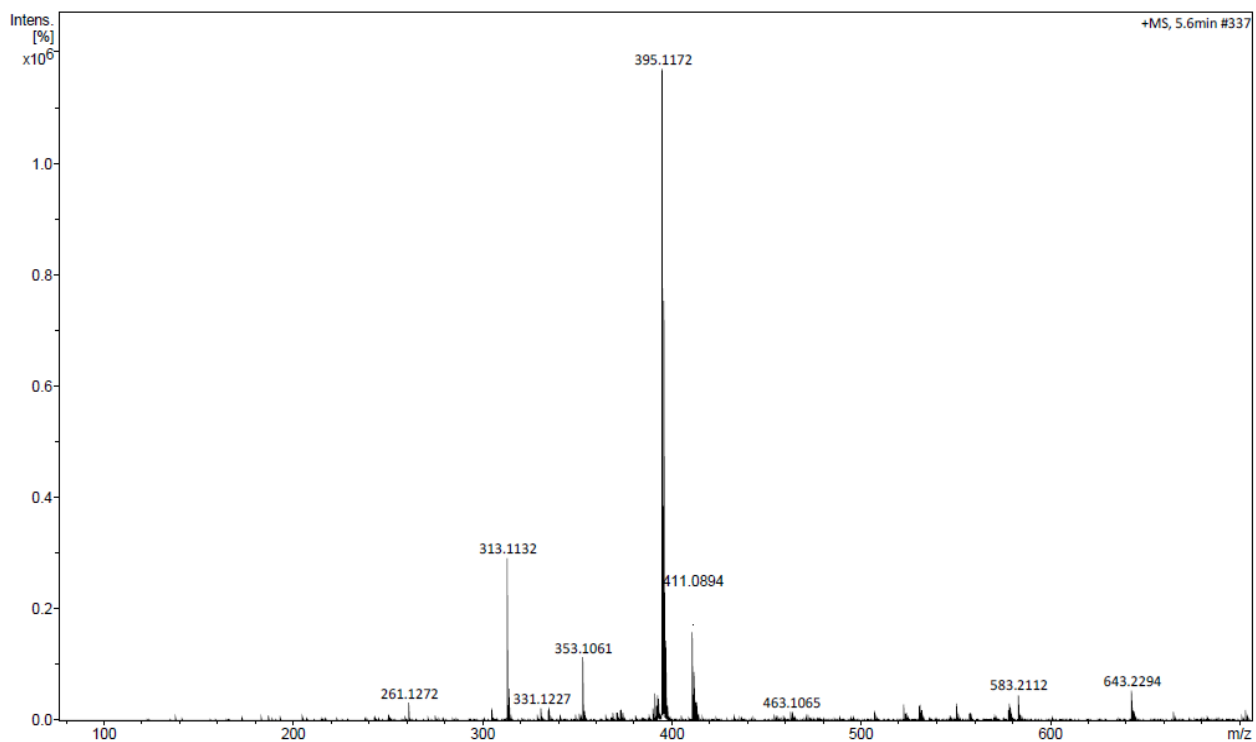
**Anexo 19.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-acetamido-4-O-acetil-6-azido-2,6-dideoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosse **65**.

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,36	1	d	$J_{1,2}$ 3,6
H-2	4,38-4,30	1	m	-
H-3	4,01	1	dd	$J_{3,4}$ 3,2 ; $J_{2,3}$ 10,8
H-4	5,28	1	d	$J_{3,4}$ 3,2
H-5	4,26	1	dd	$J_{5,6a}$ 8,5 ; $J_{5,6b}$ 3,9
H-6a	3,40	1	dd	$J_{5,6a}$ 8,5 ; $J_{6a,6b}$ 12,9
H-6b	3,30	1	dd	$J_{5,6b}$ 3,9 ; $J_{6a,6b}$ 12,9
NH	5,96	1	d	$J$ 9,4
NHCOCH <sub>3</sub>	2,22	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,06	3	s	-

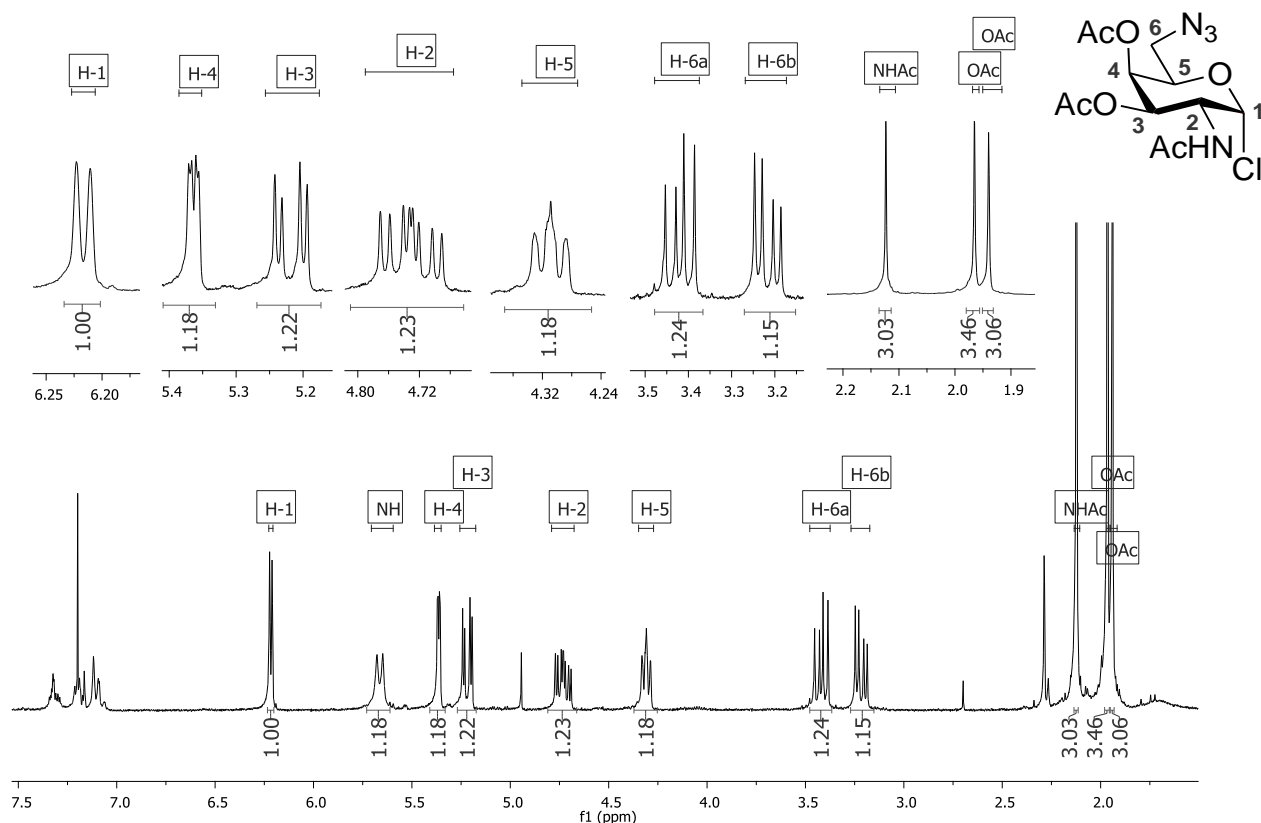


**Anexo 20 A.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-1,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosse **66**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,24	1	d	$J_{1,2,3,6}$
H-2	4,73	1	ddd	$J_{1,2,3,6}$ ; $J_{2,\text{NH}}$ 9,1 Hz; $J_{2,3}$ 11,6
H-3	5,22	1	dd	$J_{3,4}$ 2,6; $J_{2,3}$ 11,6
H-4	5,41	1	d	$J_{3,4}$ 2,6
H-5	4,11	1	t	$J_{5,6a} = J_{5,6b}$ 6,4
H-6a	3,44	1	dd	$J_{5,6a}$ 7,3; $J_{6a,6b}$ 12,8
H-6b	3,22	1	dd	$J_{5,6b}$ 5,7; $J_{6a,6b}$ 12,8
NH	5,59	1	d	$J$ 9,1
NHCOCH <sub>3</sub>	2,20	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,19; 2,04; 1,95	3 x 3	3 x s	-

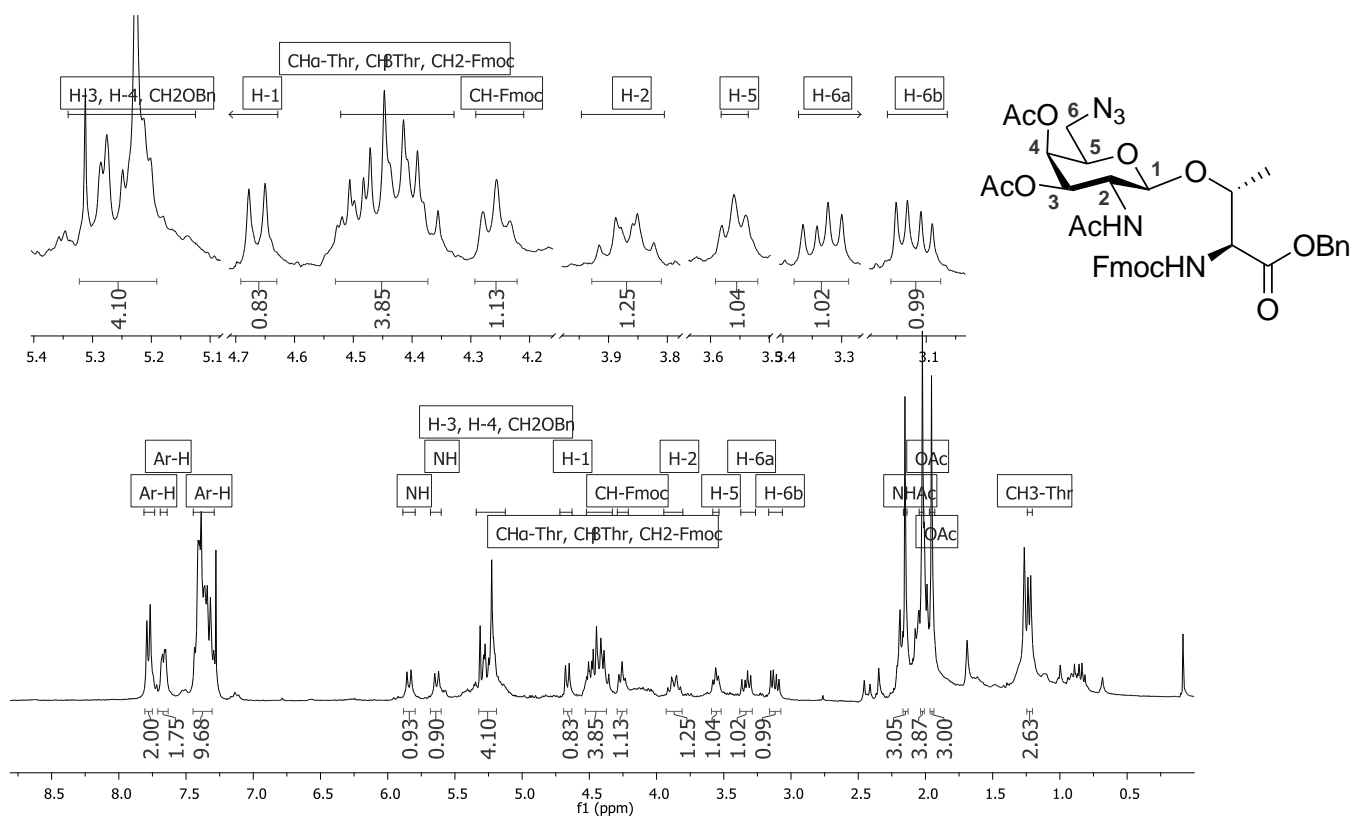


**Anexo 20 B.** Espectro de ESI-MS de 2-acetamido-1,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosse **66** (calcd. para  $C_{14}H_{20}N_4O_8Na^+[M+Na]^+$  395,1173).



**Anexo 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloruro de 2-acetamido-6-azido-2,6-dideoxi-3,4-di-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila **67**.

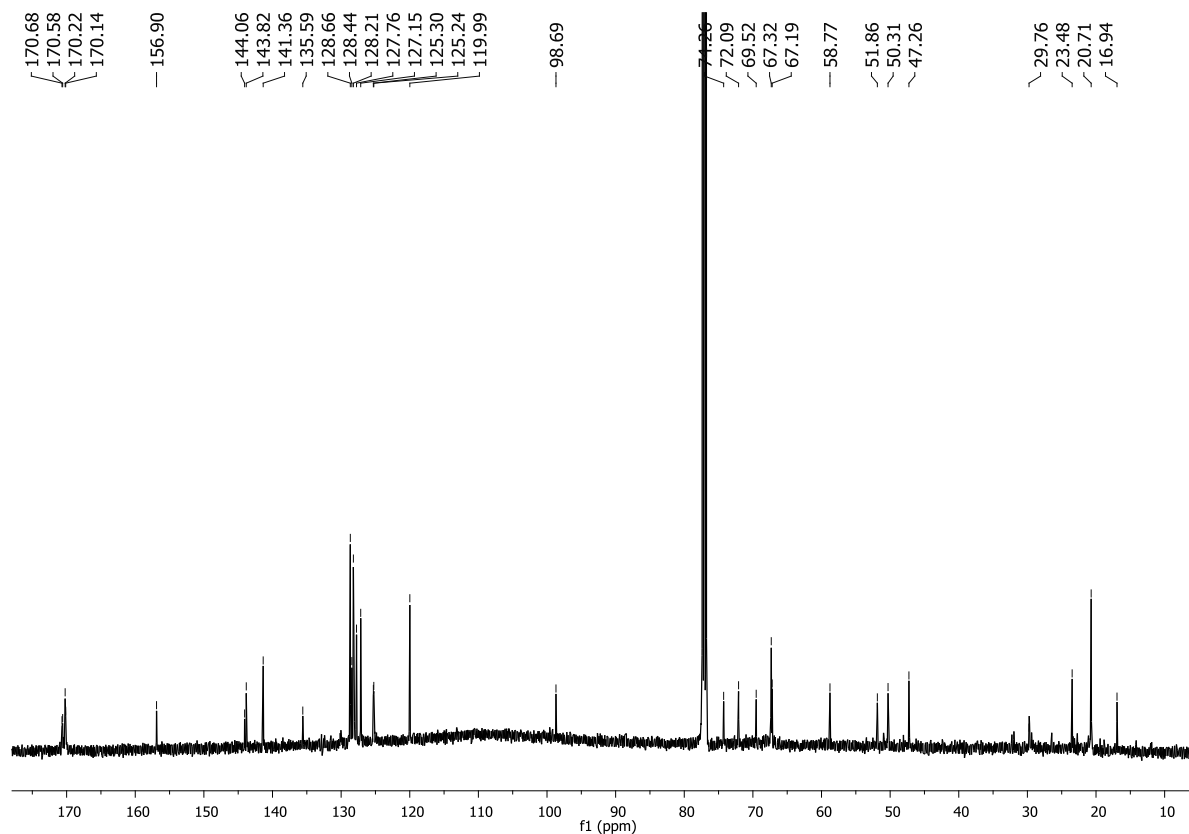
Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,28	1	d	$J_{1,2} 3,7$
H-2	4,73	1	ddd	$J_{1,2} 3,7$ ; $J_{2,\text{NH}} 8,9$ ; $J_{2,3} 11,3$
H-3	5,28	1	dd	$J_{3,4} 3,2$ ; $J_{2,3} 11,3$
H-4	5,43	1	d	$J_{3,4} 3,2$
H-5	4,37	1	t	$J_{5,6a} = J_{5,6b} 6,4$
H-6a	3,48	1	dd	$J_{5,6a} 7,4$ ; $J_{6a,6b} 12,9$
H-6b	3,28	1	dd	$J_{5,6b} 5,3$ ; $J_{6a,6b} 12,9$
NH	5,72	1	d	$J 8,9$
$\text{NHCOCH}_3$	2,19	3	s	-
$\text{CH}_3\text{CO}$	2,03; 2,00	2 x 3	2 x s	-



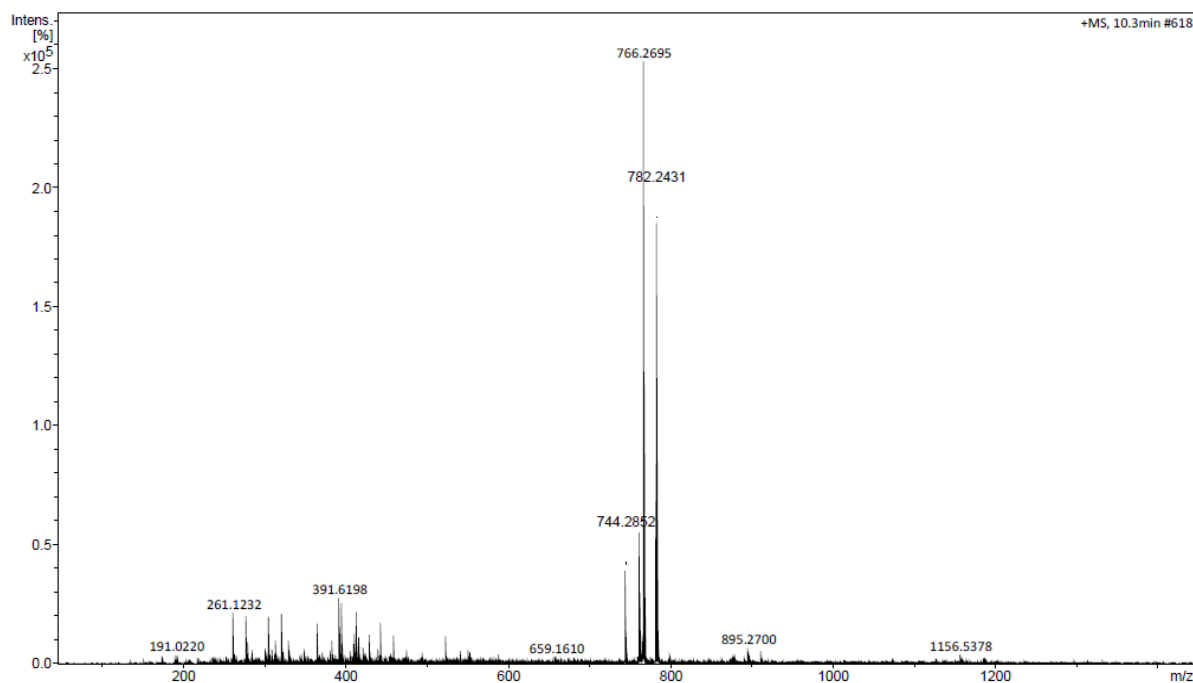
**Anexo 22 A.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **68**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
H-1	4,66	1	d	$J_{1,2}$ 8,3	99,7
H-2	3,87	1	dd	$J_{1,2}$ 8,3 ; $J_{2,3}$ 10,8	51,7
H-3; H-4; CH <sub>2</sub> OBn	5,31-5,20	4	m	-	74,2 ; 69,5 ; 67,3
H-5	3,58-3,54	1	m	-	72,1
H-6a	3,33	1	dd	$J_{5,6a}$ 7,1 ; $J_{6a,6b}$ 12,8	50,3
H-6b	3,12	1	dd	$J_{5,6b}$ 5,7 ; $J_{6a,6b}$ 12,7	
NH	5,84	1	d	$J$ 9,2	-
NH	5,64	1	d	$J$ 8,4	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,15	3	s	-	23,5
CH <sub>3</sub> CO	2,02 ; 1,95	2 x 3	2 x s	-	20,7 ; 20,7
CH $\alpha$ -Thr; CH $\beta$ - Thr; CH <sub>2</sub> Fmoc	4,51-4,36	4	m	-	29,3 ; 58,8 ; 67,2
CHFmoc	4,26	1	t	$J$ 7,1	47,3
CH <sub>3</sub> -Thr	1,23	3	d	$J$ 6,3	16,9
H arom.	7,97 - 7,30	13	d ; d ; m	$J_{orto}$ 7,3 ; $J_{orto}$ 7,3 ; -	128,7 - 120,0

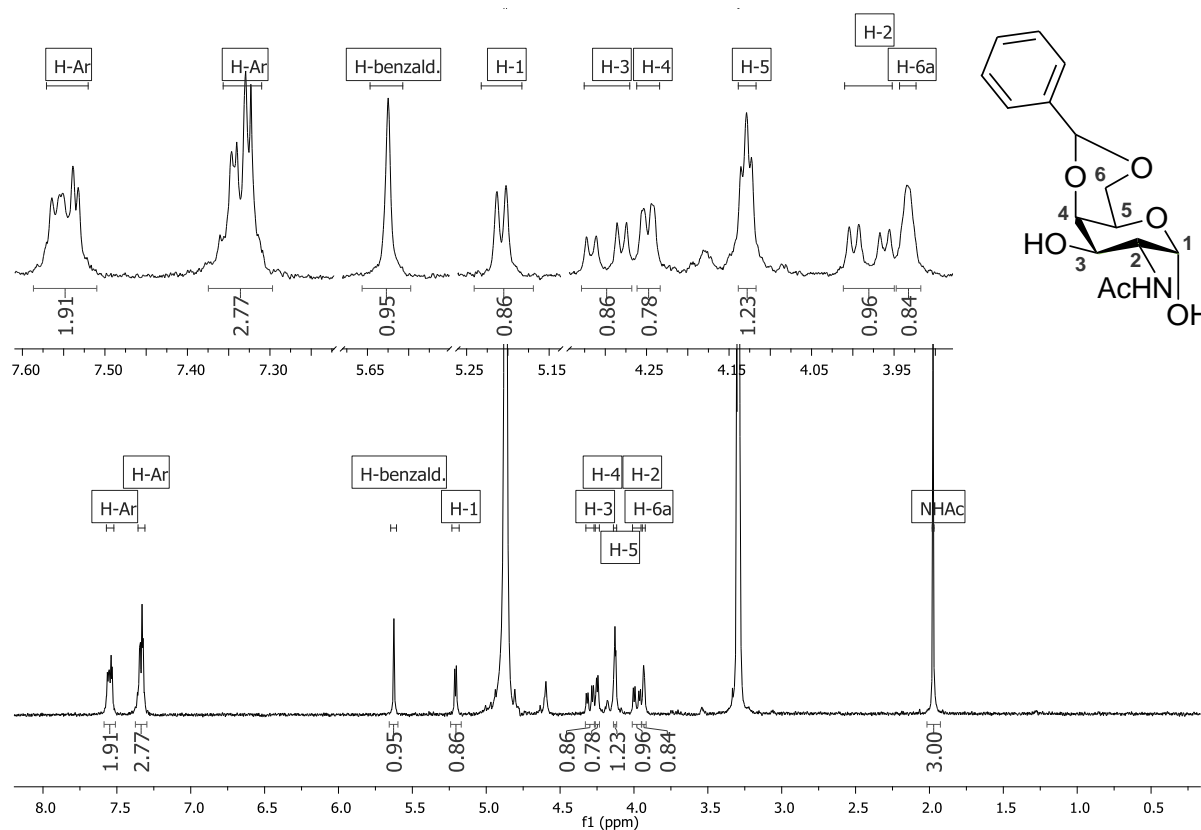




**Anexo 22 B.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **68**.

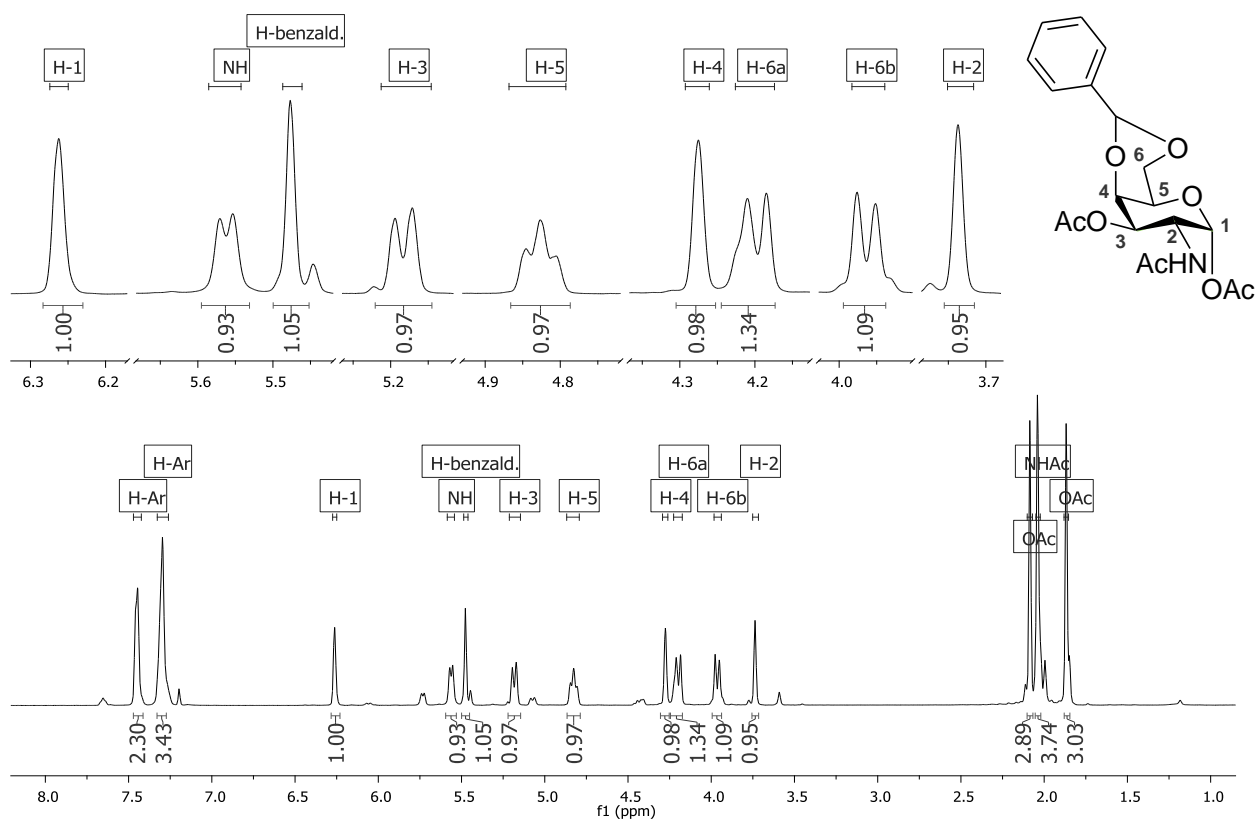


**Anexo 22 C.** Espectro de ESI-MS de éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina **68** (calcd. para  $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 766,2695).



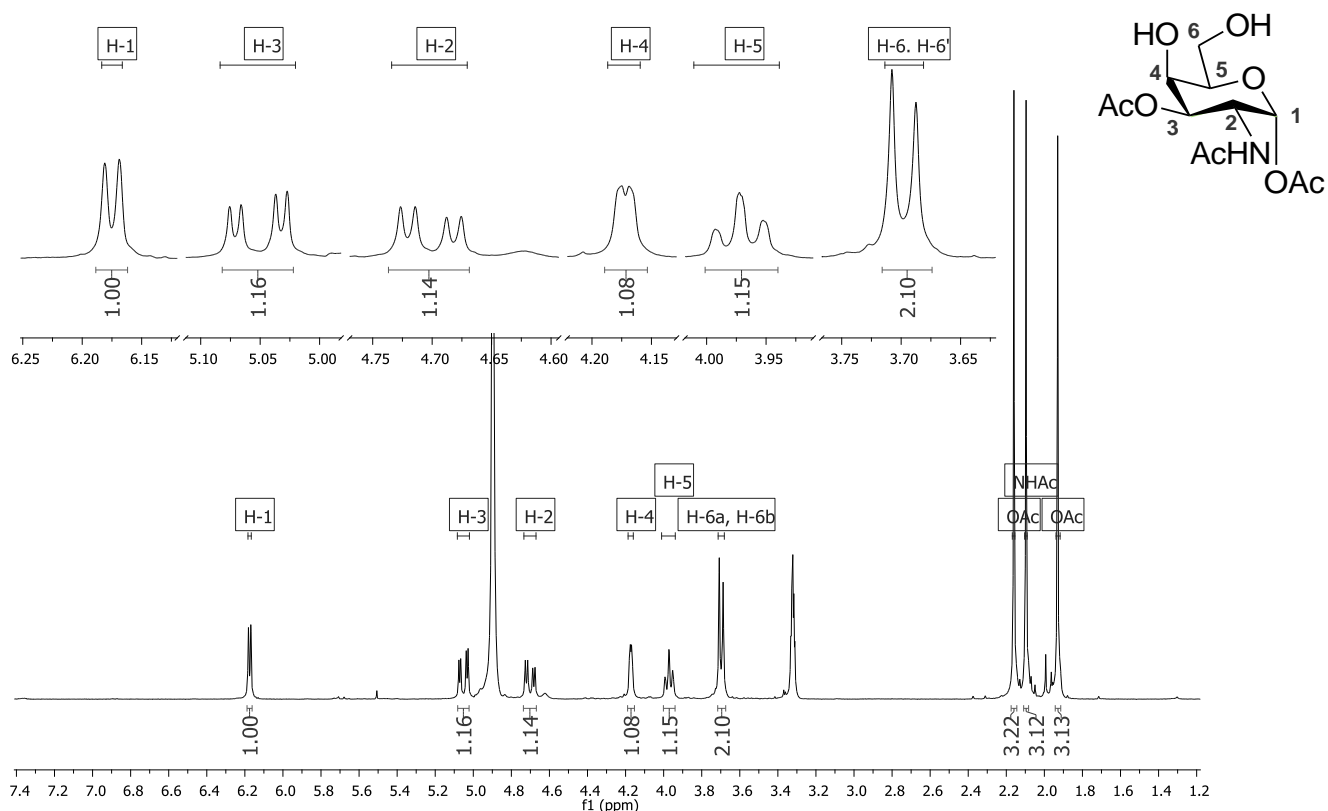
**Anexo 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi-- $\alpha$ -D-galactopiranosose **69**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,21	1	d	$J_{1,2} 3,3$
H-2	3,98	1	dd	$J_{1,2} 3,3$ ; $J_{2,3} 11,1$
H-3	4,30	1	dd	$J_{3,4} 3,1$ ; $J_{2,3} 11,1$
H-4	5,25	1	d	$J_{3,4} 3,1$
H-5	4,14-4,12	1	m	-
H-6a	3,93	1	s largo	-
NH	5,72	1	d	$J 8,9$
H-benzilideno	5,62	1	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	1,98	3	s	-
H arom.	7,57-7,53	2	m	-
H arom.	7,35-7,32	3	m	-



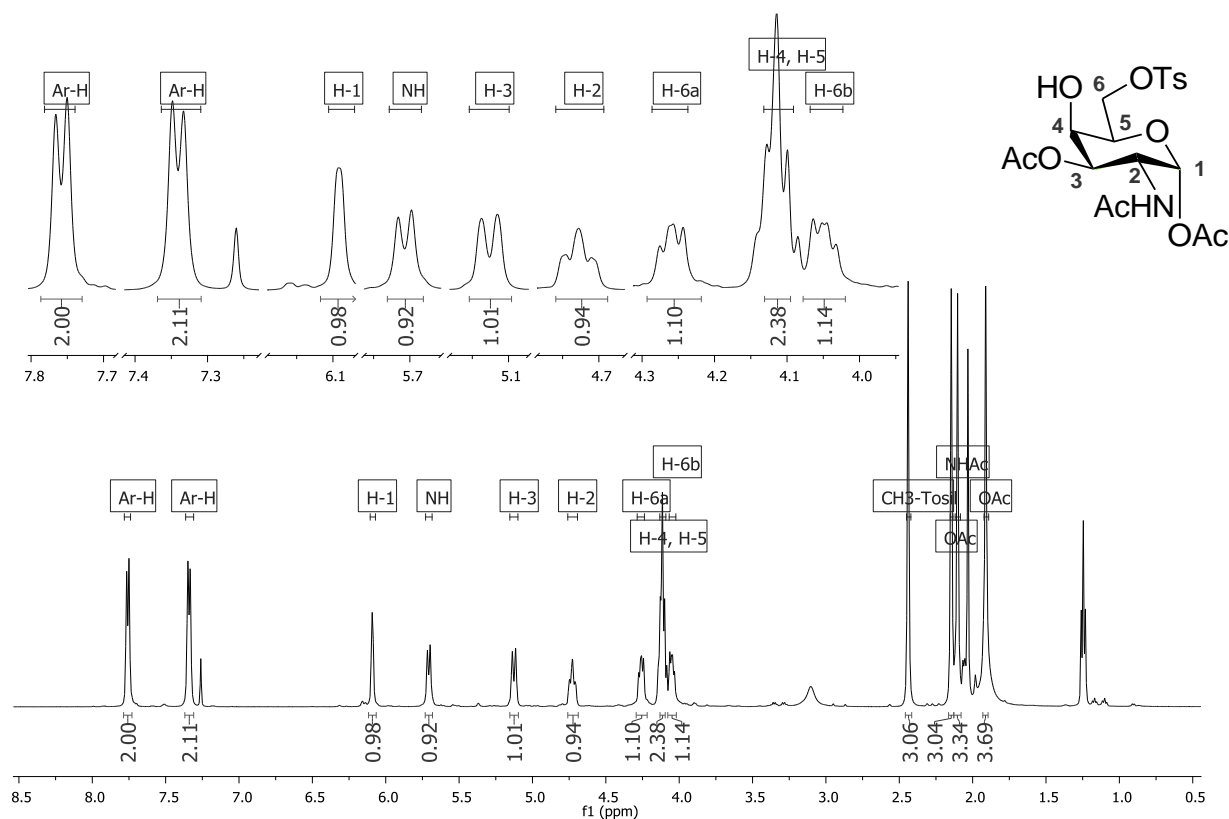
**Anexo 24.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-1,3-di-*O*-acetil-4,6-*O*-benzilideno-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranoze **70**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,26	1	s largo	-
H-2	3,74	1	s largo	-
H-3	5,18	1	d	$J_{2,3}$ 10,1
H-4	4,28	1	s largo	-
H-5	4,83	1	t	$J_{5/6a}$ 10,1
H-6a	4,20	1	d	$J_{6a/6b}$ 12,3
H-6b	3,96	1	d	$J_{6a/6b}$ 12,3
NH	5,56	1	d	$J$ 8,5
H-benzilideno	5,48	1	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,04	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO)	2,09 ; 1,87	2 x 3	2 x s	-
H arom.	7,45	2	s largo	-
H arom.	7,32	3	s largo	-



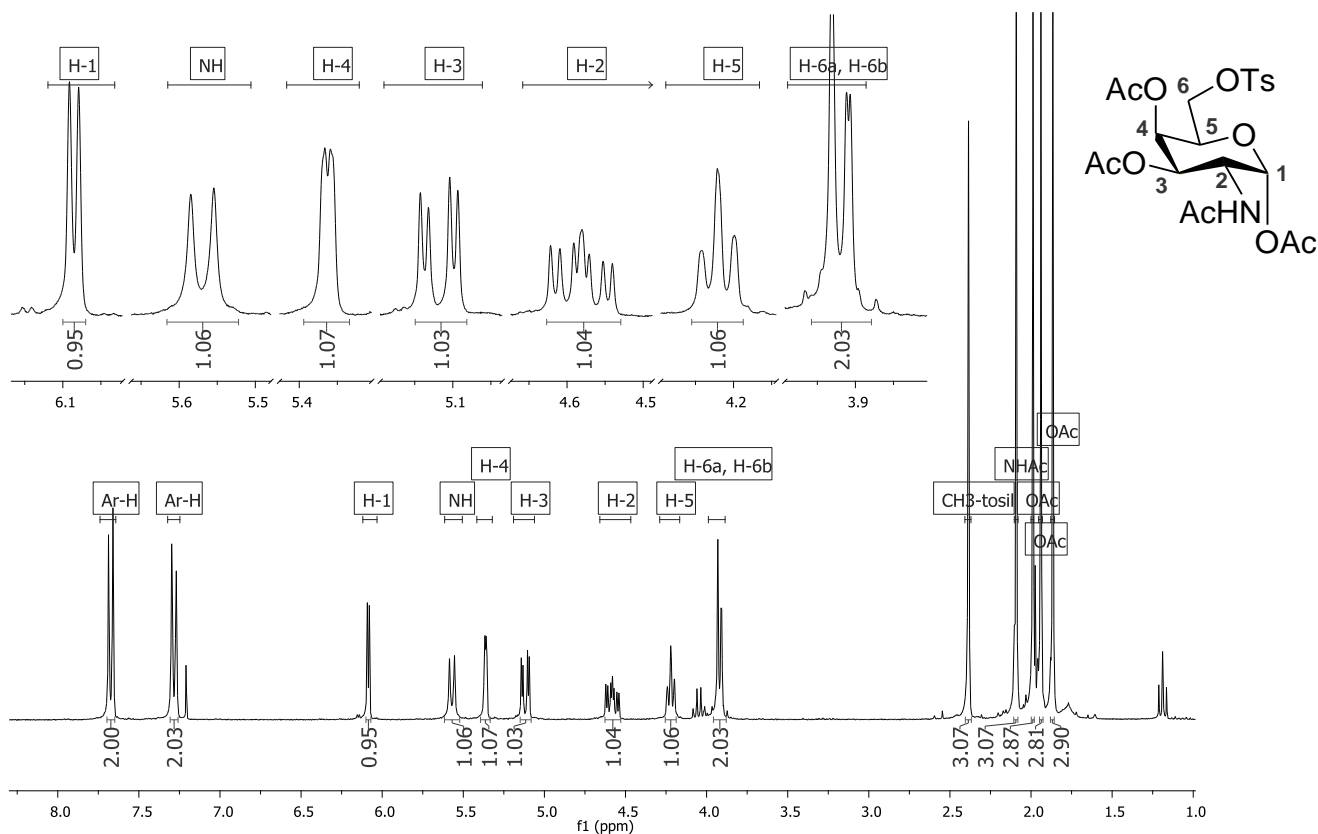
Anexo 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-1,3-di-O-acetil-2-desóxi- $\alpha$ -D-galactopiranosose 71.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,17	1	d	$J_{1,2} 3,7$
H-2	4,70	1	dd	$J_{1,2} 3,7$ ; $J_{2,3} 11,6$
H-3	5,05	1	dd	$J_{3,4} 2,4$ ; $J_{2,3} 11,6$
H-4	4,17	1	d	$J_{3,4} 2,4$
H-5	3,97	1	t	$J_{5,6a} = J_{5,6b} 6,1$
H-6a ; H-6b	3,70	2	d	$J_{5,6a} = J_{5,6b} 6,1$
NH	5,72	1	d	$J 8,9$
NHCOCH <sub>3</sub>	2,10	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,16 ; 1,93	2 x 3	2 x s	-



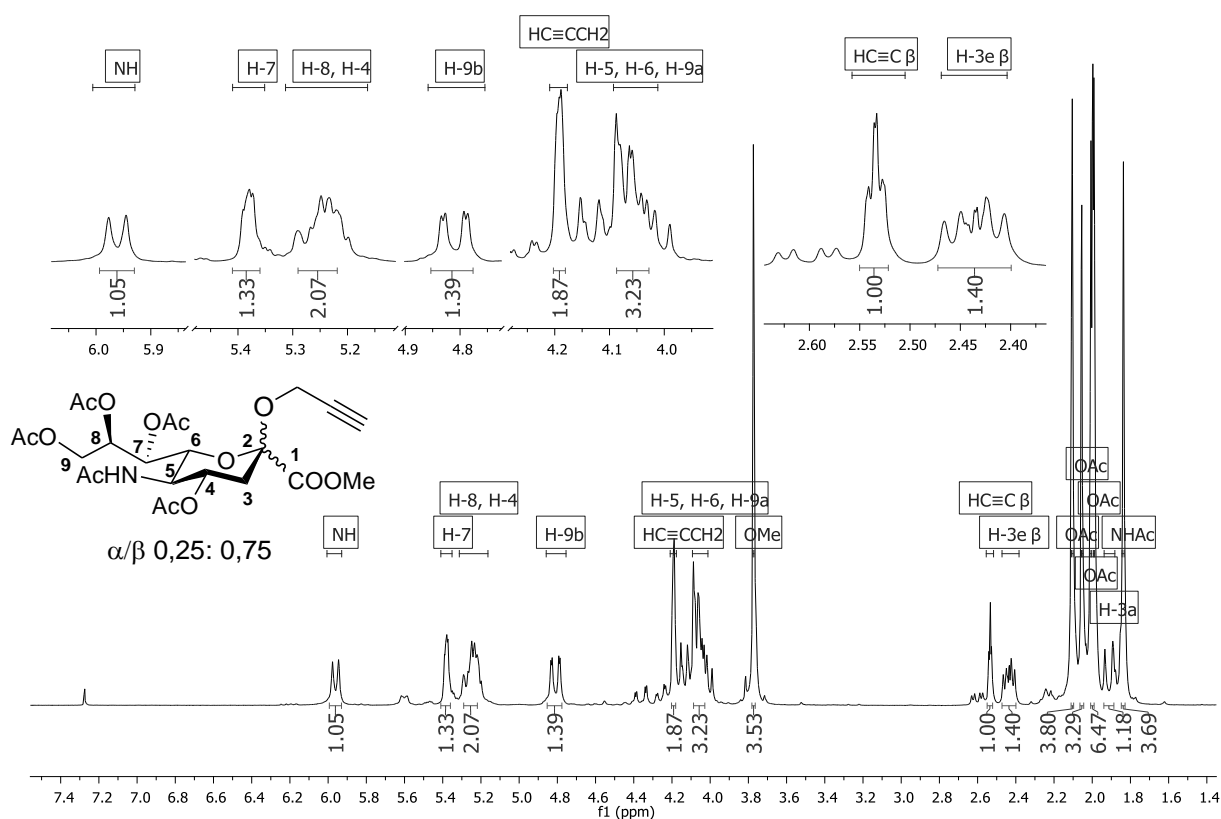
**Anexo 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-1,3-di-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila **72**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,09	1	s largo	-
H-2	4,73	1	t largo	$J_{2,3} = J_{\text{N,H}}$ 8,8
H-3	5,13	1	d	$J_{2,3}$ 11,0
H-4 ; H-5	4,19-4,13	2	m	-
H-6a	4,26	1	dd	$J_{5,6a}$ 7,1 ; $J_{6a,6b}$ 9,3
H-6b	4,05	1	dd	$J_{5,6b}$ 6,3 ; $J_{6a,6b}$ 9,3
NH	5,71	1	d	$J$ 9,1
CH <sub>3</sub> -tosil	2,44	3	s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	2,10	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,15 ; 1,91	2 x 3	2 x s	-
H arom.	7,76	2	d	$J_{\text{orto}}$ 7,7
H arom.	7,34	2	d	$J_{\text{orto}}$ 7,7



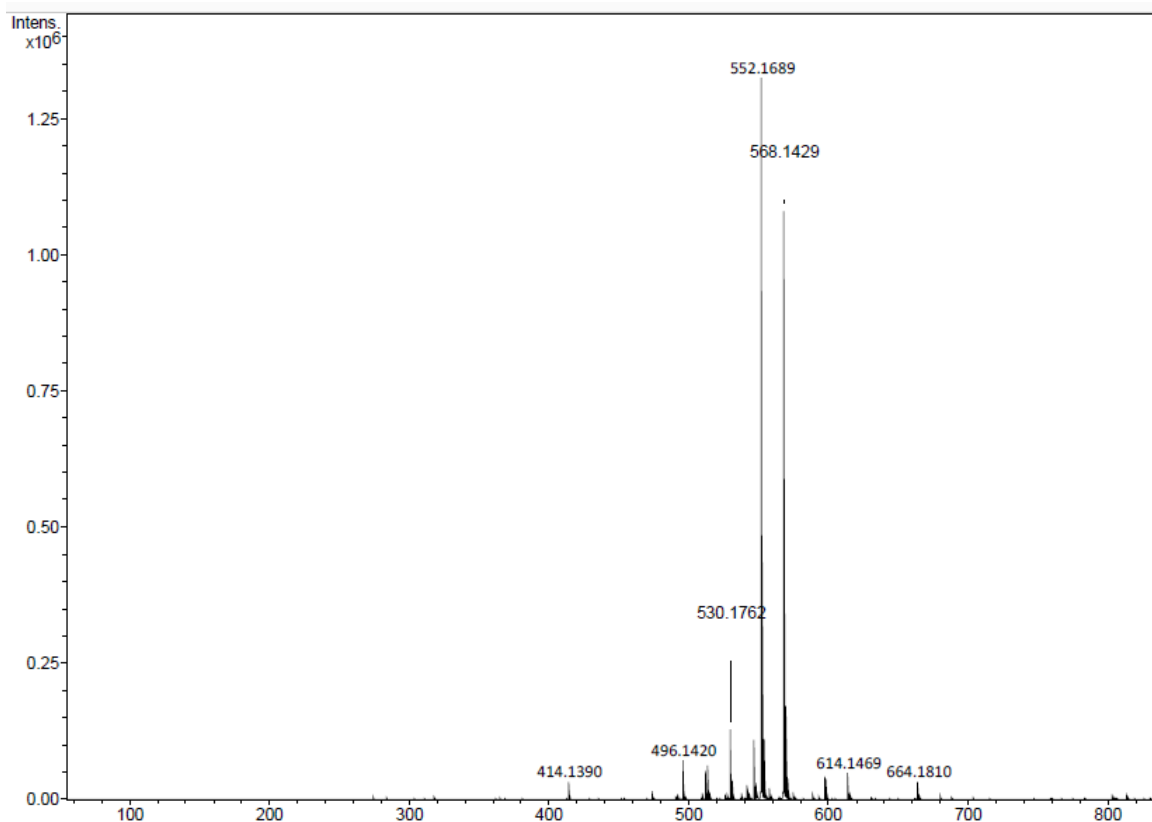
**Anexo 27.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-acetamido-1,3,4-tri-*O*-acetil-2-desóxi-6-*p*-tolueno sulfonil- $\alpha$ -D-galactopiranosila **73**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,14	1	d	$J_{1,2} 3,6$
H-2	4,67-4,59	1	m	-
H-3	5,17	1	dd	$J_{3,4} 2,7$ ; $J_{2,3} 11,6$
H-4	5,41	1	d	$J_{3,4} 2,7$
H-5	4,27	1	t	$J_{5,6a} = J_{5,6b} 6,4$
H-6a ; H-6b	3,98-3,96	2	m	-
NH	5,62	1	d	$J 9,1$
NHCOCH <sub>3</sub>	2,04	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,14 ; 1,92	2 x 3	2 x s	-
CH <sub>3</sub> -tosil	2,44	3	s	-
H arom.	7,72	2	d	$J_{\text{orto}} 8,3$
H arom.	7,33	2	d	$J_{\text{orto}} 8,3$



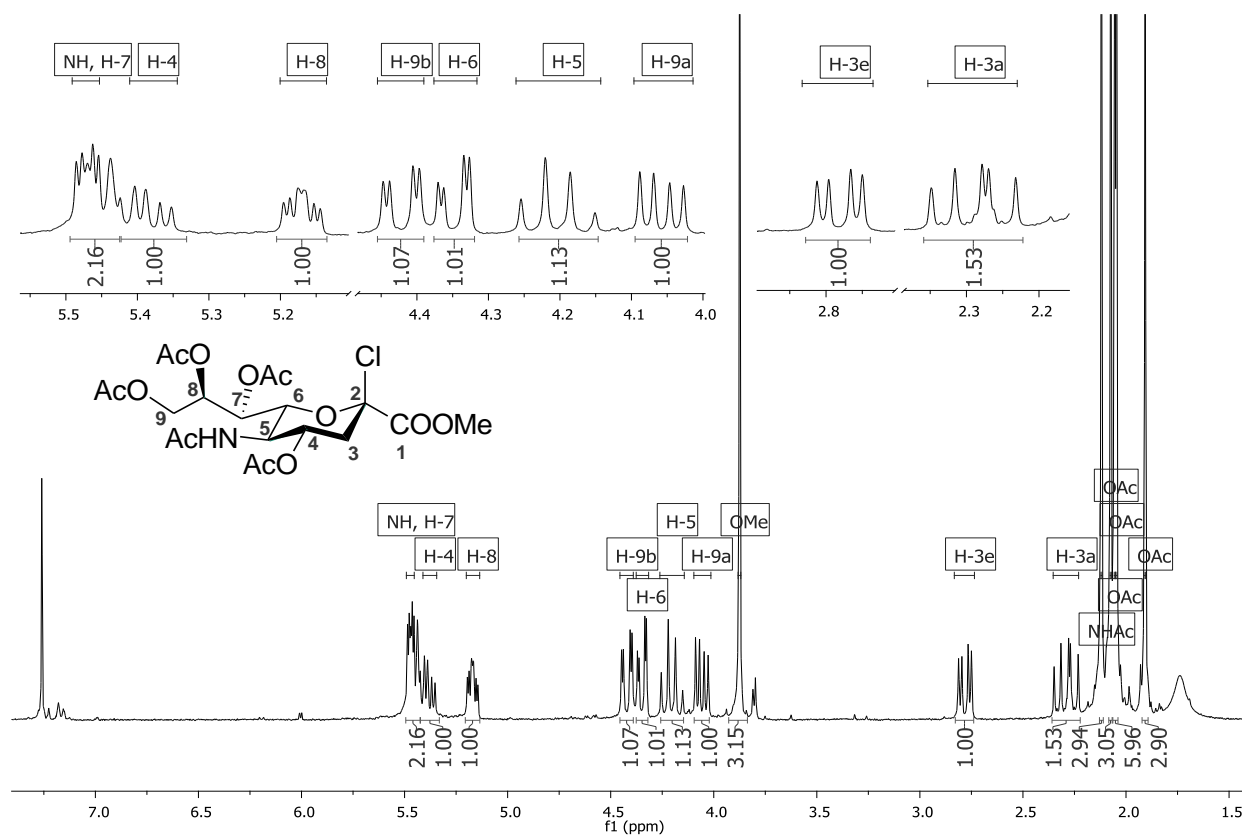
**Anexo 28 A.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-2-propargil-2,3,5-trideoxi-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato **24**  $\alpha/\beta$ .

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-3a	1,91	1	d	$J_{3a,3e} 12,4$
H-3e $\beta$	2,44	1	dd	$J_{3a,3e} 12,4 ; J_{3,4} 5,2$
HC $\equiv$ C $\beta$	2,53	1	t	$J 2,1$
HC $\equiv$ CCH $_2$	4,20 - 4,19	2	m	-
H-4, H-8	5,29-5,20	2	m	-
H-5, H-6, H-9a	4,09 - 4,02	3	m	-
H-7	5,37	1	dd	$J_{6,7} 5,1 ; J_{7,8} 6,7$
H-9b	4,81	1	dd	$J_{8,9b} 2,1 \text{ Hz} ; J_{9a,9b} 12,3$
NH	5,96	1	d	$J_{\text{NH},5} 9,5$
OCH $_3$	3,77	3	s	-
CH $_3$ CO	2,10, 2,05, 2,01, 1,99	12	4x s	-
NHCOCH $_3$	1,84	3	s	-



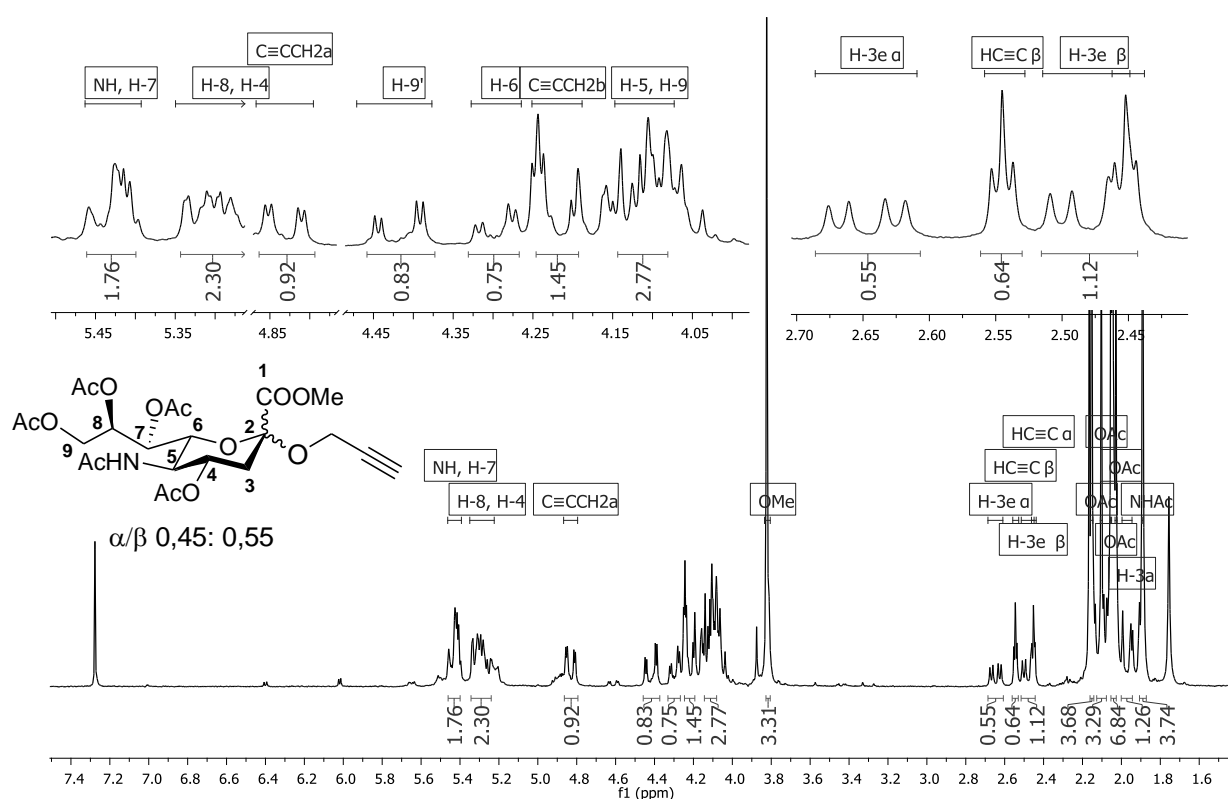
**Anexo 28 B.** Espectro de ESI-MS de metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-2-propargil-2,3,5-trideoxi-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato **24**  $\alpha/\beta$  (calcd. para  $C_{23}H_{31}NO_{13}Na^+[M+Na]^+$ : 552,1688).





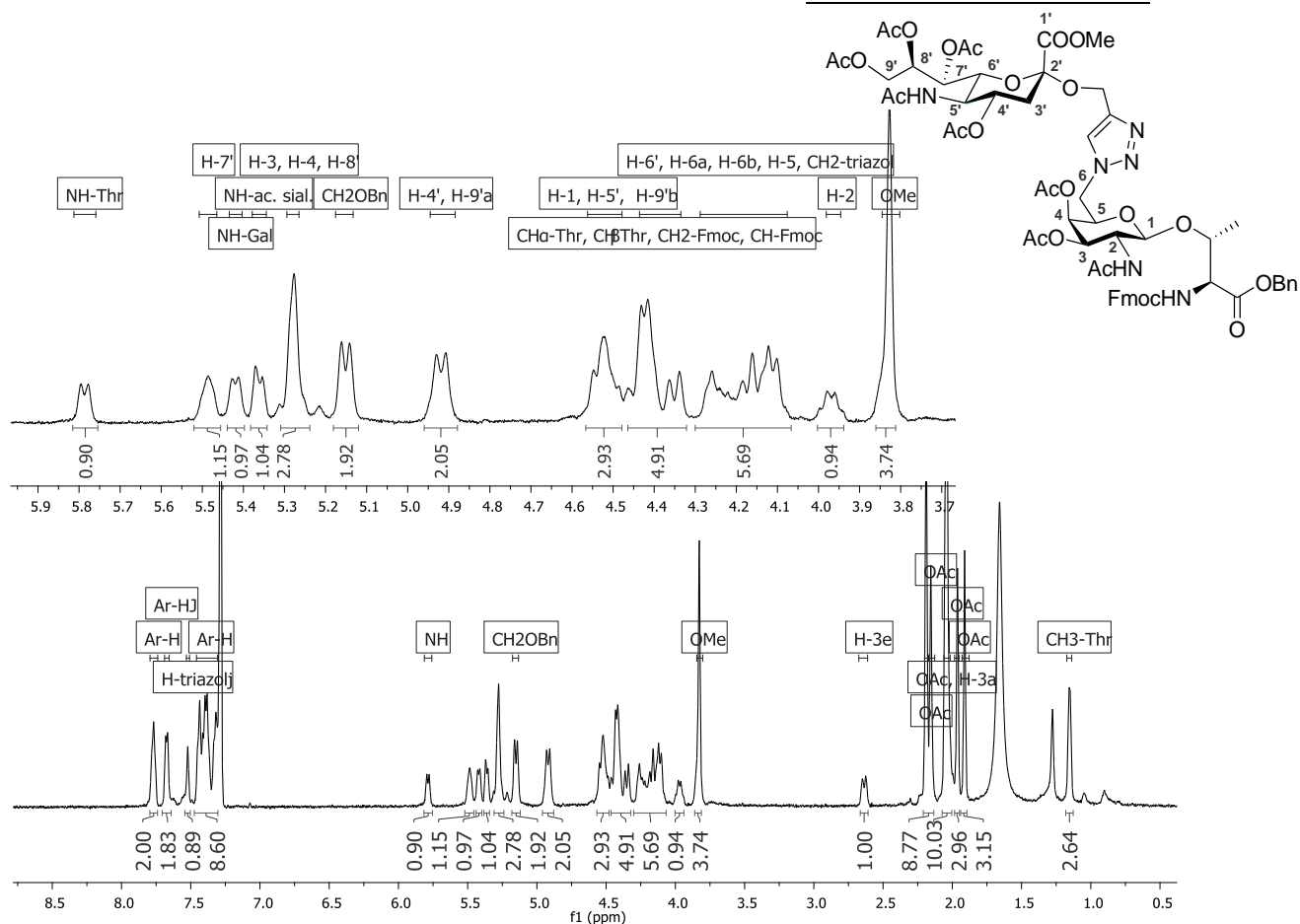
**Anexo 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-2-cloro-2,3,5-trideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosonato **76**.

Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-3a	2,35 - 2,23	1	m	-
H-3e	2,78	1	dd	$J_{3a,3e}$ 13,9 ; $J_{3,4}$ 4,8
H-4	5,38	1	dd	$J_{3e,4}$ 4,8 ; $J_{4,5}$ 10,5
H-5	4,20	1	d	$J_{4,5}$ 10,5
H-6	4,35	1	dd	$J_{5,6}$ 12,5 ; $J_{6,7}$ 2,3
H-7 ; NH	5,49-5,46	2	m	-
H-8	5,17	1	td	$J_{8,9b}$ 2,6 ; $J_{8,7}$ 6,2
H-9b	4,42	1	dd	$J_{8,9b}$ 2,6 ; $J_{9a,9b}$ 12,5
H-9a	4,06	1	dd	$J_{8,9a}$ 5,8 ; $J_{9a,9b}$ 12,5
OCH <sub>3</sub>	3,87	3	s	-
CH <sub>3</sub> CO	2,10 ; 2,07, 2,05, 2,05	4 x 3	4 x s	-
NHCOCH <sub>3</sub>	1,91	3	s	-

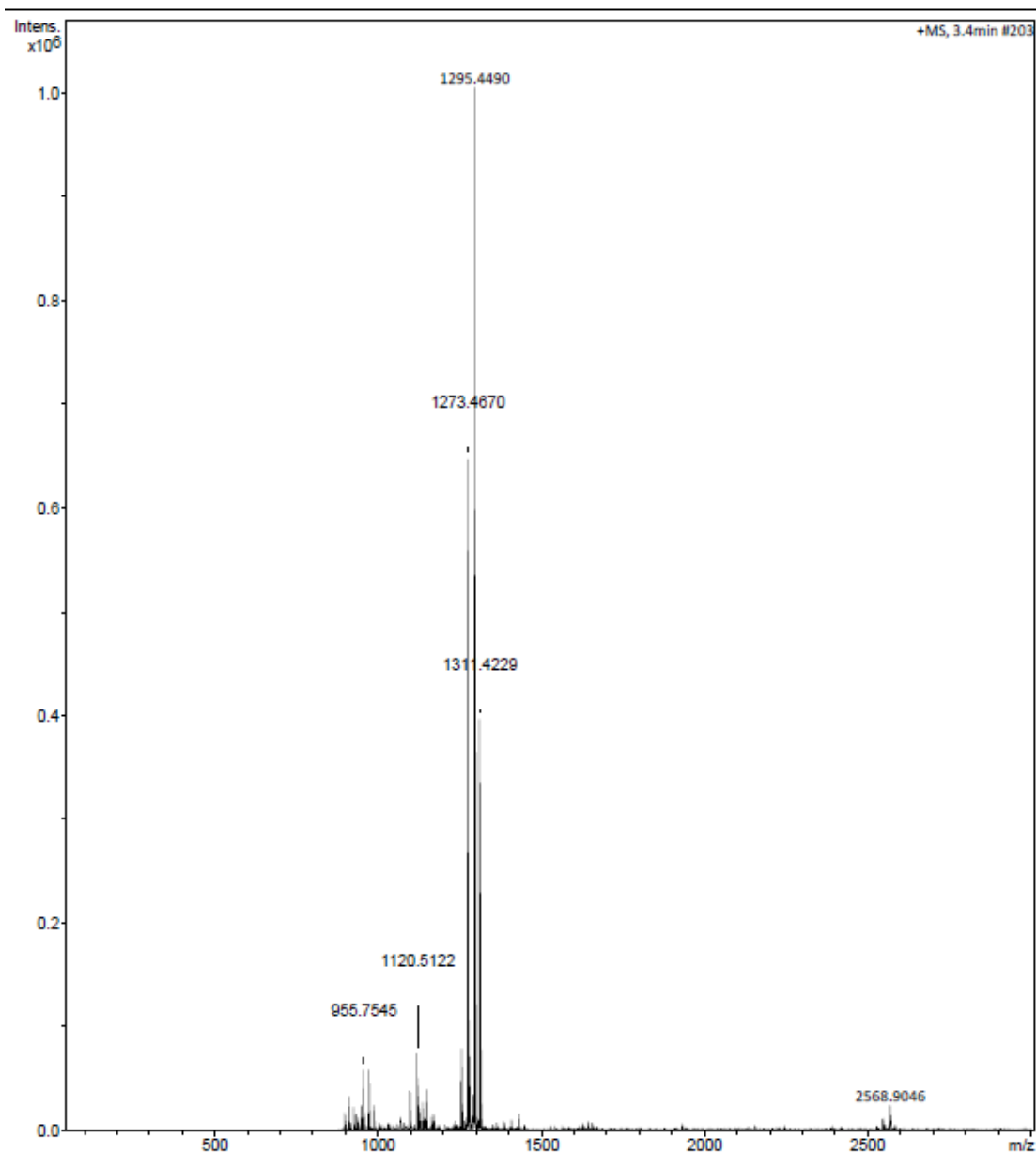


**Anexo 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de metil 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-2-propargil-2,3,5-trideoxi-D-glicero- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato **24**  $\alpha/\beta$ .

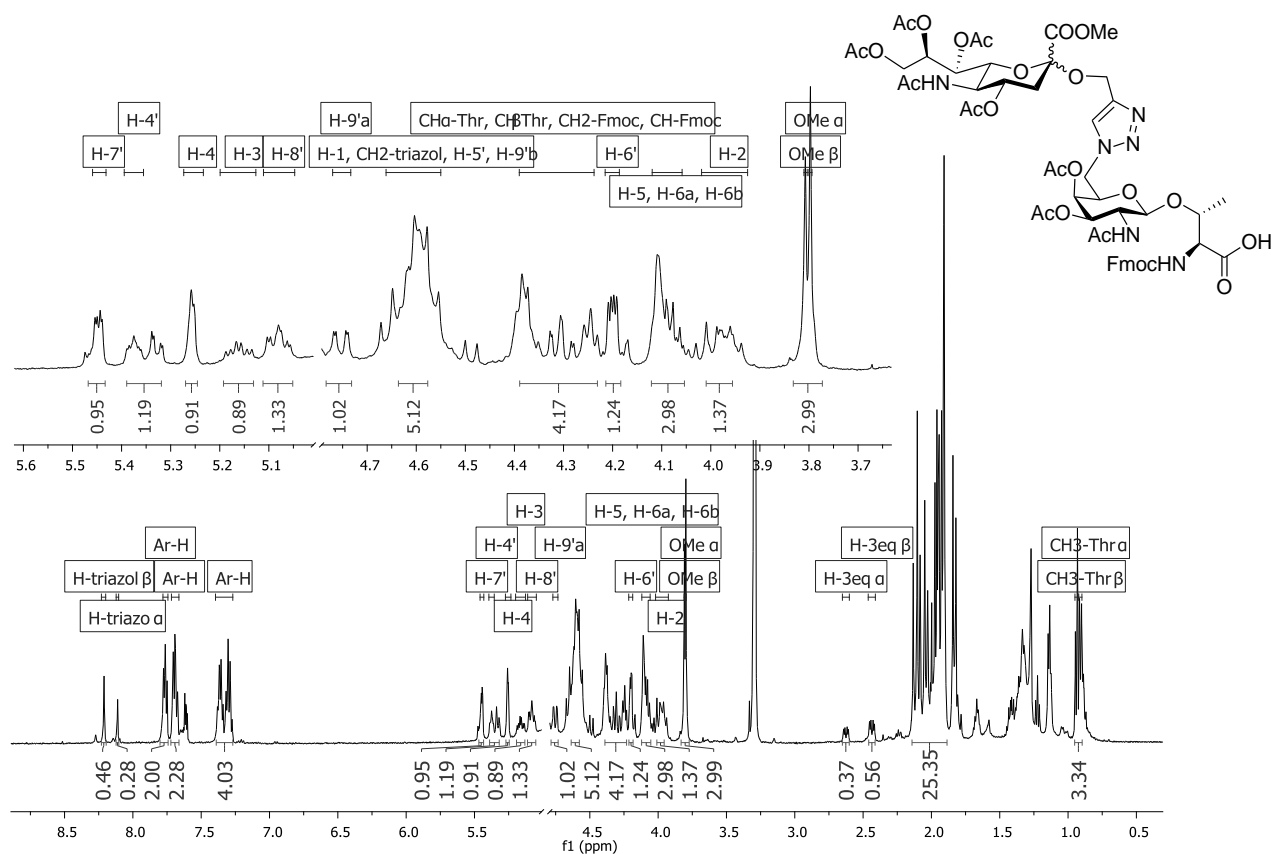
Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-3a	1,97	1	d	$J_{3a,3e}$ 12,8
H-3e $\alpha$	2,65	1	dd	$J_{3a,3e}$ 12,8 ; $J_{3,4}$ 4,4
HC $\equiv$ C $\alpha$	2,45	1	t	$J$ 2,4
HC $\equiv$ CCH $_{2a}$	4,83	1	dd	$J_{\text{CH}_{2a},\text{C}\equiv\text{CH}}$ 2,4 ; $J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}}$ 12,5
HC $\equiv$ CCH $_{2a}$	4,22	1	dd	$J_{\text{CH}_{2a},\text{C}\equiv\text{CH}}$ 2,4 ; $J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}}$ 12,5
H-4, H-8	5,33-5,24	2	m	-
H-5, H-9a	4,14-4,06	2	m	-
H-6	4,30	1	dd	$J_{5,6}$ 12,5 ; $J_{6,7}$ 2,7
H-7 ; NH	5,46-5,40	2	m	-
H-9b	4,06	1	dd	$J_{8,9b}$ 2,5 ; $J_{9a,9b}$ 15,7
OCH $_3$	3,82	3	s	-
CH $_3$ CO	2,15 ; 2,10, 2,05, 2,03	4 x 3	4x s	-
NHCH $_3$ CO	1,89	3	s	-

Anexo 31 A . Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $77\alpha$ 

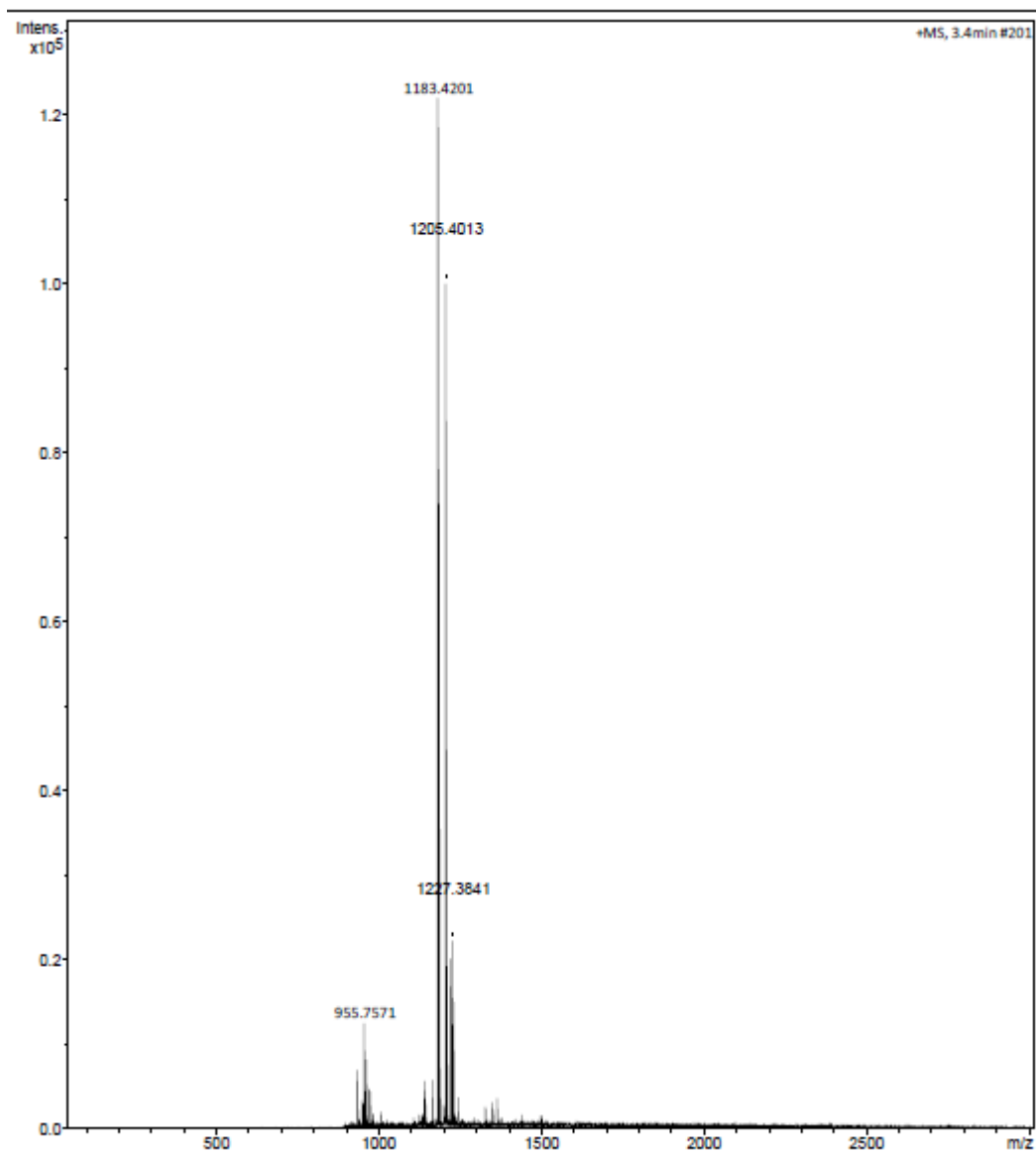
Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-triazol	7,52	1	s	-
H arom.	7,77 - 7,32	13	s largo ; d ; m	- ; $J_{orto}$ 6,7 ; -
NH	5,79; 4,42; 5,36	3x 1	3x d	$3x J$ 8,3
H-7'	5,48	1	s largo	-
H-3; H-4; H-8'	5,31-5,25	3	m	-
CH <sub>2</sub> OBn	5,15	2	d	$J$ 9,7
H-4'; H-9'a	4,92	2	d	$J_{4',5'} = J_{9'a,9'b}$ 11,3
H-1, H-5', H-9'b	4,55 - 4,52	3	m	-
CH $\alpha$ -Thr; CH $\beta$ -Thr; CH <sub>2</sub> Fmoc; CHFmoc	4,43-4,34	5	m	-
H-5; H-6a; H-6b; H-6'; CH <sub>2</sub> -triazol	4,26 - 4,10	6	m	-
CH <sub>3</sub> OH	3,83	3	s	-
H-2	3,97	1	d	$J_{2,3}$ 10,0
H-3e	2,64	1	d	$J_{3a,3e}$ 14,2
CH <sub>3</sub> CO ; H-3a	2,19 - 1,91	25	m	-
CH <sub>3</sub> -Thr	1,16	3	s largo	-



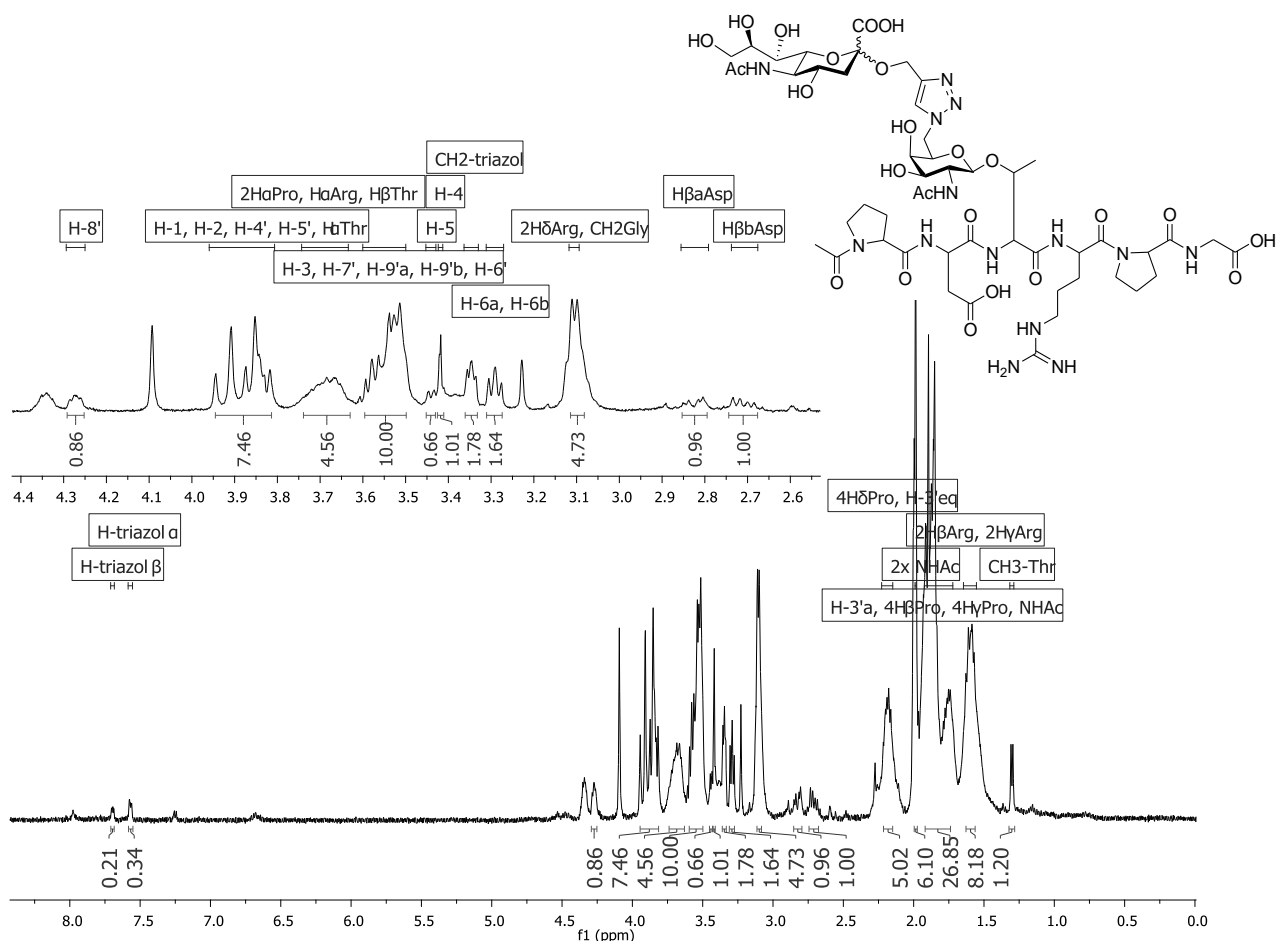
**Anexo 31 B** .Espectro de ESI-MS de (metil-5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-{(éster benzílico de *N*-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina)} **77 $\alpha$**  (calcd. para C<sub>61</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>24</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: 1295,4490).

Anexo 32 A. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **20B**  $\alpha/\beta$ 

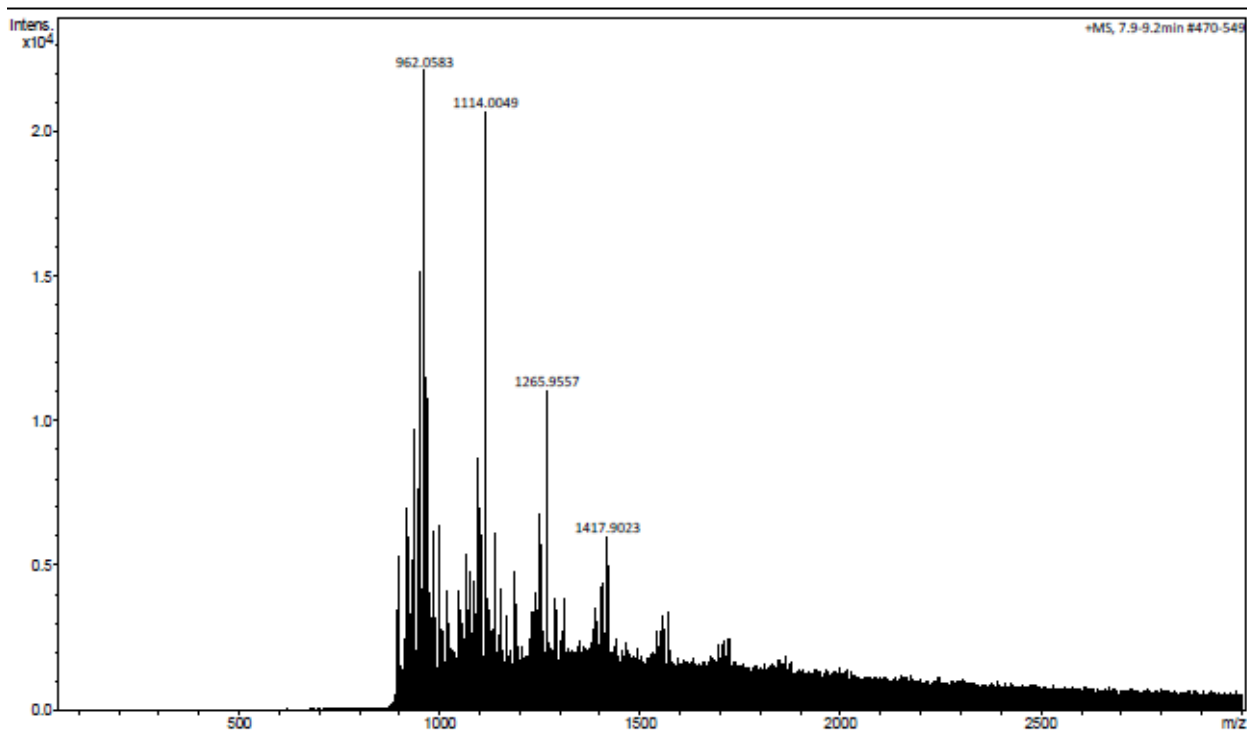
Número	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-triazol $\beta/\alpha$	8,13 ; 8,03	1	s	-
H arom.	7,70 - 7,19	8	m ; d ; m	- ; $J_{orto}$ 6,7 ; -
H-7'	5,45	1	dd	$J$ 2,1 ; $J$ 5,1
H-4'	5,39 - 5,32	1	m	-
H-4	5,26	1	d	$J_{3,4}$ 2,6
H-3	5,19 - 5,14	1	m	-
H-8'	5,10 - 5,06	1	m	-
H-9'a	4,75	1	dd	$J_{8',9'a}$ 2,3 ; $J_{9'a,9'b}$ 12,5
H-1, H-5', H-9'b, CH <sub>2</sub> -triazol	4,67-4,54	5	m	-
CH $\alpha$ Thr; CH $\beta$ Thr; CH <sub>2</sub> Fmoc; CHFmoc	4,39-4,23	5	m	-
H-5; H-6a; H-6b	4,11-4,06	3	m	-
CH <sub>3</sub> OH $\beta/\alpha$	3,81 ; 3,80	6	2x s	-
H-3e $\alpha$	2,62	1	dd	$J_{3eq,3a}$ 12,7 ; $J_{3eq,4}$ 4,7
H-3e $\beta$	2,43	1	dd	$J_{3eq,3a}$ 12,9 ; $J_{3eq,4}$ 5,0
CH <sub>3</sub> CO ; H-3a	2,13 - 1,81	25	m	-
CH <sub>3</sub> -Thr $\beta$	0,85	3	d	$J$ 7,5
CH <sub>3</sub> -Thr $\alpha$	0,82	3	d	$J$ 7,4



**Anexo 32 B.** Espectro de ESI-MS de (metil-5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-{(N-(9-fluorenilmetóxicarbonil)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)-L-treonina)} **20B**  $\alpha/\beta$  (calcd. para C<sub>54</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>24</sub><sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup>: 1183,4201).

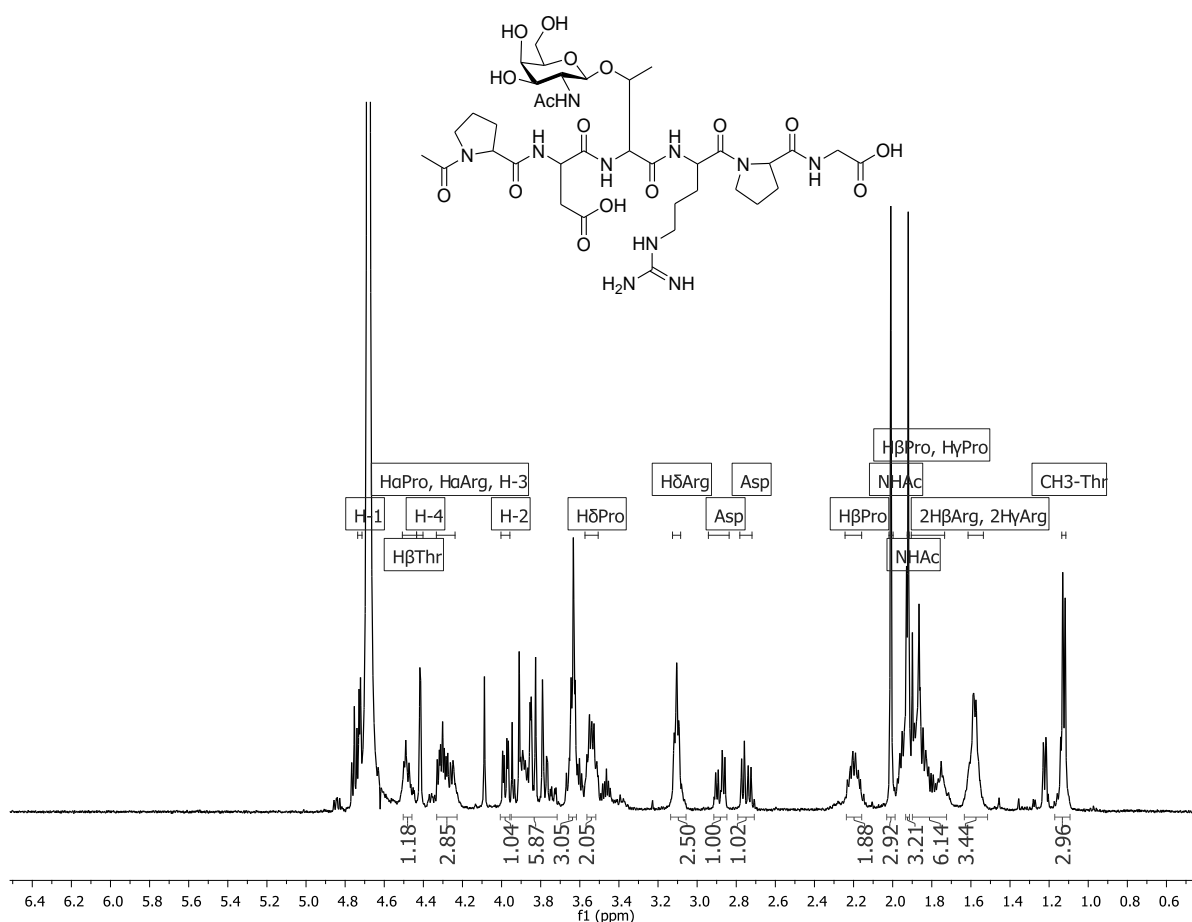
Anexo 33 A. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do glicopeptídeo 19B  $\alpha/\beta$ .

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-triazol $\beta/\alpha$	7,70 / 7,58	1	s largo	-
H-8'	4,29-4,26	1	m	-
H-1, H-2, H-4', H-5', H $\alpha$ Thr	3,94-3,82	5	m	-
2H $\alpha$ Pro, H $\alpha$ Arg, H $\beta$ Thr	3,74-3,64	4	m	-
H-3, H-6', H-7', H-9'a, H-9'b	3,59-3,51	5	m	-
H-5	3,44	1	d	$J_{5,6a}$ 6,5
H-4	3,42	1	d	$J_{3,4}$ 1,7
CH <sub>2</sub> -triazol	3,36 – 3,34	2	m	-
H-6a, H-6b	3,31 - 3,28	2	m	-
2H $\delta$ Arg, CH <sub>2</sub> Gly	3,12 – 3,09	4	m	-
H $\beta$ aAsp	2,83	1	dd	$J$ 5,4 ; $J$ 16,7
H $\beta$ bAsp	2,71	1	dd	$J$ 7,8 ; $J$ 16,7
4H $\delta$ Pro, H-3' <sub>eq</sub>	2,22 - 2,16	5	m	-
2x NHCOCH <sub>3</sub>	1,99	6	s largo	-
H-3'a, 4H $\beta$ Pro, 4H $\gamma$ Pro, NHCOCH <sub>3</sub>	1,92 – 1,73	12	m	-
2H $\beta$ Arg, 2H $\gamma$ Arg	1,63 – 1,57	4	m	$J$ 5,7
CH <sub>3</sub> Thr	1,30	3	d	$J$ 6,7



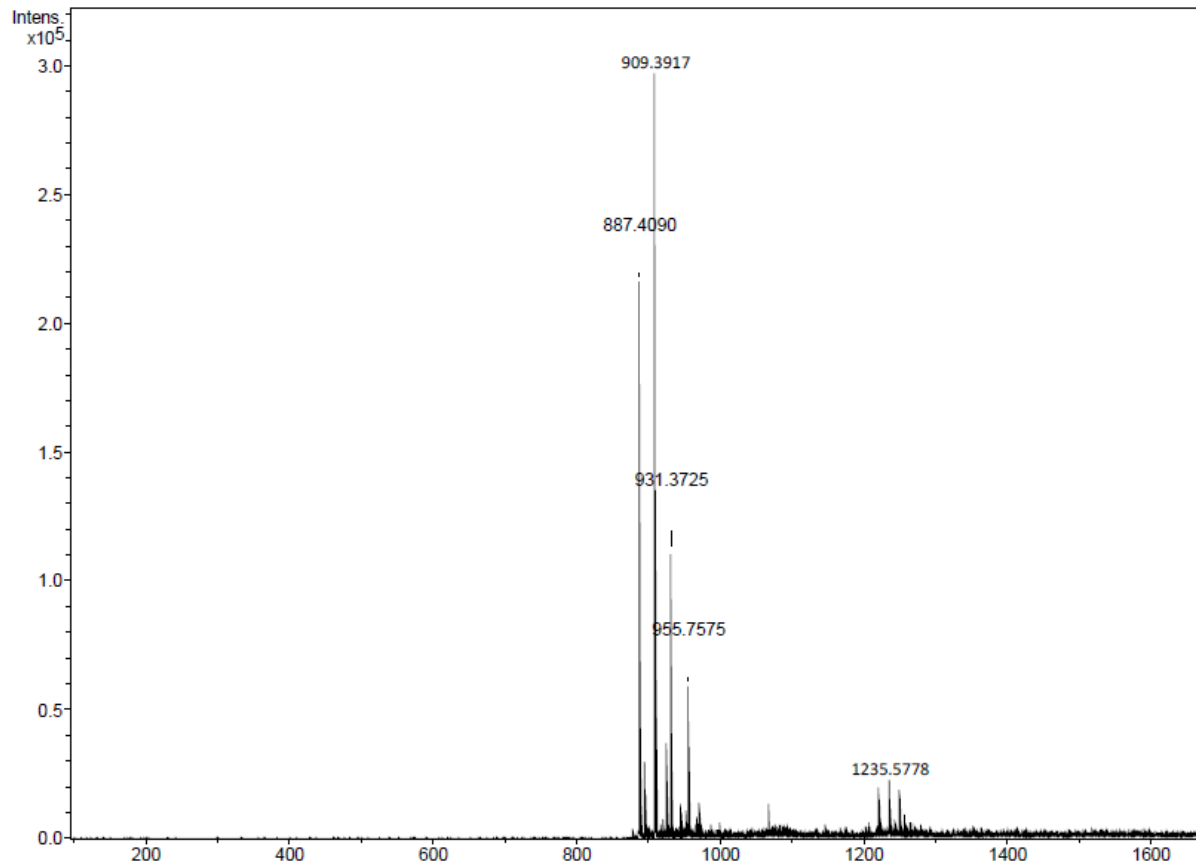
**Anexo 33 B.** Espectro de ESI-MS do glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[(5-acetamido-3,5-didesóxi-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetil-D-glicero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopiranosonato)-(2 $\rightarrow$ 6)-1,2,3-triazol-1,4)-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetil-2,6-didesóxi- $\beta$ -D-galactopiranosila)}Thr-Arg-Pro-GlyOH **19B**  $\alpha/\beta$ . (calcd. para C<sub>50</sub>H<sub>78</sub>N<sub>14</sub>O<sub>23</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: 1265,5256).





Anexo 34 A. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH 21.

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,73	1	d	$J_{1,2}$ 3,7
H-2	3,98	1	dd	$J_{1,2}$ 3,7 ; $J_{2,3}$ 11,0
H-4	4,42	1	d	$J_{3,4}$ 1,5
H-5, H-6a, H-6b, H $_{\delta}$ Pro, CH $_2$ Gly	3,95 - 3,62	6	m	-
H $_{\alpha}$ Pro, H $_{\alpha}$ Arg, H-3	4,33 - 4,25	3	m	-
H $_{\beta}$ Thr	4,50-4,45	1	m	-
H $_{\delta}$ Pro	3,46 - 3,51	3	m	-
H $_{\delta}$ Arg	3,11	1	t	$J$ 5,7
H $_{\beta a}$ Asp	2,88	1	dd	$J$ 7,1 ; $J$ 17,0
H $_{\beta b}$ Asp	2,75	1	dd	$J$ 7,1 ; $J$ 17,0
H $_{\beta}$ Pro	2,23 - 2,17	3	m	-
H $_{\beta}$ Pro, H $_{\gamma}$ Pro	1,90 - 1,75	6	m	-
NHCOCH $_3$	2,01; 1,92	6	2x s	-
2H $_{\beta}$ Arg, 2H $_{\gamma}$ Arg	1,58	4	d	$J$ 5,7
CH $_3$ Thr	1,12	3	d	$J$ 6,3



**Anexo 34 B.** Espectro de ESI-MS do glicopeptídeo NHAcPro-Asp-[ $\alpha$ GalNAc]Thr-Arg-Pro-GlyOH **21** (calcd. para  $C_{36}H_{58}N_{10}O_{16}Na^+$  [M+Na]: 909,3924).