

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi*

Daniel Fábio Kawano

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Daniel Fábio Kawano

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto
2010

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

Daniel Fábio Kawano.

Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2010.

111p. : il.; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. PAF, 2. *Trypanosoma cruzi*, 3. Doença de Chagas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Fábio Kawano

Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Daniel Fábio Kawano

Orientadora: Prof. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ivone Carvalho:

“Uns são homens,

alguns são professores,

poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se,

aos segundos, respeita-se,

aos últimos, segue-se.

Se hoje enxergo longe, é porque

fui colocado sobre ombros de gigantes.”

Autor desconhecido

Agradeço sinceramente por sua amizade e respeito, pelo comprometimento demonstrado para com meu trabalho e minha pessoa durante todos estes anos e, principalmente, por sempre considerar a formação científica e profissional de seus alunos como uma de suas prioridades. Obrigado por ser o exemplo do orientador, professor e profissional que pretendo me tornar em breve.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Adriane da Silveira Gomes, Ana Luiza Alvarez Calil, Armando Godoy Andino Junior, Ester Chung, Flávio Roberto Pinsetta, Helen Alves de Oliveira, Lilian Sibelle Campos Bernardes, Maristela Braga Martins, Michele Verza, Mônica Biondo, Oswaldo Aparecido Galo, Pedro Alves Bezerra de Moraes, Peterson de Andrade, Samanta Faria, Thiago Bueno Palopoli, Valquíria Aragão e Vanessa Leiria Campo pela convivência agradável e pelas discussões produtivas em síntese orgânica.

Aos meus amigos, técnicos de laboratório, Luís Otávio Bunhotto Zamoner, Claudia Castania de Macedo e, mais recentemente, Marcelo Rodrigues de Carvalho que dedicaram parte de seu tempo e trabalho para o andamento deste projeto.

Aos colegas do grupo de Química Farmacêutica coordenado pelos docentes Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva e Monica Tallarico Pupo pela boa convivência. Agradecimentos especiais ao Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva e Vinicius Barreto da Silva por sua amizade e pelos direcionamentos prestados durante os trabalhos de bioinformática e modelagem molecular.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo a quem devo minha formação como farmacêutico e pós-graduando. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento deste trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Maria Aparecida de Silva Kawano, meus irmãos Paulo Roberto e Rosemeire Kawano e minha futura esposa Carolina de Miranda Silva, a quem dedico cada conquista de minha vida pessoal e profissional. Aos meus parentes e amigos Lucienir Maria da Silva, João Carlos Silva e família, Ricardo Alexandre Muniz, Daniel de Paula, Roseli Machado, Thiago Franco, Adelino Marabini (em memória), Marcos Roberto Martins e família.

A todos não citados aqui, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"Human's mind, once stretched by a new idea, never regains its original dimensions"

Prof. Oliver W. Holmes

Harvard University

(1809-1894)

"We need less research, better research, and research done for the right reasons"

Prof. Douglas G. Altman

University of Oxford

(1948-)

RESUMO

KAWANO, D.F. **Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi***. 111f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Buscando sintetizar análogos de PAF imobilizados em resina para isolamento dos correspondentes receptores *T. cruzi*, foi adotada uma estratégia de síntese convergente que implicava no acoplamento à resina de uma cadeia hidrofóbica análoga à presente no fosfolípido. Através de modificação sequencial do reagente comercial D-Manitol para sua ligação à resina, os análogos seriam sintetizados em um total de 12 etapas. Após a obtenção com sucesso do primeiro intermediário e de dificuldades na obtenção do segundo intermediário, a preparação de derivados de PAF a partir de D-Manitol foi abandonada já que revisão da literatura demonstrou ser possível a síntese destes mesmos análogos em apenas cinco etapas. A nova rota sintética adotada teve como ponto de partida a fosfatidilcolina extraída de gemas de ovos e, através desta nova abordagem, foram sintetizados com sucesso três intermediários. Devido a dificuldades na adaptação de protocolos sintéticos clássicos a compostos carregados como os fosfolípidios, não foi possível a obtenção dos derivados de PAF inicialmente propostos. Os estudos de bioinformática, os quais visaram localizar a sequência deste provável receptor de PAF no proteoma do parasita, sugerem a existência de proteínas com características de receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs) e entre estas, possivelmente receptores de PAF a serem explorados na terapia da doença de Chagas.

Palavras-chave: PAF; *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas

ABSTRACT

KAWANO, D.F. **Resin-immobilized synthesis of platelet aggregation factor analogs and identification of *Trypanosoma cruzi* correlative receptor.** 111f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

In order to synthesize resin-immobilized PAF analogs to further promote the isolation of the *T.cruzi* correlative receptor, we adopted a convergent synthesis strategy. The strategy implied the coupling between the resin and a hydrophobic chain resembling PAF, in which resin-immobilized PAF analogs would be synthesized by means of sequential 12 step modification of commercially available reagent D-manitol. Despite successful achievement of the first intermediary, the synthesis of the second intermediary was accompanied by difficulties which led to an extensive literature review and subsequent change of synthetic route. The preferred route was a 5 step approach with egg phosphatidilcholine as the starting material, which rendered the successful synthesis of three intermediates. However, due to difficulties to adapt classical synthetic protocols to charged compounds as phospholipids, we could not obtain the initially proposed PAF analogs. Bioinformatic studies were conducted in order to locate the aminoacid sequence of the probable PAF receptor in *T.cruzi* proteome. Our data suggest the existence of a receptor resembling G protein coupled membrane receptors (GPCRs), which probably include PAF receptors, which, in turn, might be a potential target to the treatment of Chagas disease.

Keywords: PAF; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do PAF e seus antagonistas de receptores WEB2086 e Veranguesina.....	05
Figura 2. Imunolocalização de receptores de PAF em <i>T. cruzi</i> segundo Gomes et al. (2006).	06
Figura 3. Estrutura Química do PAF	07
Figura 4. Relação entre a lipofilicidade e atividade biológica de análogos de PAF com diferentes tamanhos de cadeia alcoólica segundo Heymans et al. (1989)	09
Figura 5. Síntese do PAF a partir de D-manitol (GODFROID et al., 1980)	10
Figura 6. Síntese do PAF a partir de D-ácido tartárico (FUJITA et al., 1980)....	11
Figura 7. Síntese do PAF a partir de epiclorigirina (TSUBOI et al., 1992).....	12
Figura 8. Síntese do PAF a partir de glicidol (ERUKULLA et al., 1995).....	12
Figura 9. Fluxograma de síntese de derivados do PAF a partir de <i>D</i> -Manitol ...	42
Figura 10. Frasco para síntese em fase sólida	44
Figura 11. Desproteção do grupo amino de Gly por remoção do grupo <i>N</i> -Fmoc seguido de acoplamento do ácido hidroxí-hexadecanóico à resina e clivagem do aminoácido por ácido trifluoroacético (TFA) para análise do produto formado.	44
Figura 12. Procedimento clássico de desproteção de grupo <i>N</i> -Fmoc com consequente formação de dibenzofulveno	45
Figura 13. Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo a utilização do reagente PyBOP	46
Figura 14. Síntese de derivado de PAF imobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo	49
Figura 15. Estrutura química dos fosfolipídios que compõe a Lecitina. A = Fosfatidilcolina, B = Fosfatidiletanolamina e C = Fosfatidilinositol.....	50
Figura 16. Processo de isolamento de Fosfatidilcolina a partir de gemas de ovos	51
Figura 17. Processo de isolamento de Fosfatidilcolina a partir de gemas de ovos (ICHIHARA et al., 2005).....	53
Figura 18. Mecanismo proposto de desacilação de L- α -FC para formação de Liso-FC e L- α -GFC.....	56

Figura 19. Formação de glicerol fosfato cíclico a partir de L- α -FC em meio alcalino	57
Figura 20. Mecanismo de inserção da cadeia alcoólica de 3 ao núcleo de GFC via 1-O-tosil-GFC (18).....	61
Figura 21. Mecanismo de tosilação da L- α -GFC (17)	61
Figura 22. Acilação seletiva da hidroxila primária de GFC segundo Fasoli et al. (2006).....	64
Figura 23. Dímeros preditos para a complexação de GFC e óxido de dibutilestanho em solução	64
Figura 24. Benzilação preferencial de hidroxila primária de diol (KONG; GRINDLEY, 1994)	69
Figura 25. Mecanismo proposto para a ativação de éteres de DBTO por nucleófilos (GRINDLEY, 1998)	70
Figura 26. Síntese de derivado de PAF immobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo tendo ácido 16-bromo-hexadecanóico como intermediário	71
Figura 27. Síntese de derivado de PAF immobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo tendo derivado benzilado de ácido hidroxihexadecanóico como intermediário	73
Figura 28. Substituição nucleofílica em diol mono tosilado	75
Figura 29. Relações evolucionárias entre receptores de PAF de 25 espécies de animais	79
Figura 30. Representação bidimensional do receptor de PAF humano.....	80
Figura 31. Alinhamento entre a sequência do receptor de PAF humano e a proteína hipotética de <i>T. cruzi</i> , Tc00.1047053511507.60, com predição dos domínios transmembrana (DTMs) por cinco métodos distintos	84
Figura 32. Estruturas secundárias das proteínas humana e do parasita	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos receptores de PAF selecionadas para o estudo.....	33
Tabela 2. Quantidade recuperada de lipídios totais, lecitina e lipídios neutros, empregando quatro diferentes solventes na extração de 50g de gema de ovo crua (Yano; Fukinbara; Takano, 1979)	52
Tabela 3. Comparação entre valores de RMN de ^1H calculados para amostra extraída de ovos e padrão Fluka	54
Tabela 4. Comparação entre valores de RMN de ^1H calculados para ácido hidroxi-hexadecanóico (2) e ácido 16-bromo-hexadecanóico (23)	72
Tabela 5. Proteínas hipotéticas de T. cruzi (200 a 600 aa) com sete domínios transmembrana.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : Deslocamento químico

aa: Aminoácidos

AAHD: Ácido hidróxi-hexadecanóico

AcOEt: Acetato de Etila

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTp: BLAST específico para proteínas

BrAHD: Ácido 16-bromo-hexadecanóico

CCC: Cromatografia em Coluna Clássica

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

DBTO: Óxido de dibutilestanho

DBU: 1,8-diazobicyclo[5,4,0]-7-undeceno

DCM: Diclorometano

DIPEA: Diisopropiletilamina

DMF: *N,N*-dimetilformamida

EC₅₀: Concentração do toxicante necessária para se obter uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima

ESI: *Electrospray ionization*

FC: Fosfatidilcolina

F-moc: 9-fluorenil-metil-oxi-carbonil

GFC: Glicerilfosforilcolina

Gly: Glicina

GPCRs: Receptores de membrana acoplados à Proteína G

GPCRDB: *GPCR database*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

KDa: Quilo-dáltons

L- α -FC: L-alfa-fosfatidilcolina

MeOH: Metanol

m/z: Razão massa/carga

OMS: Organização Mundial da Saúde

p.a.: Para análise

PAF: Fator de agregação plaquetária

ppm: Partes por Milhão

PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio

Q: Quadrupolo

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SAR: Relação estrutura e atividade dos compostos

TBAOH: Hidróxido de tetrabutilamônio

TFA: Ácido trifluoroacético

TMS: Tetrametilsilano

TOF: *Time Of Flight*

TsCl: Cloreto de Tosila

UV: Ultravioleta

v/v: Volume/volume

v/v/v: Volume/volume/volume

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	2
1.2. O fator de agregação plaquetária e sua relação com a doença de Chagas	4
1.3. Relação estrutura-atividade no fator de agregação plaquetária	6
1.4. Síntese do fator de agregação plaquetária.....	9
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Material.....	18
3.1.1. Aparelhagem analítica	18
3.1.2. Aparelhagem laboratorial	18
3.1.3. Solventes, reagentes e outros materiais	18
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Acoplamento do ácido hidroxihexadecanóico à resina de Wang-glicina	21
3.2.1.1. <i>Desproteção ortogonal do grupo N-Fmoc para posterior acoplamento</i>	21
3.2.1.2. <i>Reação de acoplamento de ácido hidroxihexadecanóico à resina</i>	22
3.2.1.3. <i>Teste de Kaiser</i>	22

3.2.1.4.	<i>Clivagem do derivado glicina-ácido hidroxihexadecanóico da resina</i>	22
3.2.2.	<i>Síntese de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol a partir de D-manitol</i>	23
3.2.3.	<i>Tentativa de síntese de 2,3-O-isopropilideno-D-gliceraldeído a partir de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol</i>	23
3.2.4.	<i>Síntese de L-alfa-glicerilfosforilcolina a partir de L-alfa-fosfatidilcolina</i>	24
3.2.4.1.	<i>Isolamento de L-alfa-fosfatidilcolina a partir da gema do ovo</i>	24
3.2.4.2.	<i>Tentativa de desacilação de L-alfa-fosfatidilcolina empregando hidróxido de tetrabutilamônio</i>	25
3.2.4.3.	<i>Desacilação de L-α-FC em solução alcoólica de hidróxido de lítio</i>	26
3.2.4.4.	<i>Desacilação de L-α-FC em solução alcoólica de metóxido de sódio</i>	27
3.2.5.	<i>Síntese de tosil/mesil glicerilfosforilcolina (tosil/mesil-O-GFC) a partir de L-α-glicerilfosforilcolina</i>	27
3.2.5.1.	<i>Tentativa de síntese de derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária em acetonitrila</i>	27
3.2.5.2.	<i>Tentativas de obtenção do derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária catalisada por piridina</i>	28
3.2.5.3.	<i>Obtenção do derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária catalisada por trietilamina e óxido de dibutilestanho</i>	29
3.2.6.	<i>Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC e resina de Wang-glicina-ácido hidroxihexadecanóico</i>	29
3.2.6.1.	<i>Tentativa de acoplamento com hidreto de sódio e 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno (DBU)</i>	29
3.2.6.2.	<i>Tentativa de acoplamento empregando diisopropiletilamina (DIPEA)</i>	30
3.2.6.3.	<i>Tentativa de acoplamento entre complexo de GFC-estanho e resina de Wang contendo resíduo de ácido 16-bromo-hexadecanóico</i>	31
3.2.6.4.	<i>Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC e derivado benzilado de ácido hidroxihexadecanóico</i>	31
3.2.7.	<i>Estudos de bioinformática</i>	32
3.2.7.1.	<i>Análise das sequências de receptores de PAF de animais</i>	32
3.2.7.2.	<i>Busca de sequências homólogas ao receptor de PAF humano no proteoma de <i>Typanosoma cruzi</i></i>	37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Síntese de derivados PAF imobilizados em resina utilizando D-Manitol	42
4.1.1. Acoplamento do ácido hidroxí-hexadecanóico à resina de Wang-glicina	43
4.1.2. Síntese de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol a partir de D-manitol.....	47
4.1.3. Tentativa de síntese de 2,3-O-isopropilideno-D-gliceraldeído a partir de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol.....	48
4.2. Síntese de Derivados PAF imobilizados em resina utilizando L-alfa-fosfatidilcolina extraída de gema de ovo	49
4.2.1. Isolamento de L-alfa-fosfatidilcolina a partir da gema do ovo	50
4.2.2. Síntese de L- α -Glicerilfosforilcolina a partir da L- α -Fosfatidilcolina	54
4.2.3. Formação regioseletiva do derivado tosil-O-glicerilfosforilcolina.....	60
4.2.4. Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC (18) e resina de Wang-glicina-ácido hidroxí-hexadecanóico (3)	67
4.2.5. Tentativa de acoplamento entre complexo de GFC-estanho e resina de Wang contendo resíduo de ácido 16-bromo-hexadecanóico	69
4.2.6. Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC (18) e derivado benzilado de ácido hidroxí-hexadecanóico (27).....	73
4.3. Estudos de Bioinformática	75
4.3.1. Determinação do tamanho ideal da cadeia alcóxílica dos derivados de PAF e introdução aos estudos de bioinformática	75
4.3.2. Busca no proteoma do parasita da sequencia correspondente à estrutura primária do receptor de PAF em <i>T. cruzi</i>	77
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 15 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença de Chagas na América Latina, parasitose que existe majoritariamente no continente americano e que foi originalmente descrita pelo brasileiro Carlos Chagas em 1909. Distribuiu-se geograficamente do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina, estando cerca de 28 milhões de pessoas sob o risco de contraí-la (GUHL; LAZDINS-HELDS, 2007). A doença de Chagas é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e a esquistossomose (PORCEL et al., 2000). Calcula-se que o número de vítimas fatais causadas por esta doença na América Latina atinja a casa de 12.500 casos por ano, o que representaria uma perda mínima de US\$ 2 bilhões por ano em função da redução da capacidade produtiva pela morte de trabalhadores adultos jovens (GUHL; LAZDINS-HELDS, 2007; MONCAYO, 1993).

A doença de Chagas é causada por um protozoário flagelado parasita, *Trypanosoma cruzi*. A forma de transmissão classicamente descrita da doença ocorre através do inseto vetor *Triatoma infestans*, conhecido popularmente no Brasil como barbeiro ou chupança. Neste tipo de transmissão, a contaminação por *T. cruzi* se dá pelo contato de mucosas ou da pele lesionada pela picada do inseto com suas fezes, sendo o período de incubação de 7 a 15 dias (REMME et al., 2006). Graças a medidas de controle sanitárias, a transmissão via *Triatoma infestans* foi interrompida no Brasil em 2006 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Entretanto, mais de 40 outras espécies de triatomíneos são conhecidas no Brasil das quais cerca de 70% podem ser encontradas em ambiente domiciliar (VINHAES; DIAS, 2000). Outras formas de transmissão da doença incluem transfusões sanguíneas (YOUNG et al., 2007), possivelmente também já erradicada no Brasil (MONCAYO; SILVEIRA, 2009),

transplantes de órgãos (KUN et al., 2009), ingestão de comida contaminada por parasitas (BENCHIMOL BARBOSA, 2006) ou congenitamente (DORN et al., 2007).

A doença de Chagas se caracteriza por dois estágios distintos no ser humano: a fase aguda, que se desenvolve rapidamente após a infecção, e a fase crônica, a qual se manifesta após um período assintomático que pode durar vários anos. A fase aguda pode não apresentar sintomas óbvios: o sinal de Romaña, edema bipalpebral uniocular com linfadenopatia regional característico desta fase da doença, se manifesta em apenas 5% dos infectados. Após anos de período assintomático, a manutenção de um processo inflamatório crônico em resposta à persistência contínua do parasita no organismo pode resultar na destruição dos tecidos musculares e nervosos, comportamento característico da fase crônica da doença. Cerca de um terço dos infectados desenvolvem sintomas cardíacos que podem conduzir a morte súbita, 6% manifestam danos digestivos graves, principalmente megacólon, e 3% apresentam acometimento do sistema nervoso periférico (REMME et al., 2006; URBINA et al., 2003).

Como os demais membros da família *Trypanosomatidae*, *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, o qual compreende diferentes estágios morfológicos e funcionais que lhe permitem se adaptar às diferentes condições de sobrevivência impostas pelo inseto vetor e pelo hospedeiro humano. No inseto vetor, a forma de replicação epimastigota se transforma em tripomastigota metacíclica, forma infectante das células de mamíferos. Nestas células, tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, as quais se proliferam e retornam à forma tripomastigota (REMME et al., 2006).

A passagem de epimastigota para tripomastigota metacíclica é uma etapa crucial do ciclo de *T. cruzi*. Além de alterações morfológicas esta também implica em

mudanças na expressão gênica e na composição dos lipídios e carboidratos da superfície celular. O processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas e tripomastigotas em amastigotas do parasita mostrou ser induzido pela ação do Fator de Agregação Plaquetária, um mediador biológico presente em diversos organismos vivos (RODRIGUES et al., 1996; AMBRÓSIO et al., 2003), ressaltando a importância do estudo das propriedades deste fosfolípido para a descoberta de novos agentes quimioterápicos com atividade tripanocida.

1.2. O fator de agregação plaquetária e sua relação com a doença de Chagas

O Fator de Agregação Plaquetária (PAF, do inglês Platelet-Activating Factor) é um mediador fosfolipídico biologicamente ativo. Embora tenha recebido esta denominação em função de seu potencial de induzir agregação plaquetária, inúmeros trabalhos têm ilustrado as propriedades biológicas do PAF em diversas células e tecidos, como na ativação de leucócitos, monócitos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, diminuição de débito cardíaco, estimulação de contração uterina e de glicogenólise no fígado. Desse modo, PAF participa tanto de processos fisiológicos quanto patológicos no organismo, tais como reações alérgicas, inflamação, asma, carcinogênese e apoptose (CHAO; OLSON, 1993). Do ponto de vista celular, PAF exerce seus efeitos através de receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs). A existência destes receptores foi comprovada por clonagem de cDNA de receptores de PAF presentes em pulmões de cobaias, evidenciando uma sequência de 342 aminoácidos e massa molecular de 38,9 KD (HONDA et. al, 1991).

Diversas observações sugerem a existência de receptores PAF em *T. cruzi*. Rodrigues et al. (1996) demonstraram que soluções de PAF 10^{-6} M foram capazes de

aumentar em cerca de 28% a diferenciação das formas epimastigotas do parasita para tripomastigotas, efeito este abolido na presença do antagonista de receptor de PAF WEB 2086 (**Figura 1**). Ambrósio et al., (2003) relataram resultados semelhantes, ao comprovar que soluções de PAF 10^{-6} M induziram a diferenciação de cerca de 30% das formas tripomastigotas em amastigotas e que este comportamento também era afetado por ação do antagonista de receptor de PAF Veranguensina (**Figura 1**).

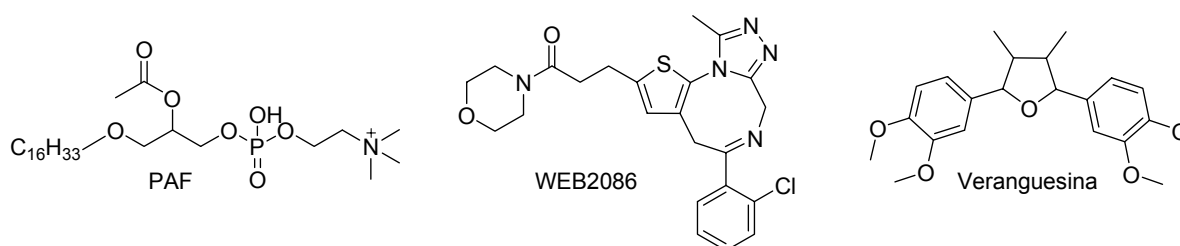


Figura 1. Estrutura química do PAF e seus antagonistas de receptores WEB2086 e Veranguensina

Outra evidência que corrobora a hipótese de receptores de PAF em *T. cruzi* diz respeito à capacidade do fosfolípido de aumentar a expressão de fosfatases no parasita (RODRIGUES et al., 1999). Entre algumas proteínas da classe dos GPCRs (como o receptor de PAF humano) foi observado que a interação do agonista no sítio ativo do receptor pode resultar na ativação de fosfatases que promovem a fosforilação de determinadas quinases intracelulares (RITTER; HALL, 2009). A constatação de que o efeito indutor do PAF sobre atividade de ecto-fosfatases de *T. cruzi* ocorre apenas em células vivas e não em frações enriquecidas de membrana pode ser interpretada como evidência adicional de que este efeito esteja relacionado à transdução de sinais dos receptores de PAF para o interior das células do parasita (RODRIGUES et al., 1999).

Nos estudos de Gomes et al. (2006), ensaios de imunofluorescência ressaltam de modo bastante evidente a presença dos prováveis receptores de PAF em células de *T. cruzi* (**Figura 2**). Entretanto, as tentativas de isolamento do receptor por Western Blot não foram bem-sucedidas e, até o momento, nenhum grupo de pesquisa obteve sucesso no isolamento e caracterização deste receptor em *Trypanosoma cruzi*.

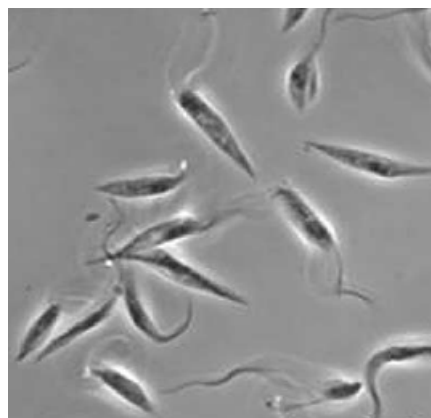


Figura 2. Imunolocalização de receptores de PAF em *T. cruzi* segundo Gomes et al. (2006).

1.3. Relação estrutura-atividade no fator de agregação plaquetária

Há mais de um século, Crum-Brown e Fraser (1868) lançaram as bases do estudo das relações entre estrutura e atividade dos compostos (SAR, do inglês Structure-Activity Relationship) ao defender a idéia de que o efeito fisiológico de uma substância é função de sua composição e constituição química. Este conceito se fundamenta na observação de que as propriedades biológicas associadas aos compostos são funções de parâmetros físico-químicos tais como solubilidade, ionização, lipofilicidade, estereoquímica e efeitos eletrônicos, os quais apresentam profundas influências sobre seu comportamento químico.

A atividade biológica resultante do processo de interação dos compostos com determinados receptores é altamente influenciada por variações da estrutura química dos ligantes. Desse modo, mesmo pequenas alterações na estrutura dos compostos podem resultar em perda completa da atividade, toxicidade inesperada ou grandes variações de potência. Uma das formas de se propor modificações racionais na estrutura de um composto é através do uso dos chamados mapas de

atividades molecular, construídos a partir da comparação dos valores de atividade biológica entre diversos análogos e o composto de partida. Após se realizar um grande número de modificações na molécula, muitas conclusões relativas a SAR podem ser feitas no intuito de se pressupor como alterações estruturais específicas poderão afetar a potência ou atividade biológica de um dado composto (SELASSIE, 2003).

Na molécula do PAF é possível distinguir quatro grupos principais responsáveis pela interação do mediador com o receptor (**Figura 3**). O grupo colina da molécula, formada por uma cadeia etilênica ligada ao grupo trimetilamônio, é altamente sensível a modificações. Tanto o aumento do número de carbonos da cadeia etilênica (WISSNER; SCHAUB; SUM; KOHLER; GOLDSTEIN, 1986) quanto a remoção ou substituição do resíduo trimetilamônio (**A**) por grupo amino não carregado resultam em perda da capacidade de agregação plaquetária (SATOCHI et al., 1981; OSTERMANN et al., 1987).

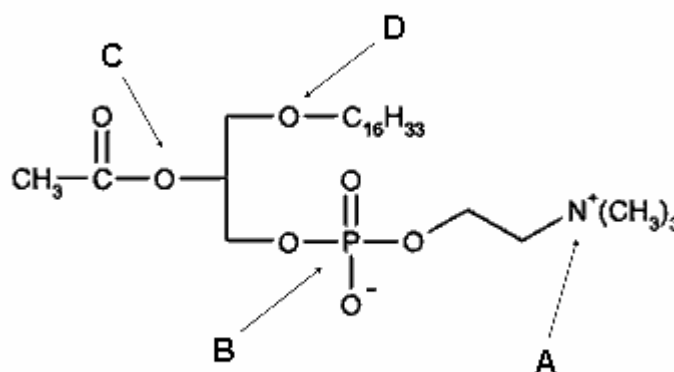


Figura 3. Estrutura Química do PAF. Em destaque os principais grupamentos da molécula:
A = Grupo Colina, **B** = Grupo Fosforil, **C** = Grupo Acetato e **D** = Cadeia Alcoxi.

Modificações no grupamento fosforil (**B**) da molécula conduzem invariavelmente a reduções na atividade biológica. Substituições por grupos não

negativamente carregados (WISSNER; KOHLER; GOLDSTEIN, 1985; WISSNER; SCHAUB; SUM; KOHLER; GOLDSTEIN, 1986) ou a remoção do átomo de oxigênio que liga o grupamento à cadeia etilênica (MOSCHIDIS; DEMOPOULOS; KRITIKOU, 1983) ocasionam reduções da atividade de agregação plaquetária na ordem de 10^4 vezes.

A presença do grupo acetato (**C**) também é essencial na interação da molécula de PAF com o receptor. A remoção deste grupo por fosfolipases A2-específicas representa um mecanismo natural de bloqueio dos efeitos tóxicos do PAF nos tecidos, gerando um decréscimo de 120 vezes na capacidade de agregação plaquetária (JAIN; ROGERS, 1989). A substituição deste grupo por cadeias longas ou mesmo por radicais menores como propil ou isobutil resulta em decréscimo desta atividade na ordem de 500 vezes (BLANK et al., 1982).

As propriedades biológicas da molécula do PAF são altamente dependentes da manutenção da função éter da cadeia alcoxi (**D**). Análogos nos quais o átomo de oxigênio da função éter está ausente (WISSNER et al., 1984) ou que apresentam múltiplas substituições dos carbonos da cadeia alcoxi por átomos de oxigênio apresentam baixos níveis de atividade de agregação plaquetária (WISSNER; KOHLER; GOLDSTEIN, 1986).

Um dos pontos mais interessantes dos estudos de SAR da molécula de PAF diz respeito ao tamanho da cadeia alcoxi. Godfroid et al. (1987) avaliaram quatorze análogos do PAF com cadeias variando de 1 a 20 átomos de carbono e constataram que os valores de atividade de agregação plaquetária destes compostos, embora numericamente próximos entre si, descreviam um comportamento não linear. Comprovou-se posteriormente se tratar de uma relação parabólica entre a lipofilicidade da cadeia alcoxi e o logaritmo da estimulação plaquetária (HEYMANS

et al. 1989), comportamento comum para muitos compostos orgânicos (**Figura 4**). Ao se considerar uma série de compostos homólogos, ou seja, compostos que diferem entre si por uma unidade constante (um grupo CH_2 , por exemplo), é possível observar um aumento regular seguido de decréscimo progressivo da atividade biológica em resposta ao aumento do número de carbonos de uma cadeia saturada. Em geral, este fenômeno se deve à formação de micelas ou mesmo ao próprio aumento da lipofilicidade, que dificulta o trânsito da molécula no meio aquoso e, conseqüentemente, sua interação com os receptores (SILVERMAN, 2004). Desse modo, alterações na cadeia alcoxi do fosfolipídio aparentam ser a maneira mais promissora de se sintetizar análogos que ainda conservem a capacidade de interagir especificamente com os receptores de PAF.

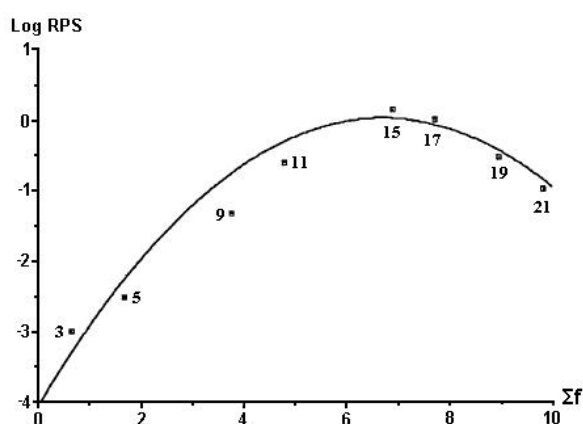


Figura 4. Relação entre a lipofilicidade e atividade biológica de análogos de PAF com diferentes tamanhos de cadeia alcoólica segundo Heymans et al. (1989).

1.4. Síntese do fator de agregação plaquetária

São descritos na literatura diferentes protocolos para síntese química de PAF, em geral envolvendo a modificação de materiais de partida enantiomericamente puros. A busca de produtos enantiopuros se baseia no fato do fosfolipídio naturalmente encontrado em mamíferos, (R)-PAF, ser aproximadamente 1000 vezes mais potente que seu enantiômero sintético, (S)-PAF. Contudo, mesmo (S)-PAF possui a capacidade de interação com receptores de PAF, apresentando valores de EC_{50} para indução de agregação plaquetária na ordem de 50 nM (SALARI et al., 1992).

O primeiro protocolo para síntese de PAF, e conseqüentemente um dos mais consagrados, foi publicado em 1980 por Godfroid et al., através do qual a síntese de PAF foi alcançada em 11 etapas a partir de D-manitol (GODFROID et al., 1980). Basicamente, este protocolo se resume na clivagem do manitol para geração do núcleo de glicerol, ao qual a cadeia alcoxílica e os grupo acetil e fosforilcolina são sequencialmente inseridos em meio a exaustivas reações de proteção/desproteção (Figura 5).

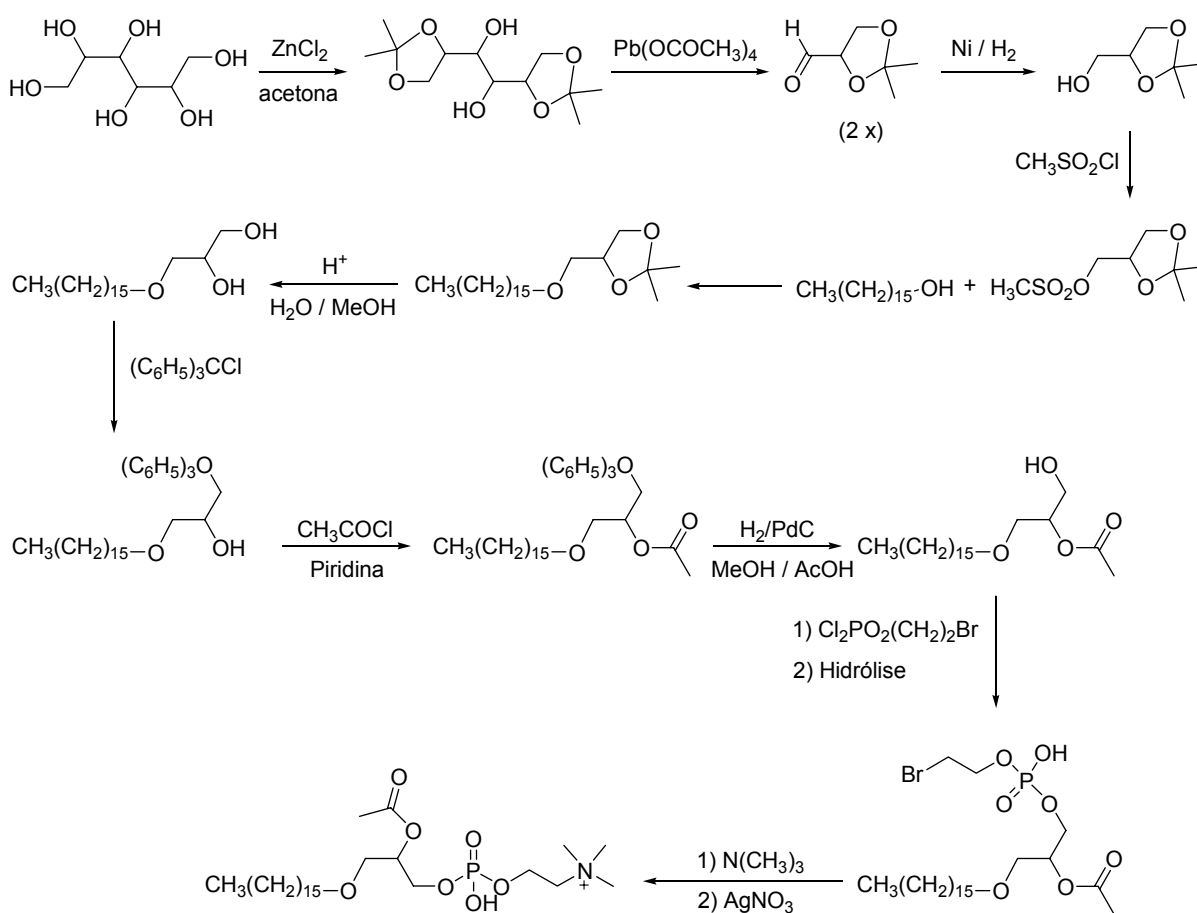


Figura 5 – Síntese do PAF a partir de D-Manitol (GODFROID et al., 1980).

Posteriormente, Fujita et al. (1982) propuseram a síntese de PAF a partir de D-ácido tartárico em 10 etapas. Neste caso, a reação de ácido tartárico com benzaldeído catalisada por ácido *p*-toluenossulfônico conduz à formação do

derivado benzilideno, o qual sofre clivagem redutiva para geração de um triol. Após proteção das hidroxilas vicinais, a cadeia alcoxílica é inserida na posição 1 e a clivagem oxidativa realizada por reação com tetracetato de chumbo. Os últimos quatro passos desta rota sintética, que representam a inserção dos grupo acetil e fosforilcolina ao núcleo de glicerol, são baseados no protocolo descrito por Godfroid et al. (1980) (**Figura 6**).

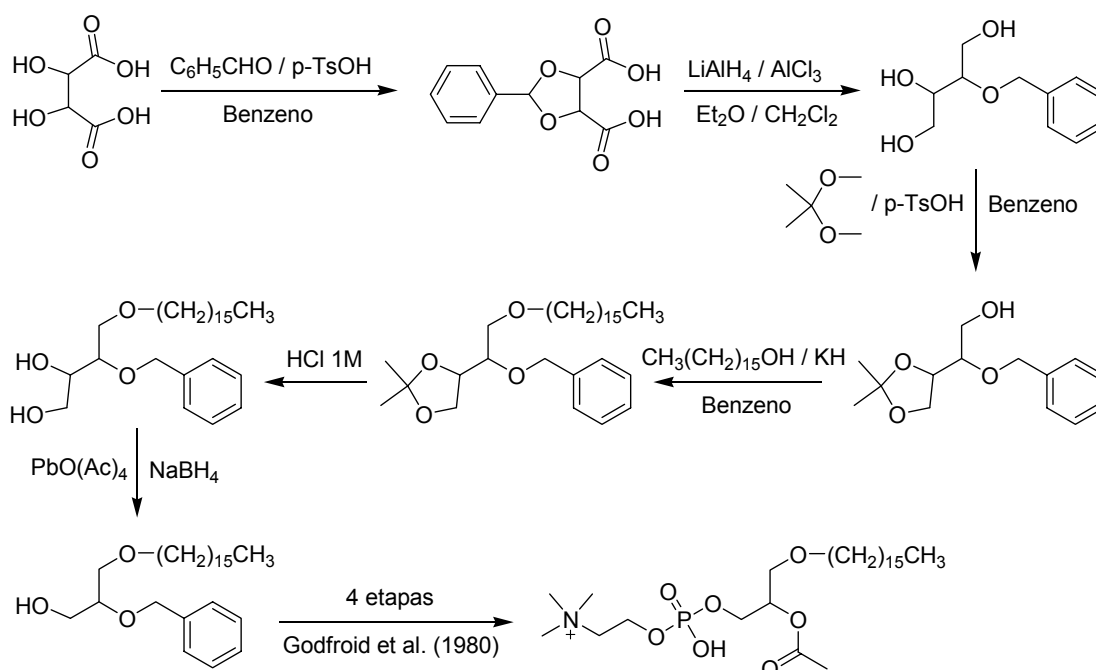


Figura 6 – Síntese do PAF a partir de D-ácido tartárico (FUJITA et al., 1980).

Redução expressiva no número de etapas foi alcançada através do uso de epiclorigrina como material de partida (TSUBOI et al., 1992). Desse modo, a preparação de PAF foi alcançada em apenas cinco etapas, através da reação entre epiclorigrina e álcool *p*-metóxi benzílico em presença de um catalisador de transferência de fase (brometo de benziltrimetilamônio), adição nucleofílica de hexadecanol ao epóxido, acetilação da posição 2 do glicerol e debenzilação oxidativa da posição 3 para inserção do grupo fosforilcolina (**Figura 7**).

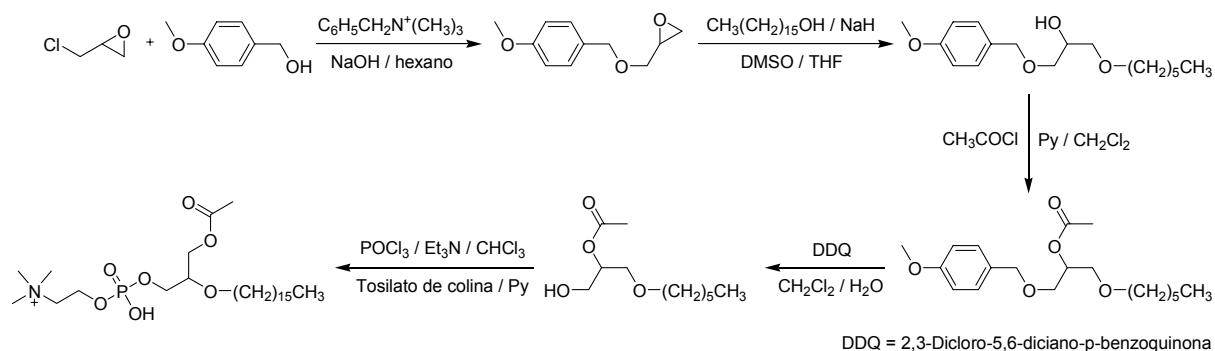


Figura 7 – Síntese do PAF a partir de epiclorigirina (TSUBOI et al., 1992).

Alguns anos mais tarde, Erukulla et al. (1995) descrevem a síntese PAF a partir de glicidol, possibilitando através do uso de reações “one-pot” a preparação do fosfolipídio em apenas três etapas: a partir de glicidol, após abertura do epóxido e inserção da cadeia alcofílica, três reações “one-pot” são realizadas para introdução regioseletiva do grupo fosforilcolina à posição 3 do núcleo de glicerol seguida de acetilação da posição 2 (**Figura 8**).

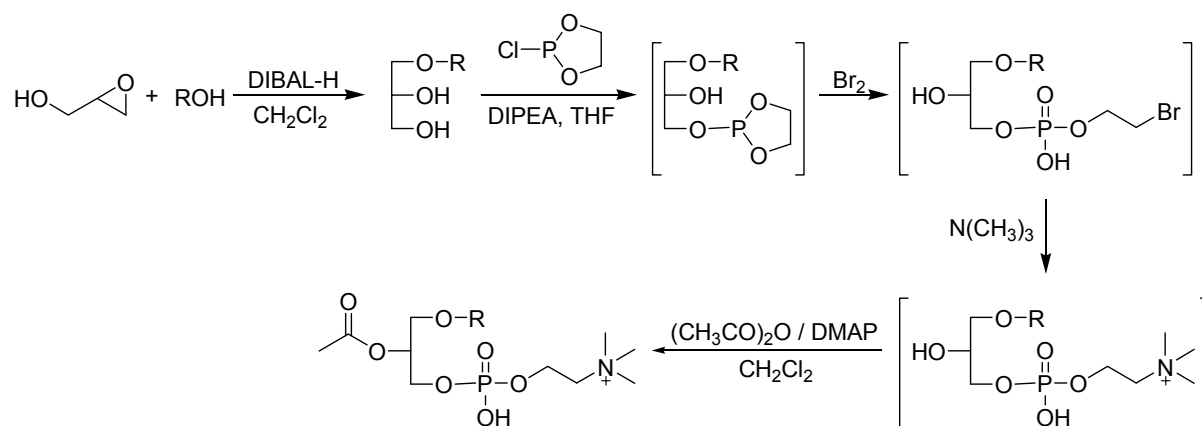


Figura 8 – Síntese do PAF a partir de glicidol (ERUKULLA et al., 1995).

No presente estudo, visamos à síntese de ligantes de receptores de PAF imobilizados em resina que possam interagir de maneira reversível com o provável receptor de PAF em *T. cruzi*. O acoplamento dos derivados de PAF à resina foi

proposto através de síntese em fase sólida, estratégia que apresenta algumas vantagens sobre os métodos convencionais de síntese: (1) as reações podem ser realizadas na presença de grande excesso dos reagentes, forçando a obtenção do produto, (2) o excesso dos reagentes e subprodutos da reação podem ser removidos através de sucessivas lavagens da resina e (3) as perdas do produto são minimizadas já que este permanece ligado à resina durante toda a síntese (CHAN; WHITE, 2000; SEEBERGER; HAASE, 2000). A preparação destes potenciais ligantes do receptor de PAF do parasita é fundamental para o isolamento e identificação destes receptores pelo grupo de pesquisa em Glicobiologia de nossa unidade chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi.

Em uma abordagem complementar, empregamos ainda estudos de bioinformática na tentativa de localizar a sequência de aminoácidos relativa ao receptor de PAF no proteoma de *T. cruzi*, ou seja, no conjunto de proteínas expresso pelo genoma do parasita. Partindo do pressuposto que este receptor realmente exista, parece lógico supor que faz parte do proteoma do parasita, cujo genoma correspondente já foi completamente sequenciado (ATWOOD 3RD et al., 2005). Muitas proteínas descritas no proteoma são classificadas como hipotéticas, pois embora sua existência seja predita ainda não há evidências experimentais de que sejam expressas *in vivo*. É possível que o receptor de PAF no parasita corresponda a uma dessas proteínas e que sua ocorrência possa ser evidenciada através de comparações entre as sequências destas proteínas com as sequências de receptores de PAF de espécies animais.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à descoberta e síntese de compostos que possuam potencial terapêutico para tratamento da doença de Chagas. Neste sentido, alcançamos com sucesso a síntese de lignanas

tetraidrofurânicas e derivados sintéticos da veraguensina com potente atividade tripanocida (NIHEI et al., 2004; BERNARDES et al., 2006), compostos que se acredita justamente atuarem como antagonistas específicos de PAF.

Através do isolamento e identificação dos receptores de PAF em *T. cruzi*, busca-se não apenas um melhor entendimento dos processos de proliferação, diferenciação e resistência do parasita, mas também o estabelecimento de um possível novo alvo para o desenvolvimento de medicamentos com atividade tripanocida. Antagonistas de receptor e inibidores específicos de GPCRs têm demonstrado potencial clínico (ZHONG; NEUBIG, 2001) podendo representar, no caso específico da doença de Chagas, uma forma efetiva de se modular os processos de reprodução e diferenciação do tripanossomo. Desse modo, o isolamento dos receptores de PAF em *T. cruzi*, pode conduzir no futuro ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de pacientes chagásicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar análogos do Fator de Agregação Plaquetária immobilizados em resina para o isolamento, purificação e possível identificação de receptores de PAF em *Trypanosoma cruzi*. Realizar estudos de bioinformática na tentativa de identificar a sequência de aminoácidos correspondente ao receptor de PAF no proteoma de *T. cruzi* através da comparação entre as sequências de proteínas presentes no proteoma com a de receptores de PAF de espécies animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Aparelhagem analítica

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DPX-300 e DRX-500 operando na frequência de hidrogênio-1 a 300,13 MHz e a 500,13 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa. Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, modelo Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, empregando ionização por electrospray (ESI) e analisadores quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF).

3.1.2. Aparelhagem laboratorial

- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Banho termostaticado: Tecnal TE-184
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10

3.1.3. Solventes, reagentes e outros materiais

- Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, conforme métodos usuais descritos (ARMAREGO; CHAI, 2003).
- As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK® 0,25 mm preparadas a

partir suspensão de sílica em água destilada. Revelação das placas foi efetuada empregando irradiações de UV de 245 e 366nm e também vapores de sublimação de iodo.

- As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando Alumina 150 mesh Sigma-Aldrich.
- Acetato de etila, grau HPLC (AcOEt) - Mallinckrodt
- Acetona, grau HPLC – Mallinckrodt
- Acetona deuterada, 99,8% [(CD₃)₂CO] - Acrós Organics
- Acetonitrila, grau HPLC - Mallinckrodt
- Ácido acético glacial – Mallinckrodt
- Ácido bromídrico solução aquosa 48% - Sigma-Aldrich
- Ácido trifluoracético, 99% - Sigma-Aldrich
- Água destilada
- Água deuterada (D₂O) - Mallinckrodt
- Amido de milho caseiro (Maizena)
- Anidrido acético, 99% - J. T. Baker
- Carbonato de potássio, p. a. (K₂CO₃) – Scharlau
- Cianeto de potássio - Acrós Organics
- Cloreto de amônio, p. a. - Merck
- Cloreto de benzila, 99% - Sigma-Aldrich
- Cloreto de lítio, 99% - Acrós Organics
- Cloreto de mesila, 98% - Sigma-Aldrich
- Cloreto de tosila, 98% - Sigma-Aldrich
- Cloreto de zinco anidro, 98% - Sigma-Aldrich
- Clorofórmio (CHCl₃) - Mallinckrodt

- Clorofórmio deuterado, 99,8% (CDCl_3) - Acrós Organics
- 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno (DBU), 98% - Sigma-Aldrich
- Diclorometano (DCM) - Mallinckrodt
- *N,N*-dimetilformamida, 99,9% (DMF) - Alfa Aesar
- DIPEA (diisopropiletilamina) - NovaBiochem
- Dowex Monosphere 550A (OH^-) - Dow
- Fenol, 99% - Sigma-Aldrich
- L-alfa-fosfatidilcolina, 99% - Fluka
- Hexano, grau HPLC – Mallinckrodt
- Hidreto de sódio, 95% - Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sódio, 99% - Merck
- Iodeto de potássio, p.a. (KI) – Merck
- Iodeto de tetrabutilamônio, 98% - Sigma-Aldrich
- Iodo, (I_2) – Merck
- Isopropanol, p.a. ($\text{H}_3\text{C}-\text{HCOH}-\text{CH}_3$) - Mallinckrodt
- D-Manitol - Sigma-Aldrich
- Metanol, p.a. (MeOH) - Mallinckrodt
- Metanol deuterado, 99,8% (CD_3OD) - Acrós Organics
- Metóxido de Sódio, 95% - Sigma-Aldrich
- Ninidrina - Acrós Organics
- Nitrato de prata, 99% - Sigma-Aldrich
- Ovos de granja
- Óxido de dibutilestanho, 98% - Sigma-Aldrich
- Piperidina, 99% - Acrós Organics
- Piridina, 99% - Sigma-Aldrich

- PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio) - NovaBiochem
- Resina de Wang-Gly-Fmoc 100-200 mesh - NovaBiochem
- Tetraacetato de chumbo, 95% - Sigma-Aldrich
- Tolueno - Mallinckrodt
- Trietilamina, p.a. - Merck

3.2. Métodos

3.2.1. Acoplamento do ácido hidroxí-hexadecanóico à resina de Wang-glicina

3.2.1.1. *Desproteção ortogonal do grupo N-Fmoc para posterior acoplamento*

Resina de Wang previamente ligada a resíduo de glicina protegida com grupo N-Fmoc (Resina de Wang-Gly-Fmoc 100-200 mesh, NovaBiochem, 100mg) foi intumescida com diclorometano (3mL). Após cerca de 3h, o solvente foi removido por filtração e *N,N*-dimetilformamida (DMF, 2mL) foi introduzido sobre a resina. A mistura foi agitada através de borbulhamento de argônio, introduzido pela parte inferior do frasco de reação. DMF foi removido por filtração e nova porção foi introduzida, agitada e o processo repetido por três vezes. Após sucessivas lavagens com DMF, a resina foi tratada com solução de piperidina 20% em DMF (2mL) para desproteção do grupo N-Fmoc. A mistura foi agitada pelo borbulhamento de argônio por cerca de 15 minutos e o reagente removido por filtração. A operação foi repetida três vezes e ao final a resina foi lavada três vezes com DMF.

3.2.1.2. *Reação de acoplamento de ácido hidroxi-hexadecanóico à resina*

Ácido hidroxi-hexadecanóico (2 equivalentes) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio (PyBOP, 2 equivalentes) foram dissolvidos com mínima quantidade de DMF. A solução foi tratada com diisopropiletilamina (DIPEA) e imediatamente introduzida sobre a resina, contendo o aminoácido glicina com grupo amino livre. A mistura foi agitada através de fluxo de argônio por 6 horas e o término da reação foi verificado através do teste de Kaiser, usado para detectar presença de grupo amino livre. A mistura foi filtrada e a resina lavada três vezes com DMF, diclorometano e metanol. Após secagem em alto vácuo, uma amostra foi submetida à clivagem para análise de RMN ^1H . RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1,25 (20H, $(\text{CH}_2)_{10}$), δ 1,37-1,92 (6H, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 2,28 (2H, NCOCH_2), δ 4,09 (2H, CH_2OH), δ 4,16 (1H, OH), δ 4,36 (s, 2H, COCH_2NCO).

3.2.1.3. *Teste de Kaiser*

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

3.2.1.4. *Clivagem do derivado glicina-ácido hidroxi-hexadecanóico da resina*

A remoção do derivado glicina-ácido hidroxi-hexadecanóico da resina foi realizada somente após sucessivas lavagens da resina com diclorometano e

metanol para a eliminação de traços de DMF. A clivagem foi realizada na presença de solução de ácido trifluoroacético 95% em água. A mistura foi agitada sob fluxo de argônio por 2 horas e filtrada para um frasco coletor. A operação foi repetida e as fases de ácido trifluoroacético 95% foram concentradas em evaporador rotatório. O sólido formado nas paredes do frasco foi tratado com éter etílico, previamente resfriado a 0°C, para formação de um filme cristalino na superfície do frasco.

3.2.2. Síntese de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol a partir de D-manitol

Cloreto de zinco anidro (600mg) foi aquecido em chama até fusão para garantir a ausência de água e posteriormente submetido à agitação com acetona anidra (3mL) (TIPSON; COHEN, 1968). Após filtração para remoção de impurezas de ZnCl₂, foi adicionado D-manitol (100mg, 0,55mmols) e a suspensão agitada em balão acoplado a condensador de refluxo, com banho de gelo até o manitol ser dissolvido (2h). A solução foi transferida para um becker contendo solução de carbonato de potássio em água (700mg/0,7ml) e filtrada sob vácuo. O precipitado foi lavado três vezes com clorofórmio resfriado (1,5mL) e o filtrado resultante combinado ao inicial para ser concentrado a um volume de 1,5mL. O composto 1,2,5,6-di-O-isopropilideno foi isolado da fase orgânica (72% de rendimento). RMN ¹H 300 MHz, (CD₃)₂CO, δ 1,20-1,40 (12H, CH₃), δ 3,49-4,17 (6H, CH₂, CH).

3.2.3. Tentativa de síntese de 2,3-O-isopropilideno-D-gliceraldeído a partir de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol

A uma suspensão de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-Manitol em tolueno (78mg em 2,5mL) foi adicionado tetraacetato de chumbo (132mg), procedendo a reação em agitação branda por 3 horas (BAER; HERMANN; FISCHER, 1939). A formação de

um precipitado de chumbo na forma de pequenos bastões foi observada e o este foi testado com solução de iodeto de potássio-amido (300mg amido: 10mL de água fervente: 300mg KI) para presença de excesso do agente oxidante tetraacetato de chumbo. Em um tubo de ensaio com 2mL de água, cinco gotas de solução KI-amido foram adicionadas junto a uma pequena amostra do precipitado de chumbo.

Neste teste, o resultado positivo (presença de oxidante) é expresso pela mudança da coloração da solução para azul, enquanto a manutenção da cor branca original indica resultado negativo (ausência de agentes oxidantes). Após a ausência de acetato de chumbo ser constatada, a amostra foi submetida à análise por cromatografia em camada delgada analítica (acetato de etila:hexano, 1:1 v/v) que, no entanto, revelou apenas a presença do material de partida 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol, posteriormente confirmada por RMN ^1H .

3.2.4. Síntese de L-alfa-glicerilfosforilcolina a partir de L-alfa-fosfatidilcolina

3.2.4.1. Isolamento de L-alfa-fosfatidilcolina a partir da gema do ovo

Os procedimentos finais de separação de L- α -FC a partir da gema do ovo foram realizados conforme descrito por Ichihara et al. (2005). A uma massa de 80g de gemas de ovos frescos foram adicionados 250mL de acetona e a mistura agitada em banho de gelo durante 30 minutos, seguida de filtração em papel de filtro. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, possibilitando a remoção grande parte dos lipídios neutros, pigmentos e água. A partir da massa restante, os fosfolipídios foram extraídos duas vezes com 150mL de clorofórmio:metanol (1:1, v/v) sob agitação em banho de gelo por 30 minutos. A massa foi filtrada e os dois filtrados reunidos para remoção dos solventes em evaporador rotatório.

O sólido resultante foi ressuspenso em volume mínimo de clorofórmio e submetido à cromatografia em coluna clássica com alumina (10g de alumina por grama de massa de fosfolipídios), empacotada em coluna de vidro com clorofórmio. Antes de realizar o empacotamento da coluna, a alumina foi lavada exaustivamente com metanol até que o líquido sobrenadante estivesse livre das partículas mais finas. A eluição dos pigmentos carotenóides e fosfolipídios neutros restantes foi realizada com acetona, tendo sido possível acompanhar visualmente o final da eluição destes pigmentos. Em seguida, a fosfatidilcolina foi eluída da coluna com 500mL de solução clorofórmio:metanol (1:1, v/v). A quantidade média isolada de fosfatidilcolina isolada por este procedimento foi de 2,8g.

3.2.4.2. Tentativa de desacilação de L-alfa-fosfatidilcolina empregando hidróxido de tetrabutylamônio

A preparação da solução de hidróxido de tetrabutylamônio 1M foi realizada de acordo com Cundiff e Markunas (1962). Foram dissolvidos 300mg de AgNO_3 (grau reagente) em 0,5mL de água e 0,5mL de solução NaOH 4N, ambos livres de carbonato. Após agitação vigorosa, a solução foi filtrada em funil com placa de vidro e o precipitado de óxido de prata formado foi lavado com 7,5mL de água fervente e 3mL de metanol. Iodeto de tetrabutylamônio (400mg) foi dissolvido em metanol (1mL) e a solução resultante resfriada em banho de sal e gelo (-5 a -10°C). O precipitado de óxido de prata umedecido foi adicionado à solução e a reação procedeu em atmosfera de argônio sob agitação intensa por 1h, sempre repondo o banho de sal e gelo. Após filtração em funil com placa de vidro, o filtrado foi mantido em repouso por 24h para observar se haveria deposição de óxido de prata, fato que justificaria uma nova filtração. Como nenhuma precipitação foi observada, a solução foi prontamente utilizada no ensaio de desacilação.

L-alfa-Fosfatidilcolina (L- α -FC, 300mg) foi dissolvida em éter (10mL) e 300 μ L de solução 1M de hidróxido de tetrabutylamônio. Após 2h à temperatura ambiente a formação de tênue precipitado de aspecto leitoso aderido ao fundo do balão foi observada, o qual foi cuidadosamente separado por decantação do solvente, lavado duas vezes com de éter (0,5mL) e seco em bomba de alto-vácuo para ser enviado para análise de RMN 1 H.

3.2.4.3. Desacilação de L- α -FC em solução alcoólica de hidróxido de lítio

A preparação da solução de hidróxido de lítio empregada nesta etapa foi realizada por metodologia desenvolvida pelo aluno, a partir de solução metanólica de LiCl 0,125M (2mL) eluídos de resina de troca iônica Dowex Monosphere 550A (OH $^-$, 166mg). Esta quantidade de resina foi calculada para não exceder a capacidade máxima de troca da mesma, 1,1eq (OH $^-$)/L de resina. Após 15 minutos, a solução foi filtrada em papel e o filtrado resultante armazenado em frasco âmbar para posterior utilização.

Seguindo os procedimentos descritos por Brockerhoff (1963), L- α -FC (30 μ mols) foi dissolvida em solução metanólica de LiOH 0,125M (0,8mL) e clorofórmio (0,2mL). Após 15 minutos sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de ácido acético glacial até obtenção de pH levemente ácido (pH \approx 6). Os solventes foram removidos em evaporador rotatório e a amostra dissolvida em volume mínimo de clorofórmio: metanol:água (1:1:1, v/v/v) para ser aplicada em coluna de alumina previamente empacotada com clorofórmio. A eluição com foi realizada com clorofórmio, clorofórmio:metanol (1:1, v/v) e metanol:água (1:1, v/v), sendo esta última fração concentrada em evaporador rotatório com controlador de vácuo para análise de RMN 1 H (52% de rendimento).

3.2.4.4. Desacilação de L- α -FC em solução alcoólica de metóxido de sódio

Solução metanólica 1,25M de metóxido de sódio foi preparada ao se dissolver CH_3ONa (270mg) em metanol (4mL). A esta solução foi adicionada L- α -FC (150 μ mols) em clorofórmio (1mL) sob agitação constante. A reação foi monitorada a cada 2 minutos por cromatografia em camada delgada analítica em placas contendo sílica gel eluídas com clorofórmio:metanol:água (65:25:4, v/v/v) por comparação à padrão de L- α -FC Fluka. Após 32 minutos, todo o material de partida havia sido consumido e a reação foi interrompida aos 40 minutos pela adição de ácido acético glacial até obtenção de pH levemente ácido (pH \approx 6). O solvente foi removido em evaporador rotatório e a amostra foi submetida à separação por cromatografia em coluna clássica com alumina, exatamente como descrito para a reação com hidróxido de lítio na **Seção 3.2.5.2**. A última fração eluída (metanol:água 1:1, v/v) foi concentrada em evaporador rotatório com controlador de vácuo e enviada para análise de RMN ^1H (rendimento de 83%). RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 3,18 (9H, N^+CH_3), 3,48-3,63 (4H, CH_2N^+ , CH_2OP), 3,73 (1H, $\text{OCHHCHOHCH}_2\text{OP}$), 3,83 (1H, $\text{OCHHCHOHCH}_2\text{OP}$), 3,88 (1H, CHOH), 4,25 (2H, POCH_2).

3.2.5. Síntese de tosil/mesil glicerilfosforilcolina (tosil/mesil-O-GFC) a partir de L- α -glicerilfosforilcolina

3.2.5.1. Tentativa de síntese de derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária em acetonitrila

Conforme adaptação realizada dos protocolos descritos por Kanda e Wells (1981) e Chakraborty, Reddy V. R. e Reddy T. J. (2003), L- α -Glicerilfosforilcolina (0,189mmol) foi dissolvida em acetonitrila (1mL) quando trietilamina (53 μ L) e cloreto de tosila (39,7mg) foram sequencialmente adicionados a 0°C sob atmosfera de

argônio. Após remoção do banho de água e gelo, a reação permaneceu sob agitação constante e atmosfera inerte por mais 6 horas, quando análise por cromatografia em camada delgada analítica (sílica gel, clorofórmio:metanol:água, 65:25:4 v/v/v) demonstrou o consumo do material de partida e a formação de um único produto UV ativo. A reação foi interrompida pela adição de solução aquosa saturada de NH_4Cl e concentrada em evaporador rotatório com controlador de vácuo. A mistura foi submetida à cromatografia em alumina, procedendo-se a eluição sequencial com as fases móveis clorofórmio, metanol-água (8:2, v/v) e água. A presença de um composto UV ativo foi confirmada na fração metanol-água, composto também visualizado sob vapor de iodo, embora análise de RMN ^1H não tenha evidenciado a formação do produto desejado.

3.2.5.2. Tentativas de obtenção do derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária catalisada por piridina

Cloreto de tosilato (63mg, 0,33mmol, 2eq) em piridina (1mL) foi adicionado a uma solução de glicerilfosforilcolina (GFC) em piridina (0,16mmol em 1mL; solubilização de GFC apenas parcial) a -10°C durante 45 minutos (KAPITÁNA; GRACZA, 2008). A reação foi mantida sob agitação em banho de gelo por mais 3 horas quando então foi agitada sob temperatura ambiente por 36 horas. Neste período, análise periódica por cromatografia em camada delgada analítica não sugeriu a formação do composto desejado. O ensaio foi então repetido nas mesmas condições exceto por se dissolver a GFC em acetonitrila. Novamente não se observou a formação do produto desejado, mesmo após 72 horas de reação. Análise de RMN ^1H confirmou a não obtenção do produto esperado.

3.2.5.3. Obtenção do derivado tosil-O-GFC por reação seletiva em hidroxila primária catalisada por trietilamina e óxido de dibutilestanho

Glicerilfosforilcolina (50mg) e óxido de dibutilestanho (53,25mg) foram suspensos em metanol (2mL) contendo peneira molecular em pó (4Å) ativada e os reagentes agitados sob temperatura de refluxo (FASOLI et al., 2006). Após 3h de reação, a mistura reacional havia mudado de um aspecto branco opaco para transparente, sinalizando a formação do complexo entre GFC e óxido de dibutilestanho, o qual pôde ser constatado por cromatografia em camada delgada analítica. O solvente foi então substituído por isopropanol (2mL) e foram adicionados cloreto de tosilato (44,90mg) e trietilamina (32,5µL), sendo a reação mantida sob agitação à temperatura ambiente. Após 1h, foi adicionada água destilada (2mL) e a fase isopropanol/água foi particionada com hexano por três vezes (4mL cada) para remoção do óxido de dibutilestanho. A fase aquosa foi seca para dar origem a um sólido amarelado oleoso e o composto desejado obtido por cromatografia em camada delgada preparativa (fase móvel clorofórmio:metanol:água, 65:25:4 v/v/v) em um rendimento de 65,36%. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 2,33;2,42 (3H, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$), δ 3,20 (9H, N^+CH_3), δ 3,61 (1H, SO_3CH_2); 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}$), δ 3,77–4,08 (2H, CH_2N^+ ; 1H, SO_3CH_2 ; 2H, CH_2OP), δ 4,24 (2H, POCH_2), δ 7,21, 7,43; 7,67, 7,78 (4H, C_6H_4).

3.2.6. Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC e resina de Wang-glicina-ácido hidroxi-hexadecanóico

3.2.6.1. Tentativa de acoplamento com hidreto de sódio e 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno (DBU)

Uma suspensão de NaH (7,86mg, 0,126mmol) em DMF (2mL) foi agitada sob borbulhamento de gás argônio junto ao derivado de ácido hidroxi-hexadecanóico

ligado a glicina e resina de Wang (0,21mmol) por 30 minutos, conforme adaptado de Wissner et al. (1985). O meio reacional foi então escoado, a resina lavada com diclorometano três vezes e uma solução de 1-O-tosil-GFC (52,26mg, 0,126mmol) em DMF (3mL) gotejada lentamente sob a mesma. Depois de aproximadamente 12 horas de reação (“overnight”) sob a agitação com gás argônio, a resina foi filtrada e novamente lavada com diclorometano três vezes. Após secagem em alto vácuo, uma amostra foi submetida à clivagem por ácido trifluoroacético 95% e enviada para análise de RMN ^1H . O mesmo protocolo foi posteriormente repetido ao se substituir NaH por uma solução de DBU em DMF (0,126mmol em 2mL) mas em ambos os casos não se obteve o produto esperado.

3.2.6.2. Tentativa de acoplamento empregando diisopropiletilamina (DIPEA)

O derivado de ácido hidroxihexadecanóico ligado a glicina e resina de Wang em DMF (138mg, 0,08957mmol em 1mL) foi agitado sob borbulhamento de gás argônio junto a iodeto de tetrabutilamônio (0,08957mmol, 2,67mg) e DIPEA (0,08957mmol, 13 μL) por 15 minutos à temperatura ambiente (SHIN et al., 2006). Em seguida, uma solução de tosil-O-GFC em DMF (18mg, 0,07464mmol em 1mL) foi lentamente gotejada sobre a mistura reacional a reação prosseguiu sob agitação à temperatura ambiente por mais 12 horas. O solvente contendo excesso de reagentes foi escoado e a resina lavada três vezes com DMF e diclorometano. Após secagem em alto vácuo, uma amostra foi submetida à clivagem por ácido trifluoroacético 95% e enviada para análise de RMN ^1H .

3.2.6.3. *Tentativa de acoplamento entre complexo de GFC-estanho e resina de Wang contendo resíduo de ácido 16-bromo-hexadecanóico*

Anidrido acético (0,7 mL) foi lentamente adicionado a uma solução aquosa de ácido hidrobromídrico 48% (190 μ L) seguida de ácido hidroxihexadecanóico (234 mg) e a mistura agitada a 100°C por 3 horas (BIDD et al., 1983). Os solventes foram removidos em evaporador rotatório, o resíduo dissolvido à quente em éter de petróleo e tratado com carvão ativo para ser filtrado em sílica para isolamento do ácido 16-bromo-hexadecanóico em um rendimento de 85,70%. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,24 (22H, $[\text{CH}_2]_{11}$), δ 1,62 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), δ 1,87 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), δ 2,34 (CH_2COOH), δ 3,40 (2H, CH_2Br).

A uma solução de 38 mg (0,08132 mmol) de acetal GFC-dibutilestanho em 1 mL de DMF foi adicionado peneira molecular (4Å) ativada (122 mg), iodeto de tetrabutilamônio (33mg, 0,08946 mmol) e ácido 16-bromo-hexadecanóico condensado à resina de Wang-Gly-ácido (0,08946 mmol) segundo protocolo descrito na **Seção 3.2.1.2** (KONG; GRINDLEY, 1994). A mistura reacional foi irradiada em microondas a 70°C durante 30 minutos e a resina sequencialmente filtrada em funil de vidro sinterizado com DMF, diclorometano e metanol, tendo sido possível a separação da resina e peneira molecular durante este processo. Após secagem em alto vácuo, uma amostra foi submetida à clivagem por ácido trifluoroacético 95% e enviada para análise de RMN ^1H .

3.2.6.4. *Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC e derivado benzilado de ácido hidroxihexadecanóico*

A uma solução de ácido hidroxihexadecanóico (176 mg, 0,646 mmol) em DMF (1 mL) agitada sobre banho de gelo foi adicionado DBU (108 μ L, 0,710 mmol) seguido de brometo de benzila (85 μ L, 0,710 mmol). A mistura foi deixada sob

agitação a temperatura ambiente “overnight”, concentrada sob pressão reduzida e particionada entre solução HCl 1M e éter etílico. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃, seca sobre Na₂SO₄ e rota-evaporada (MATULIC-ADAMIC et al., 2002). Após cromatografia em coluna clássica empregando sílica flash e 20-30% de gradiente de acetato de etila em hexano, o éster benzílico do ácido hidroxi-hexadecanóico foi obtido em um rendimento de 90,20%. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,22 (22H, [CH₂]₁₁), δ 1,49-1,67 (4H, CH₂CH₂COOH; CH₂CH₂OH), δ 2,35 (CH₂COO), δ 3,63 (2H, CH₂OH), δ 5,13 (2H, CH₂OC₆H₅), δ 7,36 (5H, C₆H₅).

As primeiras tentativas de condensação direta entre o éster benzílico do ácido hidroxi-hexadecanóico e 1-O-tosil-GFC foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por Wissner et al. (1985), conforme descrito na **Seção 3.2.6.1**. Já nas tentativas em que se objetivou realizar a condensação através de intermediário epóxi-GFC, o protocolo adotado foi o proposto por Bittman et al. (1984), conforme descrito a seguir. Uma suspensão de 1-O-tosil-GFC (184,3 mg, 0,45 mmol) em acetonitrila anidra (3 mL), foi gotejado DBU (135 µL, 0,90 mmol) em banho de gelo e a reação foi mantida a 0°C por 3 horas. Em seguida, éster benzílico do ácido hidroxi-hexadecanóico foi adicionado (254mg, 0,56 mmol) e a reação prosseguiu sob refluxo durante 36 horas. Após purificação por cromatografia em alumina empregando clorofórmio:metanol (9:1, v/v), o produto reacional foi isolado dos materiais de partida ainda visíveis por cromatografia em camada delgada analítica com rendimento de 23%.

3.2.7. Estudos de bioinformática

3.2.7.1. Análise das sequências de receptores de PAF de animais

As sequencias dos receptores de PAF de diferentes espécies animais (**Tabela 1**) foram baixadas do NCBI protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e

TreeFam database (<http://www.treefam.org/>). O alinhamento das sequências foi realizado pelo software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), um método global progressivo cujo algoritmo atua em duas etapas distintas. Inicialmente uma “árvore guia” é construída com base na similaridade das sequências e então o alinhamento aos pares é realizado de acordo com a ordem estabelecida pela árvore. Por ser gratuita e de boa qualidade, ClustalW é a ferramenta mais utilizada no alinhamento de sequências de proteínas e nucleotídeos (HIGGINS e cols., 1994).

As análises de resíduos conservados e das relações evolucionárias entre os receptores foram realizadas pelo software MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), software especialmente desenhado para análise comparativa de proteínas e genes e investigação de suas relações evolucionárias. MEGA disponibiliza ferramentas para a manipulação de dados locais e de servidores da web, para a análise estatística dos dados e visualização dos resultados (TAMURA et al., 2007). Empregou-se para a análise filogenética o algoritmo “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987) com mil repetições de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolucionárias foram calculadas utilizando o método de correção “Poisson” (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio e todas as posições contendo “gaps” foram eliminadas.

Tabela 1 - Sequências dos receptores de PAF selecionadas para o estudo.

Animal	Sequencia
Baiacú (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	MLTPDSDFLDSQFRYDLFSPAYGVI FILGLLANLYVLFILRCLQEARAMGEIRIYMTNLS IADLLFVCALPFWIGYYSRHGNWVYTFMCRLTGSLFFINTYCSVFLGAI SVNRYWAVT RPLDTASSDHRLRGI I ISVI IWVLTISMAIPYLVSPATNTDENLVVRCFEGYQNQTDSEK KTVAATHFAI IGLFFVVFALVLCNLLIAQALLSSNAKSLQHTGSSRSTSSQRPRGVKRR ALQMLLAVVGVFVVCFLPHHVIQGAWTLAVLQIKQGWGHVDWSQGTRQALNDAHQITLLL MGLNCILDVVCYFATKKFRYILGHVRRRLRKGDCSQVTMSQISTEGRNQSQVLPVHQE LEM

Animal	Sequencia
Boi (<i>Bos taurus</i>)	MEPNNSFRVDSEFRYTLFPIFYISIVFVLGVIANASYVLWVVFARLYPSKKFNEIKIFMVNLT MADLLFLVTLPLWIVYYYNQGDWILPKFLCNLAGCFFFINTYCSVAFLAVITYNRFQAVT RPIKTAQATTRKRGIILSLIIWVSVGAASYFFVLDSTNREPNTGSGANI TRCFEHEYKKG SIPVLTIIHIFLVFSFFLVFLIILFCNLVI IRTLLTQQVQIQRNAEVKRRALWMMVCTVLAV FIIICFVPHHLVQLPWTLAELGFQD TDFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLTKKF RKHLTEKLYSMRESRKCSRATSETGTEVVMQLKDVPVKS LKY
Cabra (<i>Capra hircus</i>)	MEPNNSFRVDSEFRYTLFPIFYISIVFVLGVIANASYVLWVVFARLYPSKKFNEIKIFMVNLT MADLLFLVTLPLWIVYYYNQGDWILPKFLCNLAGCFFFINTYCSVAFLAVITYNRFQAVT RPIKTAQATTRKRGIILSLIIWVSVGAASYFFVLDSTNSEPKKTGSGNI TRCFEHEYKKG SIPVLI IHI FLVFSFFLVFLIILFCNLVI IRTLLTQQVQMQRNAEVKRRALWMMVCTVLAV FVICFVPHHLVQLPWTLAELGFQD TDFHQGINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLTKKF RKHLTEKLYSMRESRKCSRATSETGTEVVVQLKDAP I KSLKY
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	MEHNGSFRVDSEFRYTLFPIVYSVIFILGVVANGYVLWVFANLYPSKKLNEIKIFMVNLT MADLLFLITLPLWIVYYNEGDWILPNFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRYQAVA YPIKTAQATTRKRGISLSLIIWVSVATASYFLATDSTNLVFNKDGSGNI TRCFEHEYEPY SVPILVVHVFIAFCFFLVFFLIIFYCNLVI IHTLLTQPMRQQRKAGVKRRALWMMVCTVLAV FIIICFVPHHVQLPWTLAELGYQTNFQAINDAHQITLCLLSTNCVLDPIIYCFLTKKF KHLSEKFYSMRSSRKCSRATSDTCTEVI V PANQTPIVSLKN
Cavalo (<i>Equus caballus</i>)	MESNNSRVDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVIANASYVLWVFGHLYSSKQLNEIKIFMVNLT VADLLFLLTLPLWVYYYNQGNWIFPKFLCNLTGCCFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVA KPIKTAQASTRKRGISLSLVIWLAIVAAASYFLFMDSTNIVPNKAGSGNI TRCFEHEYKKG SVPVLI IHI FLVFSFFLVFLIILVCNLVI IRKLLMQPEHLQRNAEVKRRALWMMVCTVLAV FIIICFVPHHMVQLPWTLAELGFQNNKFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLT KSF RKHLTQKLYSLRSSRKCLATTETGIEGVMLNQIPVNSLKN
Chimpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	MEPHDSSHMDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVIANGYVLWVVFARLYPSKKFNEIKIFMVNLT MADMLFLITLPLWIVYYQNQGNWILPKFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQANTRKRGISLSLVIWVAIVGAASYFLILDSTNTVPNGAGSGNVTRCFEHEYKKG SVPVLI IHI FIVFSFFLVFLIILFCNLVI IRTLLMQPVQQRNAEVKRRALWMMVCTVLAV FIIICFVPHHVQLPWTLAELGFQDSKFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLT KKF RKHLTEKFYSMRSSRKCSRATTDTVTEVVVFPNQIPGNSLKN
Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	MEPHNSRVDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVVANGYVLWVFAHLYPSKKLNEIKIFMVNLT VADLLFLITLPLWIIYYHNQGNWILPKFLCNLAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT QPIQTAQATTRKRGI ALSLVIWVSI SAAATYFLILDSTNIVADKAGSGNVTRCFEHEYKKG SMPVLLIHI FIVASFFIVFLIILICNLVI IRTLLTQPQQPRNAEVKRRALWMMVCTVLAV FIIICFVPHHVQLPWTLAELGFRNTDFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLT KKF RKHLTEKIYSMRNSRQCSRVTMETGTEAIVPLSQVPAKALKN
Cuíca (<i>Monodelphis domestica</i>)	AMDEDNFRIDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGFVSNAYVLWVFI SLDPSSKKLNEIKIFMVNLT VADLLFLFALPLWIVYYFNKGNWLLPKFLCNVAGCLFFINTYCSVCF LGVITYNRFQAVT DPIKAAQSTTRRRGILLSTIIWVVI VGCASYFLISDATNSVPSKMTGENVTRCFEHEYKKG SIPVLLIHFVIVLCCFFIVFLVILVCNVI I RTLLAQPLQPQSNADVKQKALWMMVCTVMAV FFICFVPHHVQLPWTLAELQIGFQDNDQVHQLINDAHQVTLCLMS INCVLDPIIYCFLT KKFRKHLKERLQSMKGRKCSRVTSDTGVEAVVPLNNFPVNSKNN

Animal	Sequencia
Elefante (<i>Loxodonta africana</i>)	MESNESSHLDSEFRYILFPIFYSIIFVLGVIANGYVLWVFASLYPSKKLNEIKIFMVNLT MADLLFLVTLPLWIVYYNQGNWILPKFLCNLAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQATTRKRGITLSLVIWVTIVAAAASYFLFMDSTNTVSDKTGLSNI TRCFEHYEKG SVPVLSIHIFIVCSFFLVFFIILVCNLVI IRTLLTQPQVQQRNAEVKRRALWVMCTVLAV FIICFVPHHMVQLPWTLAELQFQNN TSHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLT KKF RKHLTEKLYSMRSSQKCSRATIDTGTGIEVVAPLNQRPVSS LKN
Esgana-gata (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	MVSTTEQVALNVTPRLDSSVFLDSEFRYVAFPPVYSIIFILGITANLYVLFVLRRLRESK SMGEICIMINLTIGDLLFVTFLPFWIDYFRRDGNWIFQDVMCRLSGSLFFINTYSSVLF LCAISVSRYWAVTRPLDVATSDHRTRGIILSVFIWLF TLATAILFLIQPGTHTDDNNVTR CFEGYQNTPVSTKVHVFAFHLTIVIGFFLVFFVVCNFLIARTLLSKGPPRAEKRRGVK QRALQMLFSVVGVFVVCFLPHHACQCFWTLAVLHIEEGFGHVDWSQKTRQALNDAHQITW LLMSLNCILD PVVYFFATQKFKGFIMAHIKKIARGGSCSTTLTSEGSMHSQRHQSDIQTS V
Esquilo (<i>Spermophilus tridece</i>)	MEPNGSSRV DSEFRYILFPIIYSIIFVVGVIANGYVLWVFAHLYPSKKLNEIKIFMLNLT VADLLFLITLPLWIIYYNQGNWILPKFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIRTAQATTRKRGIYLSLVIWVFI VAAAASYFLI LDSTNIVTPKAGLGNITRCFEHYEKG SVPVLVIHIFIVSFFLVFLIILFCKLVI IRTLLLQPQVQKQKHAQV KRRALWVMCAVLAV FVICFVPHHVQLPWTLAELGYQDSYFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLT KKF RKHLTEKFYNI RSSRKCSRVT TDTGTDVVMPINQIPVDSLKN
Galo (<i>Gallus gallus</i>)	MSGEGKGDAAAGSVCPIDSEFRYSLFTVFYSIIFILGFVANCYVLWIFSR IYPTKKLNEIK IFMLNLTVADLLFLV TMPLWIVYYHNGNWIMPKFLCSVAGSLFFVNTYASVAFLMVITY NRYQAVTNP IRAAQFTTQRGIFLSAAIWIITVGSALYIIFDDNTNVEKIDSINYTRCFE RYDSTGNVTPVLAIHIIICTLFYVIFLFI LTWNI I IRTLFSKSGQQRKSAHV KQALWM VCTVLVVFIIISFVPHHIVDLPWTLTVLEQWKKENCHLRQQLNDAHQVTLCLL SMNCVLDP VIYCFLT KKFQKHVSQNLKSMKGRKCSRQT TDTVIE
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	MEPHDSSHMDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVIANGYVLWVFARLYPCKKFNEIKIFMVNLT MADMLFLITLPLWIVYYNQGNWILPKFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQANTRKRGISLSLVIWVAIVGAASYFLI LDSTNTVPDSAGSGNVTRCFEHYEKG SVPVLI IHIFIVSFFLVFLIILFCNLVI IRTLLMQPVQQRNAEVKRRALWVMCTVLAV FIICFVPHHVQLPWTLAELGFQDSKFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLT KKF RKHLTEKFYSMRSSRKCSRAT TDTVTEVVVFPNQIPGNLKN
Macaco Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	MEPHDSSHVDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVIANGYVLWVFARLYPSKKFNEIKIFMVNLT MADMLFLITLPLWIVYYNQGNWIFPKFLCNLAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQANTRKRGISLSLVIWVAIVGAASYFFI LDSTNTVPNSAGSGNITRCFEHYEKG SVPVLI IHIFIVSFFLVFLIILFCNLVI IRTLLMQPVQQRNAEVKRRALWVMCTVLAV FIICFVPHHMVQLPWTLAELGFQNSKFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLT KKF RKHLTEKFYSMRSSRKCSRAT TDTVTEVVVFPNQIPVNSLKN

Animal	Sequencia
Musaranho (<i>Sorex araneus</i>)	MGSNDSHRVDSEFRYTLFPIFYYSIIFVLGVIANSYVLWVVFARLYPSKKLSEIKIFMVNLT MADLLFLITLPLWIVYYNQGNWILPKFLCNLTGCGFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT QPIKTAQATTRKRGIIYLSLVIWMAIVSAASYFFFDSTNVVVPNKSGSGNVTRCFEHYEEG SVPVLI IHI FLVCSFFLVFLLIFFCNLVIIRKLLTQPAQLQSNAEVKRRALWVMCTVLA VFSICFVPHHVQLPWTLAELGYRNIQFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPIIYCFLTKKF RKHLSEKFYSLRSSRKCSRATSETGTEVVMPLKQVPANCLQD
Orangotango (<i>Pongo pygmaeus</i>)	MEPHDSSHMDSEFRYTLFPIVYSIIFVLGVIANGYVLWVVFARLYPSKKFNEIKIFMVNLT MADMLFLITLPLWIVYYNQGNWILPKFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQANTRKRGISLSLVIWVAIVGAASYFLI LDSTNTVPNSAGSDNVTRCFEHYEKG SVPVLI IHI FIVFSFFLVFLIILFCNLVIIRTLLMQPVQQORNAEVKRRALWVMCTVLA VFIICFVPHHVQLPWTLAELGFQDSKFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLTKKF RKHLTEKFSMRSSRKCSRATTDTVTEVVVFPNQIPGNSLKN
Ornitorrinco (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	TPSPAPISFTTFPPTESLQGGGDVGRVDSEFRYTLFPVAYSIIFVLGIFANGYVLWVVFAR LYPTKKLNEIKIFMVNLTVADLLFLVIMPLWIVYYWNRGDWILPPFLCNVAGCLFFINTY CSVAFLGVITYNRFQAVTRPIKAAQATTRKRGIVLSLVIWVLIWSSALYFLVAEGTNIAI EASGRNVTRCFESYEKDSQAVLAIHIFIVASFFAVFLIILVCNLTI IHMLLAQPSQAQSV RGAGVKSRLWVMCTVLA VFIICFVPHHVQLPWTLAEVKWHNHRSHQGINDAHQVTLCL LSTNCVLDPVIYCFLTKRFRKHLTEKLR
Ouriço (<i>Erinaceus europaeus</i>)	MGSNDSLVRVDSEFRYTLFPIFYYSIIFALGVIANSYVLWVVFARLYPAKKLNEIKIFMVNLT LADLLFLVTLPLWIIYYNQGNWILPKFLCNLAGCGFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT RPIKTAQSTTRKRGIIISLVIWVAIVSAASYFFFLDSTNTVLNKMGTDNITRCFEHYEKG SIPVLI IHI FLVVSFFVFLIIFFCNLIIIRTLLMQPAQVKRNVKRALWVMCTVLA VFIICFVPHHMVQLPWTLAELGFQNTHFHQFINDVHQITLCLLSTNCVLDPIIYCFLTKKF RKHLTEKLSMRGTSRKCSRATSETGTEVVMPLKPTPANTLKK
Peixe Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	STANSDFLDSNFRYMLFSVYSIIFVVGLLANVYVLFILQCLRKVKMGGEIGIYMTNLT IADLLFVCALPFWIGYYSRGGHWIYEEFLCRLTGSFFFINTYGTILFLGAIISLNRYWAVT QPLNAAAWNHRGRIIVSVLIWLCVSSAIPSLPSEGTQTDKDNLTRCFEGYHNETD TVK RKVAVTHFLIIGLFFVFFLVVMVCNLLIARALLSQPPQTLSSSGRRQRGVKQRALQMLL AVGVFLLCFLPHHVQAPWVLA VLKIKEGWGHVDWNQNTLQTLNDAHQITLVLMLGNCI LDPVIYYFATKKFRFIMAHLKVKVKGEGCSNTLNIQNSVESR
Peixe Paulistinha (<i>Danio rerio</i>)	SYHTNLTQTQITANSNLSILQKKKNRFRYTLFPIFYGVVFLGLIANCYALYVLHRMRES KAMNEIRIYMTNLTVADLLFVSALPFWIDYYMHEGHWRSTEAFCRITGTFFFINTYGSIL FLTVISINRYWAVTKPLKAASSDCWKRGAIISVLIWAFILSASIPQLTKEGIQKEQRMNR SMQRCFEGYHYTDENTKNVLVITHFSIIGLFFLVFLMVIICNISIARALLSQPISQPRAS TGRRPGGTKRRALRMLCAVIGVFVICFLPHHVQGPWVLSVLQLKKYWS'TWTHQTLNDAH QITLMLMGINCLLDPLVYCFAT

Animal	Sequencia
Pika Americana (<i>Ochotona prince</i>)	METLNSSRVDFSEFRYTLFPIVYSII FVLGVVANGYVLWVFANLYPSKKLNEIKIFMVNLT VADLLFLITLPLWII YYYNQGNWVLPKFLCNVAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVT QPIQTAQASTRKRGISLSLII WVVILAIASYFLIMDSTNVVTNMDGSSNVTRCFEHEYKKG SVPVLIHIFIVFCFFVFLIILVCNLI IHTLLMQVQQPRKAEVKRRALWVMCTVLGV FIIICFVPHMVQLPWTLAELGFRDMDFHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLTCKKF RKHLTEKLYSMRSSRKCSRATTDATDIILPLNHMPAGCLKN
Porco (<i>Sus scrofa</i>)	MEPNDSWRVDFSEFRYTLFPIFYSSII FVLGVIANASYVLWVFARVYPSKKLNEIKIFMLNLT MADLLFLVTLPLWII YYYHEGNWILPKFLCNLAGCFFFINTYCSVSFLAVITYNRFQAVT RPIKTAQATTRKRGISLSLII WVAMVAAAASYFFVLSTNIELSKTGAGNLTRCFEHEYKKG SMPVLI IHI FLVFSFFLVFLVILFCNLVI IRTLLTQSVQMORNAEVKRRALWVMCTVLAV FIIICFVPHHIVQLPWTLAELGFQSGNFHQAINDAHQITLCLLSTNCVLDPIIYCFLTCKKF RKHLSEKLFYSLRGSRKCSRVTTEGTETGVVPLSQVPVNSLKK
Porquinho-da-índia (<i>Cavia porcellus</i>)	MELNSSRVDFSEFRYTLFPIVYSII FVLGIIANGYVLWVFARLYPSKKLNEIKIFMVNLT VADLLFLITLPLWIVYYSNQGNWFLPKFLCNLAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRFQAVK YPIKTAQATTRKRGIALLSLVIWVAIVAAAASYFLVMDSTNVVSNKAGSGNITRCFEHEYKKG SKPVLIIHICIVLGFIVFLILFCNLVI IHTLLRQPVKQORNAEVRRALWVMCTVLAV FVICFVPHMVQLPWTLAELGMWPSSNHQAINDAHQVTLCLLSTNCVLDPVIYCFLTCKKF RKHLSEKLNIMRSSQKCSRVTDDTGTETMAIPINHTPVNPICK
Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>)	MEQNGSFRVDFSEFRYTLFPIVYSVIFVLGVVANGYVLWVFATLYPSKKLNEIKIFMVNLT VADLLFLMTLPLWIVYYSNEGDWIVHKFLCNLAGCLFFINTYCSVAFLGVITYNRYQAVA YPIKTAQATTRKRGITLSLVIWISIAATASYFLATDSTNVVPPKDGSGNITRCFEHEPEPY SVPILVVHIFITSCFFLVFLIFYCNMVI IHTLLTRPVRQQRKPEVKRRALWVMCTVLAV FVICFVPHHVQLPWTLAELGYQTNFHQAINDAHQITLCLLSTNCVLDPVIYCFLTCKKFR KHLSEKFYSMRSSRKCSRATSDTCTEVMMPANQTPVLPKKN

3.2.7.2. Busca de seqüências homólogas ao receptor de PAF humano no proteoma de *Typanosoma cruzi*

A busca de sequencias de receptores de membrana acoplados à proteína G no proteoma de *Typanosoma cruzi* foi realizada a confrontando sequencias de GPCRs baixadas do GPCRDB (<http://www.gpcr.org/7tm/>) e o proteoma do parasita depositado no TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). GPCRDB é um sistema de informação classe-específico que coleta dados de GPCRs incluindo sequencias, constantes de ligação e mutações (HORN e col, 2003).

TriTrypDB consiste em uma base de dados que integra informações sobre o genoma de diversos tripasonomatídeos, originalmente fragmentadas em bases de dados como GeneDB, DDBJ, EMBL e GenBank. Atualmente, TriTrypDB integra dados de *Trypanosoma cruzi* e *brucei*, além de *Leishmania braziliensis*, *infantum*, *major* e *tarentolae*. As sequências do genoma de *T. cruzi* correspondem às cepas de CL Brener, Esmeraldo e haplótipos “non-Esmeraldo-like” (41 cromossomos, 67Mb) (ASLETT et al., 2009).

As buscas no proteoma do parasita foram realizadas utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) versão 2.2.22 com algoritmo BLASTp, específico para proteínas (ALTSCHUL et al., 1990). BLAST é um método heurístico para encontrar o melhor alinhamento local entre uma dada sequência e um banco de dados. Um importante aspecto do BLAST é o de não permitir “gaps”, e sim múltiplos resultados de alinhamentos para uma mesma sequência. Os “gaps” são utilizados por muitos softwares para compensar as regiões de inserção ou deleção entre sequências alinhadas, buscando preservar o maior número possível de resíduos alinhados. O algoritmo do BLAST lança mão de estatísticas de alinhamentos sequenciais sem “gaps”, procurando eliminar estatisticamente homologias casuais (MUNIZ, 2003).

As sequências de proteínas selecionadas pelo BLAST foram submetidas à análise de domínios transmembrana utilizando o software Phobius (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004) e as proteínas contendo sete domínios transmembrana preditos foram alinhadas às sequências dos receptores de PAF de espécies animais. Após análise dos resíduos conservados realizada com auxílio do MEGA, a sequência da proteína contendo o maior número de resíduos conservados foi

submetida à predição de regiões transmembrana por outros quatro programas: TMpred, HMMTOP, TMHMM e ConPred II.

TMpred é um dos métodos que utilizam modelos probabilísticos para predizer as regiões transmembrana de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos. Seu algoritmo se fundamenta na análise estatística de uma base de dados de proteínas transmembrana conhecidas, utilizando a combinação de diversas matrizes de peso para o cálculo dos valores de escore (HOFMANN; STOFFEL, 1993).

HMMTOP realiza predições de domínios transmembrana empregando modelos do tipo “Hidden Markov”, ou seja, modelos estatísticos no qual se assume que o sistema a ser modelado é um processo de Markov com estado não diretamente observável (uma revisão detalhada sobre modelos “Hidden Markov” pode ser consultada em Rabiner & Juang, 1986). Neste caso, os modelos apresentam cinco estados: “loop” intracelular, cauda de hélice intracelular, hélice, cauda de hélice extracelular e “loop” extracelular. Para uma dada sequência de aminoácidos de um domínio transmembrana, a orientação mais provável é determinada através do modelo. Em lugar de considerar apenas a composição absoluta de aminoácidos dos diferentes segmentos da proteína, HMMTOP realiza uma busca por combinações de estados que representem uma maior divergência na distribuição de aminoácidos. A ideia central neste processo é de que alterações na topologia da proteína refletem em grandes mudanças na distribuição de aminoácidos (máxima divergência) (TUSNÁDY; SIMON, 2001).

De maneira análoga ao HMMTOP, TMHMM também emprega modelos de “Hidden Markov” mas com sete tipos de estados: núcleo da hélice, topo da hélice intracelular, topo da hélice extracelular, “loop” curto intracelular, “loop” curto

extracelular, “loop” longo intracelular e “loop” longo extracelular. Cada estado tem uma distribuição de probabilidade estimada a partir de proteínas de membrana com topologias determinadas experimentalmente. Os resultados do TMHMM se referem à topologia da proteína mais provável predita de acordo com o modelo (KROGH et al., 2001).

Phobius é considerado um dos mais precisos softwares para predição de topologia de proteínas. Embora também empregue modelos do tipo “Hidden Markov”, Phobius é o único programa capaz de discriminar entre regiões transmembrana e peptídeos sinalizadores *N*-terminais, cadeias de aminoácidos curtas (3 a 60 aa) que direcionam o transporte da proteína. Outros programas foram projetados apenas para detectar domínios transmembrana e, conseqüentemente, normalmente interpretam os peptídeos sinalizadores como regiões transmembrana (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004).

Diferentemente de todos os programas já citados, o sistema de predição utilizado pelo ConPred II é do tipo consensual, sendo os resultados gerados a partir de vários métodos incluindo KKD, TMpred, TopPred II, DAS, TMAP, MEMSAT 1.8, SOSUI, TMHMM 2.0 e HMMTOP (ARAI et al., 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese de derivados PAF immobilizados em resina utilizando D-Manitol

A síntese dos derivados propostos neste trabalho implica que os fosfolipídios estejam ligados a uma resina insolúvel para que, após a interação com os prováveis receptores de PAF de *T. cruzi*, estes possam ser isolados dos demais componentes celulares do parasita. Para tanto, foi escolhida a estratégia de síntese convergente, na qual diferentes partes da molécula são sintetizadas separadamente para posterior acoplamento (**Figura 9**).

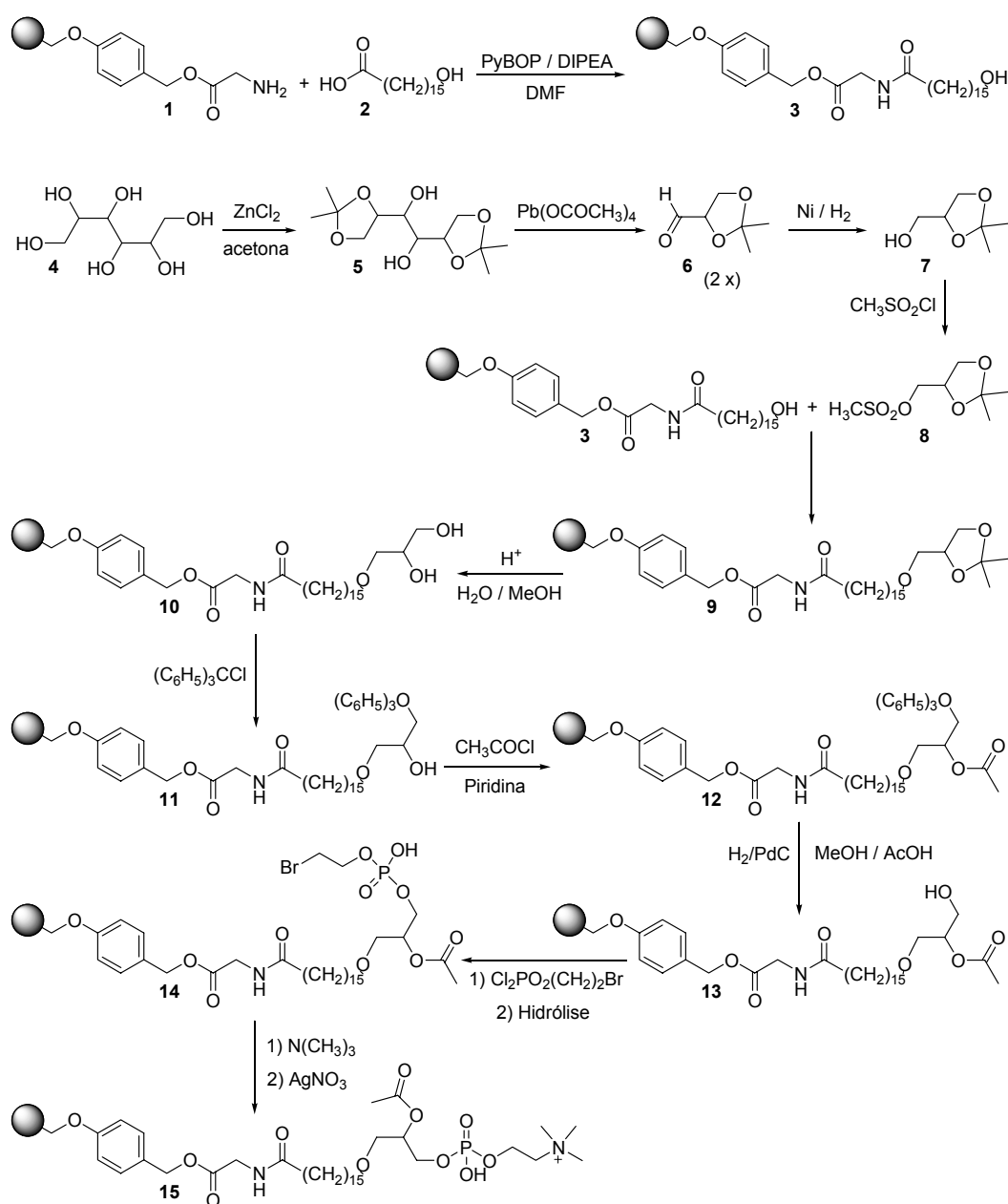


Figura 9 - Fluxograma de síntese de derivados do PAF a partir de D-Manitol

Desse modo, uma cadeia com 16 átomos de carbono análoga à da molécula de PAF é introduzida na resina através do acoplamento entre ácido hidroxihexadecanóico e o resíduo de Glicina da resina (CHAN; WHITE, 2000), gerando o intermediário-chave **3 (Figura 9)**. Em seguida, a molécula de D-Manitol seria sequencialmente modificada para a obtenção do intermediário **8** (GODFROID et al. 1987), o qual poderia ser acoplado ao intermediário **3**. Após sucessivas modificações do produto desta reação, **(9)**, (GODFROID et al. 1987) seria possível chegar ao produto final com a estereoquímica adequada num total de 12 etapas.

4.1.1. Acoplamento do ácido hidroxihexadecanóico à resina de Wang-glicina

A resina de Wang é um dos suportes utilizados em síntese em fase sólida com aminoácidos *N*-Fmoc protegidos, não apenas pela sua facilidade de manipulação, mas também pela possibilidade de clivagem seletiva do peptídeo na presença de ácido trifluoracético (TFA). É composta por mistura de clorometilpoliestireno (50-100, 100-200, 200-400 mesh) com divinilbenzeno (1%), modificada com unidades de álcool hidroxibenzílico. Com esta resina, é possível ligar cerca de 0,5 até 1,6 mmol de reagente por grama de resina, o que representa alta eficiência e rendimento para obtenção do produto desejado. Neste trabalho, a resina utilizada para acoplamento de ácido hidroxihexadecanóico **(2, Figura 9)** foi a Wang-FmocGly **(1, Figura 9)** (NovaBiochem) com capacidade de ligação de 0,65 mmol/g de resina.

O primeiro resíduo a ser introduzido na resina é extremamente importante pois, se a taxa de ligação for baixa, o rendimento do produto final também será baixo. Desta forma, a aquisição da resina comercial Wang-FmocGly, previamente acoplada ao resíduo de glicina (Gly), permite evitar problemas decorrentes de uma

baixa taxa de acoplamento normalmente obtida para o primeiro aminoácido. O acoplamento de **2** ao resíduo de glicina da resina foi realizado em frasco empregado para síntese em fase sólida, contendo placa sinterizada e torneira de três saídas, as quais permitem a agitação da mistura reacional através do borbulhamento de gás argônio (**Figura 10**).

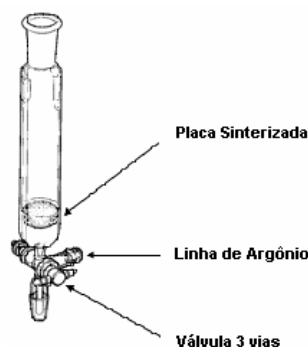


Figura 10 - Frasco para síntese em fase sólida.

Antes de iniciar a reação de acoplamento propriamente dita, foi necessária a remoção do grupo protetor *N*-Fmoc ligado a Gly (**20**). O procedimento clássico de desproteção do grupo *N*-Fmoc envolve o tratamento do aminoácido acoplado à resina com piperidina 20% em DMF (**Figura 11**).

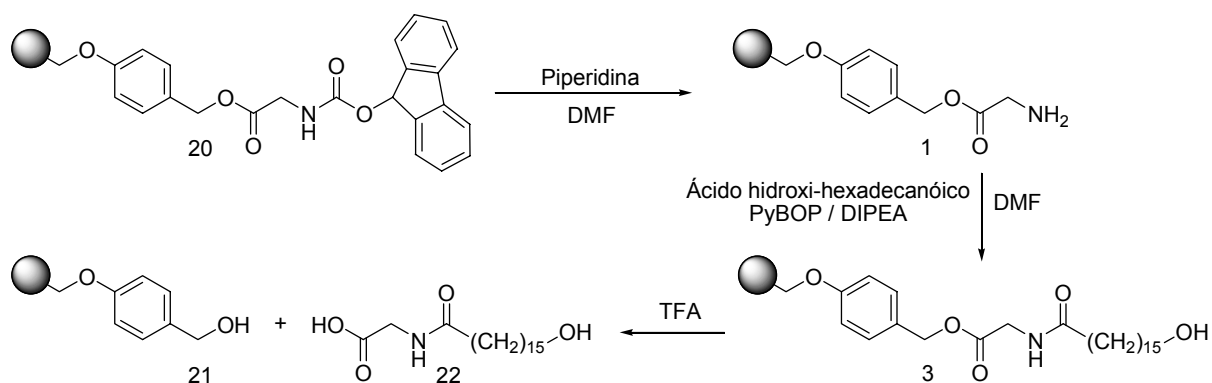


Figura 11 - Desproteção do grupo amino de Gly por remoção do grupo *N*-Fmoc seguido de acoplamento do ácido hidróxi-hexadecanóico à resina e clivagem do aminoácido por ácido trifluoroacético (TFA) para análise do produto formado.

O mecanismo da clivagem do grupo *N*-Fmoc ocorre via formação do ânion dibenzofulveno estabilizado (**Figura 12**). O grupo Fmoc (**23**) é desprotonado pela base piperidina (**24**) para fornecer o ânion ciclopentadienílico (**25**), o qual se rearranja para o correspondente derivado dibenzofulveno (**26**). O ânion carboamida, instável, se decompõe imediatamente para fornecer dióxido de carbono e grupo amino livre. Posteriormente, a molécula de dibenzofulveno (**26**) sofre ataque da base piperidina (**24**), originando o aduto dibenzofulveno-piperidina (**27**). O derivado dibenzofulveno é um composto aromático passível de ser detectado no UV, tornando possível, portanto, a monitorização mais detalhada das reações de acoplamento.

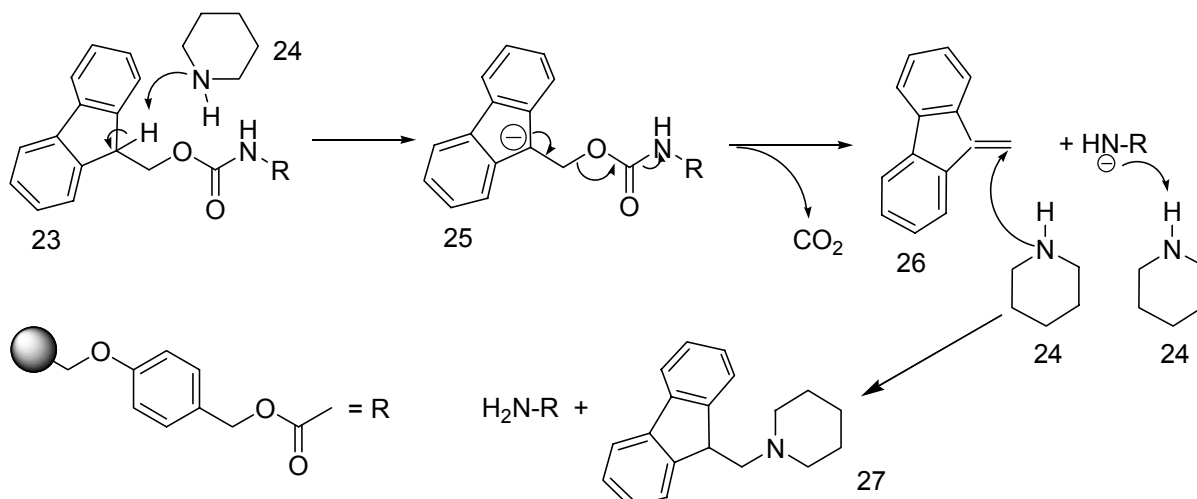


Figura 12 - Procedimento clássico de desproteção de grupo *N*-Fmoc com conseqüente formação de dibenzofulveno.

O acoplamento foi efetuado em DMF na presença do reagente de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidínio) e a base DIPEA (diisopropiletilamina) (**Figura 11**) (CHAN; WHITE, 2000). O mecanismo da reação de acoplamento envolve inicialmente a desprotonação em meio alcalino do grupo ácido carboxílico do derivado **2** a ser introduzido na resina. O átomo de oxigênio negativamente carregado ataca o íon fosfônio da molécula de PyBOP (**Figura 13, A**), liberando o resíduo de hidróxi-benzotriazol e conduzindo à

formação de um éster tripirrolidíniofosfônio (**Figura 13, B**). A esterificação do grupo carboxilato de **2** é facilitada devido à polarização da ligação fósforo-oxigênio do reagente PYBOP. O grupo hidróxi-benzotriazol nucleofílico ataca o carbono carbonílico do composto **B**, com o subsequente deslocando a porção oxitripirrolidíniofosfônio (**Figura 13, C**). O éster resultante contém o grupo abandonador necessário que será ativado durante o ataque nucleofílico do grupo amino terminal do aminoácido (**Figura 13, D**), resultando na formação do produto desejado (**Figura 13, E**).

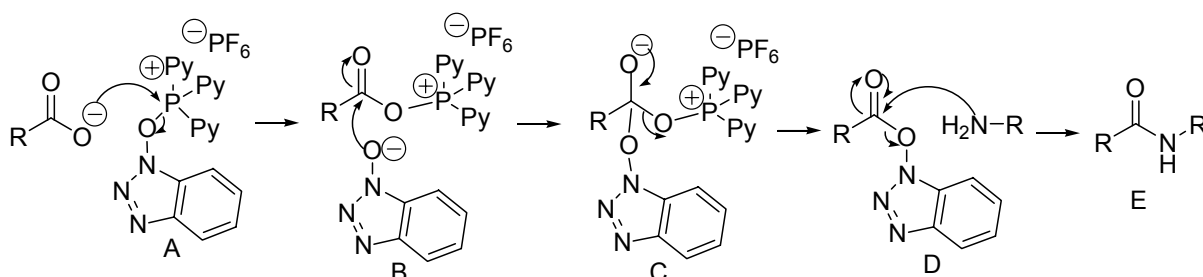


Figura 13 - Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo a utilização do reagente PyBOP

O tempo da reação de acoplamento foi de 6 horas e esta foi monitorada a partir de amostras de resina pelo teste de Kaiser, capaz de avaliar a existência de grupo amino livre. Após o acoplamento, a mistura reacional foi filtrada e a resina lavada três vezes com DMF, diclorometano e metanol. Após secagem em alto vácuo, uma amostra da resina foi clivada e enviada para análise de RMN ^1H para comprovação do acoplamento.

O espectro de RMN ^1H (**Anexo 1**) confirma a formação do produto desejado, sendo possível constatar os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alquílica do ácido hidróxi-hexadecanóico (δ 1,25, 20H; δ 1,37-1,92; 6H) bem como sinais de hidrogênios correspondentes ao aminoácido glicina (δ 2,28, 2H), anteriormente acoplado à resina de Wang. As atribuições dos sinais relativos ao ácido hidróxi-

hexadecanóico foram realizadas com base nos dados descritos por Jakob, Voss e Gerlach (1996).

4.1.2. Síntese de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol a partir de D-manitol

A reação de formação 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol (**5**, **Figura 9**) foi realizada neste trabalho a partir da proteção seletiva das hidroxilas terminais do D-manitol (**4**) em acetona catalisada por cloreto de zinco. Este intermediário pode ser empregado para a síntese de diversos produtos tais como glicerofosfato, monoglicerídeos alifáticos, α,β -diglicerídeos, triglicerídeos, álcool batílico entre outros, conforme exposto por Baer (1945). O autor descreve a síntese de **5** a partir de **4** empregando acetona e cloreto de zinco a temperatura ambiente sob agitação por 18 horas, sendo o produto final obtido com 42% de rendimento a partir da recristalização em éter de petróleo. Esta técnica foi posteriormente modificada por Morpain et al. (1990), na qual a recristalização em tolueno a 110°C resultou em aumento do rendimento para 61%.

A síntese do derivado diacetoneídeo **5** foi também realizada por Schmid et al. (1991) a partir de **4** empregando 2,2-dimetoxipropano e SnCl_2 em 1,2-dimetoxietano sob refluxo por 1 hora (rendimento de 54%). Debost, Gelas e Horton (1983) reagiram **4** com 2-metoxipropano em presença de quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico em *N,N*-dimetilformamida (DMF) por 4 horas à temperatura ambiente para a obtenção do diacetal **5** com 92% de rendimento. Entretanto, outros dois grupos de pesquisa obtiveram apenas 36-40% de rendimento repetindo os procedimentos descritos pelos últimos autores (Kuszmann; Tomori; Meerwald, 1984; Chittenden, 1991).

Seguindo os procedimentos descritos por Tipson e Cohen (1968), **4** foi adicionado a uma mistura de $ZnCl_2$ em acetona anidra e agitação foi mantida por 2 horas em banho de gelo. Após adição de solução aquosa de carbonato de potássio, a mistura foi extraída com clorofórmio e a fase orgânica concentrada para fornecer o composto desejado **5** com um rendimento de 72%. RMN 1H (**Anexo 2**) indica a formação do produto desejado, demonstrando a presença dos hidrogênios das metilas do grupo protetor em torno de δ 1,20 demais hidrogênios próximos a δ 3,80.

4.1.3. Tentativa de síntese de 2,3-O-isopropilideno-D-gliceraldeído a partir de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol

Dando prosseguimento à sequência descrita no esquema 4.1, foi realizada a tentativa de síntese do precursor 2,3-O-isopropilideno-D-gliceraldeído (**6**) a partir do intermediário **5** preparado na etapa anterior. O composto **5** foi dissolvido em tolueno e tetraacetato de chumbo adicionado sob agitação branda (BAER; HERMANN; FISCHER, 1939). Após 3 horas, foi avaliado o consumo do agente oxidante tetraacetato de chumbo com solução de iodeto de potássio/amido, a qual expressa sua presença pela mudança da coloração branca original para azul ou preta. A ausência de tetraacetato de chumbo foi então constatada, porém análise de cromatografia em camada delgada analítica sugeriu apenas a presença do material de partida **5**, posteriormente confirmada por RMN 1H . Acredita-se que a não obtenção do produto esperado esteja associada ao tetraacetato de chumbo empregado, o qual devido ao longo período de armazenagem já se encontrava provavelmente decomposto.

4.2. Síntese de Derivados PAF imobilizados em resina utilizando L-alfa-fosfatidilcolina extraída de gema de ovo

A preparação dos derivados propostos no projeto partindo-se de D-Manitol foi abandonada já que revisão adicional da literatura demonstrou que a síntese destes compostos poderia ser realizada em apenas cinco etapas através de modificações semi-sintéticas da L-alfa-fosfatidilcolina (L- α -FC) extraída de gema do ovo (**Figura 14**). Neste sentido, as cadeias alquílicas da L-alfa-fosfatidilcolina podem ser clivadas em meio básico para dar origem à da L-alfa-glicerilfosforilcolina, núcleo que preserva o grupo fosfocolina ligado à posição 3 do glicerol, possibilitando a produção de diversos análogos do PAF substituídos nas posições 1 e 2. Neste novo protocolo de síntese, a etapa de acoplamento do ácido hidroxi-hexadecanóico à resina de Wang-glicina foi mantida inalterada, como mostrado na **Figura 9**.

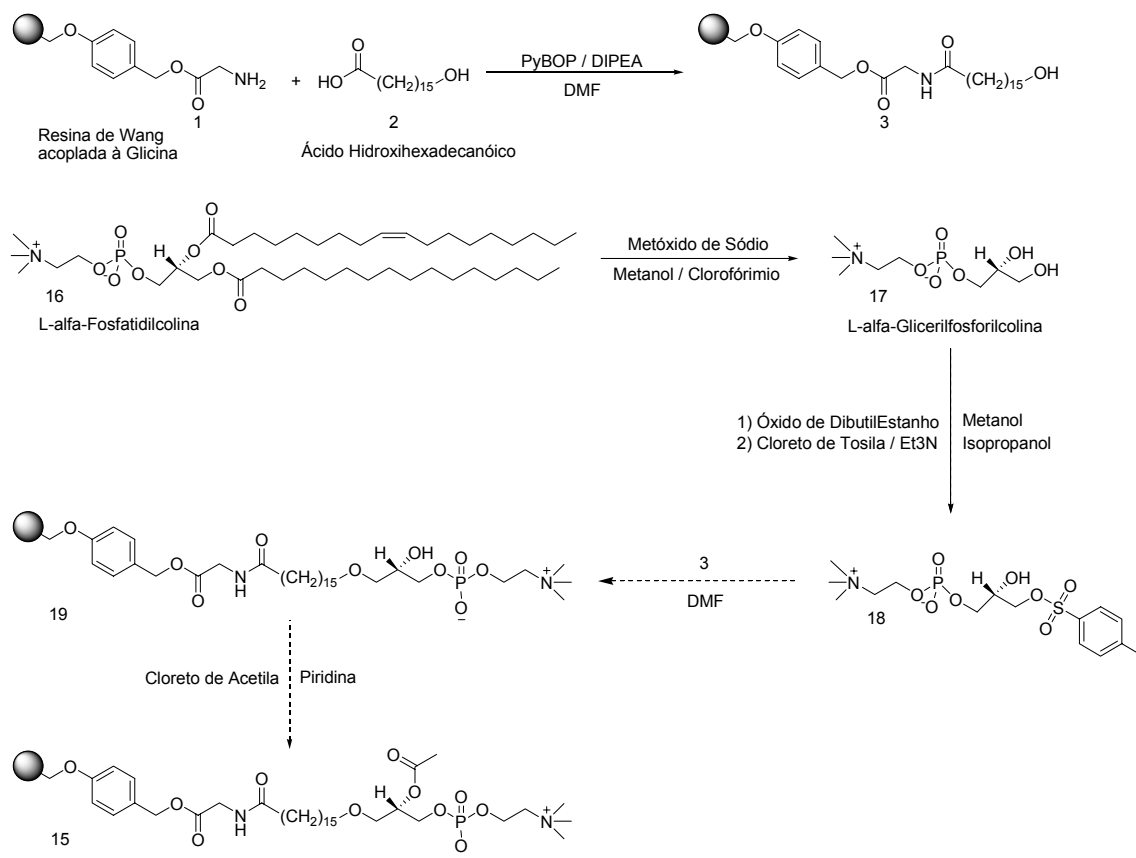


Figura 14 - Síntese de derivado de PAF imobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo.

4.2.1. Isolamento de L-alfa-fosfatidilcolina a partir da gema do ovo

A L-alfa-Fosfatidilcolina (L- α -FC) ou simplesmente fosfatidilcolina consiste em um dos três principais componentes da lecitina, junto à fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol (**Figura 15**). As fontes mais comuns para obtenção de lecitina são a soja e a gema do ovo. A extração de L- α -FC da gema de ovo apresenta vantagens sobre a soja visto que a lecitina de ovo é composta em maior proporção por L- α -FC (80,5%), seguida de apenas 11,7% de fosfatidiletanolamina. A lecitina representa 10% da massa úmida da gema do ovo e cerca de 22% do total de sólidos nela presentes (CHI; LIN, 2002).

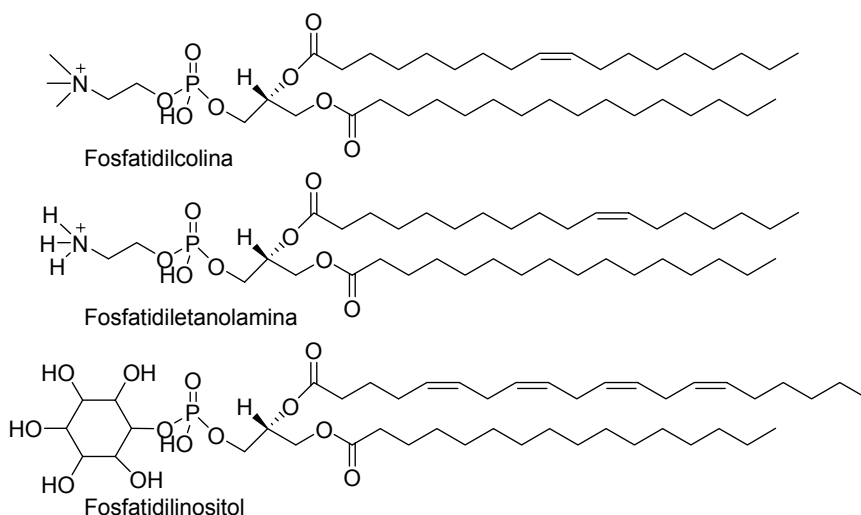


Figura 15 - Estrutura química dos fosfolipídios que compõe a Lecitina. **A** = Fosfatidilcolina, **B** = Fosfatidiletanolamina e **C** = Fosfatidilinositol.

Visando o isolamento da L- α -FC (**16**) a partir da gema de ovo, os procedimentos descritos por Palacios e Wang (2005) foram inicialmente adotados (**Figura 16**). Segundo os autores, a extração inicial de gemas de ovos com etanol permite a remoção de grande quantidade dos lipídios neutros (tais como colesterol e pigmentos) e da água naturalmente presente no material. Subsequente remoção das impurezas restantes é alcançada por uma segunda extração com acetona, e o isolamento de L- α -FC é realizado por cromatografia em coluna clássica em alumina

empregando clorofórmio:metanol (1:1, v/v) como fase móvel (PALACIOS; WANG, 2005).

Na prática, ao se empregar o método descrito acima os resultados não foram satisfatórios. Embora tenha sido possível constatar a presença de L- α -FC após a extração com clorofórmio:metanol, subsequente cromatografia em coluna não se mostrou totalmente eficiente para a isolamento da mesma visto que um segundo composto havia eluído concomitantemente nas frações correspondentes à fosfatidilcolina. Devido à coloração alaranjada, acredita-se que este contaminante seja o caroteno, substância presente em grandes quantidades nas gemas de ovos e que lhes confere sua coloração natural.

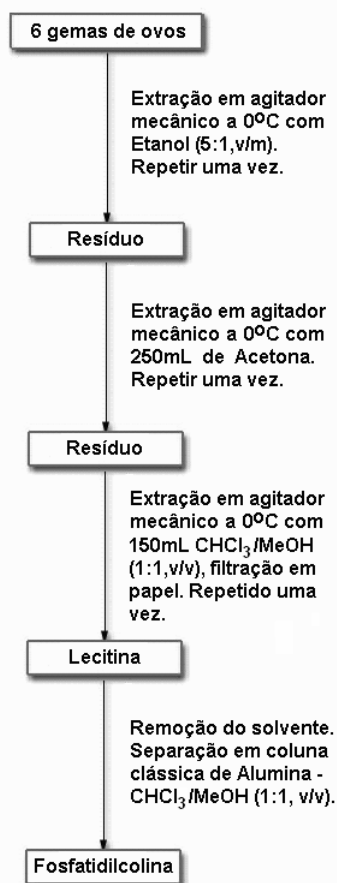


Figura 16 - Processo de isolamento de Fosfatidilcolina a partir de gemas de ovos. Adaptado de Palacios e Wang (2005) e Renkonen (1962).

Para entender porque o isolamento da L- α -FC não foi completo, nova pesquisa bibliográfica foi efetuada. Embora não tenha sido possível encontrar outros trabalhos além do publicado por Palacios e Wang (2005) que apontem a utilização do etanol como um solvente adequado para separação de lipídios neutros dos fosfolipídios presentes nas gemas de ovos, a extração por acetona se mostra adequada para esta finalidade visto que esta apresenta o maior poder de extração de lipídios neutros/lecitina entre os solventes relacionados. Dessa forma, a acetona permite solubilizar 3,6 vezes mais lipídios neutros do que lecitina enquanto para o éter, por exemplo, esta relação é de 2:1 (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Quantidade recuperada de lipídios totais, lecitina e lipídios neutros, empregando quatro diferentes solventes na extração de 50g de gema de ovo crua* (Yano; Fukinbara; Takano, 1979).

Solvente (150 g)	Lipídios totais, g	Conteúdo de lecitina, g	Conteúdo de lipídios neutros, g
Éter	12,0	4,0	8,0
Metanol	3,7	2,9	0,8
Acetona	7,9	1,7	6,2
Hexano	1,4	0,6	0,8

*Quantidades teóricas esperadas: 50,3% de água, 31,4% em peso de lipídios e 16,3% em peso de proteínas.

Revisão adicional da literatura conduziu aos procedimentos descritos por Ichihara et al. (2005), os quais passaram a serem adotados (**Figura 17**). Neste método, realiza-se uma primeira extração de lipídios neutros e pigmentos com acetona, sendo a extração de fosfolipídios realizada com clorofórmio:metanol (1:1, v/v). No procedimento de cromatografia em coluna contendo alumina para o isolamento de L- α -FC, a coluna é primeiramente lavada com acetona, permitindo a eluição dos contaminantes e o isolamento da fosfatidilcolina em sua forma pura. A quantidade de fosfatidilcolina obtida seguindo este último protocolo foi de 2,87g de L-

α -FC para cada 80g de gemas de ovos enquanto a quantidade teórica esperada de fosfatidilcolina para 80g de gemas seria de 3,5g (ICHIHARA et al., 2005).

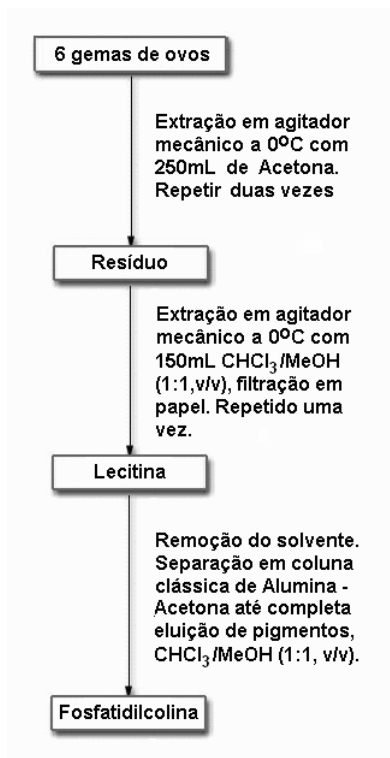


Figura 17 - Processo de isolamento de Fosfatidilcolina a partir de gemas de ovos (ICHIHARA et al., 2005).

O espectro de RMN ¹H de L- α -FC (**16**) extraída da gema de ovo (**Anexo 3**) foi comparado ao espectro do padrão fosfatidilcolina, 99% - Fluka (**Anexo 4**), sendo os respectivos valores de deslocamento químico (δ) e integrais apresentados na **Tabela 3**. As atribuições foram feitas com base nos dados descritos por Loening et al. (2005), Cheung e Olson (1990), Michaelis e Schlieper (1982), Hosur e Govil (1979) e Birdsall et al. (1972).

Tabela 3 - Comparação entre valores de RMN ^1H calculados para amostra extraída de ovos e padrão Fluka (500 MHz, CD_3OD).

δ Amostra	δ Padrão	No. H. teórico	Integral Amostra	Integral Padrão	Fragmento de referência
0,86	0,85	6	7,0	6,8	CH_3
1,24	1,24	48	51,1	46,6	$(\text{CH}_2)_n$
1,55	1,56	4	4,0	4,0	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$
2,01	1,99	4	4,2	4,0	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$
2,28	2,28	4	4,3	4,2	CH_2CO
3,18	3,18	9	9,1	10,2	N^+CH_3
3,60	3,59	2	2,7	2,0	CH_2N^+
3,96	3,96	2	1,9	2,0	CH_2OP
4,13	4,12	1	0,9	0,8	OCHHCHOH
4,23	4,23	2	1,9	2,0	POCH_2
4,39	4,39	1	0,7	1,0	OCHHCHOH
5,21	5,20	1	0,8	1,2	CHOH
5,31	5,30	2	2,9	2,2	$\text{CH}=\text{CH}$

O espectro de massas de L- α -FC extraída de ovo (**Anexo 5**) apresenta sinal de maior intensidade em m/z 760, o qual corresponde exatamente à massa molecular da L- α -FC. Isto se torna possível pelo fato do composto apresentar um grupo amônio positivamente carregado, não necessitando essencialmente formar aduto com outros íons para ser detectado.

4.2.2. Síntese de L- α -Glicerilfosforilcolina a partir da L- α -Fosfatidilcolina

Existem vários métodos descritos na literatura para a obtenção de L-alfa-Glicerilfosforilcolina (L- α -GFC, **17**) a partir da L-alfa-Fosfatidilcolina (L- α -FC, **16**), todos resultantes de desacilação alcalina de L- α -FC. Entretanto, muitos apresentam problemas relacionados ao processo de purificação do produto. A própria cristalização de **17** ocorre e apresenta bons rendimentos apenas quando o próprio produto já se encontra em estado relativamente puro; caso contrário, ou a

cristalização não ocorre ou apresenta um baixo rendimento (TATTRIE; MCARTHUR, 1958).

Tattrie e McArthur (1958) promoveram a desacilação da L- α -FC utilizando cloreto de hidroxilamônio e contornaram o problema da cristalização da GFC com o uso de cloreto de cádmio na formação de um complexo L- α -GFC/CdCl₂. Entretanto, a utilização da glicerilfosforilcolina em complexo com cádmio em testes biológicos é bastante limitada devido à toxicidade do metal. A remoção final do CdCl₂ só é alcançada por tratamento com uma mistura de resinas de troca iônica, um processo relativamente complexo e que resulta em redução de rendimentos (TATTRIE; MCARTHUR, 1958).

Robles e Roels (1971) propõem a produção de L- α -GFC a partir do uso de metóxido de lítio, seguido por isolamento através de cromatografia em sílica gel. Entretanto, o produto final não pode ser recuperado em forma completamente pura, apresentando contaminação por ácido silícico. Okui et al. (1964) propõem a hidrólise da L- α -FC pelo emprego de hidróxidos de metais alcalinos terrosos, que não é alcançada sem a produção de inúmeros subprodutos.

Brockhoff e Yurkowski (1965) relatam a desacilação de **16** através da utilização de uma base de amônio quaternário, o hidróxido de tetrabutilamônio, sem a formação de subprodutos, com **17** cristalizado em sua forma pura e sem a presença de metais pesados. O mecanismo desta reação é ilustrado na **Figura 18**.

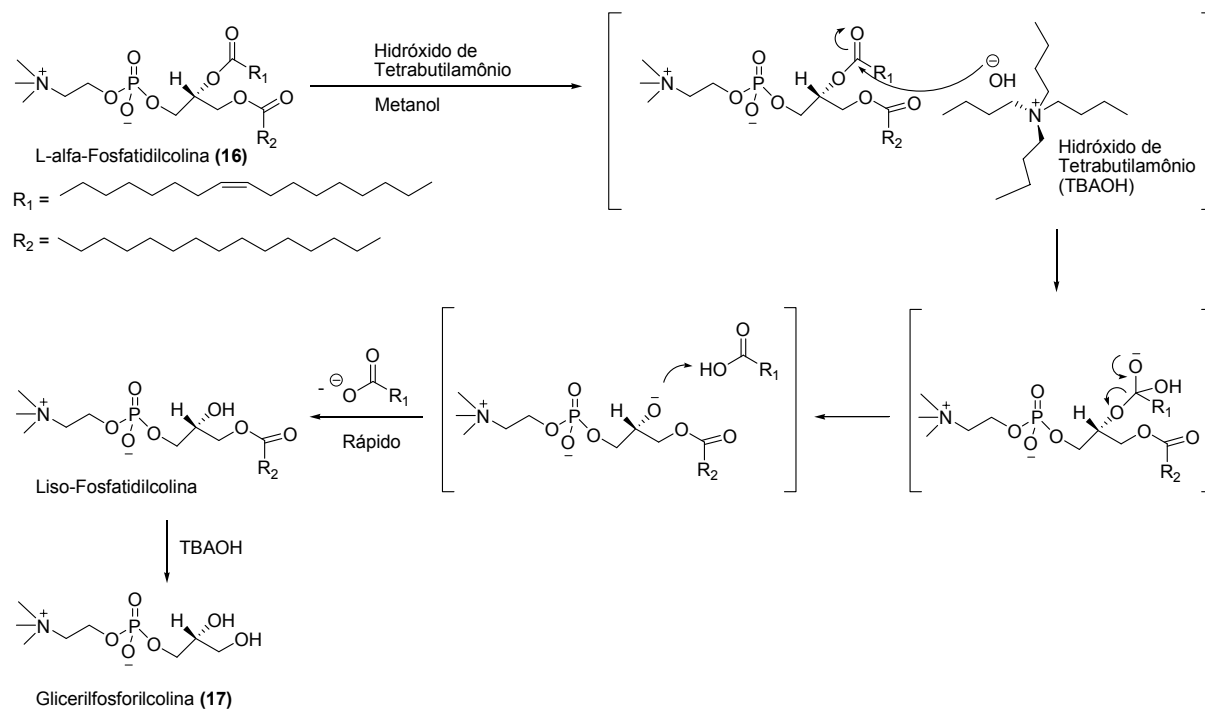


Figura 18 – Mecanismo proposto de desacilação de L- α -FC para formação de Liso-FC e L- α -GFC.

Desse modo, o procedimento descrito por Brockerhoff e Yurkowski (1965) foi seguido na tentativa de se obter **17**. O reagente hidróxido de tetrabutilamônio (TBAOH) foi preparado a partir de óxido de prata preparado *in situ* por reação de AgNO₃ com NaOH e iodeto de tetrabutilamônio (CUNDIFF; MARKUNAS, 1962). Segundo Brockerhoff e Yurkowski (1965), após dissolução de 30 mg de **16** em éter etílico e adição de TBAOH verifica-se após 1h, à temperatura ambiente, a precipitação de **17**, com rendimento de 84%. Entretanto, não foi possível observar a precipitação nem mesmo para um tempo reacional de 24 horas. A razão para tal fato está provavelmente ligada ao grau de pureza de **17**. Como citado anteriormente, a cristalização de **17** só ocorre satisfatoriamente quando o produto já se encontra suficientemente puro (TATTRIE; MCARTHUR, 1958).

A reação foi repetida aumentando-se a quantidade de **16** para 300mg, no intuito de verificar se a diminuição de escala (3g de L- α -FC no artigo para os 30mg

inicialmente empregados) não teria influenciado no processo de cristalização. Dessa vez, após 2h de reação uma quantidade ínfima de material com aspecto leitoso pode ser visualizada aderida ao fundo do balão da reação. Esta foi cuidadosamente separada e enviada para análise de RMN ^1H . Observou-se, entretanto, pelo espectro que a reação de desacilação da L- α -FC não ocorrera, constatando-se apenas a presença do material de partida **16**.

Revisão subsequente da literatura conduziu aos trabalhos do próprio Brockerhoff (1963). Além da possibilidade de contaminação por metais potencialmente tóxicos como o cádmio, um dos principais problemas das reações de desacilação da **16** se refere à formação de subprodutos. Embora este tipo de comportamento seja menos intenso para a hidrólise catalisada por base do que por ácido, o emprego de diferentes bases na desacilação da fosfatidilcolina conduz à formação de subprodutos decorrentes da cisão da ligação P—O do fosfolípido, resultando na eliminação da porção colina da molécula. Esta reação resulta na formação de um glicerol fosfato cíclico a partir de ataque intramolecular da hidroxila secundária da fosfatidilcolina ao átomo de fósforo presente na porção fosfocolina da molécula (**Figura 19**).

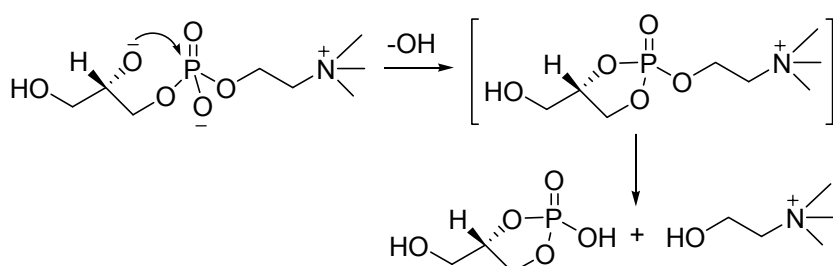


Figura 19 - Formação de glicerol fosfato cíclico a partir de L- α -FC em meio alcalino.

Em seu trabalho, Brockerhoff (1963) avalia a utilização de diversas bases na desacilação de **16**. Os percentuais de formação do produto de degradação glicerol fosfato cíclico para soluções de 0,1 M de base e tempo reacional de 15 minutos

foram: KOH = 1,0%, NaOH = 1,6%, LiOH = 0,6%, NaOCH₃ = 1,2%, LiOCH₃ = 0,6% e Hidróxido de tetraetilamônio = 0,1%. Nota-se que apenas para o hidróxido de tetraetilamônio o tempo reacional foi de 30 minutos e ainda assim o processo de desacilação foi incompleto.

O autor demonstra ainda que a intensidade da formação de subproduto é diretamente proporcional à concentração da base e inversamente proporcional à polaridade do solvente. Com relação a este último fator, acredita-se que a solvatação da hidroxila secundária e do átomo de fósforo por solventes polares exerça um efeito de blindagem, diminuindo a reatividade dos mesmos para a formação de glicerol fosfato cíclico (BROCKERHOFF, 1963).

Desse modo, percebe-se que a utilização de bases derivadas de sais de amônio quaternário (hidróxidos tetrabutil e tetraetilamônio) no processo de desacilação da L- α -FC pode ser substituída por outras bases tais como o hidróxido de lítio, desde que as condições reacionais sejam devidamente ajustadas. Neste sentido, iniciamos as tentativas de preparação de **17** partir de **16** empregando hidróxido de lítio.

Seguindo os procedimentos descritos por Brockerhoff (1963), 30 μ mol de L- α -FC foram dissolvidos em 0,8mL de solução metanólica de LiOH 0,125M e 0,2mL de clorofórmio. Esta proporção de metanol:clorofórmio (4:1, v/v) corresponde à mistura de maior polaridade em que ainda é possível a completa solubilização da L- α -FC. A preparação da solução de hidróxido de lítio foi realizada por contato de solução metanólica de LiCl 0,125M com resina de troca iônica Dowex Monosphere 550A (OH⁻), já que não dispúnhamos deste reagente em nosso laboratório. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido acético glacial até obtenção

de pH levemente ácido (pH \approx 6). Após separação do produto **17** em sua forma pura por cromatografia em alumina, o rendimento calculado foi de 52%.

O espectro de fragmentação obtido a partir de análise de massas do produto **17 (Anexo 6)** apresenta o sinal mais intenso em m/z 242 enquanto se esperaria que massa de L- α -GFC fosse visualizada em m/z 257, ou seja, um valor 15 unidades maior do que o observado. Ekroos et al. (2003) descrevem em análise de L- α -GFC por espectroscopia de massas empregando ionização por electrospray e analisadores Quadrupolo/Tempo de Vôo que um dos principais produtos de fragmentação do íon molecular corresponde ao fragmento $[M-15]^-$, resultante da mono-demetilação da amina na porção colina da molécula. Este seria ainda o principal produto de fragmentação observado quando o fosfolipídio se apresenta na forma de aduto com cloro (EKROOS et al., 2003). Tal fato explicaria o espectro de massas obtido para a desacilação de **16** com LiOH no qual é possível visualizar a presença de derivado **17** mono-demetilado $[M-15]^-$ em m/z 242 (**Anexo 6**).

Embora os espectros de massas sugiram a formação do produto desejado, o rendimento obtido motivou uma nova modificação do método. A preparação da solução de hidróxido de lítio do modo anteriormente descrito pode ter resultado em queda no rendimento da reação e optou-se por empregar metóxido de sódio na desacilação de **16**, reagente classicamente empregado neste tipo de reação.

Para determinar o tempo exato em que a desacilação total ocorreria e minimizar a formação de produto de degradação, o ensaio foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analítica (fase móvel clorofórmio:metanol:água, 65:25:4 v/v/v) com amostras colhidas a cada 2 minutos. Em 32 minutos, todo o material de partida havia sido consumido e a reação foi interrompida aos 40 minutos.

Após purificação em coluna de alumina, observou-se a formação do produto desejado **17** com rendimento de 83%.

O espectro de RMN ^1H (**Anexo 7**) evidencia sinais de **17**, como os hidrogênios das metilas do grupo amônio quaternário (δ 3,18, 9H), os quatro hidrogênios dos CH_2 da colina (3,48-3,63, 2H; 4,25, 2H), os dois hidrogênios do CH_2 anterior ao grupo fosfato (3,48-3,63, 2H), e os outros três hidrogênios dos carbonos ligados às duas hidroxilas livres (3,73, 1H; 3,83, 1H; 3,88, 1H). As atribuições deste espectro foram feitas com base nos dados descritos por Loening et al. (2005), Rhee et al. (1993), Hsour e Govil (1979) e Birdsall et al. (1972). O espectro de fragmentação de massas realizado para o produto desta reação (**Anexo 8**) evidencia comportamento de fragmentação semelhante ao observado para o produto da desacilação com LiOH, com sinal mais intenso em m/z 242.

4.2.3. Formação regioseletiva do derivado tosil-O-glicerilfosforilcolina

Para realizar a condensação do derivado sintetizado **3** com o núcleo de glicerilfosforilcolina (GFC) **17** é necessário o estabelecimento de uma ligação do tipo éter entre as duas moléculas. O principal método para a produção de éteres é a síntese de Williamson, reação através da qual um íon alcóxido (gerado pelo tratamento de um álcool com uma base forte) reage com um carbono eletrofílico. Este carbono eletrofílico normalmente se encontra ligado a um haleto de alquila ou qualquer outro grupo abandonador como tosil ou mesil, que favorece a formação da ligação entre os átomos de carbono e oxigênio (**Figura 20**):

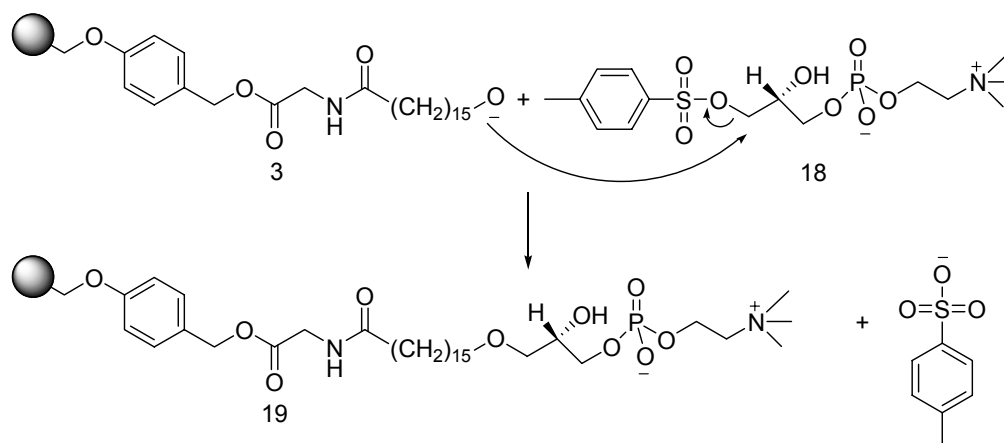


Figura 20 – Mecanismo de inserção da cadeia alcoólica de **3** ao núcleo de GFC via 1-O-tosil-GFC (**18**)

No caso da glicerilfosforilcolina, é vantajoso optar pela adição dos grupos tosil ou mesil à molécula em lugar de halogênios visto a seletividade que os primeiros apresentam frente a hidroxilas primárias em detrimento das secundárias. Na molécula de GFC (**17**) estão presentes duas hidroxilas, uma ligada a um carbono primário e outra a carbono secundário. Sob condições específicas de reagentes, solvente e temperatura, é possível obter seletivamente o produto mono-tosilado (ou mono-mesilado) ligado à hidroxila primária (**Figura 21**):

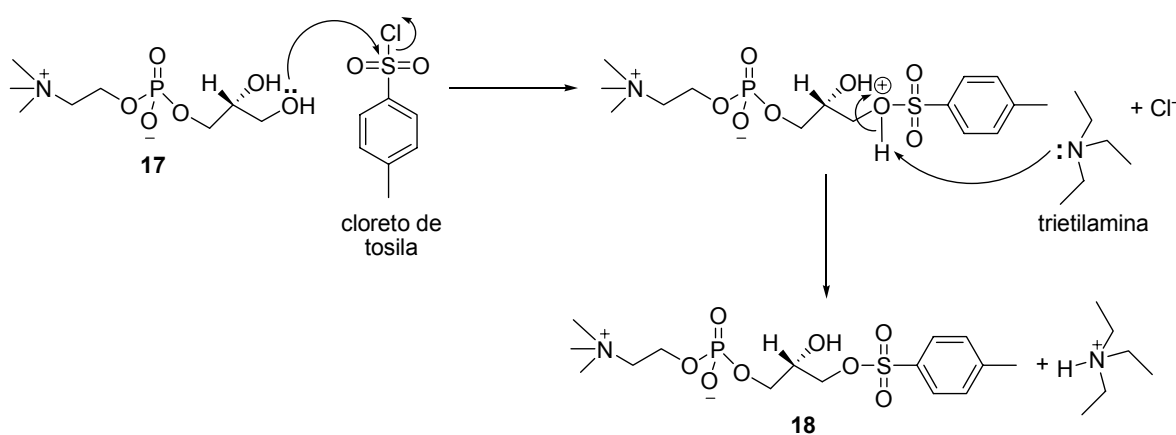


Figura 21 – Mecanismo de tosilção da L-α-GFC (**17**).

Vários estudos descrevem a tosilção seletiva de hidroxilas primárias em detrimento de hidroxilas secundárias. Das et al. (2004) descrevem a tosilção seletiva da hidroxila primária do 2-(2-hidroxiethyl)ciclohexanol empregando álcool *p*-toluenossulfônico sob refluxo em diclorometano por 1 hora (rendimento de 86%). O mesmo produto foi também obtido em reação catalisada por cloreto de zircônio em 6,5 horas com rendimento de 92% (DAS; REDDY V. S., 2004). Montgomery, Shortnacy e Thomas (1974) relatam a tosilção seletiva da 2-cloro-2',3'-*O*-isopropilidenoadenosina utilizando cloreto de tosilato (TsCl) em piridina e peneira molecular a -20°C por 4 dias (84% de rendimento). Tosilção seletiva de ciclodextrina com TsCl catalisada por brometo de zinco em piridina a -20°C também foi descrita, com tempo reacional de 20 minutos e rendimento de 64% (YAMAMURA et al., 2000).

Neste protocolo, optou-se inicialmente por adotar os procedimentos de tosilção seletiva de hidroxila primária descritos por Chakraborty et al. (2003) devido à simplicidade do processo e dos reagentes empregados. Em linhas gerais, os autores descrevem a formação do produto desejado com 84% de rendimento empregando TsCl e trietilamina em diclorometano por 5 horas. Contudo, considerando a polaridade da molécula **17**, é esperado que sua solubilidade em diclorometano não seja alta. Kanda e Wells (1981) descrevem a síntese de tosilato de colina [TsO(CH₂)₂N⁺(CH₃)₃] a partir da reação de TsCl e colina em acetonitrila. Por esta razão, este solvente foi escolhido para substituir diclorometano no ensaio de tosilção de **17**. Após seis horas de reação, análise por cromatografia em camada delgada analítica revelou o consumo do material de partida **17** e a formação de um produto UV ativo, o qual foi isolado e enviado para análise de RMN ¹H. Contudo, a análise do espectro não sugeriu a obtenção do produto esperado, fato

que motivou uma nova tentativa de síntese de **18**, desta vez utilizando piridina como solvente reacional (índice de polaridade = 5,3). Além de solvente, a piridina também atua nas reações de tosilção e mesilação como base aceptora de próton, substituindo, portanto, a trietilamina anteriormente empregada.

Seguindo o protocolo elaborado por Kapitána e Gracza (2008) para a tosilção seletiva de hidroxilas primárias, foram adicionados 2,mL de piridina a 1,6mmol de GFC, o que, no entanto, resultou em solubilização apenas parcial do fosfolípido. Optou-se por proceder com a reação nestas condições na esperança de que à medida que o GFC dissolvido no solvente fosse consumido para a formação do produto mono-tosilado (de menor polaridade), moléculas adicionais de GFC seriam solubilizadas pelo meio reacional. Entretanto, o mesmo aparentemente não se verificou sequer após 36 h de reação em temperatura ambiente, bem como não se observou a formação do produto desejado por cromatografia em camada delgada analítica.

Numa segunda tentativa, o protocolo foi repetido substituindo-se o solvente inicial, piridina, por uma mistura de piridina/acetonitrila 1:1 que promoveu a completa solubilização de GFC. Acompanhando a reação por cromatografia em camada delgada analítica, constatou-se que a maior parte do material de partida não foi consumida após 6 horas de reação e o tempo reacional foi sequencialmente prolongado para 24h, 48h, 36 e 72h. Mesmo após 72 horas de reação, a análise por cromatografia em camada delgada ainda demonstrava a presença de material de partida.

Neste ponto, optou-se pela mudança do protocolo de síntese. Após minuciosa revisão da literatura, chegou-se ao protocolo proposto por Fasoli et al. (2006). Neste

trabalho, os autores descrevem a síntese de liso-fosfolipídios por acilação seletiva da hidroxila primária do GFC (**Figura 22**):



Figura 22 – Acilação seletiva da hidroxila primária de GFC segundo Fasoli et al. (2006).

O que garante a seletividade desta reação no caso da síntese proposta por Fasoli et al. (2006) é o pré-tratamento da molécula de GFC com óxido de dibutilestanho. Sob temperatura de refluxo de isopropanol, o átomo de estanho na molécula do óxido de dibutilestanho se complexa com as hidroxilas livres de duas moléculas de GFC distintas, dando origem a três tipos possíveis de dímeros (**Figura 23**). As diferentes proporções destes dímeros em solução, cuja nomenclatura depende do número de átomos de oxigênios tricoordenados, irá determinar se o produto final sofrerá substituição no oxigênio ligado ao carbono primário ou secundário, ou seja, dímeros 1,1 e 1,2 reagem para gerar o tosilato primário (GRINDLEY, 1998).

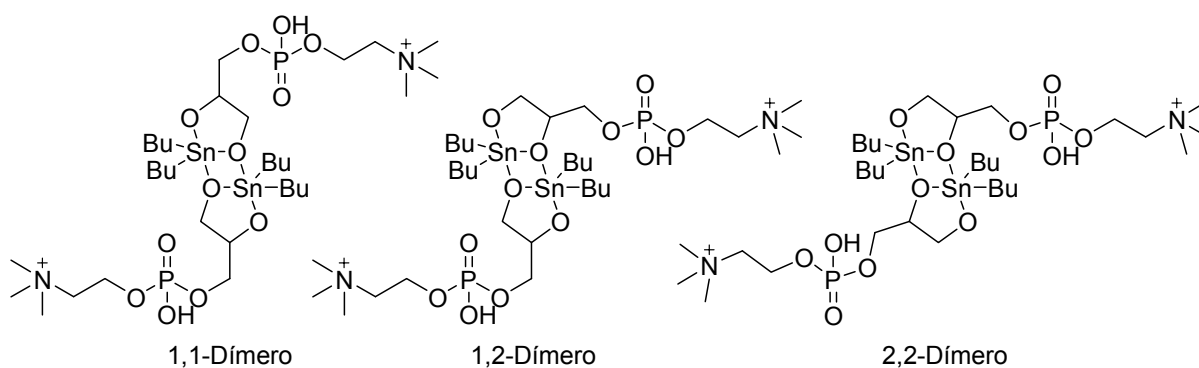


Figura 23 – Dímeros preditos para a complexação de GFC e óxido de dibutilestanho em solução.

O mais curioso neste tipo de protocolo é que tanto a geração do complexo com o óxido de dibutilestanho quanto a própria reação de acilação em si foram realizadas em isopropanol. O isopropanol (índice de polaridade = 3,9) é um álcool secundário e, portanto, apresenta uma hidroxila livre que, teoricamente, poderia reagir com cloretos de acila, de mesila ou tosila. Os autores se valem da seletividade destes reagentes por hidroxilas primárias para justificar o emprego deste solvente e argumentam que o fator preponderante sobre a viabilidade da reação diz respeito à solubilidade do diol (no caso GFC) no solvente empregado. Quando o diol não se solubiliza por completo no solvente reacional a formação do complexo com estanho é limitada e a reação não ocorre sob o mecanismo esperado (FASOLI et al., 2006).

Apesar de tosilação e acilação serem reações diferentes, decidiu-se adaptar o protocolo de Fasoli et al. (2006) para a tosilação de GFC já que a seletividade de ambas as reações poderia ser garantida pela formação do complexo do fosfolipídio com óxido de dibutilestanho. Na primeira tentativa de reproduzir o protocolo descrito pelos autores, GFC e óxido de dibutilestanho foram mantidos sob agitação em temperatura de refluxo por 1h. Embora o artigo sugerisse que a formação do complexo entre GFC e óxido de dibutilestanho pudesse ser acompanhada pela mudança da coloração do meio reacional de branco (opaco) para um aspecto límpido, o mesmo não se confirmou na prática. Neste momento, a análise por cromatografia em camada delgada analítica sugeria que boa parte do GFC se apresentava na forma não complexada. Por se tratar do primeiro ensaio, prosseguiu-se com o protocolo exatamente como descrito, adicionando trietilamina e cloreto de tosila nas quantidades molares indicadas pelos autores. Após 15 minutos de reação, os autores sugeriam a formação do produto mono-acilado com 95% de rendimento, sendo os outros 5% representados por GFC e nenhum produto di-acilado. Entretanto

o mesmo não se verificou para o ensaio de tosilação proposto, sendo que a análise de RMN ^1H também não confirmou a presença do produto esperado.

Uma série intensiva de modificações do protocolo original foi testada visando obter o produto desejado. O tempo de refluxo da mistura de GFC e óxido de dibutilestanho foi aumentado para 2h, 3h, 6h, 12h e 24h. Entretanto, a análise por cromatografia em camada delgada analítica ainda comprovava que grande parte de GFC não havia reagido. Paralelamente, diferentes tempos de tosilação foram testados, variando de 15 minutos a 48 horas, mas nenhum progresso efetivo foi constatado. A troca do cloreto de tosila por cloreto de mesila foi adotada neste momento, mas ainda não se havia alcançado um resultado satisfatório.

No entanto, a modificação da reação de uma para duas etapas distintas foi a mais satisfatória, uma vez que permitiu o emprego dos solventes mais adequados para cada etapa. Primeiramente, GFC e óxido de dibutilestanho foram mantidos sob refluxo não mais em isopropanol (índice de polaridade = 3,9), mas agora em metanol (índice de polaridade = 5,1), recém destilado e protegido de umidade pela ação de peneira molecular (4Å) ativada. Após 3 horas sob refluxo, a solução se mostrava completamente límpida e a análise por cromatografia em camada delgada analítica demonstrava que todo GFC havia sido consumido. O metanol foi então removido em evaporador rotatório, o sólido redissolvido em isopropanol e a reação conduzida sob as condições anteriormente descritas e o produto desejado isolado por cromatografia em camada delgada preparativa (fase móvel clorofórmio:metanol:água, 65:25:4 v/v/v) em um rendimento de 65,4%.

O espectro de RMN ^1H do produto desta reação (**Anexo 9**) apresentou sinais referentes aos hidrogênios do núcleo de GFC (**17**), tais como as metilas do grupo amônio quaternário (δ 3,20, 9H), os CH_2 da colina (δ 3,77–4,08, 2H; 4,24, 2H) e do

glicerol (δ 3,61, 2H; δ 3,77–4,08, 3H). Entretanto, os sinais referentes ao grupo tosil (BARTON; JASZBERENYI; TBEODORAKIS, 1991) aparecem duplicados, tanto em relação aos hidrogênios do anel aromático (δ 7,21 e 7,43; 7,67 e 7,78) quanto aos hidrogênios da metila ligada ao mesmo (δ 2,33; 2,42). Neste espectro, os valores de integral indicam uma relação de aproximadamente 2:1.

Fasoli et al. (2006) relatam que mesmo após se obter seletivamente o produto mono-substituído na posição 1 do núcleo de GFC com 95% de rendimento (e nenhum produto de substituição da posição 2), este composto pode se transformar na mistura termodinamicamente estável dos dois isômeros quando estiver dissolvido em metanol ou em meio ligeiramente ácido, o que poderia justificar a formação posterior do derivado 2-O-tosil-GFC mesmo que a reação fosse completamente seletiva.

4.2.4. Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC (18) e resina de Wang-glicina-ácido hidroxihexadecanóico (3)

A primeira tentativa de acoplamento foi realizada conforme descrito por Wissner et al. (1985), ao reagir **3** na forma impura (**Figura 20**) em solução de hidreto de sódio em *N,N*-dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos. Após 12 horas de reação à temperatura ambiente, uma amostra foi submetida à clivagem por ácido trifluoroacético 95%.

O espectro de RMN ^1H (**Anexo 10**) não apresentou os sinais característicos do aminoácido glicina e ácido hidroxihexadecanóico, anteriormente acoplados à resina de Wang. Esta constatação pode ser feita ao se comparar este espectro (**Anexo 10**) ao espectro de **3** (**Anexo 1**, δ 1,25, 20H; δ 1,37-1,92; 6H; δ 2,28, 2H). Considerando que estes grupos já haviam sido acoplados à resina anteriormente e

só deveriam ser liberados da mesma no momento da clivagem pelo ácido trifluoroacético, tal fato sugere a eliminação da porção glicina / ácido hidroxihexadecanóico durante a reação, provavelmente através da ruptura da ligação éster. De fato, a hidrólise de ligações de ésteres e amidas pode ocorrer, principalmente quando catalisada por bases fortes, como hidreto de sódio e, nestas condições, a clivagem de ésteres tende a ser mais rápida do que das amidas correspondentes (Patricelli; Cravatt, 1999).

Buscando contornar este problema, procedeu-se a tentativa de síntese de **19** (**Figura 20**) empregando o 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno (DBU), uma base muito mais fraca que hidreto de sódio (Jianga; Wang, 2002). Porém, esta ainda se mostrou suficientemente reativa para promover a clivagem da ligação éster, assim como o hidreto de sódio. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, optou-se em seguida pelo uso da diisopropiletilamina (DIPEA), uma base ainda mais fraca que o DBU (STRUBLEA; BODE, 2009), e dessa vez tal clivagem aparentemente não ocorreu.

De fato, os sinais referentes aos hidrogênios da longa cadeia hidrofóbica do ácido hidroxihexadecanóico são visíveis no espectro de RMN ^1H (**Anexo 11**, δ 1,25, 22H; 1,48, 2H; 1,58, 2H) mas os sinais correspondentes ao núcleo de GFC não são completamente evidentes. Por exemplo, o sinal dos hidrogênios das metilas do grupo amônio quaternário seria esperado em torno de δ 3,20, sendo possível observar no espectro apenas um pequeno sinal com integral correspondente a 0,6. Desse modo, há de se supor que o rendimento para 12 horas de reação foi muito pequeno ou até mesmo que o acoplamento não ocorreu.

Vale ressaltar que especificamente nesta condensação, determinar o tempo ideal de reação pode ser uma tarefa um tanto quanto complicada visto que a síntese

em fase sólida não permite o acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada e a análise do produto da reação só pode ser feita após clivagem por ácido trifluoroacético, procedimento que dura cerca de 2 horas. O ensaio foi repetido com tempos de acoplamento de 24, 48 e 36 horas de reação mas, a partir da análise dos espectros de RMN ^1H , não se verificou a formação do produto desejado. De modo análogo, a concentração de DIPEA foi aumentada de 1 equivalente para 2 e 5 equivalentes em tentativas posteriores (36 horas) mas novamente não se observou a formação do produto desejado, estranhamente apresentando o espectro de RMN ^1H sinais referentes ao reagente Tosil-GFC além de um único sinal da cadeia hidrofóbica em δ 1,18 (35H) (**Anexo 12**).

4.2.5. Tentativa de acoplamento entre complexo de GFC-estanho e resina de Wang contendo resíduo de ácido 16-bromo-hexadecanóico

Dado o insucesso na preparação do derivado **19** pelo método anteriormente proposto, uma nova modificação na rota sintética foi proposta. Kong e Grindley (1994) relatam a benzilação predominante da hidroxila primária de um diol após sua complexação com óxido de dibutilestanho (DBTO) (**Figura 24**).

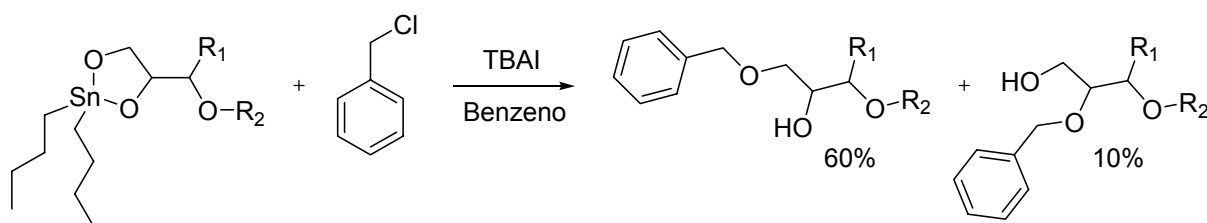


Figura 24 – Benzilação preferencial de hidroxila primária de diol (KONG; GRINDLEY, 1994).

Segundo os autores, após 3 dias de refluxo em benzeno sob catálise de iodeto de tetrabutilamônio, a reação resulta na formação majoritária da ligação éter em hidroxila primária (60%) contra apenas 10% na hidroxila secundária. Na

realidade, esta reação trata-se de uma síntese de Williamson, na qual o alcóxido que irá atacar o carbono benzílico é gerado em presença do iodeto de tetrabutilamônio (**Figura 25**). Sem a presença deste nucleófilo, a reação descrita aconteceria em velocidade extremamente reduzida (GRINDLEY, 1998).

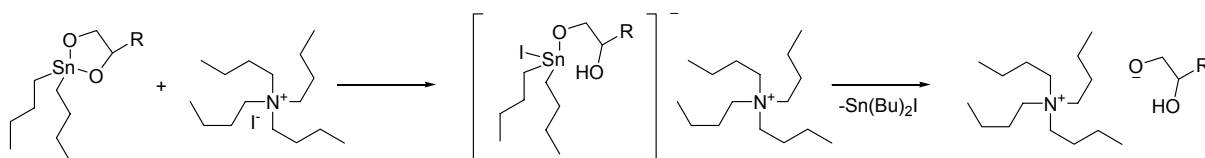


Figura 25 – Mecanismo proposto para a ativação de éteres de DBTO por nucleófilos (GRINDLEY, 1998).

Desse modo, buscou-se adaptar o protocolo descrito para a obtenção de **19**. Nesta nova estratégia, o derivado halogenado do ácido hexadecanóico é condensado à resina de Wang-Gly para posterior acoplamento ao núcleo de GFC complexado com óxido de dibutilestanho (**Figura 26**). A principal desvantagem deste método em relação ao anterior diz respeito à inevitável formação do derivado 2-O-GFC (**26**) ligado à resina que, ainda que em pequena quantidade, resultaria na redução do número de sítios disponíveis para interação com os potenciais receptores de PAF de *T. cruzi*.

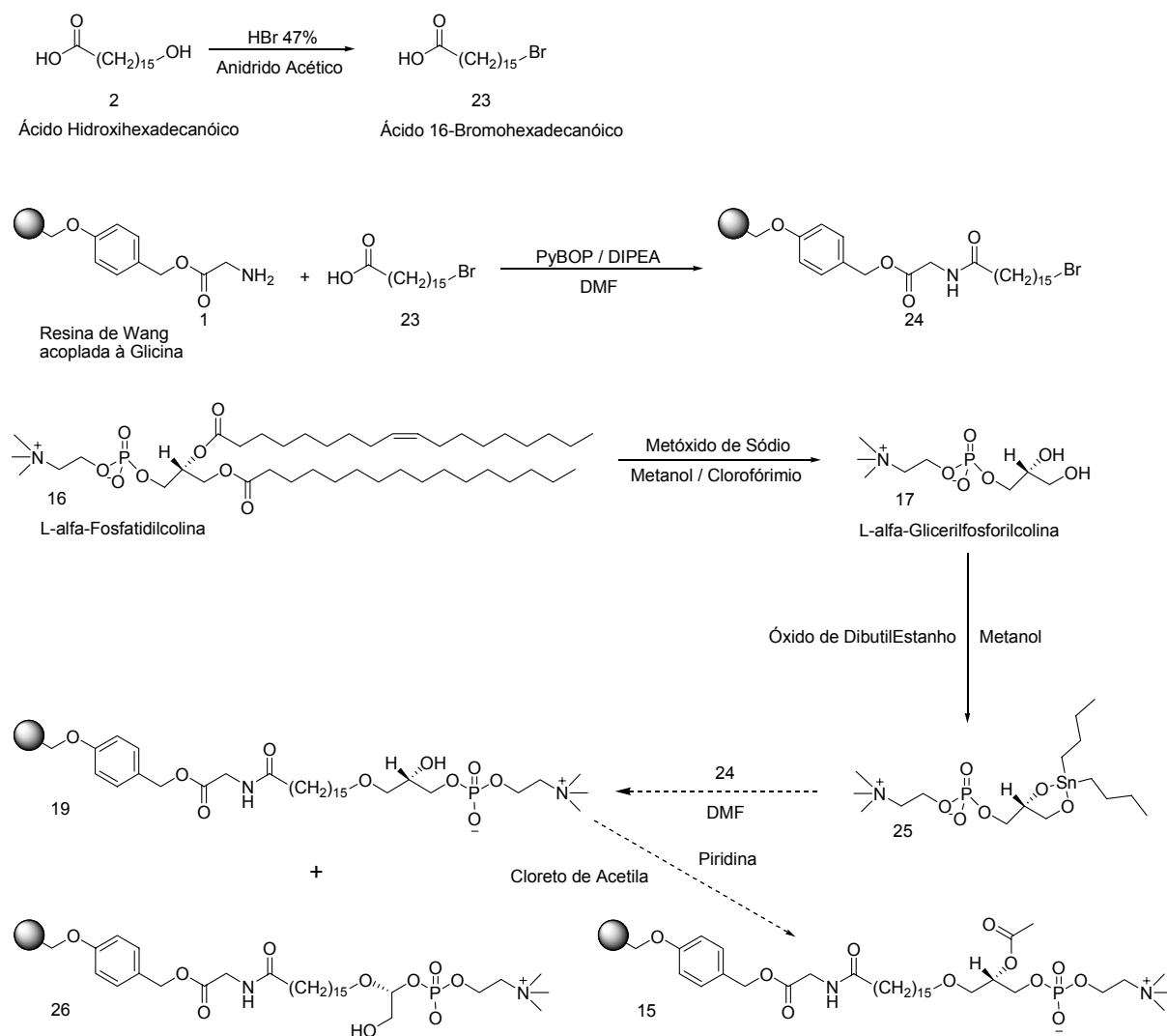


Figura 26 – Tentativa de síntese de derivado de PAF imobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo tendo ácido 16-bromo-hexadecanóico como intermediário.

Neste sentido, ácido hidróxi-hexadecanóico foi quantitativamente convertido em ácido 16-bromo-hexadecanóico sob refluxo de 3 horas em solução aquosa de ácido bromídrico 48% e anidrido acético (BIDD et al., 1983). A confirmação da obtenção do derivado bromado de ácido hexadecanóico foi realizada com base na comparação dos espectros de RMN ^1H do material de partida e do produto de reação (Tabela 4). A principal diferença entre os dois compostos se reflete no deslocamento químico dos hidrogênios vizinhos ao halogênio/hidroxila, respectivamente em δ 3,40 e 3,67, valores semelhantes aos descritos na literatura (BIDD et al., 1983; JAKOB;

VOSS; GERLACH, 1996). Embora nenhum procedimento de purificação tenha sido realizado na reação (apenas a evaporação do solvente) o espectro de RMN ^1H do ácido 16-bromo-hexadecanóico é compatível com o de um produto aparentemente puro (**Anexo 13**).

Tabela 4 - Comparação entre valores de RMN ^1H calculados para ácido hidróxi-hexadecanóico (**2**) e ácido 16-bromo-hexadecanóico (**23**).

δ 2	δ 23	No. H. teórico	Integral BrAHD	Integral AHHD	Fragmento de referência-
1,24	1,25	22	22,94	46,63	$(\text{CH}_2)_n$
1,62	1,61	2	2,02	4,02	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
1,87	1,72	2	2,00	4,02	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br} / \text{OH}$
2,34	2,35	2	2,03	4,22	CH_2COOH
3,40	3,67	2	2,01	10,21	$\text{CH}_2\text{Br} / \text{OH}$

Em sequência, ácido 16-bromo-hexadecanóico foi acoplado à resina de Wang utilizando-se os procedimentos anteriormente descritos para o ácido hidróxi-hexadecanóico. A resina foi lavada com DMF, diclorometano e metanol e diretamente transferida para um balão contendo iodeto de tetrabutilamônio, DMF e o acetal formado entre o óxido de dibutilestanho e GFC (**25**). Dada a impossibilidade de acompanhar a reação por cromatografia em camada delgada, a resina foi arbitrariamente irradiada em microondas pelo de tempo de 30 minutos (70°C), lavada e clivada em ácido trifluoroacético para análise de RMN ^1H (**anexo 14**) que, entretanto, não sugeriu a formação do produto desejado. Para superar estas limitações inerentes à resina, novo protocolo foi proposto para que o acoplamento fosse realizado apenas na última etapa da rota sintética.

4.2.6. Tentativas de acoplamento entre tosil-O-GFC (18) e derivado benzilado de ácido hidroxi-hexadecanóico (27)

Embora a síntese em fase sólida apresente inúmeras vantagens em relação à síntese convencional, principalmente no que se refere à possibilidade de se filtrar o excesso de reagentes ao final do procedimento, o controle do tempo de reação se mostra um tanto quanto complicado em função da dificuldade de monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica. No caso específico das reações propostas neste projeto, que em sua grande maioria são adaptações de protocolos com materiais de partida e/ou reagentes distintos, esta limitação torna-se ainda mais importante. Desse modo, uma nova modificação foi proposta na rota sintética, de modo que a etapa de condensação entre o núcleo de GFC (17) e o ácido hidroxi-hexadecanóico (2) fosse realizada antes da etapa de ligação à resina (**Figura 27**).

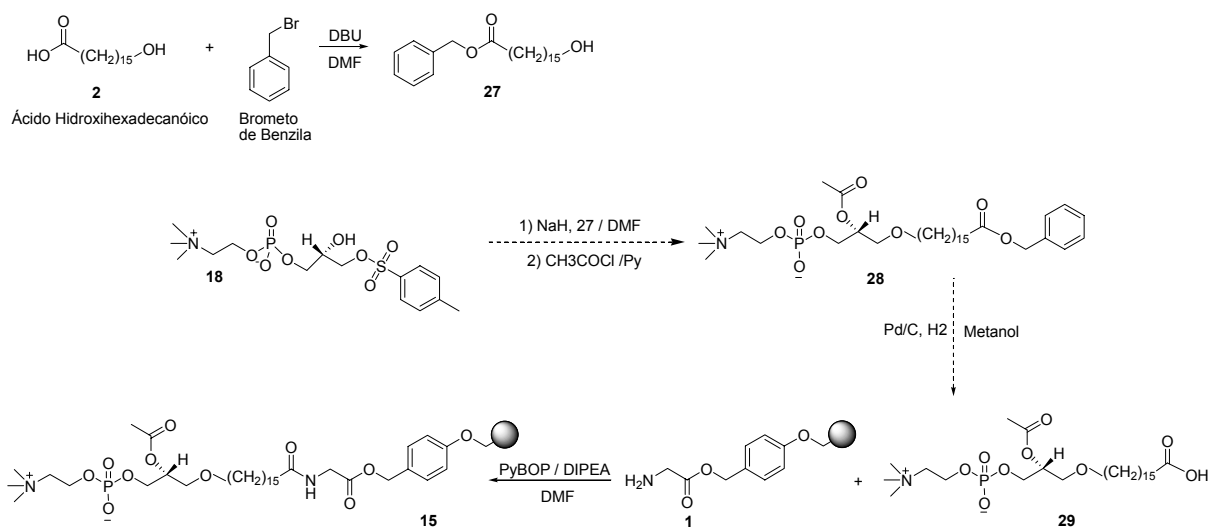


Figura 27 – Tentativa de síntese de derivado de PAF imobilizado em resina a partir de L- α -FC extraída de gema de ovo tendo derivado benzilado de ácido hidroxi-hexadecanóico como intermediário.

Para evitar a formação de subprodutos indesejáveis de reação envolvendo o ácido carboxílico de 2 durante a conjugação com 18, o ácido hidroxi-hexadecanóico foi protegido na forma de éster benzílico (MATULIC-ADAMIC et al., 2002), sendo

que a remoção desta proteção pode ser feita em momento oportuno por hidrogenólise (WUTS; GREENE, 2007).

O espectro de RMN ^1H do derivado benzilado do ácido hidroxihexadecanóico é compatível com a obtenção do produto esperado (**anexo 15**), sendo possível constatar os sinais referentes a hidrogênios da cadeia alquílica do ácido hidroxihexadecanóico (δ 1,22, 22H; δ 1,49-1,67; 6H; δ 2,35, 2H; δ 3,63, 2H) bem como sinais de hidrogênios referentes à proteção de éster benzílico (δ 5,13, 2H; δ 7,36, 5H).

A primeira abordagem de acoplamento foi realizada conforme descrito por Wissner et al. (1985), ao tratar **27** com solução de hidreto de sódio em *N,N*-dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos. Após gotejar lentamente uma solução de **18** em DMF, a reação foi mantida sob agitação (70°C) 24 horas. Após purificação por cromatografia em coluna clássica com alumina (clorofórmio:metanol 9:1, v/v) o produto reacional foi submetido à análise de RMN ^1H que, entretanto, não confirmou no produto esperado (**anexo 16**).

No intuito de superar este insucesso, procedeu-se a tentativa de realizar a reação através de um intermediário epóxi-GFC, o qual é esperado gerar o mesmo produto final (**Figura 28**). Para tanto, uma solução de **18** e DBU em DMF foi inicialmente agitada em banho de gelo durante 3 horas e, subsequentemente, tratada com **27** a 70°C por 24 horas. Após este período, notou-se a formação de um produto via cromatografia em camada delgada analítica, o qual foi isolado via cromatografia em coluna clássica com alumina (clorofórmio:metanol 9:1, v/v) e submetido à análise de RMN ^1H (**anexo 17**). Contudo, mais uma vez o espectro de RMN ^1H não sugeriu a formação do produto esperado.

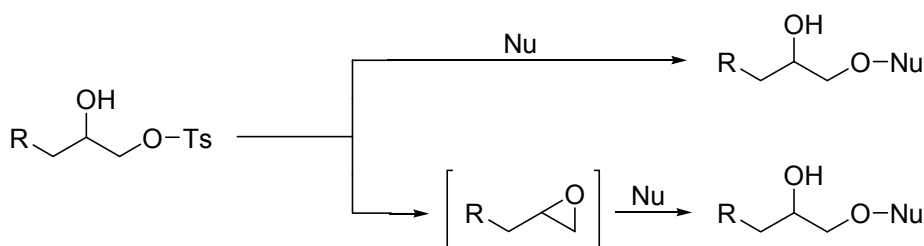


Figura 28 – Substituição nucleofílica em diol mono tosilado. Adaptado de Kim et al. (2009).

4.3. Estudos de Bioinformática

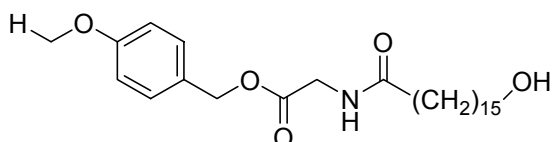
4.3.1. Determinação do tamanho ideal da cadeia alcoxílica dos derivados de PAF e introdução aos estudos de bioinformática

Este estudo propôs a síntese de derivados de PAF ligados a uma resina insolúvel a partir de sua cadeia alcoxílica para o isolamento de receptores deste mediador em *T. cruzi*. A escolha da modificação desta posição (representada pela letra **D** na **Figura 3**) foi anteriormente justificada pelo fato de que modificações em todas as demais posições da molécula conduziriam à redução acentuada na atividade biológica e, conseqüentemente, na capacidade de interação com receptor de PAF. Já para a cadeia alcoxílica, a intensidade da atividade biológica estaria relacionada ao grau de lipofilicidade da mesma (HEYMANS et al., 1989), permitindo modificações desta porção da molécula desde que a lipofilicidade da cadeia fosse similar à observada na molécula de PAF.

Com base nos trabalhos realizados por Heymans et al. (1989) é possível observar que esta relação entre a lipofilicidade da cadeia e capacidade do referido composto em induzir a agregação de plaquetas humanas é do tipo parabólica (**Figura 3**), correspondendo o valor máximo da constante de lipofilicidade ao valor de 6,89, ou seja, ao próprio PAF com a cadeia C16. Desse modo, uma questão pertinente a este projeto diz respeito ao impacto que a adição dos grupamentos da

resina de Wang e o resíduo de aminoácido glicina causam à lipofilicidade da cadeia alcoxílica dos derivados.

A lipofilicidade total da cadeia pode ser expressa pela somatória do índice de lipofilicidade de cada grupo químico nela presente, segundo uma tabela de valores estabelecidos experimentalmente por Rekker e De Kort (1979). Desse modo, o logaritmo da lipofilicidade da cadeia alcoxílica do derivado sintetizado pode ser calculada como:



$$\log P = \sum a_i f_i$$

$$\log P = n_1 f(\text{O alifático}) + n_2 f(\text{CH}_2) + f(\text{NH}) + n_3 f(\text{C=O}) + f(\text{C}_6\text{H}_4)$$

$$\log P = 3 \times (-1,581) + 18 \times 0,530 - 1,825 + 2 \times (-1,703) + 1,688$$

$$\log P = -4,74 + 9,54 - 1,825 - 3,406 + 1,688$$

$$\log P = 1,257$$

Considerando o valor de $\log P = 6,89$ para o derivado C16-PAF (HEYMANS et al., 1989), é possível calcular o tamanho “ideal” da cadeia alcoxílica esta série de derivados:

$$\log P = \sum a_i f_i$$

$$\log P = n_1 f(\text{O alifático}) + n_2 f(\text{CH}_2) + f(\text{NH}) + n_3 f(\text{C=O}) + f(\text{C}_6\text{H}_4)$$

$$6,89 = 3 \times (-1,581) + Y \times 0,530 - 1,825 + 2 \times (-1,703) + 1,688$$

$$6,89 = -4,743 - 1,825 - 3,406 + 1,688 +$$

$$6,89 + 8,286 = Y \times 0,530$$

$$Y = 15,176/0,53 = 28,63 \cong 29 \text{ átomos de carbono (26 da cadeia espaçadora).}$$

O que daria como resultado de cadeia alcoólica ideal um derivado com 26 átomos de carbono a ser ligado ao aminoácido glicina, em lugar do ácido hidroxihexadecanóico (16C) anteriormente proposto. Porém, seriam estes resultados obtidos para o receptor de PAF em humanos seguramente extrapoláveis para o receptor de PAF em *T. cruzi*?

À exceção da informação de que o próprio C16-PAF é capaz de produzir respostas biológicas em *T. cruzi* através de seu suposto receptor (RODRIGUES et al., 1996; AMBRÓSIO et al., 2003), quase nada se sabe sobre a relação entre estrutura e atividade dos derivados de PAF no parasita. Porém, se fosse possível construir um modelo tridimensional deste receptor através de técnicas de modelagem molecular, então também seria possível estudar as interações que cada análogo poderia realizar com este receptor e, conseqüentemente, estabelecer qual o composto mais adequado para o isolamento do mesmo. Neste sentido, os próximos tópicos descrevem as tentativas de identificação da sequência do receptor de PAF de *T. cruzi* no proteoma do parasita a partir da sequência do receptor humano e de outras 24 espécies de animais.

4.3.2. Busca no proteoma do parasita da sequência correspondente à estrutura primária do receptor de PAF em *T. cruzi*.

A principal premissa que baseia este trabalho diz respeito à existência do receptor de PAF em *T. cruzi*, suportada pelas observações experimentais de que: 1) PAF é capaz de produzir respostas biológicas no parasita (RODRIGUES et al., 1996), 2) estes efeitos são abolidos na presença de um antagonista de PAF, o WEB2086 (RODRIGUES et al., 1999) e 3) estudos de imunofluorescência demonstraram a presença destes possíveis receptores na membrana celular do

parasita, fato coerente com natureza do receptor de PAF que faz parte da família dos receptores de membrana acoplados à proteína G (GOMES et al., 2006). Portanto, se este receptor realmente existe, necessariamente faz parte do proteoma do parasita, cujo genoma correspondente já foi completamente sequenciado (ATWOOD 3RD et al., 2005).

Para se determinar o padrão de conservação das sequências dos receptores de PAF em diferentes espécies, 25 sequências de diferentes animais foram submetidas a uma análise das relações evolucionárias entre os receptores. Todas estas sequências pertencem exclusivamente a espécies de animais, uma vez que sequências de organismos evolutivamente mais próximos ao *T. cruzi* não são disponíveis. Através da árvore filogenética (**Figura 29**) fica claro que estes receptores se dividem em duas linhagens principais: uma agrupando mamíferos, anfíbio e ave e outra contendo exclusivamente os peixes. A linhagem dos mamíferos pode ser ainda subdividida em dois grandes grupos, discriminando cúica e ornitorrinco dos demais. Receptores de PAF humanos, de orangotango e chimpanzé foram ainda sub-agrupados juntos.

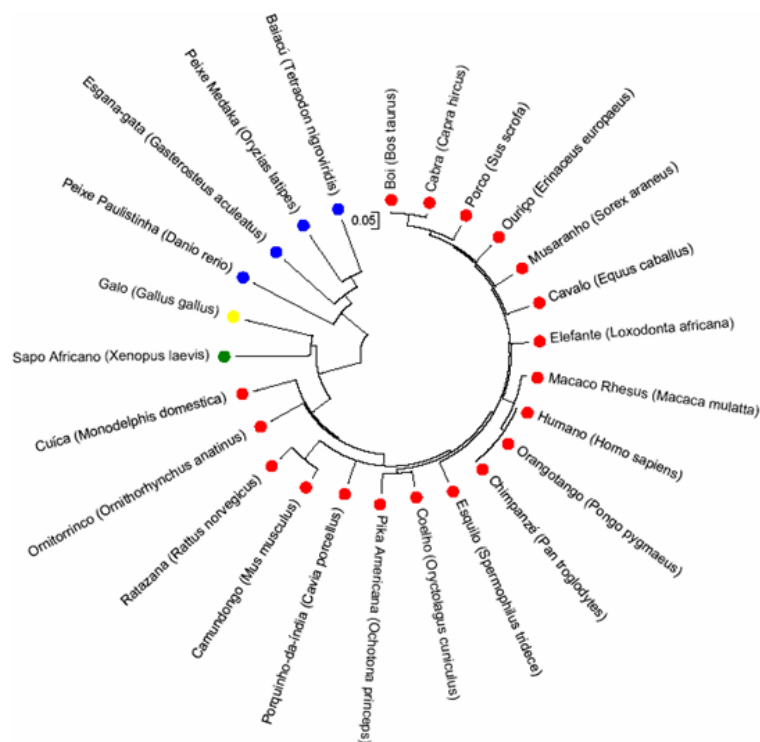


Figura 29 – Relações evolucionárias entre receptores de PAF de 25 espécies de animais. **Vermelho** = mamíferos; **verde** = anfíbio; **amarelo** = ave; **azul** = peixes.

A partir do alinhamento múltiplo das sequências, foi possível perceber que dos 342 aminoácidos do receptor de PAF humano 78 (22,8%) são completamente conservados entre as espécies (**Figura 30**). Dentre estes, estudos de mutagênese indicam que os resíduos de histidina 188, 248, e 249 provavelmente fazem parte do sítio de ligação e que as fenilalaninas 97 e 98 contribuem para a estabilidade estrutural do receptor, embora não sejam essenciais para sua funcionalidade (PRESCOTT et al., 2000). De modo análogo, resíduos de cisteínas 90 e 173 também contribuem para a estrutura terciária do receptor, atuando através da formação de uma ponte de dissulfeto entre duas alças da proteína (GUI et al., 2007).

Observa-se ainda que a grande maioria dos resíduos conservados está situada dentro dos domínios transmembrana do receptor (**Figura 30**), o que já seria naturalmente esperado visto que as maiores divergências de sequência entre proteínas homólogas geralmente aparecem nas regiões próximas da superfície

protéica, ou seja, nas alças ou “loops”. Nestas regiões, até mesmo as propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos que sofrem mutações costumam diferir. Os resíduos localizados no interior das proteínas variam com menor frequência e com menor distinção de propriedades físico-químicas (SILVA; SILVA, 2007).

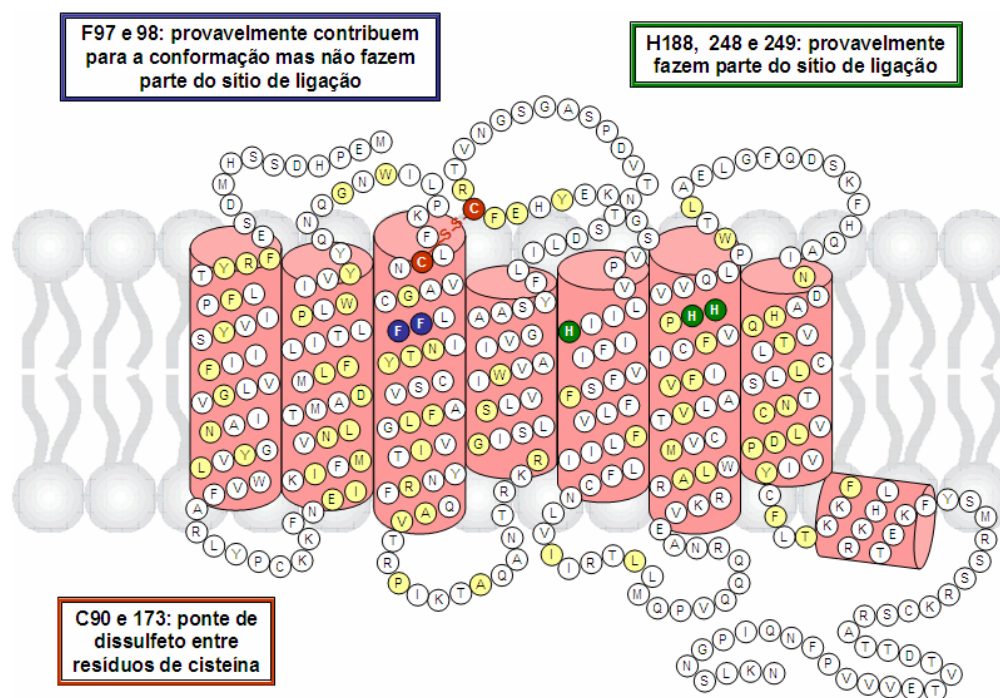


Figura 30 – Representação bidimensional do receptor de PAF humano. Resíduos conservados são ressaltados em cores. Adaptado de Prescott et al. (2000) e Gui et al. (2007).

Na tentativa de identificar proteínas que pudessem corresponder ao receptor de PAF de *T. cruzi*, as sequências de 5.684 receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs) foram confrontadas às 23.031 proteínas sequenciadas do parasita utilizando o algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990). O motivo de não se empregar apenas as sequências dos 25 receptores de PAF na busca (mas também de um grande número de GPCRs) foi maximizar os resultados da busca, dado à grande diversidade esperada na comparação entre as sequências de receptores de animais e a do parasita. Desse modo, 6.440 proteínas do parasita foram inicialmente selecionadas, das quais 73 sequências apresentaram sete

domínios transmembrana segundo triagem inicial realizada pelo software Phobius (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004).

Considerando que os 25 receptores de PAF de animais possuem um tamanho de cadeia que varia entre 322 aa (Peixe Paulistinha) a 363 aa (Baiacu), foram selecionadas para análise de resíduos conservados as sequências de proteínas de *T. cruzi* com tamanho de cadeia entre 200 e 600 aa, as quais, em princípio, representariam um tamanho de cadeia mais provável para o receptor de PAF do parasita. Na prática, obteve-se como resultado 33 proteínas hipotéticas diferentes, assim denominadas por terem sido determinadas como parte do proteoma do parasita de maneira indireta (por exemplo, através de um gene correspondente), não tendo ainda sido isoladas por métodos experimentais.

Comparações destas proteínas com o receptor de PAF humano via BLAST resultaram em níveis de escore semelhantes, variando entre 15,0 e 21,9 (**Tabela 5**). Apenas uma única proteína, a Tc00.1047053511249.90, apresentou níveis de escore não significativos quando comparado ao receptor de PAF humano. No alinhamento com a sequência do receptor de PAF humano, nenhuma das proteínas analisadas apresentou todos os resíduos correspondentes à tríade de histidina (H188, H248, e H249) e apenas uma proteína, a Tc00.1047053505945.90, mostrou resíduos conservados correspondentes às fenilalaninas 97 e 98.

Com relação ao total de aminoácidos conservados, a proteína Tc00.1047053511507.60 apresentou 15 resíduos conservados, os quais representam aproximadamente 20% do total observado na comparação entre receptores de PAF de animais. A partir do alinhamento da sequência desta proteína com o receptor de PAF humano (**Figura 31**) é possível constatar que, à exceção do primeiro domínio do receptor humano, existe uma certa sobreposição entre todas as

regiões transmembrana das duas proteínas, em alguns casos com duas regiões transmembrana da proteína hipotética se sobrepondo a um único domínio do receptor de PAF humano (**Domínio V, Figura 31**). Esta região da proteína do parasita, correspondente aos domínios IV e V da Tc00.1047053511507.60, poderia hipoteticamente representar uma única região transmembrana mesmo porque, do contrário, a alça entre as duas regiões seria composta por apenas dois aminoácidos (**Figura 32, A**).

Tabela 5 – Proteínas hipotéticas de *T. cruzi* (200 a 600 aa) com sete domínios transmembrana.

Código da proteína	Cadeia (aa)	Resíduos conservados	Escore	e-value	F97	F98	H188	H248	H249
1047053511507.60	311	15	19,2	0,14		■			
1047053506503.4	467	14	18,5	0,33			■		
1047053505945.90	288	14	16,2	0,99	■	■	■		
1047053509945.24	319	14	18,1	0,34					
1047053511127.300	534	14	20,8	0,07		■			
1047053429257.20	412	14	19,2	0,17		■	■	■	
1047053509539.30	253	13	16,9	0,48	■				
1047053509269.19	471	13	18,1	0,41				■	
1047053508277.210	319	13	18,1	0,33					
1047053510493.10	240	13	15,8	1,10					
1047053506999.10	377	13	13,9	7,30					
1047053506179.30	600	12	21,6	0,05		■			
1047053507681.50	516	12	15,8	2,70	■				
1047053507969.30	470	11	18,1	0,44					
1047053511573.49	235	11	15,0	1,80	■				
1047053511249.90	252	10	-	-					
1047053503505.20	369	10	16,2	1,60	■				
1047053503487.70	382	9	19,6	0,12					
1047053510729.290	335	9	20,8	0,06					■
1047053504137.150	340	9	21,9	0,02					
1047053509799.90	310	9	15,4	1,70				■	
1047053504159.40	276	9	17,3	0,42					
1047053511245.160	287	9	19,6	0,10		■			■
1047053507663.80	600	9	21,9	0,05					
1047053505193.74	340	9	15,0	2,60		■			
1047053509799.100	340	8	21,6	0,03		■			
1047053506467.4	340	8	15,0	2,80		■			
1047053510989.10	287	8	19,6	0,10	■				■
1047053511245.140	279	8	17,3	0,40					
1047053511245.150	300	7	16,9	0,69					
1047053504137.140	310	7	15,4	1,70				■	
1047053510511.9	264	7	18,1	0,26					
1047053503635.20	494	3	18,9	0,29					■

Do ponto de vista estrutural, não está exatamente claro a importância do primeiro domínio para a funcionalidade do receptor de PAF humano. Sabe-se que mutações nos domínios II, III, e VII do receptor podem conduzir à maior afinidade pelo PAF ao passo que mutações nos domínios V, VI, e VII geralmente resultam em queda da afinidade (PRESCOTT et al., 2000). Na realidade, a mutação de todos os aminoácidos do terceiro domínio do receptor de PAF ainda produz receptores ativos, embora com menor especificidade pelo substrato (PRESCOTT et al., 2000), e mesmo para algumas GPCRs, cinco domínios transmembrana parecem ser suficientes para a funcionalidade do receptor (MIRZADEGAN et al., 2003).

Certa similaridade pode ser constatada comparando as estruturas secundárias das proteínas humana e do parasita (**Figura 32**). Além dos domínios transmembrana, a proteína hipotética ainda preserva as extremidades *N* e *C* terminais, sendo esta última responsável no receptor de PAF pelo fenômeno de dessensibilização após ativação inicial pelo fosfolípido (feedback negativo). Adicionalmente, a região correspondente ao terceiro “loop” no receptor de PAF humano (formada entre os domínios V e VI) também estaria preservada, sendo esta necessária à transdução de sinais ao meio intracelular após o acoplamento do PAF ao receptor (PRESCOTT et al., 2000). No caso da proteína hipotética, um tamanho de cadeia de 311 aa não difere muito da menor sequência de receptor de PAF empregada neste estudo (322 aa, Peixe Paulistinha), bem como sua massa correspondente a 35,1 KD seria compatível com os estudos de imunodeteção de GPCRs em *T. cruzi*, nos quais valores máximos encontrados foram de 38KD (NEW; WONG, 1998).

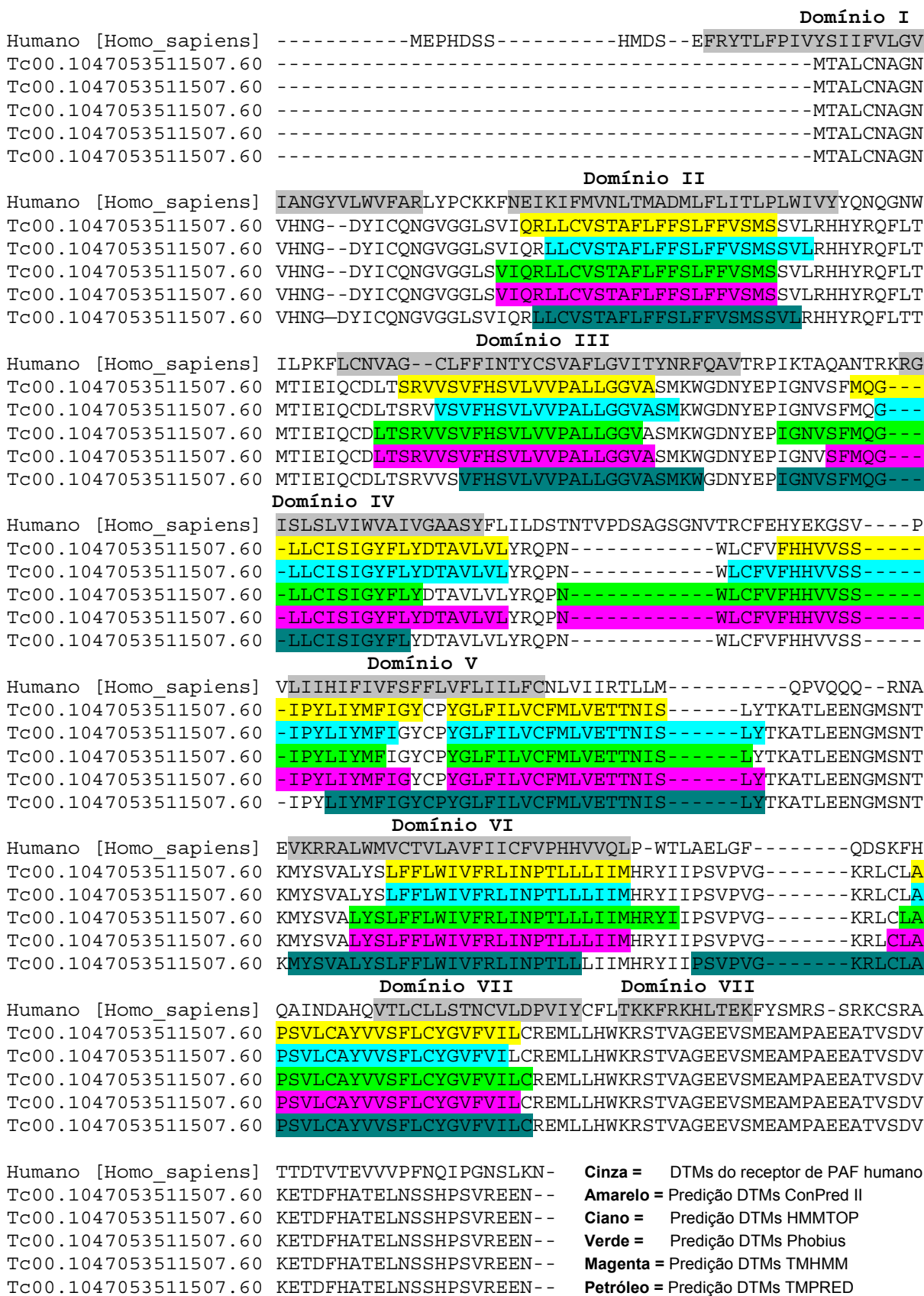


Figura 31 – Alinhamento entre a sequência do receptor de PAF humano e a proteína hipotética de *T. cruzi*, Tc00.1047053511507.60, com predição dos domínios transmembrana (DTMs) por cinco métodos distintos.

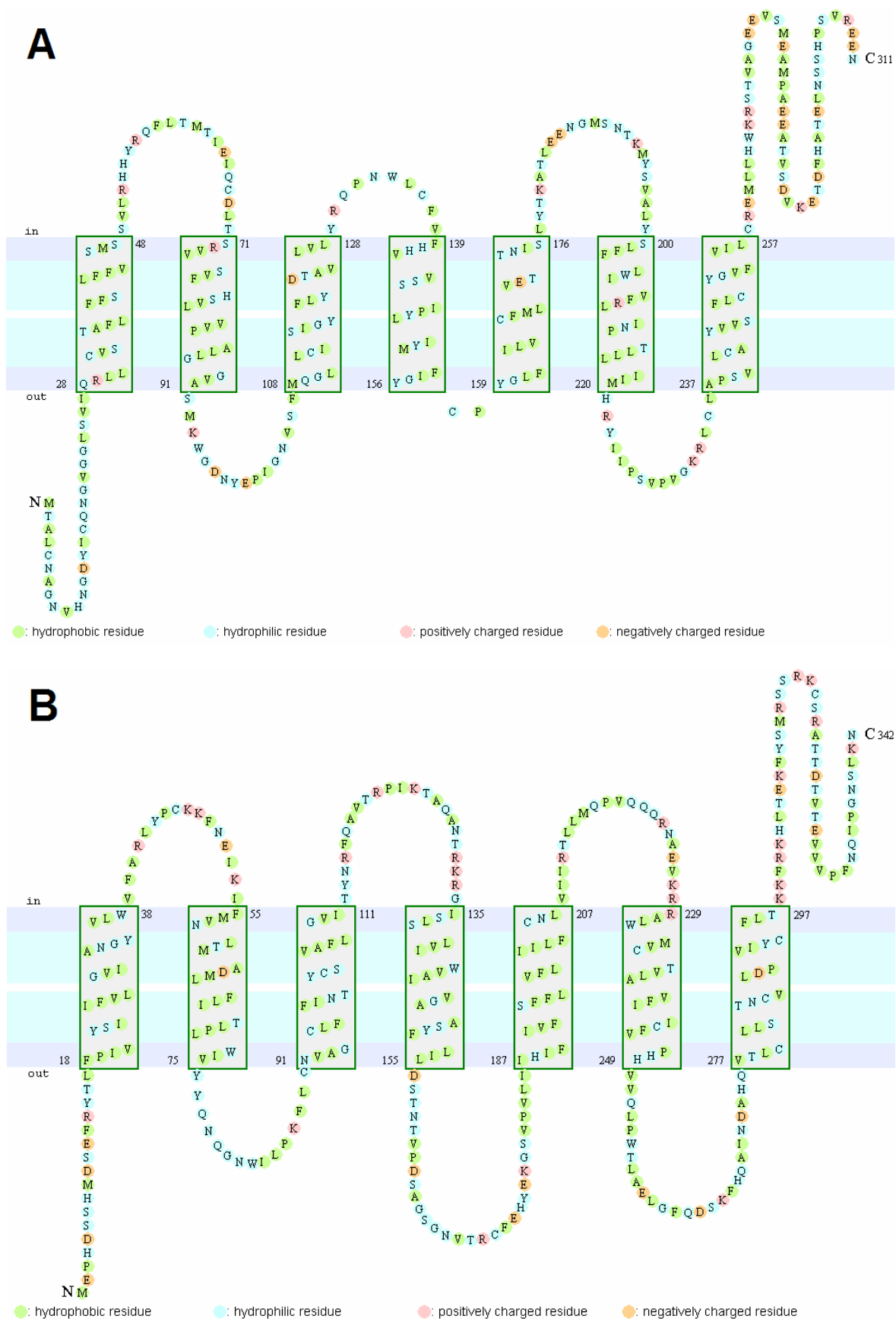


Figura 32 – Representação da estrutura secundária da proteína de *T. cruzi* Tc00.1047053511507.60 (A) e do receptor de PAF humano (B) gerada por ConPred II (Arai e col., 2004).

5. CONCLUSÕES

Durante o processo de síntese dos análogos propostos neste trabalho, diversos problemas surgiram e foram solucionados com base em revisão da literatura e subsequente adaptação dos protocolos de síntese empregados. Neste sentido, foram realizadas com sucesso a extração e desacilação da fosfatidilcolina de gema de ovo, a condensação do ácido hidroxi-hexadecanóico à resina de Wang-Glicina e a tosilação de Glicerilfosforilcolina, alcançada através de um protocolo de síntese inédito. Entretanto, apesar de todos os esforços realizados, não foi possível a obtenção do produto final **(15)** proposto. Aparentemente, dois grandes entraves impediram o êxito deste projeto: o uso da resina de Wang em protocolos de síntese nunca anteriormente descritos (Síntese de Williamson, por exemplo) e a manipulação do núcleo de GFC, positivamente carregado.

A principal limitação das reações envolvendo a resina de Wang está na impossibilidade, do ponto de vista prático, do acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). É verdade que teoricamente seria possível utilizar a CCDA após clivagem da resina por ácido trifluoroacético, mas vale ressaltar que cada amostra de resina clivada neste procedimento demandaria 2 horas de reação, o que seria pouco adequado para se controlar, por exemplo, uma reação de 30 minutos.

O uso da Resina de Wang para a síntese de aminoácidos trata-se de um procedimento devidamente padronizado, além de ser possível o acompanhamento da reação através do teste de Kaiser, o qual indica a presença/ausência de grupos amino livres. Desse modo, as experiências adquiridas ao longo deste projeto sugerem que a etapa de condensação à resina deva ser a última do fluxograma de síntese para que esta seja feita através pela geração de um grupo amida (como na síntese de aminoácidos) e não através de síntese de Williamson.

O uso da glicerilfosforilcolina como intermediário-chave do planejamento sintético inicialmente se mostrava altamente conveniente, visto que esta poderia ser obtida de uma fonte irrisória, gemas de ovos, além de conter o grupo fosfocolina necessário aos análogos de PAF na sua estrutura. Contudo, ao longo deste projeto, observou-se que a presença da carga positiva no nitrogênio quaternário (bem como a carga negativa do grupo fosfato dependendo do pH do meio) impõe restrições consideráveis tanto aos protocolos de síntese que podem ser adotados quanto aos seus correspondentes processos de purificação.

O uso de água, que seria o solvente ideal para a molécula de GFC, é incompatível com a maioria das reações descritas em síntese orgânica, também sendo classicamente empregada nos procedimentos de partição para solubilizar sais e outras substâncias que se pretende separar da fase orgânica de interesse, situação inversa do observado para a GFC. Ademais, o uso da sílica, a fase estacionária mais utilizada no processo de purificação por cromatografia em coluna, é impraticável no caso deste tipo de substância visto que o deslocamento destes compostos do ponto de origem só pode ser feito pelo uso de fases móveis extremamente polares, as quais promovem o arraste de sais da fase estacionária e, conseqüentemente, resultam na contaminação do produto que inicialmente se pretendia purificar.

Em relação aos estudos de bioinformática, salienta-se que, somente pela análise de sequências, não foi possível afirmar com certeza que uma proteína hipotética específica corresponda ao receptor de PAF no parasita. De fato, a ausência das estruturas tridimensionais das proteínas hipotéticas e do receptor de PAF humano impede que seja efetuada uma análise mais minuciosa relativa ao acoplamento do ligante aos potenciais receptores. Sabe-se que protozoários e

animais são espécies muito distantes do ponto de vista evolutivo e, conseqüentemente, divergências na sequência de proteínas correspondentes já seriam esperadas. Contudo, os métodos empregados neste estudo sugerem que o proteoma de *T. cruzi* contém proteínas com características de GPCRs e entre estas, possivelmente, receptores de PAF a serem explorados na terapia da doença de Chagas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARAI, M.; MITSUKE, H.; IKEDA, M.; XIA, J.-X.; KIKUCHI, T.; SATAKE, M.; SHIMIZU, T. ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 390-393, 2004.

AMBRÓSIO, L.; ALIBERTI, J. C.; GUARATINI, T.; LOPES, N. P.; MACHADO, J.B.M.; KATO, M. J.; TEDESCO, A. C.; YAMAUCHI, L. M. L.; SILVA, J. S.; DIAS-BARUFFI, M. Interaction between Platelet Activating Factor (PAF) and *Trypanosoma cruzi*: biological action and molecular aspects of a putative Receptor. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 13, p. 74-75, 2003.

ARMAREGO, W. L. E.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. 5^a ed. USA: Butterworth-Heinemann, 2003.

ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; CARRINGTON, M.; DEPLEDGE, D. P.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GARDNER, M. J.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O. S.; HEIGES, M.; HERTZFOWLER, C.; HOUSTON, R.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; KRAEMER, E.; LI, W.; LOGAN, F. J.; MILLER, J. A.; MITRA, S.; MYLER, P. J.; NAYAK, V.; PENNINGTON, C.; PHAN, I.; PINNEY, D. F.; RAMASAMY, G.; ROGERS, M. B.; ROOS, D. S.; ROSS, C.; SIVAM, D.; SMITH, D. F.; SRINIVASAMOORTHY, G.; STOECKERT JR, C. J.; SUBRAMANIAN, S.; THIBODEAU, R.; TIVEY, A.; TREATMAN, C.; VELARDE, G.; WANG, H. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 457-462, 2010.

ATWOOD 3RD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.

BAER, E. 1,2,5,6-diacetone D-mannitol and 1,2,5,6-diacetone L-mannitol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 67, p. 338-339, 1945.

BAER, E.; HERMANN, O. L.; FISCHER, H. O. L. Studies on acetone-glyceraldehyde IV: preparation of D(+)-acetone glycerol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 463-473, 1939.

BARTON, D. H. R.; JASZBERENYI, J. C.; TBEODORAKIS, E. A. O-sulfinylation of alcohols with methanesulfonyl cyanide or *p*-toluenesulfonyl cyanide. **Tetrahedron**, v. 41, n. 44, p. 9167-9178, 1991.

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, p. 132–133, 2006.

BERNARDES, L. S. C.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7075–7082, 2006.

BIDD, J.; KELLY, D. J.; OTTLEY, P. M.; PAYNTER, O. I.; SIMMONDS, D. J.; WHITING, M. C. Convenient syntheses of bifunctional C₁₂-acyclic compounds from cyclododecanone. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 7, p. 1369-1372, 1983.

BIRDSALL, N. J. M.; FEENEY, J.; LEE, A. G.; LEVINE, Y. K.; METCALFE, J. C. Dipalmitoyl-lecithin: assignment of the ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectra and conformational studies. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 10, p. 1441-1445, 1972.

BITTMAN, R.; BYUN, H. S.; MERCIER, B.; SALARI, H. Isosteric phosphonate analogs of ET-16-OMe. Synthesis and biological evaluation of the enantiomers of 2'-(Trimethyl-ammonio)ethyl 4-(hexadecyloxy)-3-methoxybutanephosphonate and 2'-(trimethylammonio) ethyl 4-(hexadecylthio)-3-methoxybutanephosphonate. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 425–430, 1994.

BLANK, M. L.; CRESS, E. A.; LEE, T. C.; MALONE, B.; SURLLES, J. R.; PIANTADOSI, C.; HAJDU, J.; SNYDER, F. Structural features of platelet activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) required for hypotensive and platelet serotonin responses. **Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 3-20, 1982.

BROCKERHOFF, H. Breakdown of phospholipids in mild alkaline hydrolysis. **Journal of Lipid Research**, v. 4, p. 96-99, 1963.

BROCKERHOFF, H.; YURKOWSKI, M. Simplified preparation of L-alpha-glycerylphosphorylcholine. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1777, 1965.

CHAKRABORTY, T. K.; REDDY, V. R.; REDDY, T. J. Synthesis of highly substituted tetrahydropyrans: preparation of the C₂₀-C₂₈ moiety of phorbaxozoles. **Tetrahedron**, v. 59, p. 8613–8622, 2003.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. Oxford University Press, p. 9-31, 2000.

CHAO, W.; OLSON, M. S. Platelet activating factor: receptor and signal transduction. **Biochemical Journal**, v. 292, p. 617-629, 1993.

CHEUNG, A. P.; OLSON, L. L. $^1\text{H-NMR}$ assay of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in AL721. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 8, n. 8-12, p. 729-734, 1990.

CHI, Y.; LIN, S. Research advances in extraction and application of egg-yolk lecithin. **Journal of Food Fermentation Industries**, v. 28, p. 50-53, 2002.

CHITTENDEN, G. J. F. Some new aspects of the synthesis and isolation of 1,2:5,6-di-O-iso-propylidene-D-mannitol. **Carbohydrate Research**, v. 222, p. 283-287, 1991.

CRUM-BROWN, A.; FRASER, T. R. On the connection between chemical constitution and physiological action: with special reference to the physiological action of the salts of the ammonium bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia. **Journal of Anatomy and Physiology**, v. 2, n. 2, p. 224-242, 1868.

CUNDIFF, R. H.; MARKUNAS, P. C. Further improvements in the preparation and utilization of Tetrabutylammonium hydroxide titrants. **Analytical Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 584-585, 1962.

DAS, B.; REDDY, V. S. ZrCl_4 as an efficient catalyst for selective tosylation of alcohols with *p*-Toluenesulfonic Acid. **Chemistry Letters**, v. 33, n. 11, p. 1428-1429, 2004.

DAS, B.; REDDY, V. S.; REDDY, M. R. An efficient and selective tosylation of alcohols with *p*-toluenesulfonic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 6717-671, 2004.

DEBOST, J. L.; GELAS, J.; HORTON, D. Selective preparation of mono- and diacetals of D-mannitol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 1381-1382, 1983.

DORN, P.; PERNICIARO, L.; YABSLEY, M. J.; ROELLIG, D. M.; BALSAMO, G.; DIAZ, J.; WESSON, D. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 605-507, 2007.

EKROOS, K.; EJSING, C. S.; BAHR, U.; KARAS, M.; SIMONS, K.; SHEVCHENKO, A. Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 11, p. 2181-92, 2003.

ERUKULLA, R. K.; BYUN, H. S.; BITTMAN, R. Three-Step synthesis of platelet-activating factor from chiral glycidol via regioselective monophosphitylation of 1-O-hexadecyl-*sn*-glycerol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, 7706-7708, 1995.

FASOLI, E.; ARNONE, A.; CALIGIURI, A.; D'ARRIGO, P.; FERRAB, L.; SERVI, S. Tin-mediated synthesis of lyso-phospholipids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 2974–2978, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FUJITA, K.; NAKAI, H.; KOBAYASHI, S.; INOUE, K.; NOJIMA, S.; OHNO, M. An efficient and stereoselective synthesis of platelet-activating factors and the enantiomers from D- and L-tartaric acids. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 34, p. 3507-3510, 1982.

GODFROID, J. J.; HEYMANS, F.; MICHEL, E.; REDEUILH, C.; STEINER, E.; BENVENISTE, J. Platelet activating factor (PAF-acether): total synthesis of 1-O-octadecyl 2-O-acetyl *sn*-glycero-3-phosphoryl choline. **FEBS Letters**, v. 28; 116 (2), p. 161-164, 1980.

GODFROID J. J.; BROQUET, C.; JOUQUEY, S.; LEBBAR, M.; HEYMANS, F.; REDEUILH, C.; STEINER, E.; MICHEL, E.; COEFFIER, E.; FICHELE, J.; WORCEL, M. Structure-activity relationship in PAF-acether 3: hydrophobic contribution to agonistic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 792-797, 1987.

GOMES, M. T.; MONTEIRO, R. Q.; GRILLO, L. A.; LEITE-LOPES, F.; STROEDER, H.; FERREIRA-PEREIRA, A.; ALVIANO, C. S.; BARRETO-BERGTER, E.; NETO, H. C.; CUNHA E SILVA, N. L.; ALMEIDA, I. C.; SOARES, R. M.; LOPES, A. H. Platelet-activating factor-like activity isolated from *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 165–173, 2006.

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

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

GUI, C.; ZHU, W.; CHEN, G.; LUO, X.; LIEW, O. W.; PUAH, C. M.; CHEN, K.; JIANG, H. Understanding the Regulation Mechanisms of PAF Receptor by Agonists and Antagonists: Molecular Modeling and Molecular Dynamics Simulation Studies. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 67, p. 41–52, 2007.

HEYMANS, F.; STEINER, E.; JOUQUEY, S.; GODFROID, J. J. PAF receptor 2: quantitative hydrophobic contribution of the agonist's etheroxid chain. **Journal of Lipid Mediators**, v. 1, n. 5, p. 303-312, 1989.

HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. TMbase: a database of membrane spanning protein segments. **Biological Chemistry**, v. 374, p. 166, 1993.

HONDA, Z.; NAKAMURA, M.; MIKI, I.; MINAMI, M.; WATANABE, T.; SEYAMA, Y.; OKADO, H.; TOH, H.; ITO, K.; MIYAMOTO, T.; SHIMIZU, T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. **Nature**, v. 349, n. 6307, p. 342-346, 1991.

HORN, F.; BETTLER, E.; OLIVEIRA, L.; CAMPAGNE, F.; COHEN, F. E.; VRIEND, G. GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 294-297, 2003.

HOSUR, R. V.; GOVIL, G. Conformation of glycerol moiety of dipalmitoyl lecithin in CDCl₃ solution by ¹H and ¹³C NMR. **Current Science**, v. 48, p. 329-332, 1979.

ICHIHARA, K.; IWASAKI, H.; UEDA, K.; TAKIZAWA, R.; NAITO, H.; TOMOSUGI, M. Synthesis of phosphatidylcholine: An improved method without using the cadmium chloride complex of sn-glycero-3-phosphocholine. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 137, p. 94-99, 2005.

JAIN, M. K.; ROGERS, J. Substrate specificity of interfacial catalysis by phospholipase A2 in the scooting mode. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1003, p. 91-97, 1989.

JAKOB, B.; VOSS, G.; GERLACH, H. Synthesis of (S)- and (R)-3-hydroxyhexadecanoic acid. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n. 11, p. 3255-3262, 1996.

JIANGA, N.; WANG, J. DBU-promoted condensation of acyldiazomethanes to aldehydes and imines under catalytic conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 7, p. 1285-1287, 2002.

KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, p. 1027-1036, 2004.

KANDA, P.; WELLS, M. A. Synthesis of sn-glycero-1-phosphocholine. **Journal of Lipid Research**, v. 22, p. 879-882, 1981.

KAPITÁNA, P.; GRACZA, T. Stereocontrolled oxycarbonylation of 4-benzyloxyhepta-1,6-diene-3,5-diols promoted by chiral palladium(II) complexes. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 38-44, 2008.

KIM, C.; KEUM, J. E.; YU, S. H.; KO, S. Y. Regioselective Mitsunobu-tosylation of 1,2-diols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1671-1674, 2009.

KONG, X. GRINDLEY, B. Control of regioselectivity in reactions of dialkylstannylene acetals. Part I: a dramatic reversal of regioselectivity in mono-p-toluenesulfonation reactions. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 72, p. 2396-2404, 1994.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, p. 567-580, 2001.

KUN, H.; MOORE, A.; MASCOLA, L.; STEURER, F.; LAWRENCE, G.; KUBAK, B.; RADHAKRISHNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; KUEHNERT, M. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 11, p. 1534-1540, 2009.

KUSZMANN, J.; TOMORI, E.; MEERWALD, I. The synthesis of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-D-mannitol. **Carbohydrate Research**, v. 128, p. 87-89, 1984.

LOENING, N. M.; CHAMBERLIN, A. M.; ZEPEDA, A. G.; GONZALEZ, R. G.; CHENG, L. L. Quantification of phosphocholine and glycerophosphocholine with ³¹P edited ¹H NMR spectroscopy. **NMR in Biomedicine**, v. 18, n. 7, p. 413-420, 2005.

MATULIC-ADAMIC, J.; SEREBRYANY, V.; HAEBERLI, P.; MOKLER, V. R.; BEIGELMAN, L. Synthesis of N-Acetyl-D-galactosamine and folic acid

MICHAELIS, L.; SCHLIEPER, P. 500 MHz ¹H NMR of phospholipid liposomes: lanthanide shift on glycerol-γ and acyl-chain C2 resonances. **FEBS letters**, v. 147, n. 1, p. 40-44, 1982.

MIRZADEGAN T, BENKÖ G, FILIPEK S, PALCZEWSKI K. Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. **Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 2759-2767, 2003.

MONCAYO, A. **Tropical disease research: progress from 1991 to 1992**. Genebra: OMS, 1993, p. 67-75. (11th report of the UNDP/WORLD BANK/WHO: special program for research and training in tropical diseases).

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

MONTGOMERY, J. A.; SHORTNACY, A. T.; THOMAS, H. J. Analogs of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1197 a 1207, 1974.

MORPAIN, C.; NASSER, B.; LAUDE, B.; LATRUFFE, N. Improved preparation of di-O-isopropylidene-1,2:5,6-D-mannitol. **Organic Preparation Procedures International**, v. 22, p. 540-543, 1990.

MOSCHIDIS, M. C.; DEMOPOULOS, C. A.; KRITIKOU, L. G. Phosphono-platelet activating factor I: synthesis of 1-O-hexadecyl-2-O-acetyl-glycerol-3-(2-trimethyl ammonium-methyl) phosphonate and its platelet activating potency. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 33, n. 1, p. 87-92, 1983.

MUNIZ, J. R. C. **Aplicação da bioinformática nos estudos dos genes e enzimas envolvidos na síntese da goma fastidiana produzida pela *Xylela fastidiosa***. 2003. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

NEW, D. C.; WONG, J. T. Y. The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in Protozoa and ancestral Metazoa. **Biological Signals and Receptors**, v. 7, p. 98-108, 1998.

NIHEI, K.; KONNO, K.; BERNARDES, L. S. C.; LOPES, N., P. ; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; MARTINS, R. C. C.; KATO, M. J. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. **Archive for Organic Chemistry**, v. 6, p. 112-126, 2004.

OKUI S; SUZUKI Y; KOYAMA H; UMEZAWA O. Hydrolysis of lecithin with hydroxides of alkaline earth metals and the preparation of L-alpha-glycerolphosphorylcholine. **Yakugaku Zasshi**, v. 84, n. 12, 1206-1209, 1964.

OSTERMANN, G.; KERTSCHER, H. P.; LANG, A.; TILL, U. Modification of the polar head group of platelet activating factor: influence on the biological activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 43, n. 4, p. 247-255, 1987.

PALACIOS, L. E.; WANG, T. Extraction of egg-yolk lecithin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, (2005), 82(8), 565-569.

PATRICELLI, M. P.; CRAVATT, B. F. Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 38, n. 43, p. 14125–14130, 1999.

PORCEL, B. M.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U.; ANDERSSON, B. *Trypanosoma cruzi*: a putative vacuolar ATP synthase subunit and a CAAX prenyl protease-encoding gene as examples of gene identification in genome projects. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 176-186, 2000.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 69, p. 419–445, 2000.

RABINER, L. R.; JUANG, B. H. An Introduction to Hidden Markov Models. **IEEE ASSP Magazine**, p. 4-16, 1986.

REKKER, R. F.; DE KORT, H. M. The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 479-488, 1979.

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

RENKONEN, O. Breakdown of lecithin on aluminum oxide columns. **Journal of Lipid Research**, v. 3, p. 181–183, 1962.

RHEE, D.; MARKOVICH, R.; CHAE, W. G.; QIU, X.; PIDGEON, C. Chromatographic surfaces prepared from lysophosphatidylcholine ligands. **Analytica Chimica Acta**, v. 297, n. 3, p. 377-386, 1994.

RITTER, S. L.; HALL, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. **Nature Reviews in Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 819–830, 2009.

ROBLES, E. C.; ROELS, G. F. Preparation of deacylated phosphoglycerides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 6, n. 1, p. 31-8, 1971.

RODRIGUES, C. O.; DUTRA, P. M. L.; SOUTO-PADRON, T.; CORDEIRO, R. S. B.; LOPES, A. H. C. S. Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, p. 735-740, 1996.

RODRIGUES C. O.; DUTRA P. M. L.; BARROS F. S.; SOUTO-PADRON T.; MEYER-FERNANDES J. R.; LOPES A. H. C. S. Platelet-activating factor induction of secreted phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 266, p. 36-42, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAI, T.; KAWAI, H.; KAMISHOHARA, M.; ODAGAWA, A.; SUZUKI, A.; UCHIDA, T.; KAWASAKI, T.; TSURUO, T.; OTAKE, N. Structure-antitumor activity relationship of semi-synthetic spicamycin derivatives. **Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 12, p. 1467-1480, 1995.

SALARI, H.; DRYDEN, P.; HOWARD, S.; BITTMAN, R. Two different sites of action for platelet activating factor and 1-O-alkyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine on platelets and leukemic cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 70, n. 2, p. 129-135, 1992.

SATOUCHI, K.; PINCKARD, R. N.; MCMANUS, L. M.; HANAHAN, D. J. Modification of the polar head group of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and subsequent effects upon platelet activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 9, p. 4425-4432, 1981.

SCHMID, C. R.; BRYANT, J. D.; DOWLATZEDAH, M.; PHILLIPS, J. L.; PRATHER, D. E.; SCHANTZ, R. D.; SEAR, N. L.; VIANCO, C. S. Synthesis of 2,3-O-1sopropylidene-D-glyceraldehyde in high chemical and optical purity: observations on the development of a practical bulk process. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 4056-4058, 1991.

SEEBERGER, P. H; HAASE, W-C. Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 4389-4393, 2000.

SELASSIE, C. D. History of quantitative structure-activity relationships. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**. 6^a ed. Nova York: John Wiley & Sons Inc, 2003. p. 03-04.

SHIN, E.; CHANG, J.; KIM, H.J.; KIM, Y.; PARK, Y.S. Stereoselective preparation of *N*-alkyl dipeptide analogues via dynamic kinetic resolution of alpha-halo acyl amino esters. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 27, n. 3, p. 447-449, 2006.

SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 04, p. 15-26, 2007.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. 2^a ed. California: Elsevier Academic Press, 2004. p. 26-28.

STRUBLEA, J. R.; BODE, J. W. Formal synthesis of salinosporamide: a via NHC-catalyzed intramolecular lactonization. **Tetrahedron**, v. 65, n. 26, p. 4957-4967, 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TATTRIE, N. H.; MCARTHUR, C. S. L-alpha-glycerophosphorylcholine. **Biochemical Preparations**, v. 6, p. 16-19, 1958.

TIPSON, R. S.; COHEN, A. Reaction of some sulfonic esters of D-mannitol with methoxide: synthesis of 2,3:4,5-dianhydro-D-iditol. **Carbohydrate Research**, v. 7, n. 3, p. 232-243, 1968.

TSUBOI, S.; TAKEDA, S.; YAMASAKI, Y.; SAKAI, T.; UTAKA, M.; ISHIDA, S.; YAMADA, E.; HIRANO, J. A convenient synthesis of Platelet-Activating Factors and their analogues from chiral epichlorohydrin. **Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 1417-1420, 1992.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, p. 849-850, 2001.

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

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 2, p. S7-S12, 2000.

WISSNER, A.; SUM, P. E.; SCHAUB, R. E.; KOHLER, C. A.; GOLDSTEIN, B. M. Analogues of platelet activating factor (PAF) 1: some modifications of the alkoxy chain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 1174-1181, 1984.

WISSNER, A.; KOHLER, C. A.; GOLDSTEIN, B. M. Analogues of platelet activating factor (PAF) 3: replacement of the phosphate moiety with a sulfonylbismethylene group. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 1365-1367, 1985.

WISSNER, A.; SCHAUB, R. E.; SUM, P. E.; KOHLER, C. A.; GOLDSTEIN, B. M. Analogues of platelet activating factor (PAF) 4: some modifications of the phosphocholine moiety. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 328-333, 1986.

WISSNER, A.; KOHLER, C. A.; GOLDSTEIN, B. M. Analogues of platelet activating factor (PAF) 5: multiple oxygen substitution of the alkoxy chain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 1315-1319, 1986.

WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W. **Greene's protective groups in organic synthesis**. 4^a edição. Nova York: Wiley Interscience, 2007.

YAMAMURA, H.; KAWASAKI, J.; SAITO, H.; ARAKI, S.; KAWAI, M. Zinc bromide-promoted tosylation of alcohols allows efficient temperature-controlled primary hydroxy sulfonylation. **Chemistry Letters**, v. 7, p. 706-707, 2001.

YAMAUCHI, K.; UNE, F.; TABATA, S.; KINOSHITA, M. Synthesis of glycerophosphonolipids containing aminoalkylphosphonic acids. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I: Organic and Biorganic Chemistry**, v. 5, p. 765-770, 1986.

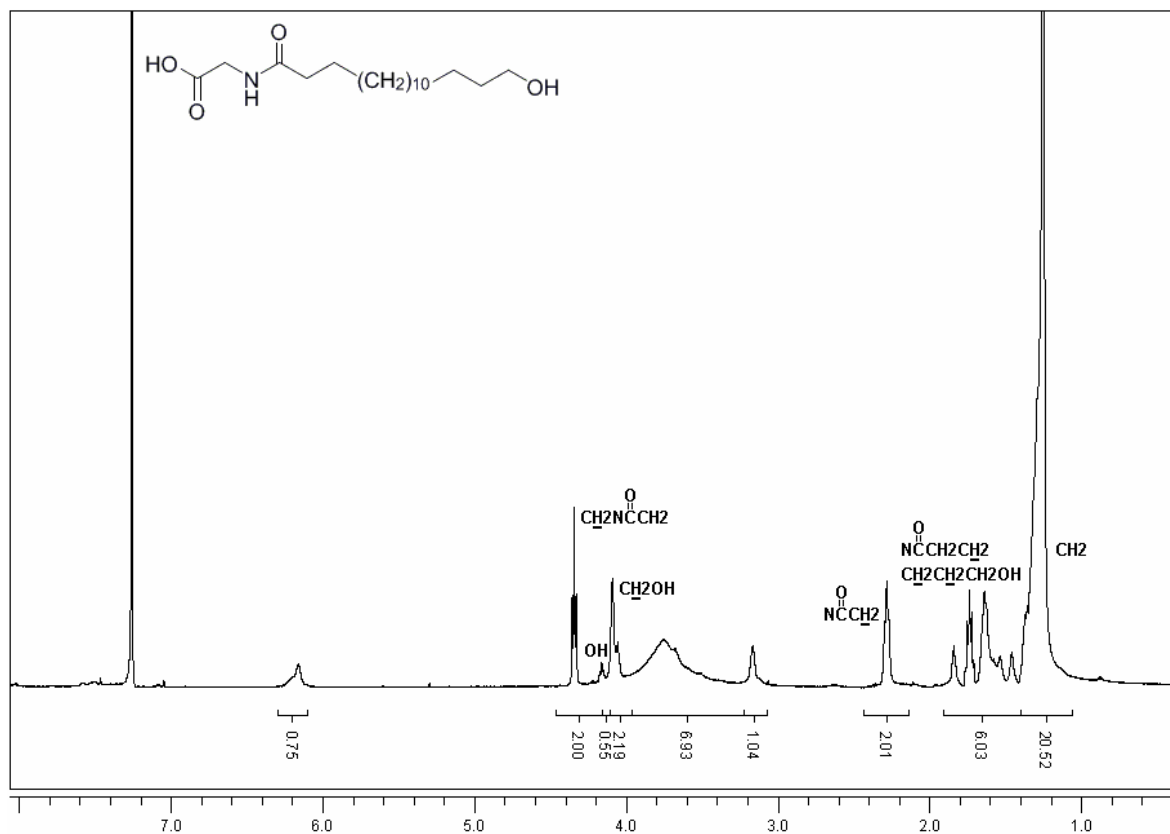
YANO, N.; FUKINBARA, I.; TAKANO, M. **Process for obtaining yolk lecithin from raw egg yolk**. US n. PI. 4157404, 06 de Junho de 1979.

YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, v. 47, p. 540-547, 2007.

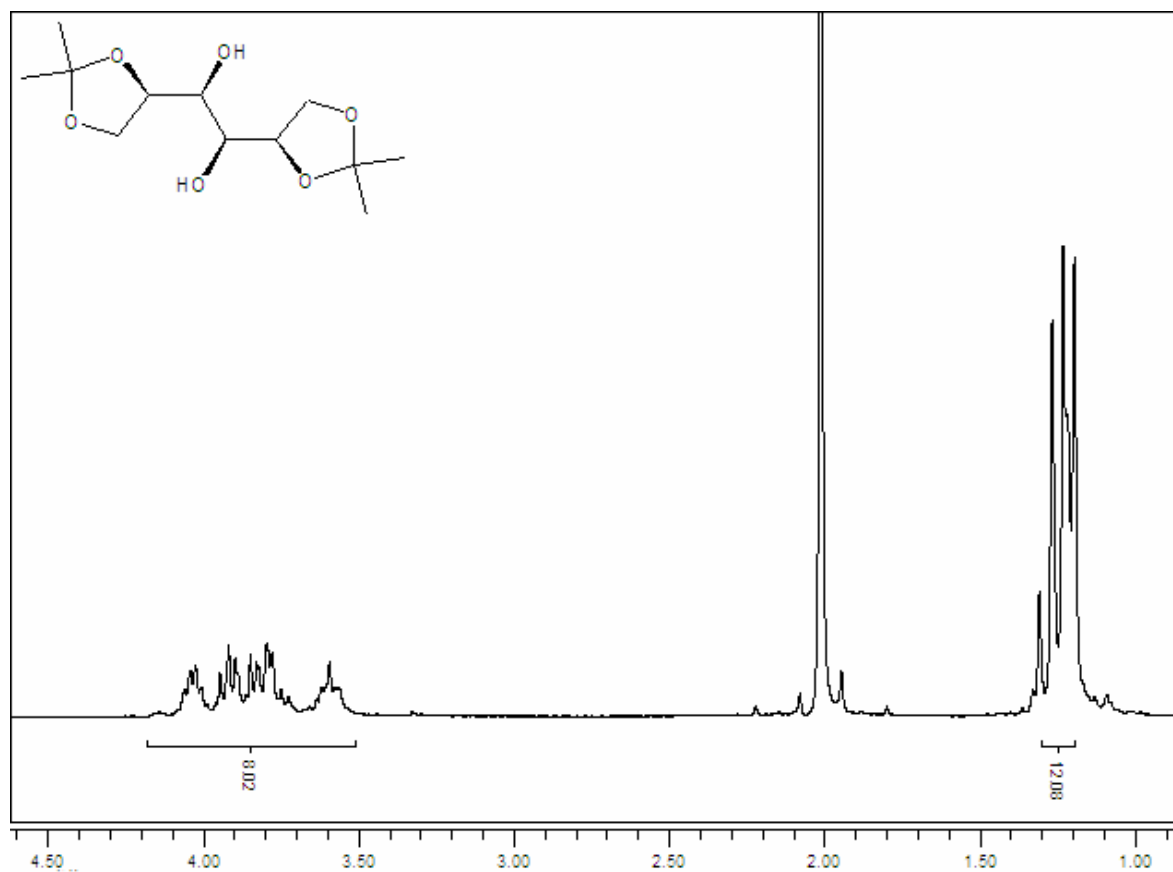
ZHONG, W.; NEUBIG, R. B. Regulators of G Protein Signaling: novel multifunctional drug targets. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 837-845, 2001.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: BRYSON, V.; VOGEL, H. J. (eds.) **Evolving Genes and Proteins**. Nova York: Academic Press, 1965. pp. 97-166.

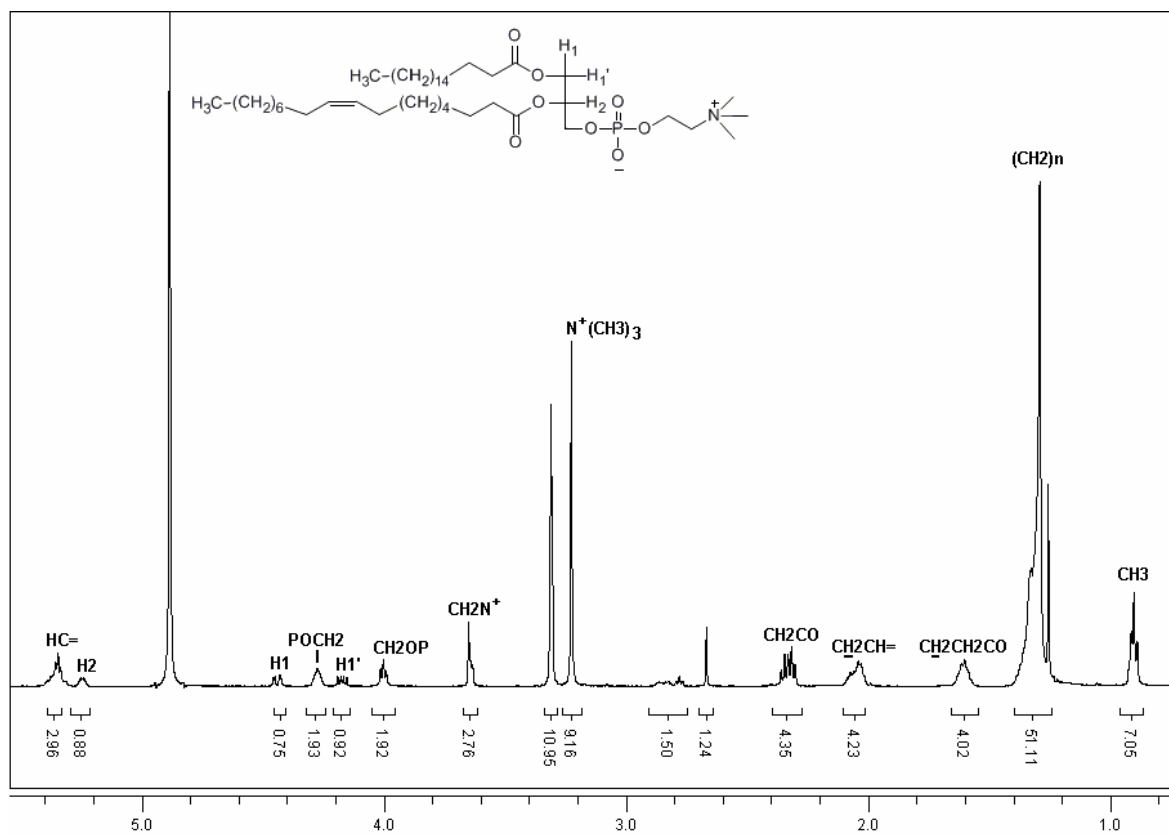
ANEXOS



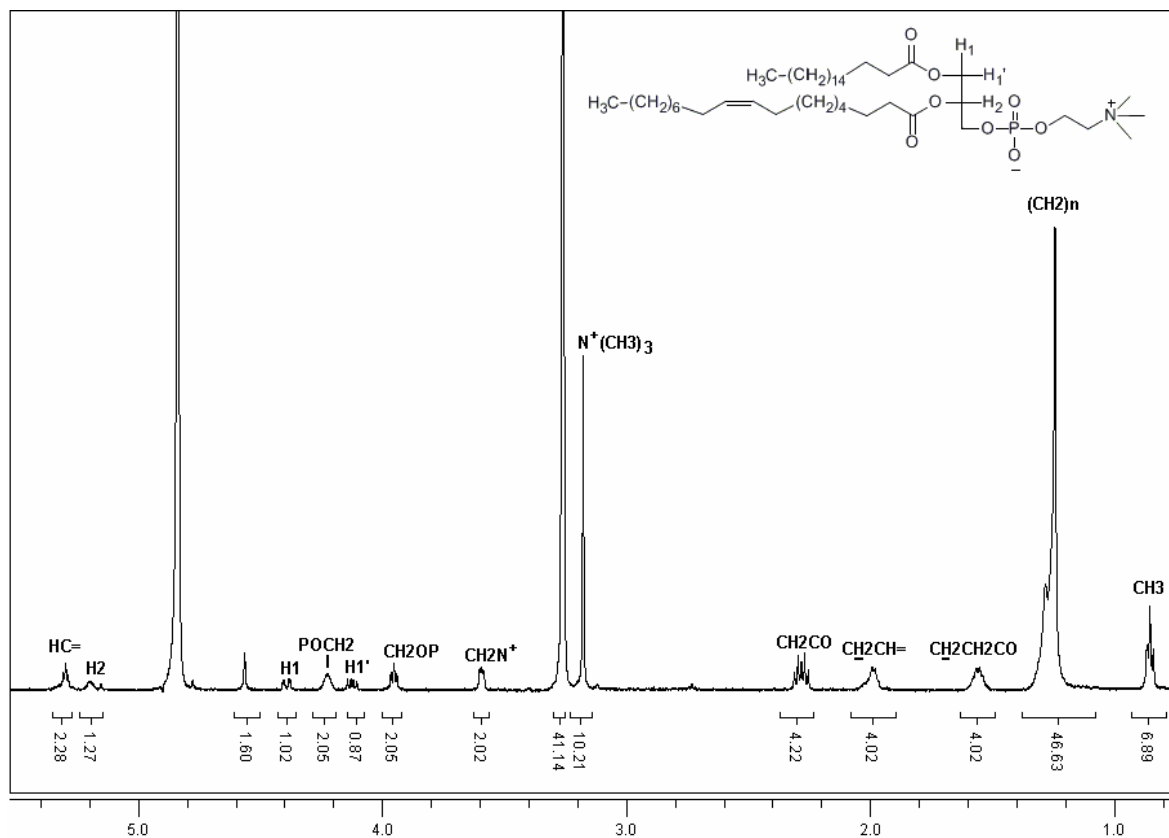
Anexo 1 - Espectro de RMN ^1H de derivado Gly-Ácido Hidroxi-hexadecanóico (500 MHz, CDCl_3).



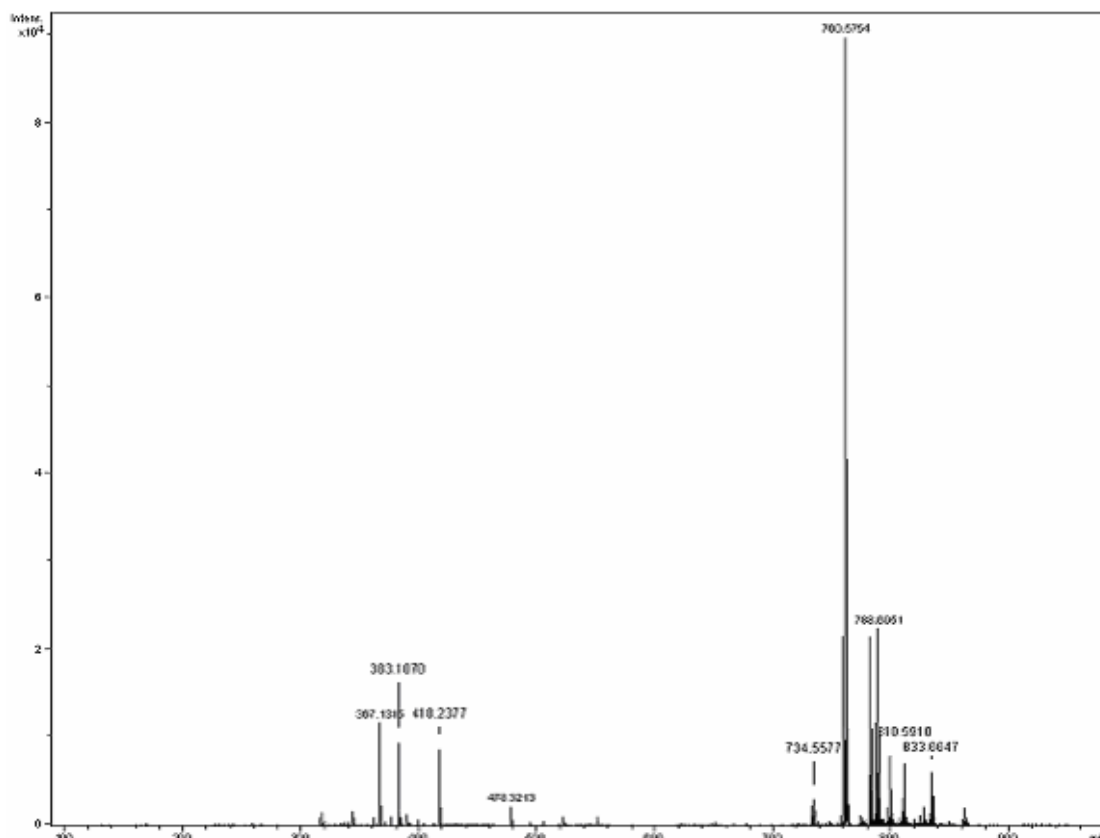
Anexo 2 - Espectro de RMN ^1H de 1,2,5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).



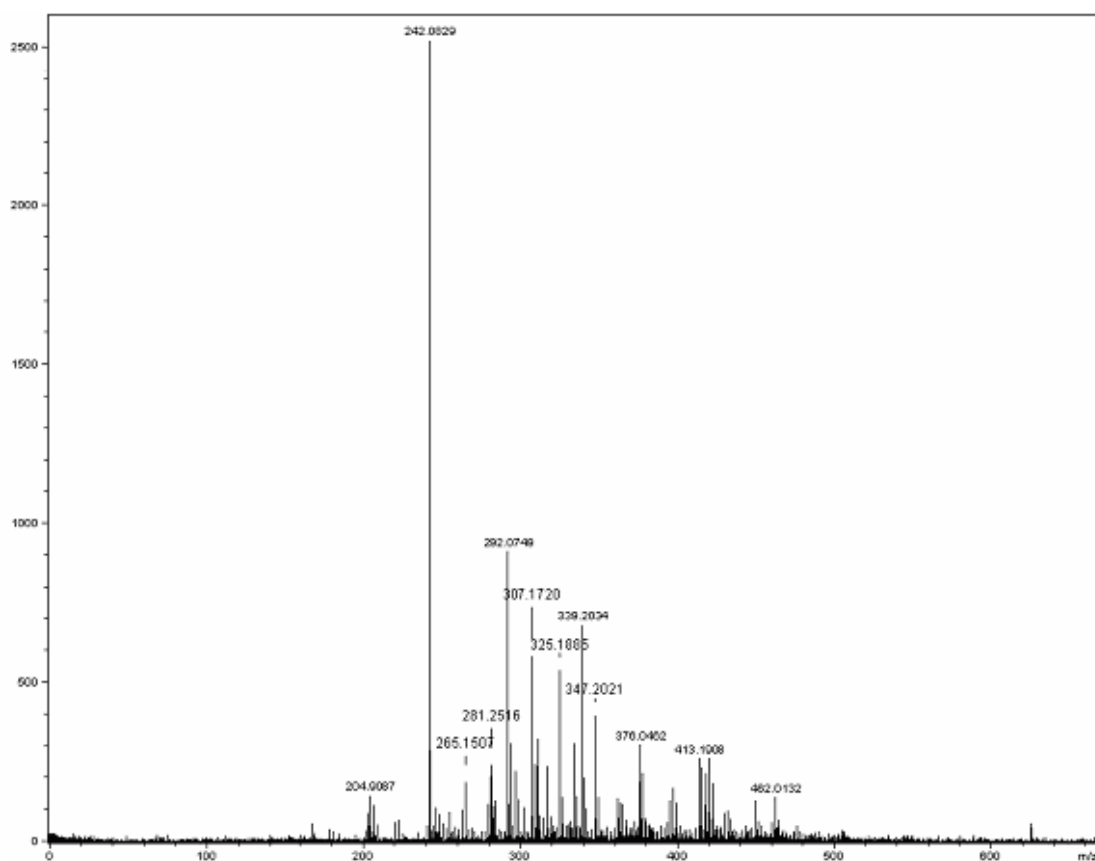
Anexo 3 - Espectro de RMN ¹H de L-α-FC amostra extraída de gemas de ovos (500 MHz, (CD₃OD).



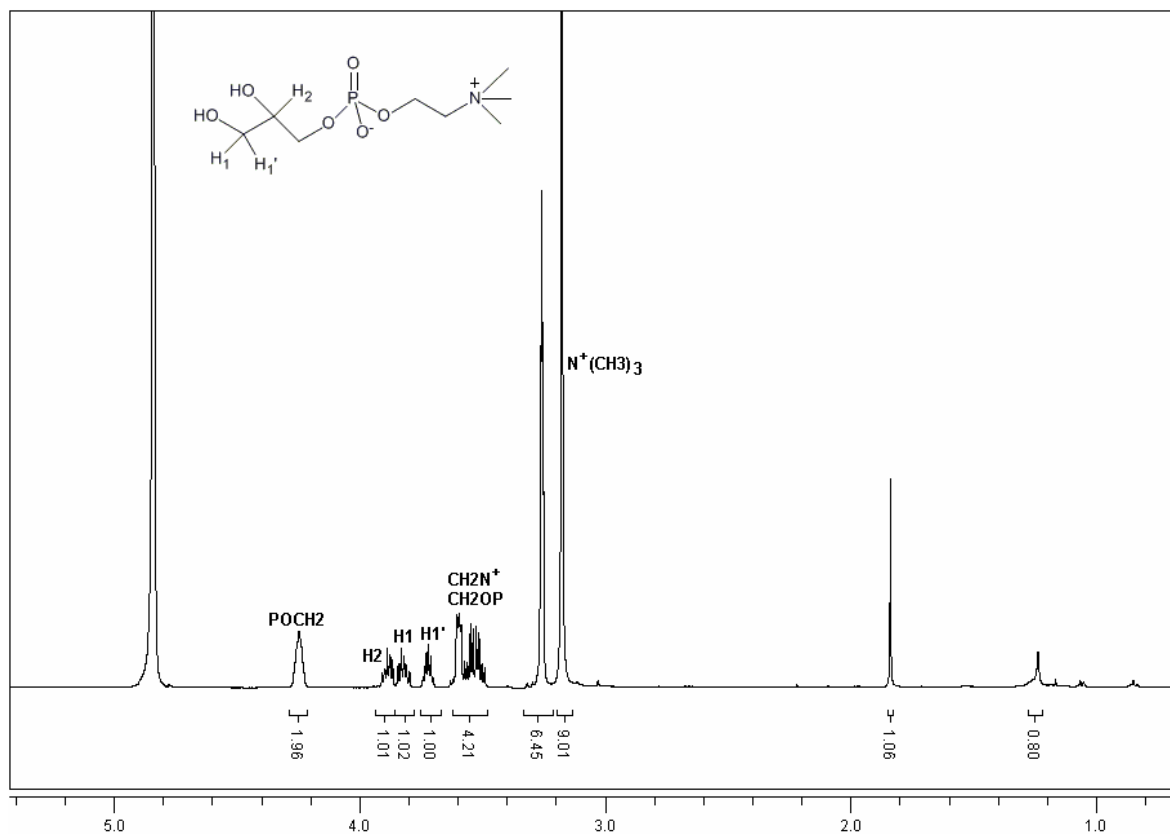
Anexo 4 - Espectro de RMN ¹H de L-α-FC padrão Fluka (500 MHz, (CD₃OD).



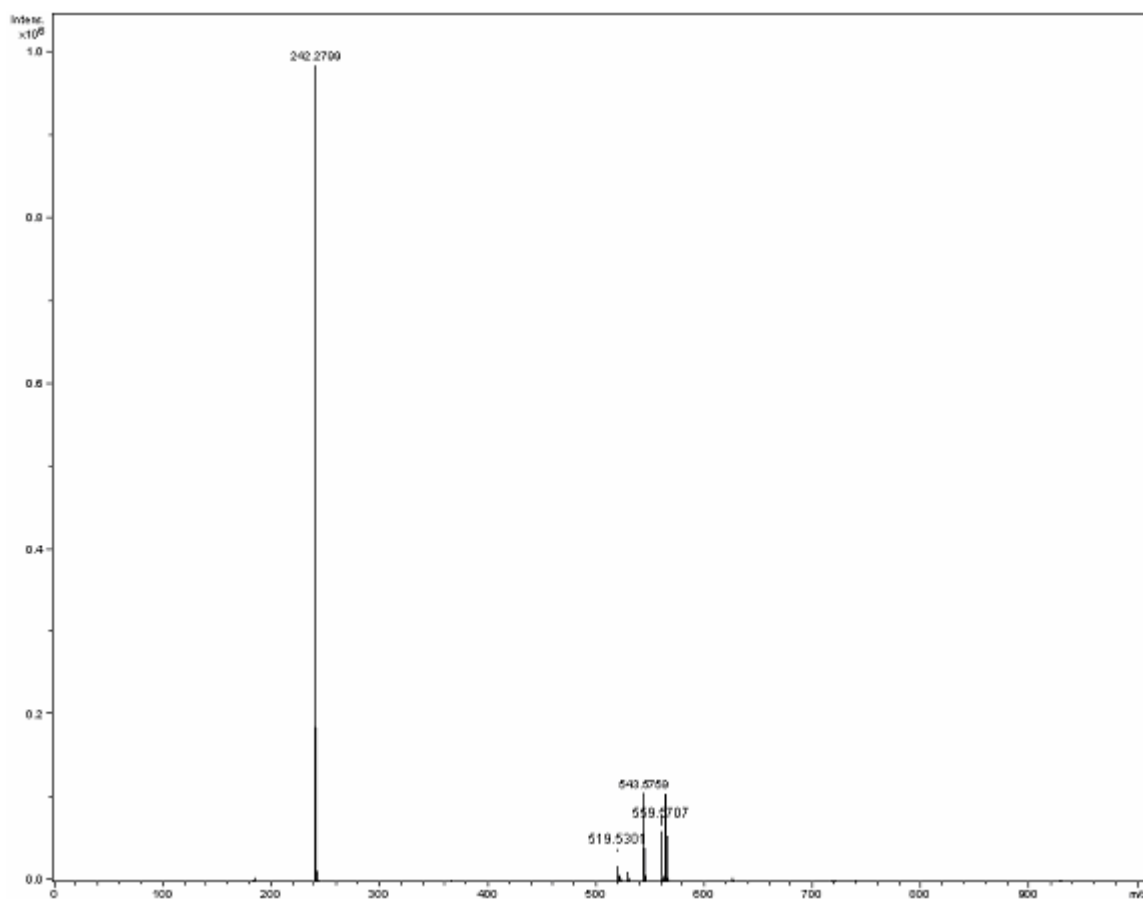
Anexo 5 - Espectro de massas de L- α -FC de gemas de ovos (Ionização por "electrospray", modo positivo).



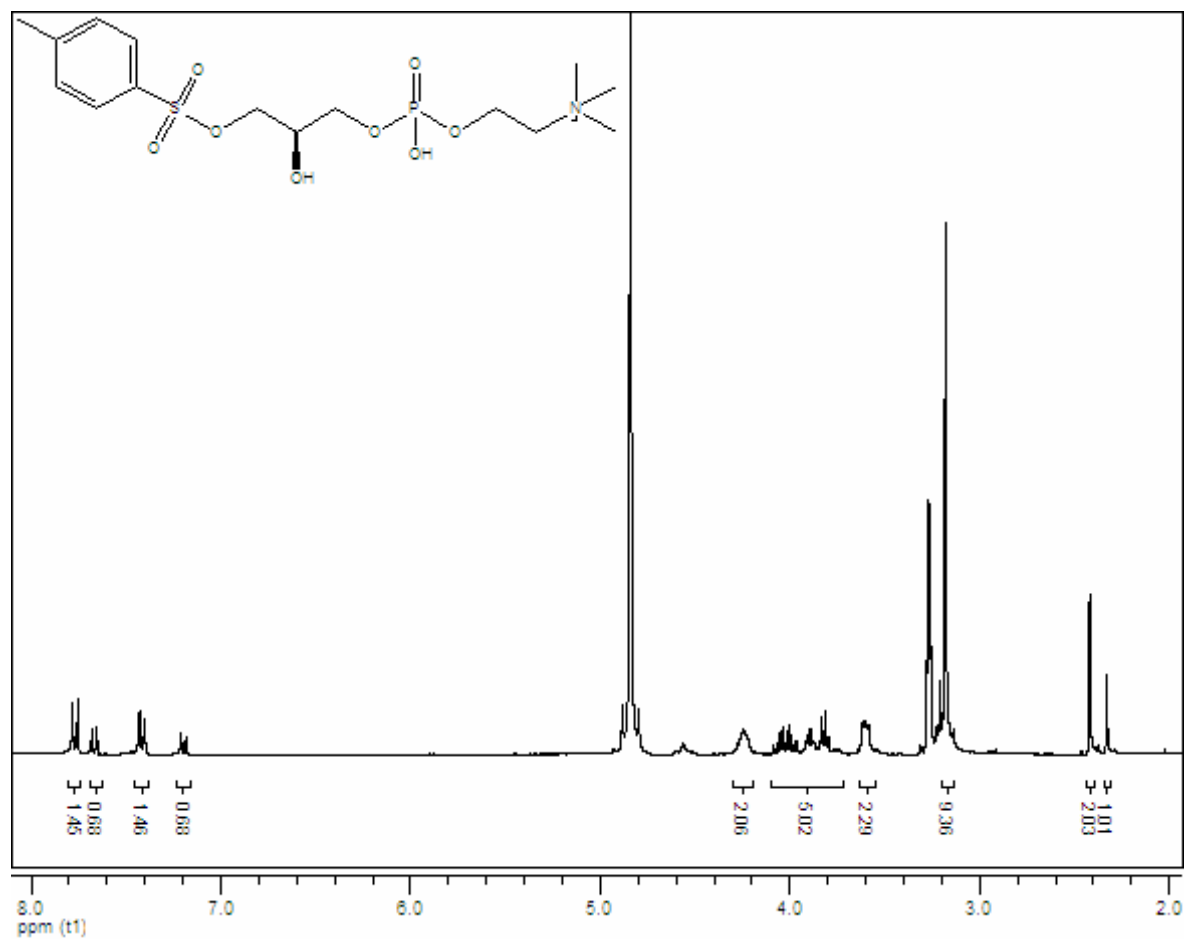
Anexo 6 - Espectro de massas de L- α -GFC formada por desidratação com LIOH (Ionização por "electrospray", modo negativo).



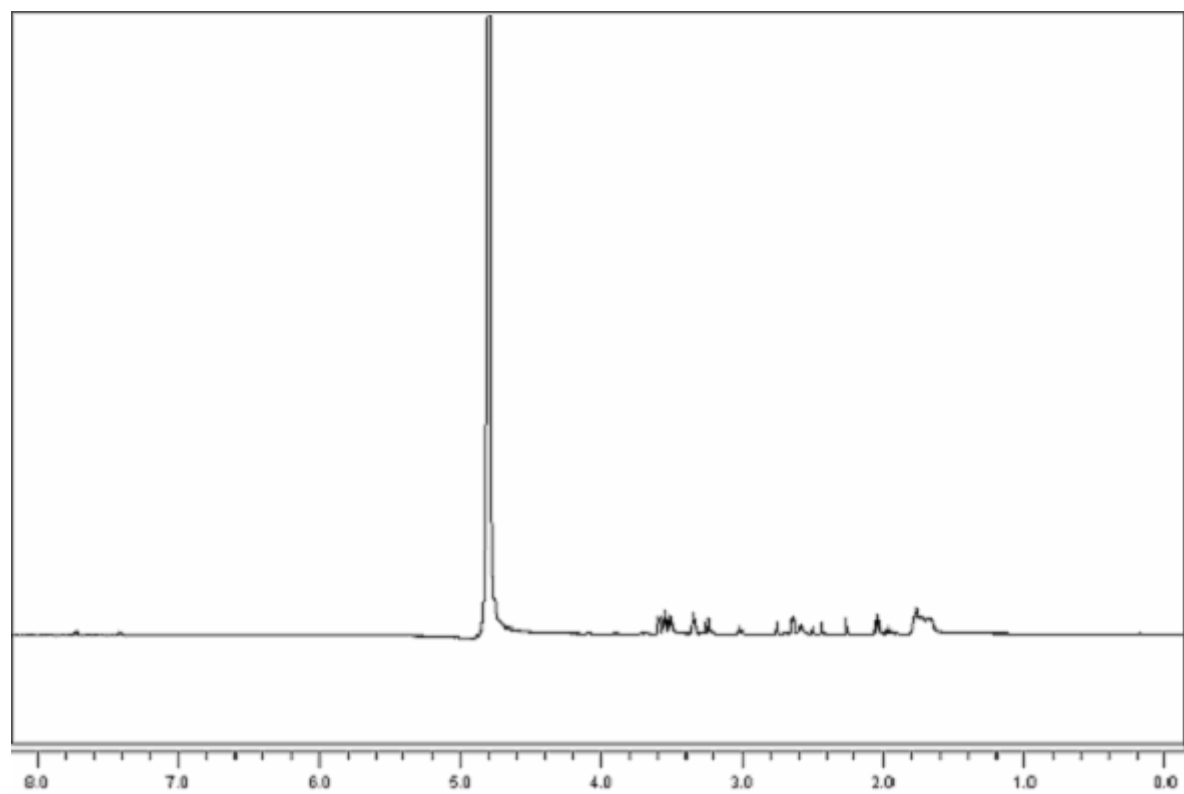
Anexo 7 - Espectro de RMN ¹H de L- α -GFC desacilado por metóxido de sódio (500 MHz, CD₃OD).



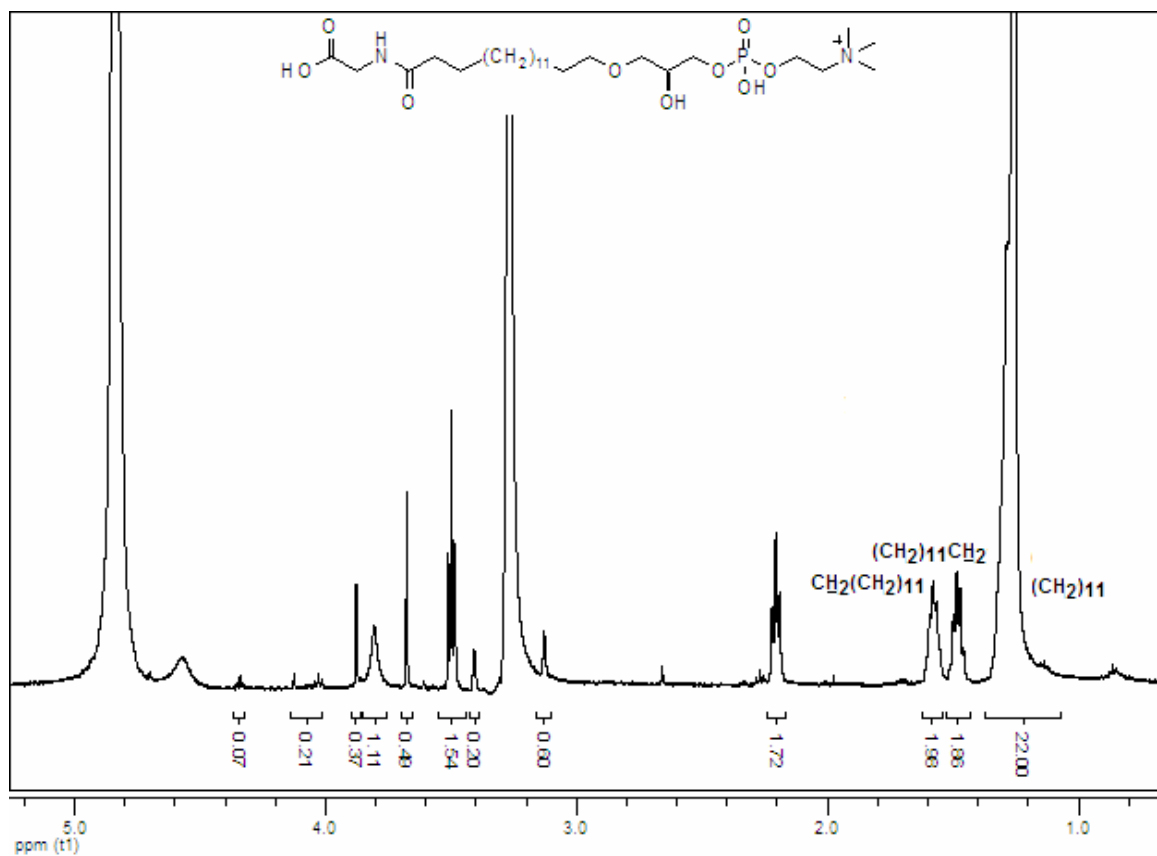
Anexo 8 - Espectro de massas de L- α -GFC formado por desacilação com metóxido de sódio. (Ionização por "electrospray", modo positivo).



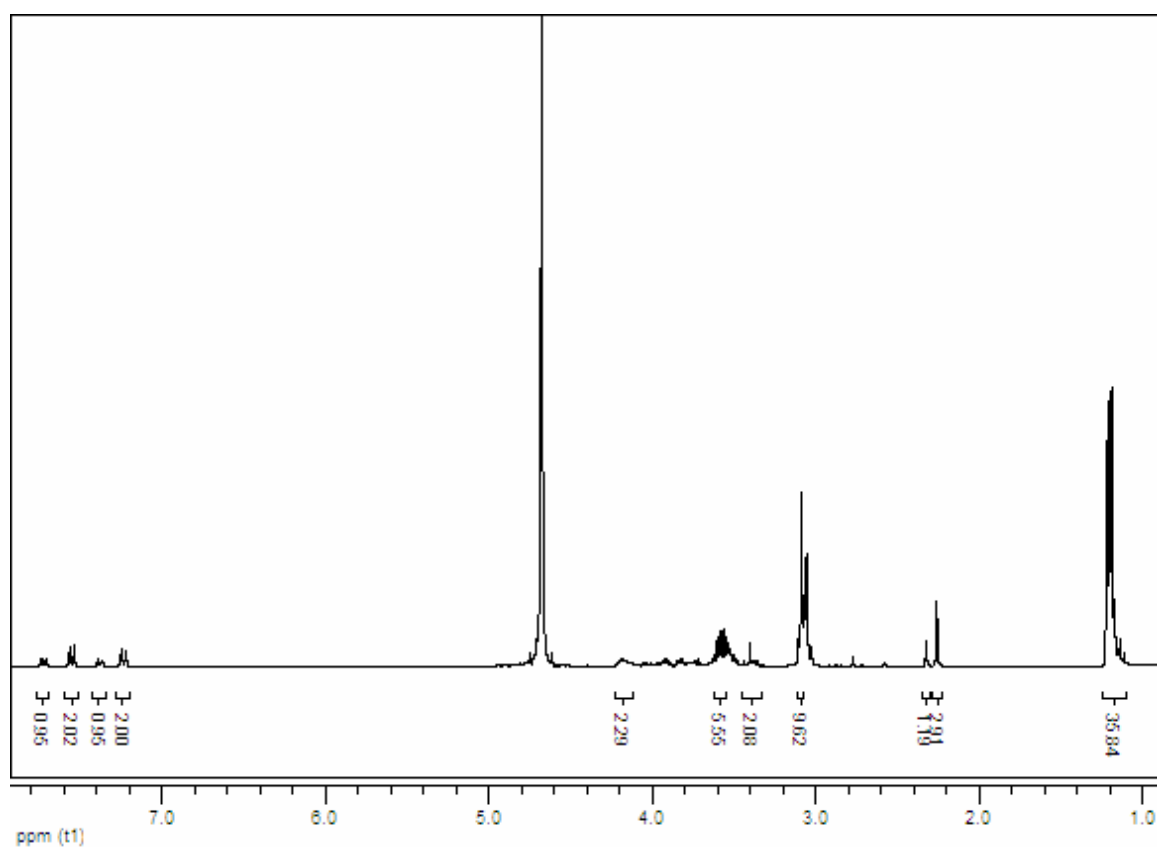
Anexo 9 - Espectro de RMN ¹H do produto da reação entre L- α -GFC e cloreto de tosilato (500 MHz, CD₃OD).



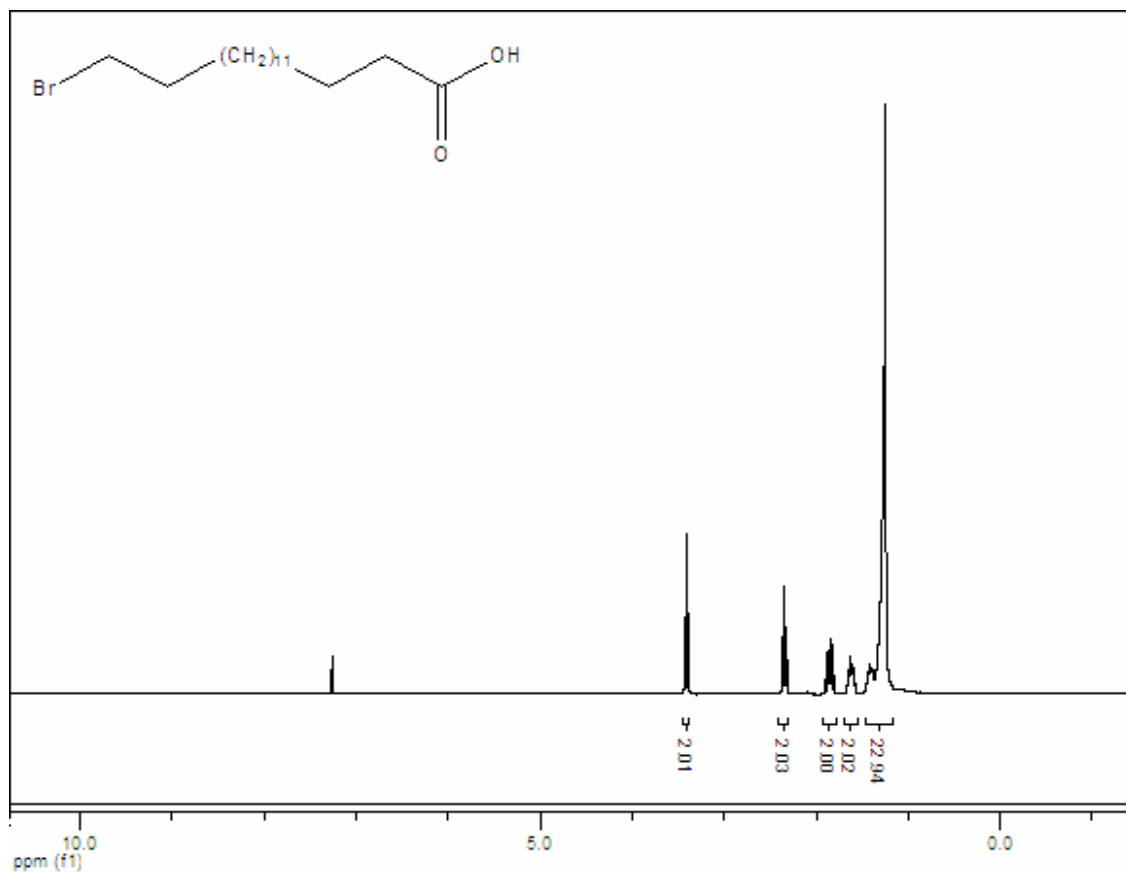
Anexo 10 - Espectro de RMN do produto da reação entre 1-O-tosil-*sn*-GFC (**18**) e o derivado Wang-Gly-Ácido Hidroxi-hexadecanóico (**3**) utilizando hidreto de sódio (500 MHz, D₂O).



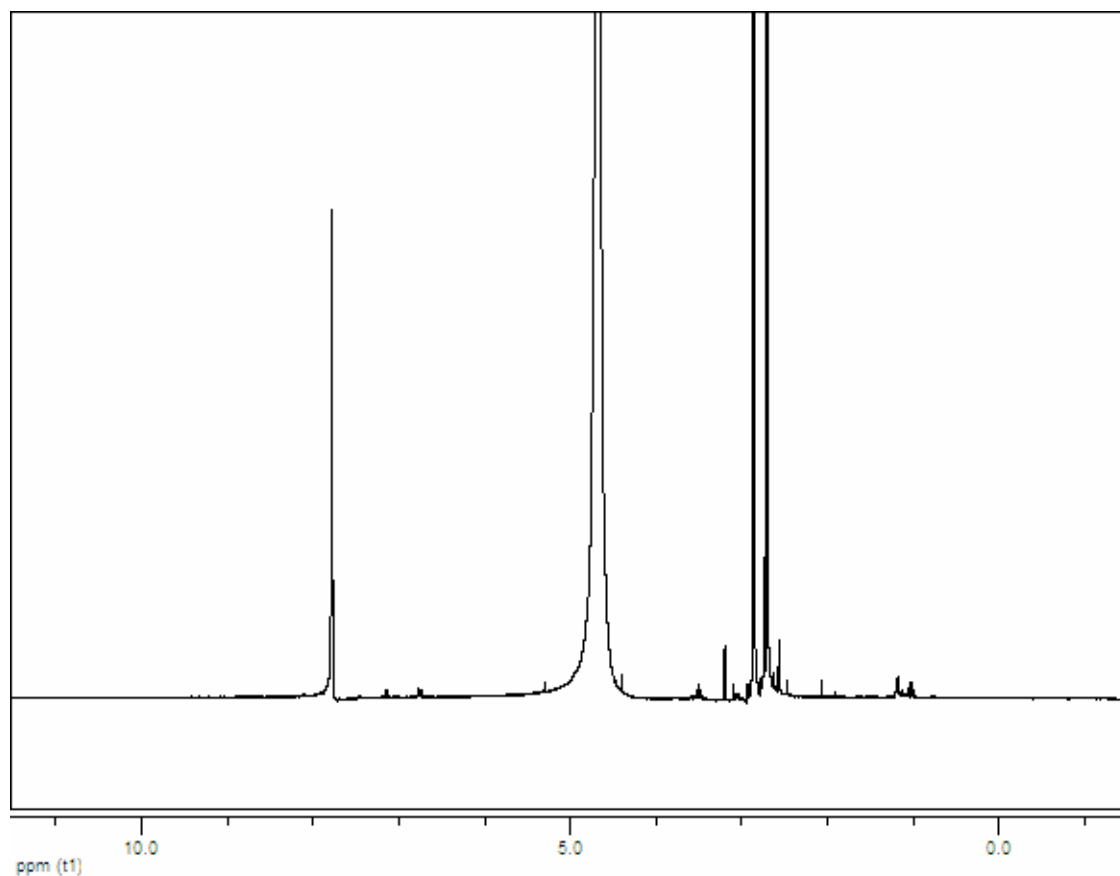
Anexo 11 - Espectro de RMN do produto da reação entre 1-*O*-tosil-*sn*-gliceril-fosfocolina (**18**) e o derivado Wang-Gly-Ácido Hidroxi-hexadecanóico (**3**) utilizando DIPEA 1eq (500 MHz, CD₃OD).



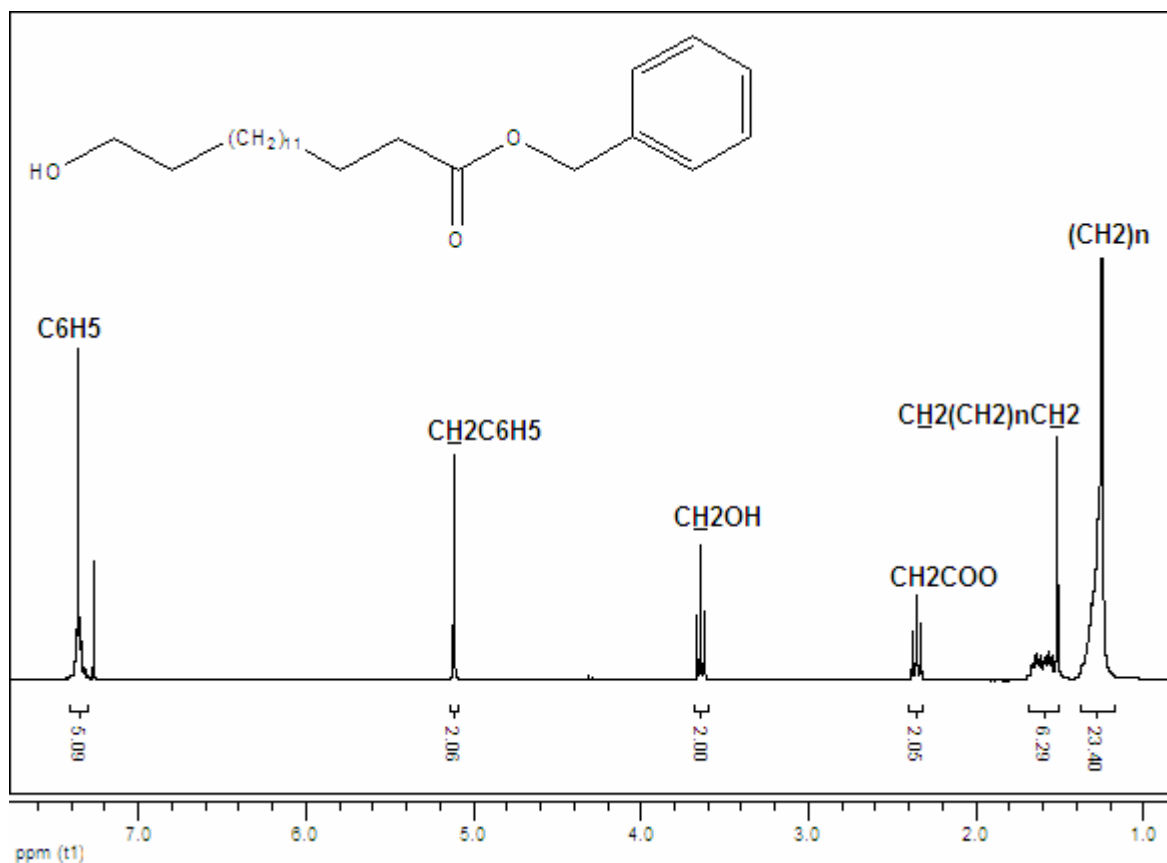
Anexo 12 - Espectro de RMN do produto da reação entre 1-*O*-tosil-*sn*-gliceril-fosfocolina (**18**) e o derivado Wang-Gly-Ácido Hidroxi-hexadecanóico (**3**) utilizando DIPEA 5eq (300 MHz, D₂O).



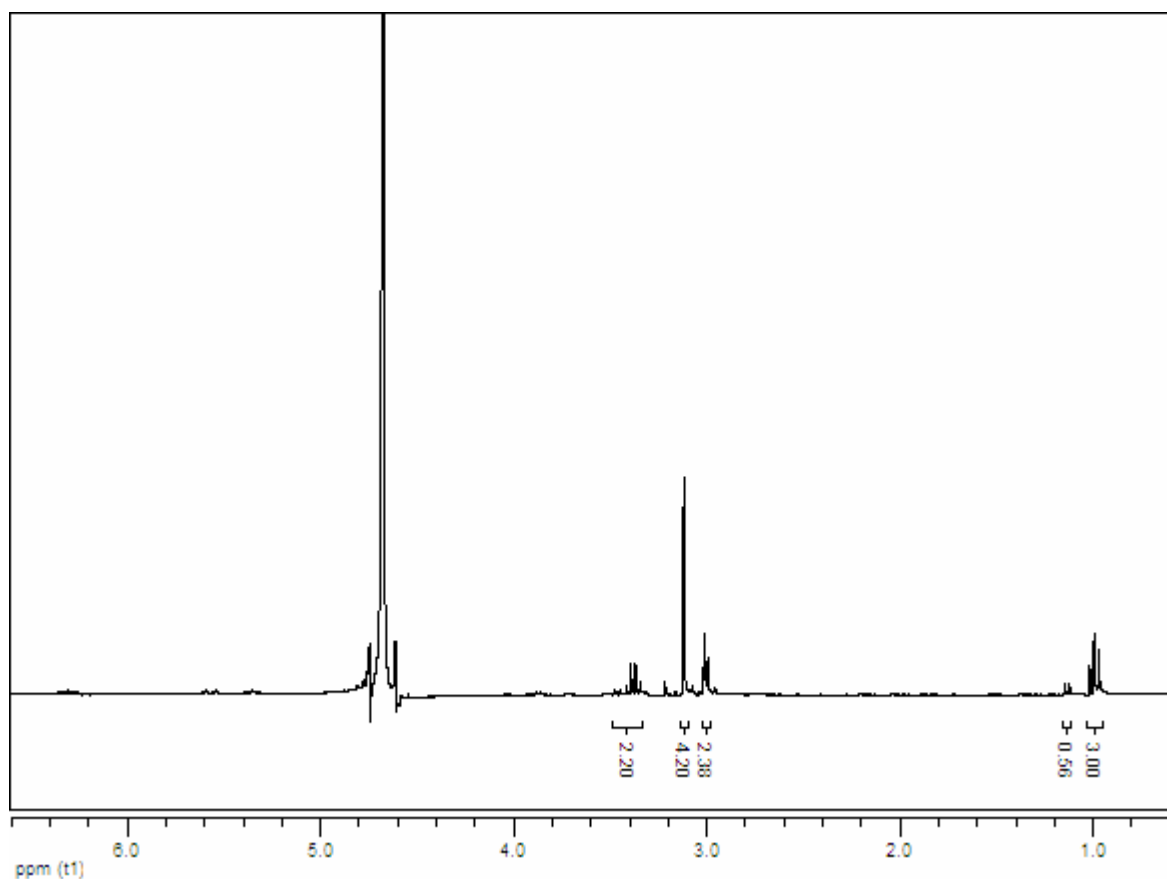
Anexo 13 - Espectro de RMN ^1H de do Ácido 16-bromo-hexadecanóico (300 MHz, CDCl_3).



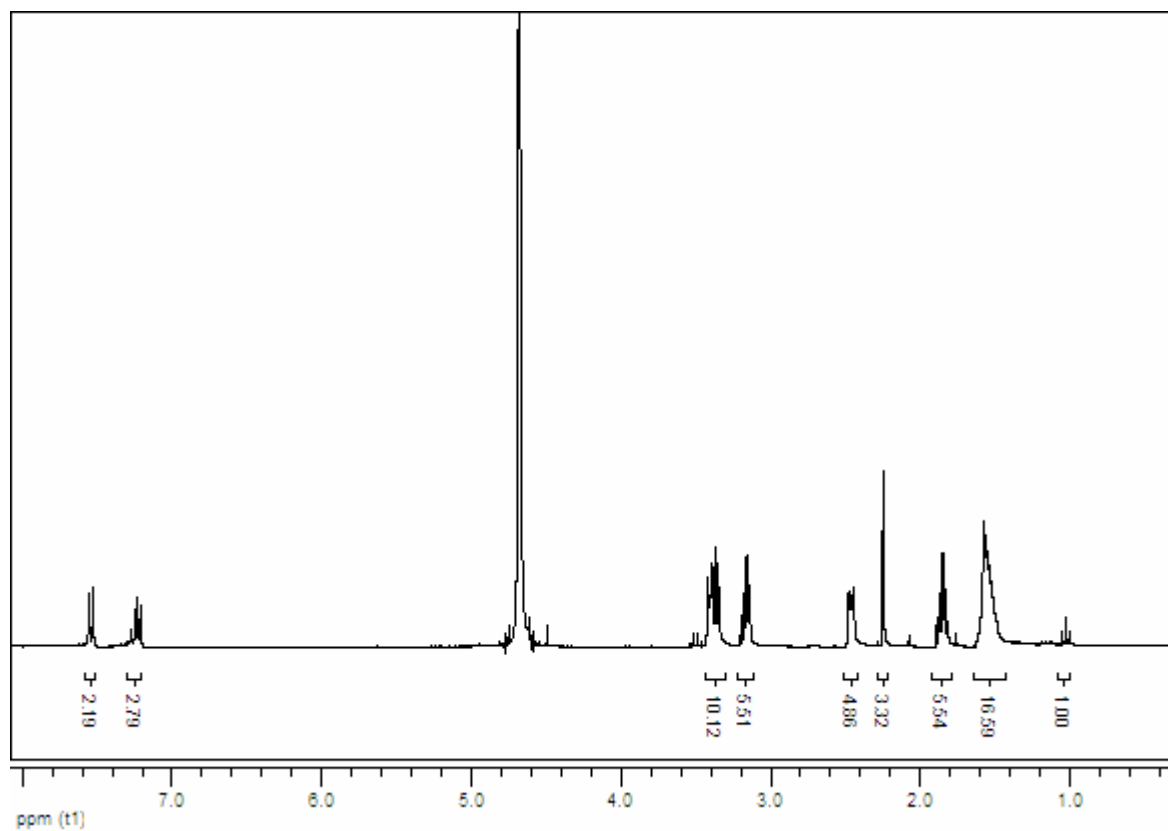
Anexo 14 - Espectro de RMN do produto da reação entre ácido 16-bromo-hexadecanóico e acetal formado por GPC-dibutilestanho (300 MHz, CD_3OD).



Anexo 15 - Espectro de RMN Do derivado bezilado de ácido hidróxi-hexadecanóico (300 MHz, CDCl_3).



Anexo 16 - Espectro de RMN do produto da reação entre 1-*O*-tosil-*sn*-GFC (**18**) e o derivado benzilado de ácido hidróxi-hexadecanóico (**27**) utilizando hidreto de sódio (300 MHz, D_2O).



Anexo 17 - Espectro de RMN do produto da reação entre 1-*O*-tosil-*sn*-GFC (**18**) e o derivado benzilado de ácido hidroxi-hexadecanóico (**27**) via intermediário epoxi-GFC (300 MHz, D₂O).