

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA LARA SILVA LOPES

Planejamento e síntese de derivados β -D-galactosamida de leucina e anidrido succínico com potencial atividade inibidora da enzima *trans*-sialidase

Ribeirão Preto

2022

DANIELA LARA SILVA LOPES

Planejamento e síntese de derivados β -D-galactosamida de leucina e anidrido succínico com potencial atividade inibidora da enzima *trans*-sialidase

Versão Original

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Área de concentração: química farmacêutica

Orientador (a): Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto

2022

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.

Catálogo na publicação

Biblioteca Central

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

Lopes, Daniela Lara Silva

Planejamento e síntese de derivados β -D-galactosamida de leucina e anidrido succínico com potencial atividade inibidora da enzima *trans*-sialidase. Ribeirão Preto, 2022

77p.: il.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Área de concentração: química farmacêutica

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. Doença de Chagas. 2. *T.cruzi* 3. *trans*-sialidase. 4. Galactose. 5. Fmoc leucina. 6. Anidrido succínico.

Nome: Lopes, Daniela Lara Silva

Planejamento e síntese de derivados β -D-galactosamida de leucina e anidrido succínico com potencial atividade inibidora da enzima *trans*-sialidase

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico. Área de concentração: química farmacêutica.

Trabalho aprovado pela Comissão de Graduação da FCFRP/USP.

Data da apresentação oral e defesa pública do TCC: 21/10/2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr.	<u>Flávio da Silva Emery (Presidente da banca)</u>
Instituição:	<u>FCFRP-USP</u>
Julgamento	<u>Nota final: 9,25</u>

Prof. Dra.	<u>Rose Mary Zumstein Georgeto Naal (Membro</u>
<u>Convidado)</u>	
Instituição:	<u>FCFRP-USP</u>
Julgamento	<u>Nota final: 10</u>

Prof. Dra.	<u>Ivone Carvalho (Orientadora)</u>
Instituição:	<u>FCFRP-USP</u>
Julgamento	<u>Nota final: 9,5</u>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela benção da vida e por me amparar em todos os momentos.

À professora Dra. Ivone Carvalho, que me ofereceu uma oportunidade para desenvolver esse trabalho, me orientando em todas as etapas.

Ao doutorando Marcelo Fiori, pela dedicação e comprometimento em me auxiliar nos afazeres dos trabalhos desenvolvidos durante minha estadia no laboratório.

Ao mestrando Dayan Setton e técnico Luis Zanomer pela colaboração em minhas atividades experimentais.

À minha família, por proporcionar as condições para que eu pudesse estudar na Universidade de São Paulo.

Aos meus amigos e próximos, por sempre me apoiar e me dar forças em todos os momentos.

À Isabella Guerino, uma pessoa próxima a mim, por me incentivar todos os dias a lutar pelos meus sonhos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por oferecer todo o suporte necessário para que eu realizasse o curso de Farmácia-Bioquímica.

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shakespeare)

RESUMO

LOPES, D. L. S. **Planejamento e síntese de novos derivados β -D-galactosamida de leucina e anidrido succínico com potencial atividade inibidora da enzima *trans-sialidase***. 2022. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença negligenciada, cujo agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esse parasito expressa em sua superfície a enzima *trans-sialidase* (TcTS), que está ancorada pela molécula glicosilfosfatidilinositol (GPI). A TcTS apresenta maior atividade na fase tripomastigota de *T. cruzi* e é responsável por catalisar a transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para grupos aceptores de galactopiranosila, como mucinas de *T. cruzi* (TcMUC), originando ligações α -2,3 com unidades de β -galactose. Este mecanismo contribui para a proteção e sobrevivência do parasita dos mecanismos de defesa do vetor e do hospedeiro. TcTS tem um papel fundamental na adesão e invasão das células do hospedeiro, sendo assim, essa enzima é essencial para o desenvolvimento da doença de Chagas e, portanto, um alvo molecular promissor para a preparação de fármacos. Diante disso, este trabalho discute sobre o planejamento e síntese de derivados de β -D-galactosamida de leucina e de anidrido succínico, sendo os grupos galactosila e ácido succínico capazes de mimetizar os substratos aceptor (mucinas galactosiladas) e doador de ácido siálico, respectivamente. A estratégia sintética envolveu o uso dos precursores 1-amino-galactose desprotegido e acetilado, para a obtenção de produtos que seriam avaliados quanto a sua potencial atividade inibidora da enzima *trans-sialidase*. Os melhores resultados foram obtidos pela reação de 1-amino-galactose acetilada com anidrido succínico para formação do produto **4** protegido com 68% de rendimento, após purificação por coluna cromatografia. A remoção dos grupos acetila, na presença de metóxido de sódio, forneceu o produto final **4** desprotegido com 52% de rendimento, o qual apresentou atividade inibitória (42%) na concentração 1,0mM.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. *trans-sialidase*. Ácido siálico. Galactose.

ABSTRACT

LOPES, D. L. S. **Planning and synthesis of new β -D-galactosamide leucine and succinic anhydride derivatives with potential inhibitory activity of the *trans*-sialidase enzyme.** 2022. Monograph (Completion of Course Work) – Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2022.

Chagas disease (CD), also known as American trypanosomiasis, is a neglected disease whose causative agent is the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. This parasite expresses on its surface the *trans*-sialidase enzyme (TcTS), which is anchored by the glycosylphosphatidylinositol (GPI) molecule. TcTS shows greater activity in the trypomastigote phase of *T.cruzi* and is responsible for catalyzing the transfer of sialic acid from host glycoconjugates to galactopyranosyl acceptor groups, such as *T.cruzi* mucins (TcMUC), creating α -2,3 bonds with β -galactose units. This mechanism contributes to the protection and survival of the parasite from vector and host defense mechanisms. TcTS plays a key role in the adhesion and invasion of host cells, thus, this enzyme is essential for the development of Chagas disease and, therefore, a promising molecular target for drug preparation. Therefore, this work discusses the planning and synthesis of β -D-galactosamide derivatives of leucine and succinic anhydride, with the galactosyl and succinic acid groups capable of mimicking the acceptor substrates (galactosylated mucins) and sialic acid donor, respectively. The synthetic strategy involved the use of unprotected and acetylated 1-amino-galactose precursors to obtain products that would be evaluated for their potential inhibitory activity of the *trans*-sialidase enzyme. The best results were obtained by the reaction of acetylated 1-amino-galactose with succinic anhydride to form the protected product **4** in 68% yield, after purification by column chromatography. Removal of the acetyl groups, in the presence of sodium methoxide, provided the unprotected end product **4** in 52% yield, which showed inhibitory activity (42%) at 1.0mM concentration.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. *trans*-sialidase. Sialic acid. Galactose.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

(NH₄)₂CO₃: carbonato de amônio

°C: grau Celsius

Å: Angstrom

AcOEt: Acetato de etila

APC: Células Apresentadoras de Antígenos

Arg: Arginina

Asp: Ácido aspártico

Ca: cálcio

CCC: Cromatografia em coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCD-PREP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CCl₃: clorofórmio deuterado

CK: citoqueratina

CRD: carboidrato domínio de reconhecimento

CYP51: C14 α -esterol desmetilase

Cz: cruzipáina

d: dubleto

D₂O: água deuterada

DC: Doença de Chagas

DCC: díciclo-hexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DCU: díciclo-hexiluréia

dd: duplo dubleto

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

E1: Eliminação Unicolectular

Eq: Equivalente

Et₃N: trietilamina

FDA: US Food and Drug Administration

Glu: Ácido glutâmico

Gp: glictoproteína

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol

H_{2(g)}: gás hidrogênio

H₂NCOONH₄: carbamato de amônio

H₂O: água

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HCl: ácido clorídrico

Hex: Hexano

HOBt: 1-hidróxi-benzotriazol

Hz: Hertz

IFN - γ : Interferon-gama

IL-12: Interleucina 12

J: constante de acoplamento

Leu: leucina

m: multipeto

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MASP: Proteínas associadas à mucinas

MeOH: Metanol

MW: Micro-ondas

N: Normal

N₂: nitrogênio gasoso

NaOH: hidróxido de sódio

NaOMe: Metóxido de sódio

NK: Células *Natural Killer*

NK-kB: Fator nuclear

NO: Óxido Nítrico

OH: hidroxila

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

Pd/C: Paládio sobre carvão

PDB: Banco de Dados de Proteínas

ppm: parte por milhão

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões

Py: piridina

PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino) fosfônio

R_f: Fator de Retenção

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de prótons

s: singleto

SPFS: Síntese de Peptídeo em Fase Sólida

SQ: Esqualeno Sintase

T. cruzi: *Tripanossoma cruzi*

t: tripleto

TcMUC: Mucinas ancoradas

TcTS: *trans*-sialidase de *T.cruzi*

TLR: receptores do tipo Toll-Like

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Trp: Triptofano

TS: *trans*-Sialidase

Tyr: Tirosina

Tyr: Tirosina

UV: Ultravioleta

Val: Valina

W: Watt

δ : deslocamento químico

α : alfa

β : beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Doença de Chagas (DC).....	14
1.1.1	Aspectos gerais da DC e do parasita <i>T.cruzi</i>	14
1.1.2	Resposta imune.....	15
1.2	<i>trans</i> -Sialidase de <i>T.cruzi</i> (TcTS).....	17
1.2.1	Mecanismo de ação de TcTS.....	17
1.2.2	Invasão celular pelo parasita.....	20
1.3	Ácido siálico e mucinas.....	22
1.4	Farmacoterapia atual da Doença de Chagas.....	23
1.4.1	Estudos sobre novas abordagens terapêuticas.....	24
1.5	Inibidores miméticos de substrato doador.....	27
1.6	Inibidores miméticos de substratos aceptores.....	28
1.7	Inibidores miméticos de substratos duplos.....	28
1.8	Importância dos carboidratos na química farmacêutica.....	29
1.8.1	Classificação dos carboidratos.....	29
1.8.2	Reatividade da posição anomérica.....	33
2	DESENVOLVIMENTO.....	34
2.1	OBJETIVOS.....	34
2.2	ESTRATÉGIA SINTÉTICA.....	34
2.2.1	Estratégia geral de obtenção dos compostos propostos no trabalho	34
2.2.2	Estratégia sintética para obtenção da 1-amino-galactose (1) a partir de galactose.....	34
2.2.3	Estratégia sintética para obtenção da 1-amino-galactose peracetilada (2) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila.....	35
2.2.4	Estratégia sintética para obtenção de (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com (1) ou (2).....	37
2.2.5	Mecanismo de acoplamento entre 1-amino-galactose (1) e Fmoc leucina 38	
2.2.6	Mecanismo de clivagem do grupo Fmoc e obtenção de (3).....	40
2.2.7	Estratégia sintética para obtenção de (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2).....	41
2.2.8	Mecanismo de acilação com anidrido succínico.....	43

2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.3.1	Aparelhagem analítica	45
2.3.2	Método geral de separação em cromatografia em camada delgada (CCD)	45
2.3.3	Método geral de purificação em cromatografia de alta eficiência (CLAE)	45
2.3.4	Método geral de separação em cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP).....	45
2.3.5	Método geral de purificação por Biotage Horizon™	45
2.3.6	Método geral de separação em cromatografia em Coluna (CCC)	45
2.3.7	Método sintético para obtenção de 1-amino-galactose (1) a partir de galactose	46
2.3.8	Método sintético para obtenção de 1-amino-galactose peracetilada (2) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosila.....	46
2.3.9	Método sintético para obtenção de (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com (1) ou (2)	46
2.3.10	Método sintético para obtenção de (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2).....	47
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
2.4.1	Análise da galactose.....	48
2.4.2	Síntese de 1-amino-galactose (1) a partir de galactose	50
2.4.3	Teste de Kaiser.....	51
2.4.4	Síntese do derivado 1-amino-galactose peracetilado (2) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosila	52
2.4.5	Síntese do derivado (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com os precursores (1) ou (2)	53
2.4.6	Síntese do derivado (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2)	57
2.4.7	Ensaio biológico de inibição da atividade hidrolase da <i>trans-sialidase</i> ..	58
3.	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas (DC)

1.1.1 Aspectos gerais da DC e do parasita *T.cruzi*

Em 1909 ocorreu um marco histórico na medicina, em que o pesquisador brasileiro Carlos Chagas descobriu a tripanossomíase americana, posteriormente denominada doença de Chagas, sendo essa uma doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, tendo como vetor, os insetos triatomíneos, conhecido popularmente como barbeiro. Desde então, vários trabalhos foram conduzidos afim de obter maior esclarecimento sobre a patologia, tratamento e suas implicações na saúde humana (FIOCRUZ, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa doença, considerada negligenciada, atinge de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria em países da América Latina e uma das principais causadas de morte por doenças parasitária nessa região (DNDI, 2022).

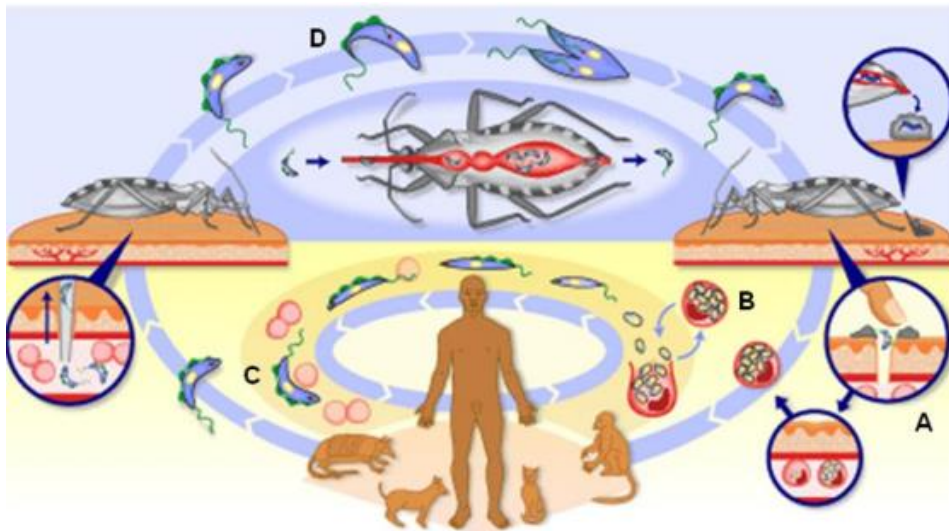
O inseto *triatoma infestans* é o principal vetor do *T.cruzi* no Brasil, mas existem outras vias alternativas de transmissão além da vetorial, como a transfusional, transplacentária (congênita), por transplante de órgãos, por acidentes laboratoriais, pelo leite materno e pela via oral, com a ingestão de alimentos contaminados (BRASIL, 2019).

Na doença de Chagas existem duas manifestações clínicas, sendo a fase aguda e a fase crônica. Quanto a fase aguda, predomina o parasito circulante na corrente sanguínea em grandes quantidades, podendo ser um quadro assintomático ou estar associado com manifestações febris por tempo prolongado, edemas localizados e generalizados (MONCAYO, 1999; DO CAMPO, 2001). Já na fase crônica existem raros parasitas circulantes na corrente sanguínea, sendo caracterizada pela destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis à alguns órgãos, como esôfago, cólon, coração e outros e, nos casos mais graves levar a insuficiência cardíaca aguda e hepatoesplenomegalia (PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009).

O ciclo de vida do *T.cruzi* é do tipo heteroxênico, em que o parasita se multiplica no meio intracelular do hospedeiro vertebrado (mamífero), sendo

encontrado as formas amastigota e tripomastigota, e se multiplica no meio extracelular no inseto vetor (triatomíneos), nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Dessa maneira, o ciclo (figura 1) se inicia quando triatomíneos infectados se alimentam de sangue de mamíferos e liberam em suas fezes formas tripomastigotas metacíclicas (**A**), que entram no corpo humano pelo local da picada, permitindo que o parasita interaja com moléculas da superfície da célula hospedeira, como o monossacarídeo ácido siálico, integrinas, bradisinina e invada as células. Durante o processo de endocitose compensatória, o parasita é internalizado em um vacúolo formado por membrana plasmática e lisossomal (FERNANDES *et al.*, 2011). Após algum tempo de residência no vacúolo, os parasitas escapam para o citosol da célula, a forma tripomastigota perde o seu flagelo e se multiplica por fissão binária sob a forma amastigota (**B**). Após multiplicar-se, a forma amastigota se diferencia em tripomastigota (**C**), rompe a célula infectada e alcança a circulação sanguínea, até infectar outra célula. As formas tripomastigotas podem invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas por um vetor, sendo que nesse último caso, são convertidas na forma epimastigota (**D**) não infecciosa e posteriormente na forma tripomastigota metacíclica, completando o ciclo de vida (NEVES *et al.*, 1995).

Figura 1 – Ciclo de vida do *T. cruzi*.



Fonte: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php>

1.1.2 Resposta imune

A infecção por *T. cruzi* ativa fatores relacionados à imunidade inata e à imunidade adquirida, na tentativa de combater o parasita e diminuir a sua

multiplicação nos tecidos do hospedeiro. Considerando a permanência prolongada do parasita no corpo humano, isso acarreta um prolongamento da atividade da resposta imune, o que pode acarretar o aparecimento de lesões teciduais, alterações funcionais nervosas e musculares (SANTILIANO; ALMEIDA, 2012).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo e envolve diversos mecanismos efetores humorais e celulares. (CUERVO *et al.*, 2011). Alguns componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células *Natural Killer* (NK) são muito importantes contra a infecção pelo *T.cruzi* (TARLETON, 2007; MAYA *et al.*, 2007). As células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e células dendríticas possuem em sua superfície receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os do tipo Toll-Like (TLR), capazes de detectar e reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), induzindo a resposta imune do hospedeiro (TARLETON, 2007).

Alguns estudos indicam que as mucinas ligadas à membrana do parasita por uma âncora de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol), são caracterizadas como PAMPs. (GAZZINELL; DENKERS, 2006). Essas moléculas de mucinas atuam como agonistas dos receptores de TLR (como o TLR2-6) na superfície de macrófagos ativando as vias de sinalização do fator nuclear NK-kB, levando a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF- α , IFN- γ , NO e de genes que controlam a replicação parasitária (CAMPO, 2007).

Além disso, os macrófagos adquirem, processam e apresentam antígenos para células T e B, e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação das mesmas. No entanto, apesar das citocinas TNF- α , IFN- γ e o NO contribuírem para aumentar a destruição de parasitas por macrófagos e proteger as células da infecção, o *T. cruzi* escapa desse efeito protetor, sendo que os mecanismos que induzem essa evasão ainda não são bem definidos (revisado por TARLETON, 2007).

As células NK, por sua vez, são fonte primária de IFN- γ na fase aguda, realizam a lise de alvos reconhecidos por seus PRRs, além de fazerem uma ponte entre os processos da resposta inata e adaptativa, sendo, portanto, considerada muito importante no controle da infecção pelo parasita (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009).

Ademais, na resposta inata tem a ativação dos linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺, que unidos geram uma resposta robusta, mas que na maioria dos casos não consegue eliminar o parasita (CAMARGO, 2014).

Quanto à imunidade adquirida, na fase aguda da infecção tem-se expressiva ativação de linfócitos B, com hiperprodução de imunoglobulinas e o aparecimento de anticorpos específicos. Este processo está relacionado com a queda da parasitemia (NORRIS *et al.*, 1994) e eliminação de formas sanguíneas do parasita. Alguns estudos relataram a existência de anticorpos associados a um estado de proteção do hospedeiro, capazes de reagir apenas com formas vivas do parasita, e de induzir nestas a lise por Complemento (SANTILIANO; ALMEIDA, 2012).

1.2 *trans*-Sialidase de *T.cruzi* (TcTS)

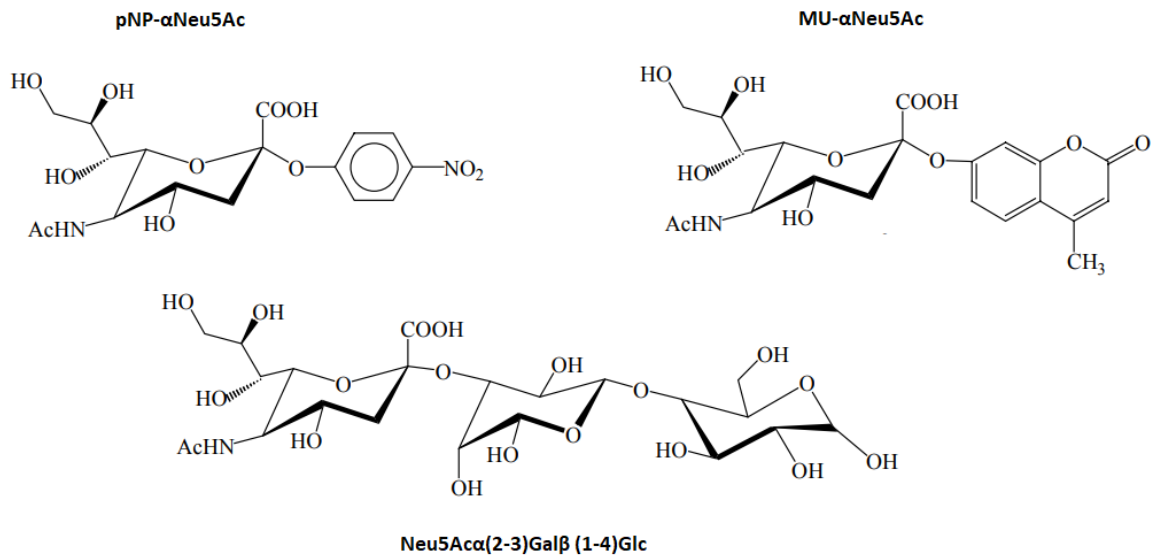
A enzima *trans*-sialidase de *T.cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita, sendo significativamente expressa em tripomastigotas. Esta enzima é ancorada na membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) e é funcionalmente dividida em dois domínios, o domínio catalítico, que é localizado no segmento conservado da região *N*-terminal e o domínio de lectina na região *C*-terminal, com funções estruturais (CAMPO, 2007).

Considerando que *T.cruzi* é incapaz de sintetizar o ácido siálico, ele usa TcTS para transferir esse monossacarídeo de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas aceptoras de ácido siálico, como mucinas ancoradas (TcMUC), que estão presentes na membrana plasmática do parasita, produzindo, assim, uma cobertura negativa ao patógeno, de modo a protegê-lo da lise por anticorpos humanos anti- α -glicosídicos e aumentar sua virulência (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006).

1.2.1 Mecanismo de ação de TcTS

Trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) catalisa a transferência de resíduos de ácido siálico de substratos doadores, como glicoconjugados sialilados do hospedeiro, ácido *p*-nitrofenil-*N*-acetilnerâmico (pNP- α Neu5Ac), ácido 4-metilumbeliferil-Nacetilneurâmico (MU- α Neu5Ac) ou sialil lactose (Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)Glc), representados na figura 2, para aceptores contendo unidades de β -galactose (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006).

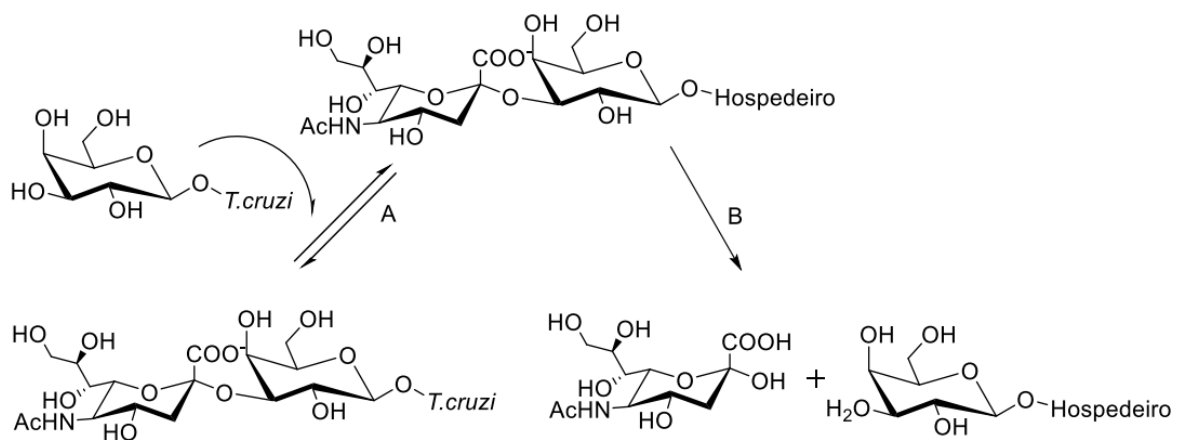
Figura 2 – Substratos doadores: pNP- α Neu5Ac, MU- α Neu5Ac, e Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-4)Glc



Fonte: Campo, Silva, Taft e Carvalho (2006)

TcTS tem duas atividades: uma hidrolase e uma transferase, sendo a primeira considerada uma atividade residual e a segunda a principal atividade. Esta enzima é a única que catalisa preferencialmente a transferência de ácido siálico para moléculas semelhantes à mucina formando uma ligação α -2,3 com aceptores de β -galactose, representado no esquema 1, na superfície do parasita (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006).

Esquema 1 - Reação de transferência (A) e hidrólise de ácido siálico (B) pela *trans*-sialidase



Fonte: De Andrade (2012).

A TcTS não pode transferir ácido siálico não ligado, ele apenas remove esse carboidrato do hospedeiro para o parasita controlando o nível da infecção. Após a invasão do *T.cruzi*, uma reação imune é gerada no hospedeiro, produzindo um fagossomo, que encapsula o parasita. No entanto, em poucos minutos o parasita está livre novamente, pois acredita-se que a TcTS permite que o parasita escape mais facilmente rompendo a membrana do fagossomo. (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006).

Embora a reação de transglicosilação catalisada por TcTS constitui um dos mais importantes mecanismos pelos quais o parasita invade as células do hospedeiro e causa infecções, outras papéis multifuncionais de TcTS também ocorrem em infecção por *T.cruzi*, como fuga de vacúolos, evasão de imunidade do complemento e tropismo tecidual do parasita (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006). Além disso, essa enzima também é capaz de se desprender da superfície do parasita para o sangue do hospedeiro e agir longe do local da infecção, induzindo apoptose no baço, timo e gânglios periféricos MUCCI et al., 2002; LEGUIZAMON et al., 1999).

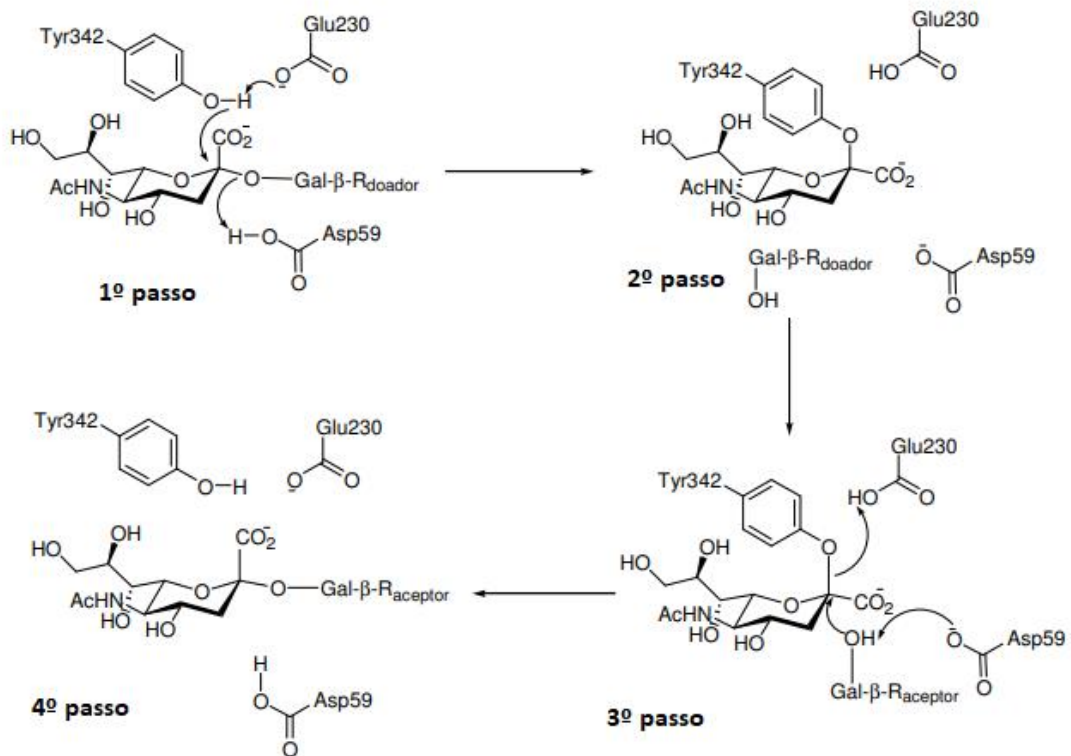
A arquitetura molecular do sítio ativo de TcTS possui uma tríade de aminoácidos Arg (Arg35, Arg245 e Arg314) que liga-se ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico, um ácido glutâmico (Glu357) que estabiliza Arg35, um resíduo de ácido aspártico (Asp59), essencial para a atividade catalítica, e dois resíduos (Tyr342 e Glu230) na porção inferior do sítio ativo, os quais estão adequadamente posicionados para estabilizar os estados de transição reacionais. Existe também um sítio hidrofóbico que liga-se ao grupo *N*-acetil da molécula de ácido siálico e apresenta resíduos de cadeias laterais de Val95, Leu176 e Trp120. Assim, a TcTS desempenha uma elevada atividade (CAMPO, 2007).

A transglicosilação catalisada por TcTS tem relação com a flexibilidade do sítio ativo, uma vez que, a unidade galactosila (3-OH) da lactose (acceptor) é posicionado de forma a interagir tanto com o resíduo catalíticos Asp59 quanto com o carbono anomérico do doador, de maneira a realizar um ataque nucleofílico no substrato (ou intermediário da reação) (CAMPO; SILVA; TAFT; CARVALHO, 2006).

A enzima TcTS catalisa a reação de trans-glicosilação, descrito no esquema 2, por meio de um mecanismo conhecido como duplo-deslocamento, sendo que a ligação de lactose (substrato acceptor contendo galactose) ao sítio ativo ocorre

somente após a entrada da molécula de ácido siálico (substrato doador). Após a ligação do substrato doador de ácido siálico, o grupo hidroxílico de Tyr342, com assistência de Glu230 atuando como base, realiza ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**1º passo**), com deslocamento do grupo abandonador protonado e formação do intermediário TcTS-sialosídeo (**2º passo**). Posteriormente, o grupo hidroxila 3-OH da molécula aceptora de lactose, na presença do resíduo Asp59 como base, realiza um segundo ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**3º passo**), resultando em retenção de configuração da molécula de ácido siálico (**4º passo**) (NERES; BRYCE; DOUGLAS, 2008; DE ANDRADE, 2012).

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



Fonte: De Andrade (2012).

1.2.2 Invasão celular pelo parasita

Considerando os trabalhos de Dias (1934), Kofoid *et al.* (1935) e de Meyer & Xavier-de-Oliveira (1948), foi verificado que, dependendo da cepa, o *T. cruzi* pode levar menos de 20 minutos para entrar na célula hospedeira (JORGE; CASTRO, 2000).

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do *T. cruzi* não estão totalmente compreendidos, mesmo com o maior conhecimento dos mecanismos de invasão celular e sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras (JORGE; CASTRO, 2000).

Existem evidências de que o parasito tem um tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear, células musculares e nervosas de animais infectados (ANDRADE, 1974; MELO & BRENER, 1978). No entanto, *in vitro*, o parasito tem capacidade de invadir todos os tipos celulares. Sabe-se que os macrófagos possuem um papel fundamental na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, sendo, portanto, o hospedeiro inicial do parasita (JORGE; CASTRO, 2000).

Glicoproteínas de superfície estão diretamente relacionadas a adesão e invasão celular do parasita no hospedeiro, interagindo com múltiplos ligantes, como laminina, fibronectina, colágeno, vimentina, citoqueratina (CK) e provavelmente, outras células de superfície e proteínas extracelulares (CAMPO; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016).

Quanto a adesão do parasita à célula hospedeira a partir da sialilação de sua superfície, esse processo desencadeia ativação de diferentes vias, como PI-3 quinase/Akt, MAP quinase e ERK (revisado por WALKER *et al.*, 2013).

Algumas moléculas presentes na superfície do parasita também fazem parte do processo de adesão e internalização e, ativam uma sinalização dependente de cálcio (Ca^{2+}), promovendo o recrutamento de lisossomos para o local de entrada do *T. cruzi* e, conseqüentemente, sua fusão com a membrana celular (OLIVEIRA, 2017). Dentre essas moléculas estão a cruzipaina (Cz) que participa do processo de internalização e desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* e a oligopeptidase B (OPB), que está envolvida na invasão de células de mamíferos não fagocitárias pela ativação de um mecanismo de sinalização de Ca^{2+} , que regula o recrutamento e fusão de lisossomos do hospedeiro no local de invasão do parasita para formar um vacúolo (CAMPO; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016).

Quanto aos alvos das células hospedeiras, galectina-3 (Gal-3) e os receptores Toll-like (TLRs) são os alvos mais relevantes na infecção por *T. cruzi*. Galectina-3 tem um papel fundamental na adesão do parasita às células hospedeiras ligando-se

especificamente às mucinas do *T. cruzi*, via seu carboidrato domínio de reconhecimento (CRD). (CAMPO; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016).

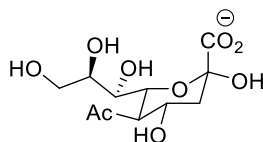
Embora exista diferentes moléculas e mecanismos envolvidos na invasão do *T. cruzi* nas células hospedeiras, essa característica pode ser vantajosa na busca de alvos para o desenvolvimento de medicamentos capazes de impedir mais do que uma única via de invasão, alcançando, assim, maior eficácia nos estágios iniciais da infecção.

Logo, os inibidores de TcTS mais potentes descritos até agora são representados por compostos miméticos de substratos duplos, ou seja, moléculas capazes de ocupar tanto o sítio de ligação do ácido siálico (substrato doador) como os locais de ligação da β -galactose (substrato aceptor), de modo que a transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasita é impedida ou bloqueada. Sendo assim, considerando a importância da unidade de galactose e da função carboxila do ácido siálico para interações no sítio ativo de TcTS, esse trabalho é focado na síntese de derivados de galactose com ligantes na posição anomérica contendo grupo carboxílico terminal para mimetizar os substratos aceptor e doador de ácido siálico, respectivamente.

1.3 Ácido siálico e mucinas

O ácido siálico (figura 3) é uma molécula pertencente à classe de carboidratos de nove carbonos, importante para diversos processos biológicos, sendo encontrada nos glicoconjugados de membrana e ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos (FÁTIMA *et al.*, 2005). Esses tipos diferem entre si por variações estruturais no grau de substituição e oxidação no esqueleto carbônico e têm como molécula precursora a N-acetil-D-manosamina (ManNAc) (ANGATA *et al.*, 2002).

Figura 3 – Estrutura do ácido siálico



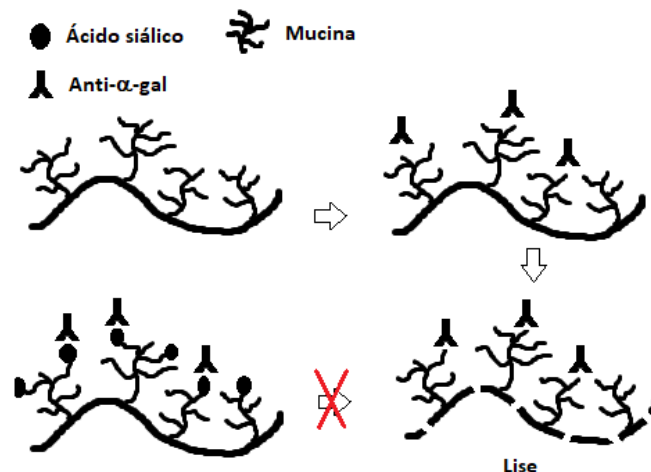
Fonte: Moreira *et al.* (2009)

As mucinas, por sua vez, são glicoproteínas polianiónicas altamente glicosiladas, agentes protetores de mucosas e constituem uma barreira protetora na

superfície parasitária (SERRANO *et al.*, 2001). Essas moléculas são fundamentais para o desenvolvimento do parasita e crescimento no inseto vetor, uma vez que são capazes de resistir à ação de enzimas digestivas, além de estarem envolvidas nos processos de reconhecimento e invasão celular (CAMPO, 2007).

As moléculas de mucinas de *T.cruzi* possuem resíduos terminais de α -galactose e de β -galactose, os quais funcionam como epítomos, sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti- α -galactosil (figura 4). Quando as mucinas são sialiladas pela ação da *trans*-sialidase, uma forte carga negativa é gerada na superfície do parasita, protegendo-o contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 2000).

Figura 4-Proteção de *T.cruzi* contra anticorpos anti- α -Gal devido à sialilação da *trans*-Sialidase.

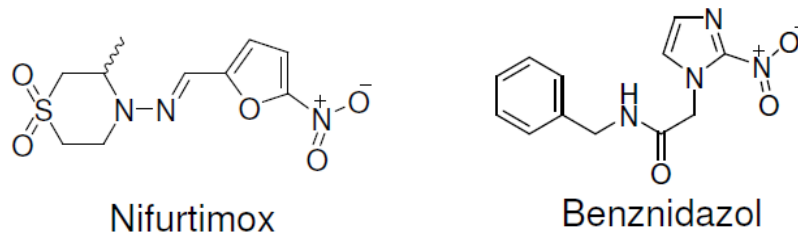


Fonte: construção da figura baseada em Pereira *et al.* (2000)

1.4 Farmacoterapia atual da Doença de Chagas

O tratamento etiológico atual para a doença de Chagas é feito por dois fármacos nitroheterocíclicos (figura 5) introduzidos nos anos 60-70, o benznidazol (Rochagan) e nifurtimox (Lampit), sendo esses medicamentos eficazes para tratar a fase aguda da doença ao reduzir níveis de parasitemia, a gravidade e a letalidade. No entanto, são pouco eficazes na fase crônica da doença, sendo isso um grande problema e dentre as causas para esse empasse, podem-se citar as variações na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi*, as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis desses fármacos e seus efeitos colaterais (CASTRO; SOEIRO, 2017; CUNHA-FILHO *et al.*, 2012).

Figura 5 – Medicamentos utilizados para o tratamento etiológico da doença de Chagas



Fonte: Castro; Soeiro (2017).

Todavia, no Brasil, apenas o benznidazol tem autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para ser comercializado, uma vez que o nifurtimox é altamente tóxico (BENZNIDAZOL... 2014). Benznidazol, atualmente, é produzido e comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), após os direitos de patente e tecnologia terem sido cedidos ao governo brasileiro pelo grupo suíço Roche em 2003 (CUNHA-FILHO *et al.*, 2012).

Benznidazol [N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol) acetamida] pode ser encontrado na forma de comprimidos de 100 mg e seu esquema terapêutico corresponde a doses diárias de 5 a 7,5 mg/kg de peso corpóreo, fracionadas em duas ou três administrações, sendo o período de tratamento habitual de trinta a sessenta dias (CUNHA-FILHO *et al.*, 2012).

Diante do exposto, fica claro a necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mais seguros e eficazes em todos os estágios da doença de Chagas.

1.4.1 Estudos sobre novas abordagens terapêuticas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas seria aquele capaz de promover cura parasitológica tanto na fase aguda como na fase crônica, ser eficaz após uma ou poucas doses, acessível ao paciente, apresentar poucos efeitos adversos e ausência de efeitos teratogênicos, não induzir resistência e ser de fácil administração. No entanto, tais características não condiz com as opções atuais de tratamento e, ademais, existem muitos desafios quanto ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da doença (CASTRO; SOEIRO, 2017).

Diante dos impactos socioeconômicos provocados pela doença de Chagas e de sua relevância epidemiológica, pode-se notar o desinteresse da indústria farmacêutica na pesquisa e produção de medicamentos para essa doença, uma vez que por atingir majoritariamente à população de baixa renda, não traz perspectivas de lucro para essas instituições. Sendo isso, associado à complexidade da doença, alguns dos motivos que explicam a falta de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas (CUNHA-FILHO *et al.*, 2012).

Conforme dados da US Food and Drug Administration (FDA), nos últimos três anos, não houve nenhum registro de novos medicamentos para tratar doenças negligenciadas. Todavia, há um aumento de interesse sobre o assunto no meio acadêmico, especialmente nas pesquisas desenvolvidas nas universidades públicas da América Latina, sendo que nos últimos cinco anos, foram publicados em média setecentos trabalhos por ano (CUNHA-FILHO, 2012).

O desenvolvimento de formulações mais eficientes para os medicamentos atualmente usados na terapia contra DC é uma estratégia promissora capaz de otimizar e melhorar a ação dessas drogas, podendo superar as dificuldades relacionadas à biodisponibilidade e estabilidade desses ativos. Algumas das estratégias já exploradas consiste na elaboração de lipossomas multilamelares para administração parenteral, micropartículas de benznidazol com o objetivo de melhorar sua solubilização, redução do tamanho de partícula para obtenção de microcristais, complexação com uso de açúcares cíclicos, como ciclodextrinas, dentre outras (CUNHA-FILHO, 2012).

Por outro lado, para obtenção de fármacos mais eficazes e menos tóxicos, é importante o conhecimento do ciclo de vida, metabolismo e genoma do *T.cruzi*, para que assim, a partir dos alvos terapêuticos encontrados no parasita, novos agentes específicos contra a doença possam ser investigados.

O sequenciamento recentemente concluído do genoma do *T.cruzi* (cepa CL Brener), é constituído de sequências repetidas que incluem genes de moléculas de superfície, como *trans*-sialidase, protease gp 63 e proteínas associadas à mucinas (MASP), sendo esses, potenciais alvos para o desenvolvimentos de novos agentes terapêuticos (DEGRAVE, 2017). É importante considerar que o alvo terapêutico

explorado deve ser encontrado somente no parasita e ser essencial para algum dos estágios do seu ciclo replicativo.

A partir do conhecimento sobre a bioquímica de *T. cruzi*, foi possível identificar outros potenciais alvos do parasita, como, por exemplo: metabolismo de esteróis, DNA, cisteíno protease, síntese de nucleotídeos e via de *salvage* de purinas, dihidrofolato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e metabolismo de pirofosfato (CASTRO; SOEIRO, 2017).

Atualmente, duas estratégias para o desenvolvimento de fármacos têm sido amplamente empregadas, sendo elas o reposicionamento e combinação. Quanto ao reposicionamento, trata-se de uma abordagem muito eficiente, uma vez que os perfis de segurança e farmacocinética já foram previamente elucidados e questões associadas à produção e armazenamento já estão validadas. Já a combinação entre medicamentos permite que haja redução de doses e de tempo de tratamento, além de reduzir efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência nos parasitas (CASTRO; SOEIRO, 2017).

Todavia, Bushiazzo e colaboradores reportaram a descoberta de um anticorpo monoclonal de camundongo 12G9, que foi capaz de inibir a sialilação da superfície do parasita e a invasão celular, pois apresenta alta afinidade e especificidade pela enzima TcTS. Ademais, com a determinação da estrutura cristalográfica do complexo TcTS-anticorpo 13G9 (código do PDB 3OPZ) foi possível observar que a cadeia leve do anticorpo bloqueia o movimento do resíduo de Tyr119, impedindo a entrada do ácido siálico no sítio catalítico para a reação *trans*-glicosilação (BUSCHIAZZO *et al.*, 2012).

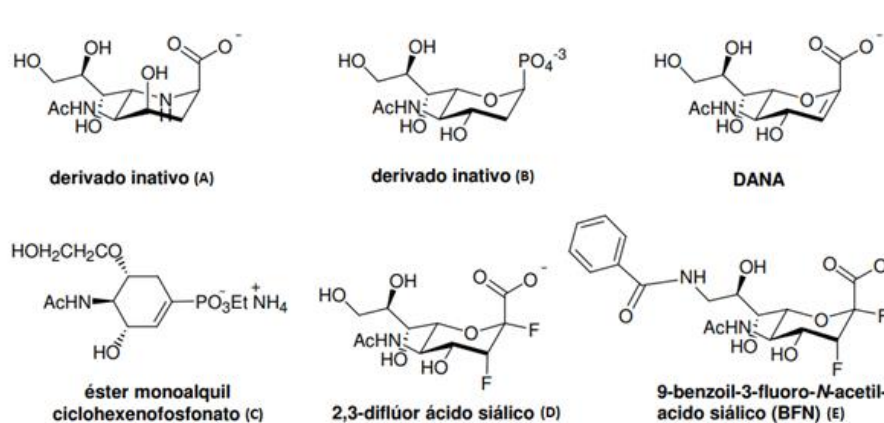
Portanto, ao considerar a estrutura cristalográfica de TcTS, a maioria dos seus inibidores foi classificada de acordo com a região do sítio ativo onde se ligam, sendo o sítio de ligação do ácido siálico (doador) e sítio de ligação de β -galactose (sítio acceptor) (GIORGI *et al.*, 2010). Dessa maneira, os inibidores de TcTS podem ser agrupados em três grandes grupos: I) miméticos de substrato doador (ácido siálico) que se ligam na região do substrato doador; II) miméticos de substratos aceptores (lactose e galactose), que se ligam na região do substrato acceptor e III) miméticos de substratos duplos, que se ligam em ambas as regiões do sítio ativo (NERES *et al.*, 2009).

Logo, o desenvolvimento de um candidato a fármaco anti-parasitário pode surgir de diferentes estratégias, como por meio de experimentos com produtos naturais ou sintéticos, considerando-se, sobretudo, os estudos sobre potenciais alvos de *T. cruzi*, como a *trans*-sialidase, objeto de estudo deste trabalho.

1.5 Inibidores miméticos de substrato doador

Com relação a busca de inibidores específicos de TcTS, o uso do bioisosterismo como método de modificação molecular da estrutura do ácido siálico (figura 6) tem sido amplamente empregado (MOREIRA *et al.*, 2009).

Figura 6 – Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico



Fonte: De Andrade (2012).

Em um primeiro momento, a substituição do átomo de oxigênio do anel da estrutura de ácido siálico por nitrogênio (A) e o grupo hidroxila por um grupo fosfato (B) resultaram em duas moléculas inativas para TcTS (MOREIRA *et al.*, 2009). Considerando a estrutura de DANA, um potente inibidor de influenza, esse apresentou fraca inibição de TcTS (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

Outra estratégia importante foi a substituição do anel do ácido siálico por ciclohexeno com simultânea mudança do grupo carboxila por fosfato, formando o **C**, que apresentou melhor atividade do que DANA, mas ainda assim não foi satisfatória (STREICHER; BUSSE, 2007).

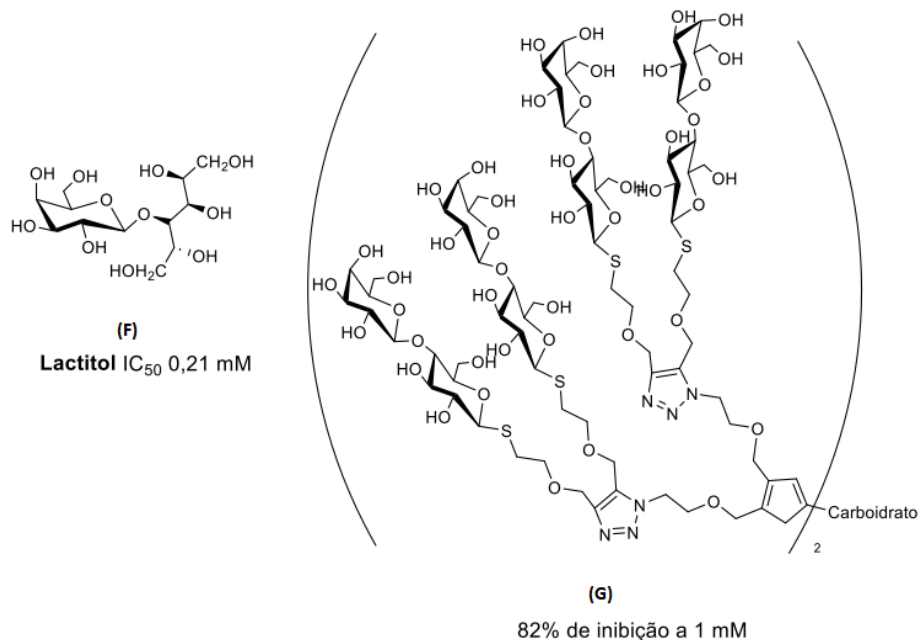
Além disso, o emprego da estratégia de fluoração do ácido siálico descrita por Buchini e colaboradores levou a formação de **D** e **E**, que inibiram a enzima TcTS de forma tempo-dependente, mas para completa inativação houve necessidade de concentrações muito elevadas dos inibidores (WATTS *et al.*, 2003; BUCHINI; BUSCHIAZZO; WITHERS, 2008).

1.6 Inibidores miméticos de substratos aceptores

Com relação ao planejamento de compostos que ocupem exclusivamente o sítio aceptor do ácido siálico, Lactitol (**F**) é um análogo de lactose muito importante descoberto até o momento (figura 7). No entanto, esse composto não inibe a atividade catalítica de TcTS, atuando somente como um aceptor preferencial de ácido siálico (AGUSTI *et al.*, 2004).

Em uma outra abordagem, Rosali e colaboradores prepararam o composto **G** (figura 7) capaz de inibir a transferência de ácido siálico para o substrato natural N-acetilactosamina, inibindo a enzima em 82% a 1mM (AGUSTÍ *et al.*, 2016).

Figura 7 - Derivados miméticos de substratos aceptores

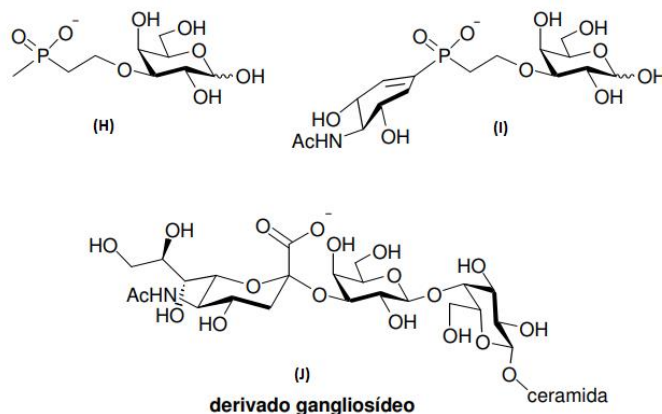


Fonte: Figueredo (2018).

1.7 Inibidores miméticos de substratos duplos

A literatura sugere que os inibidores miméticos de substratos duplos é a melhor estratégia para inibição da TcTS (NERES *et al.*, 2009). Dentre alguns dos derivados planejados para ocupar a região do doador e do aceptor no sítio ativo da enzima, estão os derivados fosforilados da galactose (**H**), (**I**) e (**J**) (figura 8), sendo esse último um dos inibidores mais potentes, apresentando valor de IC₅₀ na ordem de 100µM (BUSSE *et al.*, 2007; VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1992).

Figura 8 - Estruturas de derivados miméticos de substratos duplos de TcTS



Fonte: De Andrade (2012).

1.8 Importância dos carboidratos na química farmacêutica

O potencial terapêutico dos carboidratos tem sido bem demonstrado pelo número de compostos à base de carboidratos, sintéticos, semi-sintéticos ou de fontes naturais para o tratamento de doenças como infecções bacterianas e virais, câncer ou diabetes, entre outras.

A descoberta de carboidratos bioativos e seu desenvolvimento para uma aplicação farmacêutica adicional envolvem estudos de interdisciplinaridade que fazem a ponte entre química, biologia e ciências médicas/farmacêuticas, como química de carboidratos, bioquímica, glicobiologia, planejamento de fármacos, microbiologia e oncologia.

O perfil biológico dessas moléculas surge por uma variedade de mecanismos, muitos deles contando com a interferência em eventos dependentes de carboidratos, incluindo a inibição de enzimas que agem de carboidratos, inibição de interações carboidrato-proteína ou carboidrato-carboidrato, interação com estruturas biologicamente relevantes baseadas em carboidratos ou inibição de sua biossíntese.

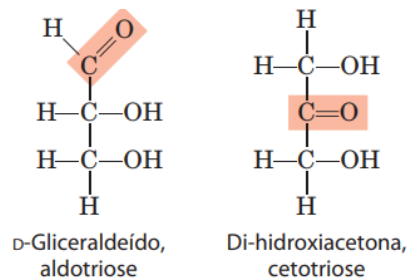
1.8.1 Classificação dos carboidratos

Os carboidratos pertencem a classe de moléculas biológicas mais abundantes na natureza e sua fórmula geral é $(\text{CH}_2\text{O})_n$, em que $n \geq 3$.

Existem três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos, ou açúcares simples, são

aldeídos ou cetonas. Os monossacarídeos são sólidos cristalinos e incolores, são solúveis em água e a maioria tem sabor adocicado. O monossacarídeo que contém grupo aldeído é chamado de aldose, enquanto aquele que contém o grupo cetona, é chamado de cetose (figura 9).

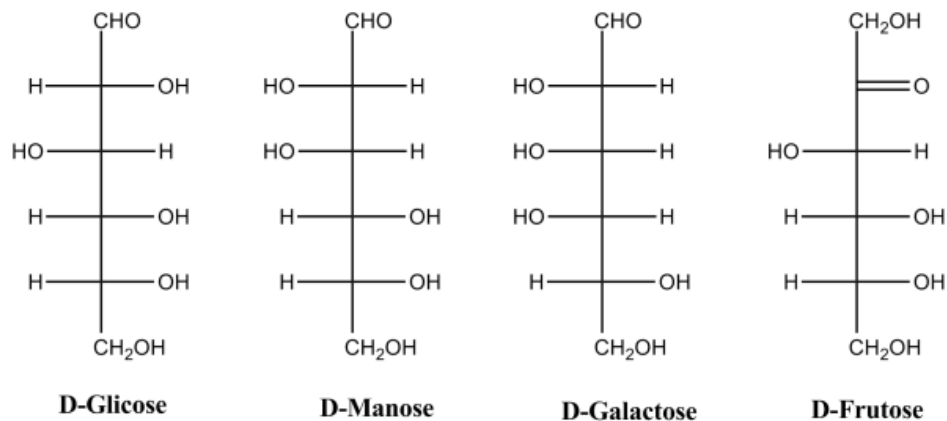
Figura 9- Estrutura de duas trioses, sendo uma aldose e uma cetose.



Fonte: NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª. Ed, 2014, pg 244

Monossacarídeos com quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono no esqueleto são chamados, respectivamente, de tetroses, pentoses, hexoses e heptoses. Sendo as hexoses mais importantes, descritas na figura 10.

Figura 10- Representação das principais hexoses: D-glicose, D-manose, D-galactose e D-frutose.



Fonte: Brás, N., (2015) Monossacarídeos, Rev. Ciência Elem., V3(1):081

Nas projeções de Fischer de monossacarídeos (Figura 10), o grupo carbonila é sempre colocado no topo (no caso de aldoses) ou mais próximo do topo possível (no caso das cetoses).

As designações D e L são usadas para descrever as configurações de carboidratos e aminoácidos e não são semelhantes às designações R e S, uma vez que elas não estão necessariamente relacionadas às rotações ópticas dos açúcares. As designações D e L indicam a configuração do carbono assimétrico mais distante

da carbonila, sendo que se o grupo hidroxila (OH) ligado a esse carbono assimétrico estiver voltado para a direita (*dextro*), a substância é um açúcar da série D e se o grupo OH estiver voltado para a esquerda (*levo*), é um açúcar da série L.

A galactose é uma aldose com quatro carbonos assimétricos que possui uma configuração D e sua imagem especular tem configuração L (figura 11). Quase todos os açúcares encontrados na natureza são da série D.

Figura 11-Estrutura da D-galactose e L-galactose.

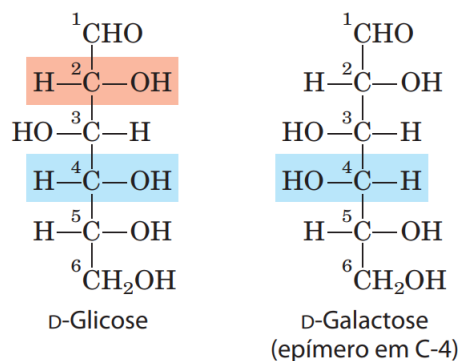


Fonte: Bruice, P. Y. Química Orgânica, v.2, 4ª. Ed., 2006, pg.338.

Geralmente, uma molécula com n centros quirais pode ter 2^n estereoisômeros e, considerando que as aldohexoses, como a glicose, manose, galactose, possuem seis carbonos, sendo quatro assimétrico, isso resulta em dezesseis estereoisômeros possíveis ($2^4=16$), ou oito pares de enantiômeros.

Epímeros são diastereoisômeros, ou seja, estereoisômeros que não são a imagem especular um do outro, que diferem na configuração de somente um carbono assimétrico. Assim, dois açúcares que diferem apenas na configuração de um carbono são chamados de epímeros. A D-glicose é epímero da D-galactose em C-4 do monossacarídeo (figura 12).

Figura 12-Estrutura dos epímeros D-glicose e D-galactose.

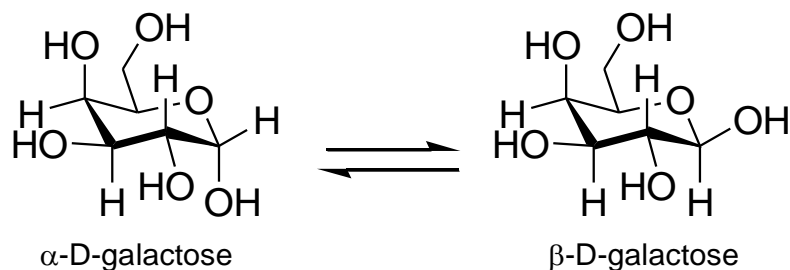


Fonte: NELSON, D. L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª. Ed, 2014, pg 246

Em solução aquosa, as aldotetroses e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono no esqueleto ocorrem predominantemente como estruturas cíclicas (em anel), nas quais o grupo carbonil forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila presente na cadeia. A formação dessas estruturas em anel é o resultado de uma reação geral entre álcoois e aldeídos ou cetonas para formar derivados chamados de hemiacetais ou hemicetais, respectivamente.

Como a hidroxila pode atacar de duas maneiras diferentes o carbono carbonílico, pela “frente” ou por “trás”, a reação pode produzir qualquer uma de duas configurações estereoisoméricas, denominadas α e β no novo centro assimétrico formado em C-1 (carbono carbonílico da cadeia aberta), também denominado de carbono anomérico. A configuração α é encontrada quando o grupo hidroxila ligado ao carbono anomérico está abaixo e paralelo ao plano do anel; enquanto que a configuração β , a grupo hidroxila está acima e mais distante do plano do anel (esquema 3).

Esquema 3 – Representação da estrutura de α e β D-galactose

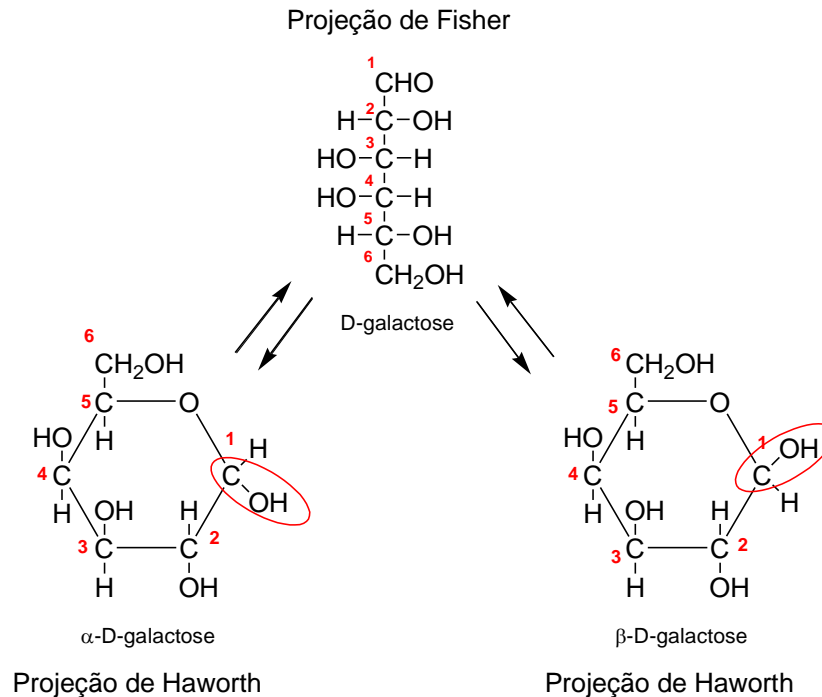


Fonte: Lopes (2022)

Os compostos com anéis de seis membros são chamados de piranoses, pois se assemelham ao composto em anel de seis membros pirano, logo, a galactose pode ser chamada de α -D-galactopiranosose ou β -D-galactopiranosose.

As estruturas cíclicas dos açúcares são representadas mais corretamente pelas fórmulas em perspectiva de Haworth do que pelas projeções de Fisher comumente utilizadas para as estruturas de açúcares lineares (esquema 4).

Esquema 4 – Projeção de Fisher e Haworth da galactose



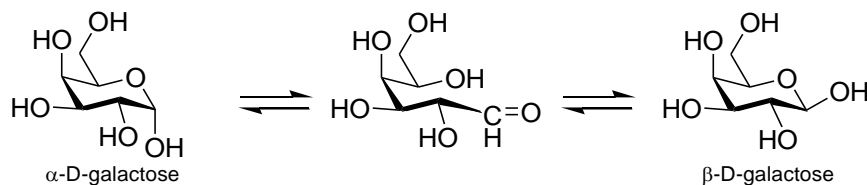
Fonte: Lopes (2022)

1.8.2 Reatividade da posição anomérica

Considerando a estrutura do açúcar, o carbono anomérico é o mais eletrofílico da estrutura, pois está ligado a dois oxigênios, sendo, portanto, um centro altamente suscetível ao ataque da água em meio aquoso e, conseqüente abertura do anel.

Os anômeros α e β da D-galactose se interconvertem em solução aquosa por um processo chamado de mutarrotação (esquema 5), no qual uma forma em anel (por exemplo, o anômero α) se abre brevemente na forma linear, e então se fecha novamente produzindo o anômero β e essa interconversão é detectada por alterações na rotação óptica.

Esquema 5 - Mutarrotação de D-glicose



Fonte: CAREY, F. A. Química Orgânica, v.2, 7ª. Ed, 2011, pg.1064.

O carbono anomérico, por se encontrar livre em monossacarídeos, é altamente susceptível à oxidação, sendo chamado, portanto, de açúcar redutor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 OBJETIVOS

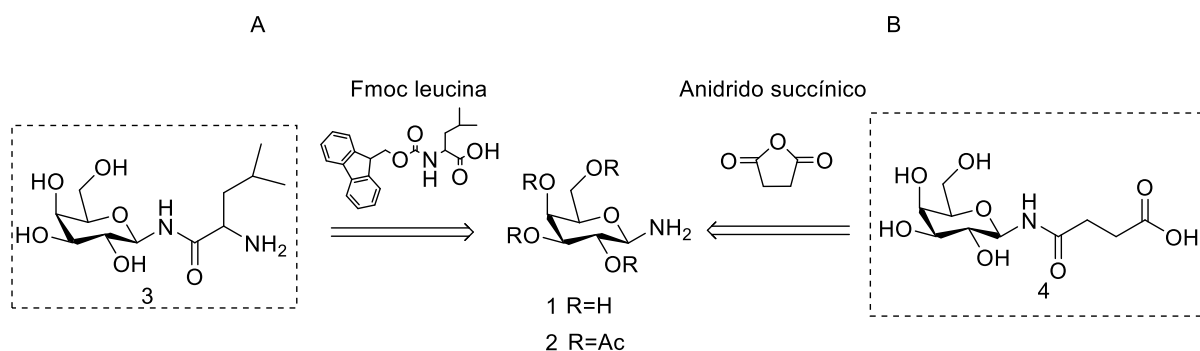
O objetivo deste trabalho consiste no planejamento e síntese de derivados de β -D-galactosamida de leucina e de anidrido succínico, sendo os grupos galactosila e ácido succínico capazes de mimetizar os substratos acceptor (mucinas galactosiladas) e doador de ácido siálico, respectivamente. O composto obtido foi avaliado quanto a sua atividade inibidora da enzima *trans*-sialidase de *T.cruzi*, alvo molecular promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos contra a doença de Chagas.

2.2 ESTRATÉGIA SINTÉTICA

2.2.1 Estratégia geral de obtenção dos compostos propostos no trabalho

Inicialmente, a síntese de β -D-galactosamida de leucina **3** foi proposta, a partir do acoplamento entre o aminoácido Fmoc leucina com 1-amino-galactose **1** (com hidroxilas livres) e, posteriormente, com 1-amino-galactose peracetilada **2**, como mostrado no esquema 6A. Em um segundo momento, foi planejado a síntese de β -D-galactosamida de ácido succínico **4**, a partir do acoplamento do anidrido succínico com **1** ou **2**, esquema 6B.

Esquema 6 – Retrossíntese dos produtos de interesse no trabalho



Fonte: Lopes (2022).

2.2.2 Estratégia sintética para obtenção da 1-amino-galactose (1) a partir de galactose

De acordo com a literatura descrita por Barker *et al.* (1974), foi usado um método para síntese de β -D-galactopiranosilamina a partir de amônia anidra e MeOH. Outro método importante de aminação de glicose foi introduzido por Kochetkov (LIKHOSHERTOV *et al.*, 1986) e posteriormente modificada por Likhoshertov (LIKHOSHERTOV *et al.*, 2002, 2003, 2004).

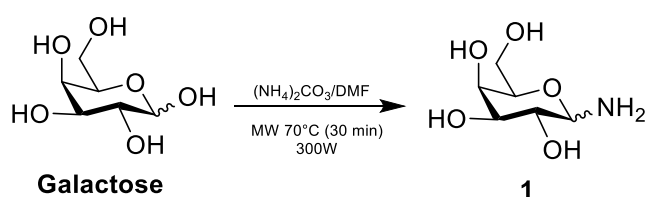
A reação de Kochetkov é realizada com carbonato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, enquanto a reação de Likhoshertov emprega carbamato de amônio $\text{H}_2\text{NCOONH}_4$ como agente de aminação. Ambos métodos são realizados a partir do tratamento de um sacarídeo, com quantidade excessiva do agente de aminação, sendo uma abordagem direta para inserção regioseletiva de grupo amino na posição anomérica de carboidratos (C-1) (TANG *et al.*, 2020).

A reação por Kochetkov tem a vantagem de ser realizada por irradiação com microondas, encurtando o tempo de reação de 5-6 dias para 90 minutos (BRUN; DISNEY; SEEBERGER, 2006; BEJUGAM; FLITSCH, 2004), além de diminuir significativamente a quantidade de sal de amônio utilizado de 40-50 para 5 vezes. Existe também a possibilidade de emprego da irradiação na reação por Likhoshertov, mas devido ao $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ apresentar um custo menor, este foi empregado para a obtenção de 1-amino-galactose **1**.

Portanto, o protocolo de Kochetkov (LIKHOSHERTOV *et al.*, 1986) foi modificado e usado para obtenção de 1-amino-galactose **1**, com alterações nas condições reacionais, como a irradiação por microondas, quantidade de agente de aminação e tipo de solvente.

Logo, a reação foi realizada na presença de excesso de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ em dimetilformamida (DMF), sendo irradiado em microondas por 30 minutos, 70°C e 300W, para a obtenção de **1** (Esquema 7).

Esquema 7 – Representação da síntese de 1-amino-galactose **1**.



Fonte: Likhoshertov *et al.* (1986).

2.2.3 Estratégia sintética para obtenção da 1-amino-galactose peracetilada (**2**) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila

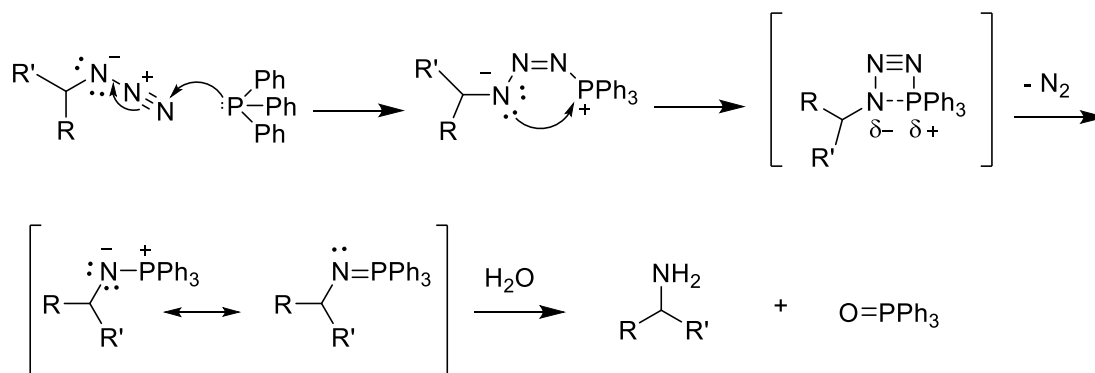
Alguns métodos descritos na literatura são usados para a conversão de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila em amina. A hidrogenação, é uma reação

química em que ocorre adição de uma molécula de hidrogênio a um carbono ou heteroátomo, normalmente na presença de um metal catalisador, como níquel, platina ou paládio.

Entre todos os catalisadores de níquel comerciais, o níquel Raney (Ni Raney) é o mais utilizado industrialmente para reações de hidrogenação (NISHIMURA, 2001). Considerando que níquel é um metal barato e disponível, e embora seja utilizado em alguns processos industriais importantes, seu uso é limitado. A baixa reatividade do níquel exige que ele seja utilizado em condições de alta temperatura e pressão. Sendo assim, outros metais nobres como paládio e platina, embora mais caros, são muito mais ativos e podem ser utilizados em uma diversidade maior de reações.

Outro método descrito de modificação de azido em amino é a reação de Staudinger, com adição de trifetil-fosfina em meio aquoso. O mecanismo consiste no ataque nucleofílico de trifetil-fosfina ao grupo azido no nitrogênio terminal eletrofílico, formando o intermediário iminofosforana, que após rearranjo e eliminação de nitrogênio gasoso forma um intermediário instável, posteriormente hidrolisado, obtendo-se óxido de fosfina e amina primária, esquema 8.

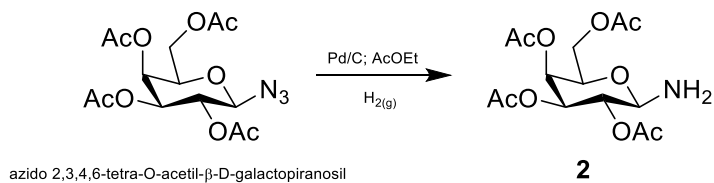
Esquema 8 – Mecanismo da reação de Staudinger



Fonte: TIAN; WANG, 2004; LIN; HOYT, 2005.

Dessa maneira, considerando a principal desvantagem da reação de Staudinger, que consiste na remoção do óxido de fosfina formado, foi utilizado, portanto, a hidrogenação catalítica para reduzir o grupo azido em amina primária, obtendo-se o produto **2**. E, considerando que o níquel é um catalisador com baixa atividade, foi empregado o Pd/C, disponível no laboratório, além de AcOEt e H_{2(g)}, conforme descrito por Parmenopoulou *et al.* (2014) (esquema 9).

Esquema 9 – Redução do grupo azida à amina primária, obtendo-se **2**.



Fonte: Parmenopoulou *et al.* (2014).

2.2.4 Estratégia sintética para obtenção de (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com (1) ou (2)

Primeiramente, para obtenção de **3**, considerando o esquema 6A, foi empregado o composto **1**, ainda dissolvido em DMF, para acoplamento com Fmoc leucina. O aminoácido foi usado com o grupo amino protegido (Fmoc) para evitar reações secundárias e, conseqüentemente, alcançar maior eficiência na reação.

O acoplamento entre **1** e a região carbóxi-terminal da Fmoc leucina foi feito na presença de reagentes de acoplamento comumente empregados na síntese de peptídeos, como a diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), frequentemente utilizado por apresentar boa reatividade e custo acessível e, em outro momento, o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino) fosfônio (PyBOP), muito utilizado em Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS), método desenvolvido inicialmente por Bruce Merrifield em 1963 (CHAN; WHITE, 2000; MARRIFIELD, 1963).

Apesar da reatividade, o reagente DCC conduz à formação do subproduto diciclo-hexiluréia (DCU), insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, o que muitas vezes, inviabiliza seu emprego na síntese em fase sólida. Sendo assim, normalmente, usa-se DCC acompanhado de um aditivo, como o HOBt (1-hidróxi-benzotriazol), com o intuito de aumentar a taxa de acoplamento e reduzir a racemização do carbono central do aminoácido.

Em um segundo momento foi realizado o acoplamento empregando-se PyBOP ao invés de DCC, junto à base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), HOBt, em DMF, sob agitação, à temperatura ambiente.

Para obtenção de **3**, também foi proposto uma outra estratégia, sendo empregado 1-amino-galactose protegida **2**, previamente sintetizado, o aminoácido Fmoc leucina, HOBt, PyBOP, DIPEA e DMF, sob agitação, à temperatura ambiente por 24 horas.

É importante destacar que a remoção do grupo Fmoc da unidade de aminoácido seria realizada a partir do uso de Morfolina 20% em DMF, seguido de filtração em resina para retirada do dibenzofulveno.

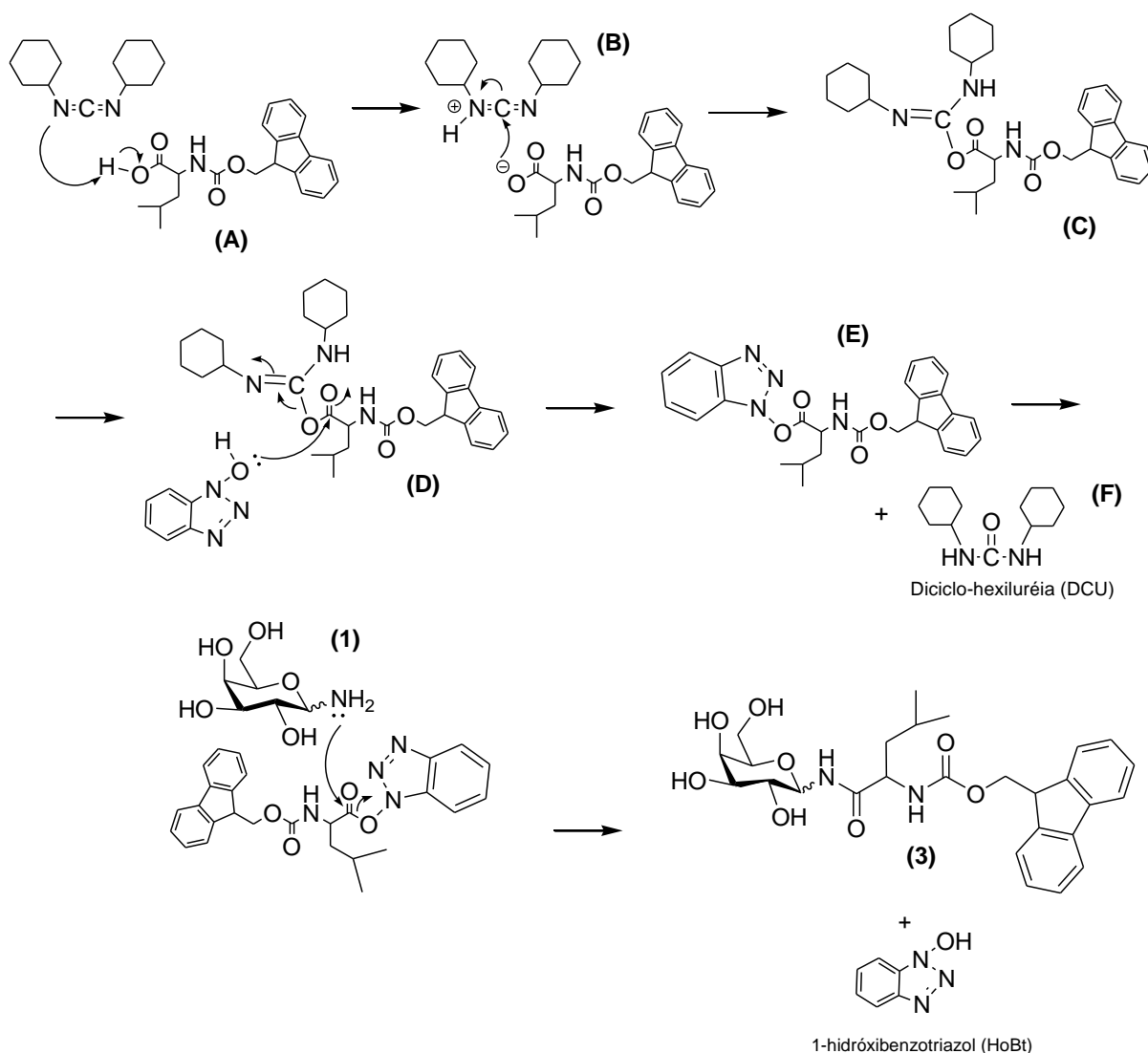
Considerando o uso de **2** para o acoplamento com Fmoc Leucina, a desacetilação seria realizada com o emprego da solução de NaOMe em MeOH e posteriormente, resina de troca iônica ácida (DOWEX 1X4-50) para conversão dos grupos alcóxidos em hidroxilas.

2.2.5 Mecanismo de acoplamento entre 1-amino-galactose (1) e Fmoc leucina

Considerando a reação de acoplamento na presença DCC, o HOBt atua como nucleófilo auxiliar, formando um intermediário altamente reativo que rapidamente reage com o O-terminal do aminoácido, aumentando a eficiência da síntese e suprimindo a racemização (HAM; KIM, 2004).

O mecanismo da reação envolve inicialmente a ativação da carbonila pelo reagente DCC. Primeiramente, o par de elétrons do nitrogênio do reagente DCC desprotona a hidroxila do grupo carboxílico de Fmoc leucina (**A**). Em seguida, o átomo de oxigênio deste aminoácido, carregado negativamente, realiza um ataque nucleofílico no carbono da ligação carbono-nitrogênio do DCC (**B**), a qual é fortemente polar, formando um intermediário correspondente ao derivado do aminoácido com a carboxila ativada (**C**). O átomo de oxigênio do HOBt realiza o ataque nucleofílico no carbono desta carboxila ativada (**D**), resultando na formação de um segundo intermediário do aminoácido com carboxila ativada (**E**) e liberação do subproduto DCU (**F**). O carbono carbonílico de (**E**) sofre o ataque nucleofílico do grupo amino da 1-amino-galactose **1**, levando a liberação do HOBt e formação do **3** ligado ao grupo Fmoc (Esquema 10) (CLAYDEN; GREEVS; WARREN, 2012).

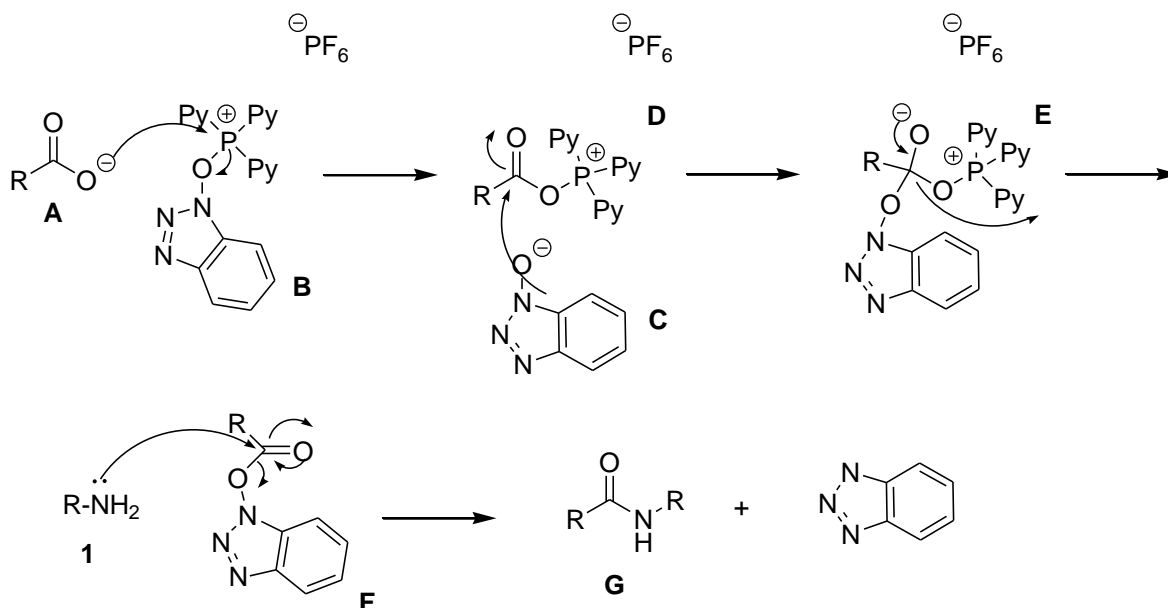
Esquema 10 – Mecanismo da reação para obtenção de **3** ligado ao grupo Fmoc, na presença de DCC e HOBt.



Fonte: Lima (2013).

Ademais, a reação em que foi empregado PyBOP, o aditivo HOBT e a base DIPEA, o mecanismo de acoplamento envolve, primeiramente, a desprotonação pela base DIPEA do ácido carboxílico do Fmoc aminoácido, levando o oxigênio deste aminoácido, carregado negativamente, a atacar PyBOP (B). Em seguida, o grupo HOBT da molécula de PyBOP é liberado (C), permanecendo na forma de éster tripirrolidino-fosfônio (D). O grupo (C), liberado anteriormente, possui caráter nucleofílico e ataca o carbono carbonílico do aminoácido, deslocando o grupo oxitripirrolidino-fosfônio (E). O éster resultante formado entre o aminoácido e o grupo hidróxibenzotriazol (F) desloca o grupo tripirrolidino-fosfônio e o grupo amino da 1-amino-galactose (1) realiza um ataque nucleofílico no carbono carbonílico, liberando o grupo hidróxibenzotriazol com conseqüente formação da ligação amida (G), esquema 11 (CAMPO, 2007).

Esquema 11 - Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo os reagentes PyBOP, HOBT e DIPEA

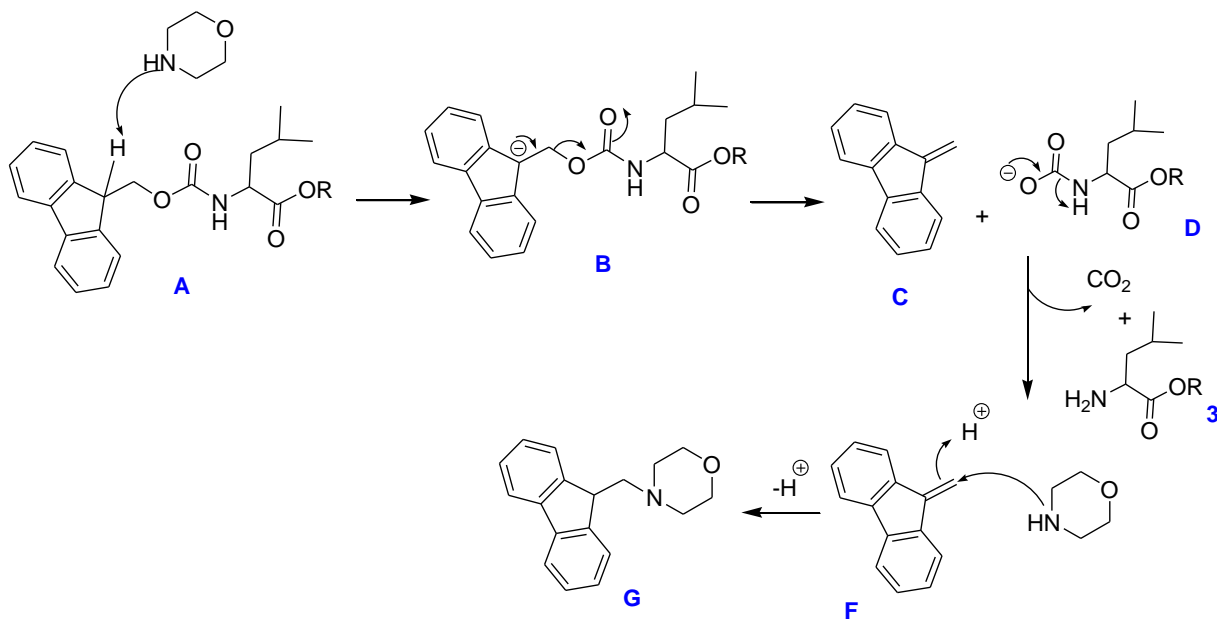


Fonte: Lima (2013).

2.2.6 Mecanismo de clivagem do grupo Fmoc e obtenção de (3)

O mecanismo de clivagem do grupo Fmoc empregando-se morfolina envolve a Eliminação Unimolecular (E1) com formação do ânion dibenzofulveno-morfolina estabilizado. Primeiramente, a base morfolina desprotona o grupo Fmoc (A), originando o ânion ciclopentadienílico (B), o qual se rearranja para o derivado dibenzofulveno (C), eliminando o aminoácido na forma de ânion carboamida (D). O ânion carboamida instável (D) se decompõe fornecendo dióxido de carbono e o produto 3. Posteriormente, morfolina ataca a molécula dibenzofulveno (F) formando o derivado dibenzofulveno-morfolina (G), esquema 12 (CAMPO, 2007).

Esquema 12 – Mecanismo da reação de clivagem de grupo Fmoc por morfolina para obtenção de 3.



Fonte: Lima (2013).

2.2.7 Estratégia sintética para obtenção de (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2)

De acordo com a literatura descrita por Barker *et al.* (1974), a acetilação da glicose, como uma acilação clássica, é realizada em piridina e anidrido acético por 30 horas, à temperatura ambiente, com posterior hidrólise do excesso de anidrido acético. Após 2 horas a mistura é concentrada, dissolvida em clorofórmio (ou cloreto de etila) e a solução extraída empregando-se ácido sulfúrico 2N, bicarbonato de sódio saturado e água. Este método pode ser aplicado na peracilação de 1-amino-galactose **1**, substituindo anidrido acético por anidrido succínico, conforme descrito no esquema 6B.

Por outro lado, o método utilizado por Kassab, Felix, Parrot-Lopez e Bonaly (1997), para condensação da tetra-O-acetil-β-D-galactosil isotiocianato com ácido succínico, utiliza Et₃N e tolueno. O produto foi purificado e a hidrólise do acetato foi realizada com uma solução de NaOH/MeOH, durante 4 horas, em temperatura ambiente. Essa estratégia pode ser aplicada na condensação de 1-amino-galactose peracetilada **2** com anidrido succínico, esquema 6B.

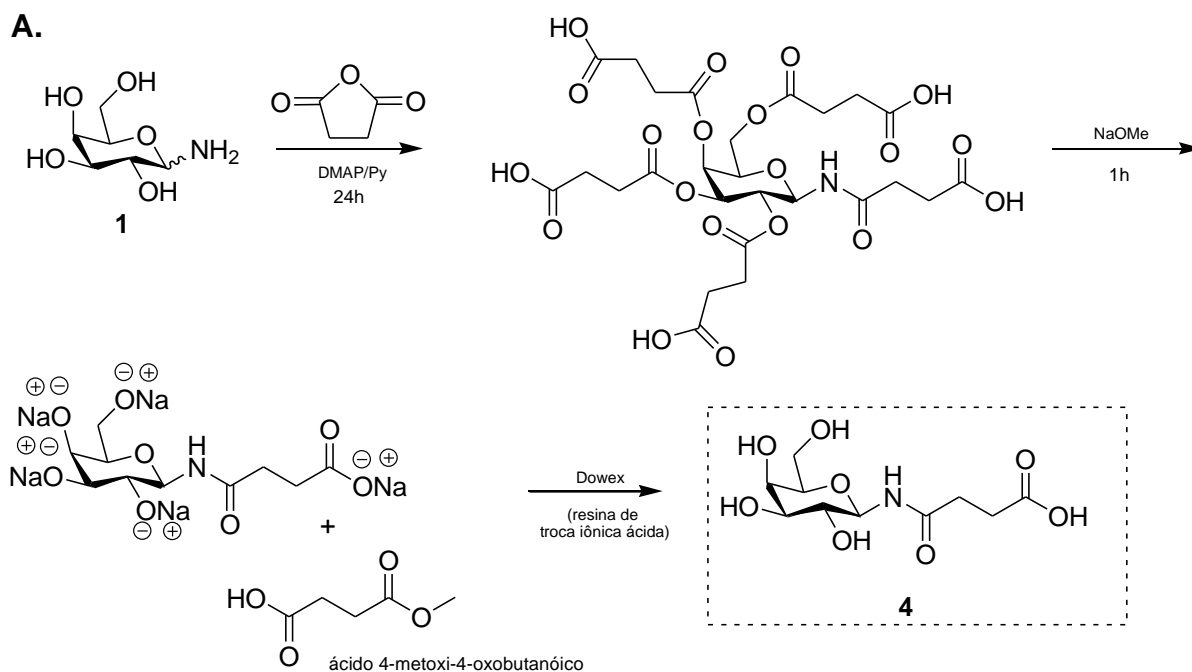
Sendo assim, para este trabalho foram propostas duas estratégias para a obtenção do produto **4**, representados no esquema 6B, sendo que a primeira partiu de 1-amino-galactose **1**, excesso de anidrido succínico, o catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP), em piridina anidra, sob agitação, à temperatura

ambiente, por 24 horas (DE ANDRADE, 2012; LEMANSKI; ZIEGLER, 2000) para peracilação concomitante dos grupos amino e hidroxílicos. E a segunda estratégia, foi realizada a partir de 1-amino-galactose peracetilada **2**, anidrido succínico, Et₃N e DMF, sob agitação, à temperatura ambiente, por 1 hora (PARMENOPOULOU *et al.*,2014). Em ambas as estratégias, para obtenção do produto **4**, a etapa seguinte envolveu o uso de uma solução de NaOMe em MeOH e resina de troca iônica ácida (DOWEX 1X4-50) para liberação dos grupos hidroxílicos do açúcar.

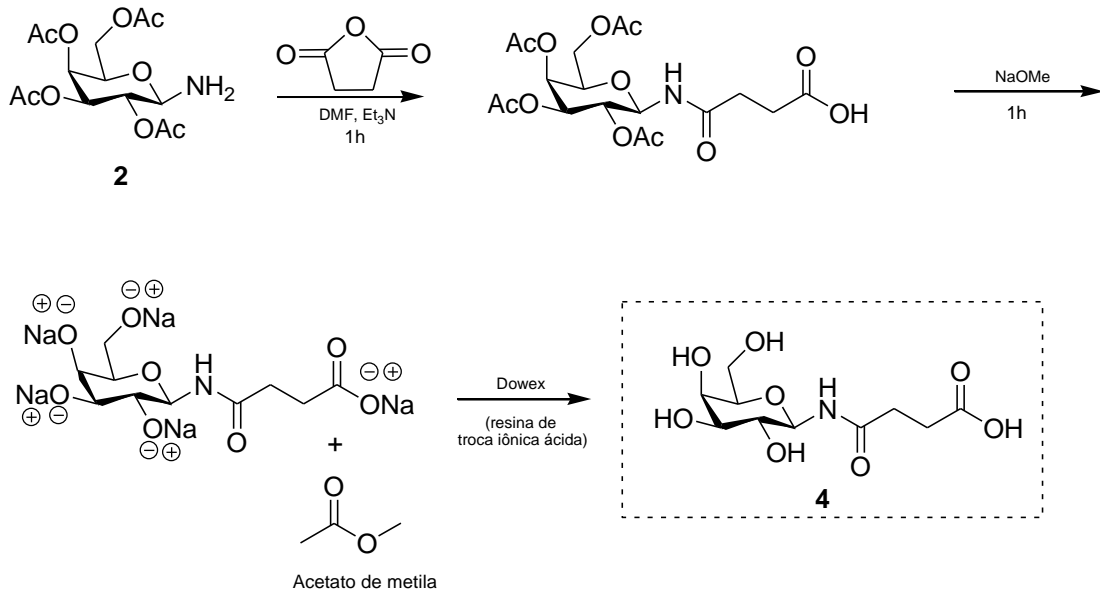
Dessa forma, partindo de 1-amino-galactose **1**, seria obtido um composto peracilado com anidrido succínico, que ao ser tratado com uma solução NaOMe em MeOH e resina de troca iônica ácida (DOWEX 1X4-50), geraria o composto 4-metoxi-4-oxobutanóico, de modo a obter produto **4** (esquema 13A).

Ademais, partindo de 1-amino-galactose peracetilada **2**, foi obtido o produto de condensação entre apenas a função amino e anidrido succínico, na presença de trietilamina, que ao ser desacetilado, liberou acetato de metila e o produto **4** (esquema 13B).

Esquema 13 – Representação das estratégias de obtenção do produto **4**, a partir de 1-amino-galactose **1** e 1-amino-galactose peracetilada **2**.



B.



Fonte: Lopes (2022).

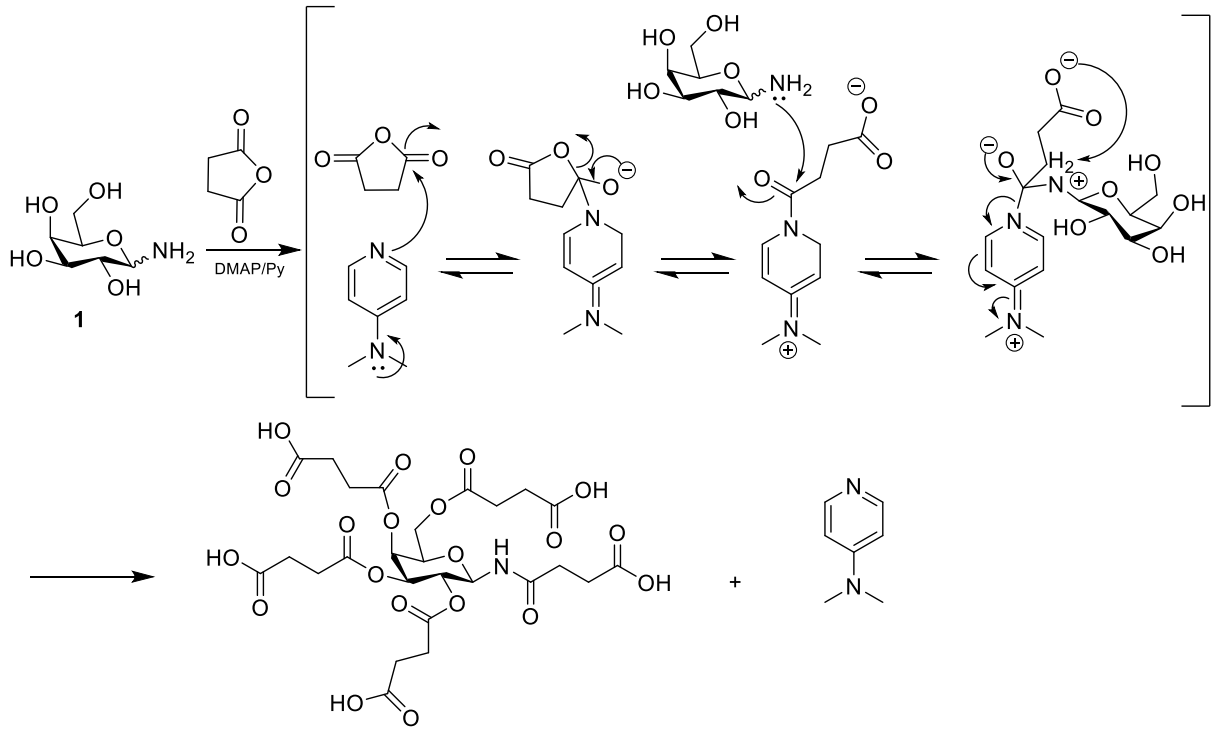
2.2.8 Mecanismo de acilação com anidrido succínico

O anidrido succínico é altamente reativo e pode ser usado para preparar ésteres e amidas. No caso desse trabalho, além da formação de amida, a função carboxila é inserida na molécula de galactose, mimetizando, assim, o ácido siálico.

A conversão química de carboidratos por meio da reação de esterificação usando o anidrido succínico como agente acilante altera as propriedades dessas substâncias como, por exemplo: polaridade, elasticidade, capacidade de absorção ou troca de íons, resistência a ataque microbológico e térmico, podendo gerar uma maior atividade biológica do composto acilado (SILVA, 2014).

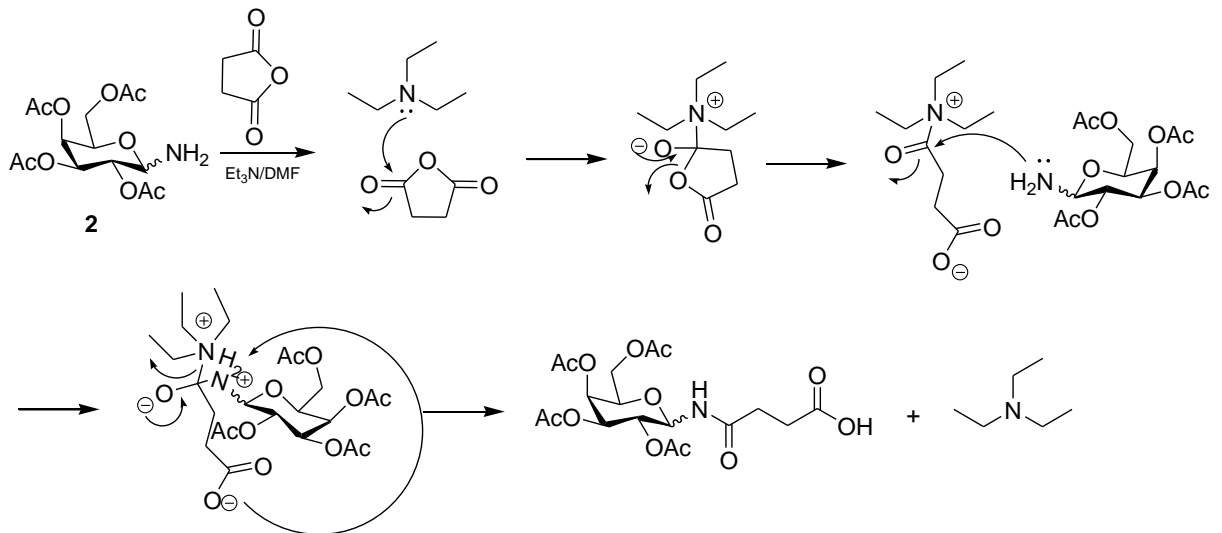
Quanto ao mecanismo de acilação na presença do catalisador DMAP (esquema 14) e Et₃N (esquema 15), esses reagem com o anidrido succínico gerando um intermediário mais suscetível ao ataque do grupo amino para formação da amida.

Esquema 14 - Representação do mecanismo de acilação de 1 com anidrido succínico, na presença de DMAP e piridina.



Fonte: De Andrade (2012).

Esquema 15 - Representação do mecanismo de condensação de 2 com anidrido succínico na presença de Et_3N e DMF



Fonte: Lopes (2022).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Aparelhagem analítica

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), carbono (RMN ^{13}C) foram registrados no espectrômetro Bruker Avance DRX 300 (300 MHz) ou DPX 500 (500 MHz), na Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

Os deslocamentos químicos (δ) são relatados em partes por milhão (ppm), colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= singlete, d= dubleto, t= tripleto, dd= duplo dubleto, m= multipletto), a constante de acoplamento (J), dada em Hertz (Hz), e o número de hidrogênios deduzidos a partir da integral relativa. As atribuições descritas foram realizadas com o auxílio das análises bidimensionais de gCOSY, gHMQC. A análise de infravermelho foi realizada pelo aparelho Shimadzu.

2.3.2 Método geral de separação em cromatografia em camada delgada (CCD)

A separação dos compostos obtidos foi feita por CCD, com a fase móvel (AcOEt/MeOH 9:1 e 8:2), além de (DCM/MeOH 9:1 e 8:2), (Acetonitrila 85:AcOEt 20: Isopropanol 50: H₂O 50) e (AcOEt/Tolueno 7:3).

2.3.3 Método geral de purificação em cromatografia de alta eficiência (CLAE)

A purificação final foi realizada em equipamento CLAE, ShimadzuShim-Park, utilizando coluna C18 de fase reversa, tamanho 250 x 10,0mm, sob gradiente isocrático (10% de acetonitrila) a um fluxo de 1mL/minuto, com detecção UV (190nm e 250nm).

2.3.4 Método geral de separação em cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP)

A separação dos compostos foi realizada com a fase móvel (AcOEt 100%), além de (AcOEt/MeOH 9:1) e (DCM/MeOH 8:2).

2.3.5 Método geral de purificação por Biotage Horizon™

A purificação do composto foi realizada usando a fase móvel (AcOEt/MeOH 8:2).

2.3.6 Método geral de separação em cromatografia em Coluna (CCC)

A purificação dos compostos foi realizada utilizando sílica gel tipo "Flash" com a fase móvel (AcOEt/Hex 7:3) e (AcOEt/Tolueno 7:3).

2.3.7 Método sintético para obtenção de 1-amino-galactose (1) a partir de galactose

A síntese de **1** foi baseada protocolo de Kochetkov (LIKHOSHERTOV *et al.*, 1986), sendo realizada a partir de galactose (100mg; 0,55mmol; 1Eq), $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (265mg; 2,75mmol; 5Eq) e 2mL de DMF. A mistura foi irradiada por 30 minutos, 70°C, 300W e apresentou uma cor clara. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), cuja fase móvel utilizada foi (Acetonitrila 85:AcOEt 20: Isopropanol 50: H₂O 50), além disso, foi observada uma coloração púrpura para o teste da de Kaiser (KAISER *et al.*, 1970), indicando a presença do grupo amino livre. O produto não foi purificado, uma vez que é muito instável, logo, já foi empregado nas outras reações do trabalho.

2.3.8 Método sintético para obtenção de 1-amino-galactose peracetilada (2) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosila

A síntese da 1-amino-galactose peracetilada **2** foi realizada a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosila (100mg; 0,268mmol; 1Eq), AcOEt (5mL), Pd/C (20mg) em sistema fechado com H_{2(g)}, à temperatura ambiente, sob agitação, por 3 horas, conforme descrito por Parmenopoulou *et al.* (2014). A reação foi acompanhada por CCD, cuja fase móvel usada foi (AcOEt 100%), a amostra foi filtrada, concentrada e o produto final foi obtido. Rendimento (85mg, 0,24mmol, 91%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) (ANEXO C) δ_H: 5,39-5,40 (m, 1H, H-5), 5,09-4,98 (m, 2H, H-3, H-4), 4,34-4,04 (m, 3H, H-1, H-6), 3,88 (dd, 1H, *J* 6,90, 13,6 Hz, H-2), 2,15-1,98 (m, 12H, OAc).

2.3.9 Método sintético para obtenção de (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com (1) ou (2)

Considerando o esquema 6A, partindo de 1-amino-galactose **1**, foi adicionado Fmoc leucina (197,90mg; 0,56mmol; 1Eq), HOBt (75,66mg; 0,56mmol; 1Eq), PyBOP (291,41mg; 0,56mmol; 1Eq), DIPEA (245mL; 1,4mmol; 2,5Eq) e 2mL de DMF, com agitação, à temperatura ambiente, por 118 horas.

A reação foi acompanhada por CCD, cuja fase móvel utilizada foi (AcOEt/MeOH 8:2), sendo que a mancha de menor Fator de retenção (R_f) foi associada ao produto. Por fim, a amostra foi concentrada para remoção de DMF, solubilizada em MeOH e purificada por Biotage, cuja fase móvel usada foi (AcOEt/MeOH 8:2).

Com relação a obtenção de **3** a partir de 1-amino-galactose peracetilada **2**, foi usado Fmoc leucina (197,90mg; 0,56mmol; 2,3Eq), HOBt (75,66mg; 0,56mmol; 2,3Eq), PyBOP (291,41mg; 0,56mmol; 2,3Eq), DIPEA (250 μ L) e 2mL de DMF, com agitação, à temperatura ambiente, por 46 horas. A reação foi acompanhada por CCD (AcOEt/Hex 7:3), sendo posteriormente concentrada e purificada por CCC, cuja fase móvel usada foi (AcOEt/Tolueno 7:3).

2.3.10 Método sintético para obtenção de (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2)

Com relação a obtenção de **4** a partir de 1-amino-galactose **1**, descrito no esquema 6B, foi adicionado excesso de anidrido succínico (280mg; 2,8mmol; 5Eq), DMAP (34mg; 0,28mmol; 0,5Eq) e 2mL de piridina anidra, sob agitação por 24 horas, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD com a fase móvel (AcOEt/Hex 7:3) e após esse tempo a amostra foi concentrada para remoção da piridina, diluída em DCM e lavada com uma solução de HCl (1,0M) e água. O produto ficou na fase aquosa, que foi concentrada e posteriormente solubilizada em MeOH. Por fim, foi adicionado quantidade suficiente de uma solução de NaOMe em MeOH para atingir um pH básico (pH 9,0), após isso foi empregado a resina de troca iônica ácida (Dowex 1x4-50), até alcançar pH 6 ou 7.

Por outro lado, levando-se em consideração a obtenção de **4** a partir de 1-amino-galactose peracetilada **2**, representado no esquema 6B, foi adicionado anidrido succínico (27mg; 0,267mmol; 1,0Eq), Et₃N (40 μ L) e 1mL de DMF, com agitação, à temperatura ambiente, por 1 hora. A reação foi acompanhada por CCD com a fase móvel (AcOEt/Hex 7:3), sendo posteriormente concentrada para remoção do DMF e purificada por CCC (AcOEt/Hex 7:3; AcOEt 100%), obtendo o rendimento (81mg; 0,18mmol, 68%). Após isso, o produto foi tratado com uma solução de NaOMe em MeOH até atingir pH 9,0 e, em seguida, foi empregado a resina de troca iônica ácida (Dowex 1X4-50) até alcançar pH 6-7 e, portanto, o produto **4** desprotegido foi obtido com o rendimento (26mg; 0,093mmol, 52%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do produto **4** protegido (ANEXO I), δ H: 6,57 (d, 1H, J_{NH} 9,2 Hz), 5,46 (d, 1H, J 1,9 Hz, H-4), 5,27 (t, 1H, J 9,1 Hz, H-2), 5,18-5,10 (m, 2H, H-1, H-3), 4,16-4,04 (m, 3H, H-5, H-6), 2,78-2,50 (m, 4H, H-CH₂), 2,02-2,18 (m, 12H, H-OAc).

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) do produto **4** desprotegido (ANEXO I), δH : 4,78 (d, 1H, J 8,8 Hz, H-1), 3,85 (d, 1H, J 3,2 Hz, H-4), 3,67-3,49 (m, 5H, H-2, H-3, H-5, H-6), 2,50-2,42 (m, 2H, H- CH_2), 2,39-2,34 (m, 2H, H- CH_2).

RMN ^{13}C (D_2O , 75MHz) do produto **4** desprotegido (ANEXO K) δC : 181,24 ($\text{C}_1=\text{O}$), 177,47 ($\text{C}_4=\text{O}$), 80,11 ($\text{C}_1\text{-GAL}$), 76,96 ($\text{C}_5\text{-GAL}$), 73,77 ($\text{C}_3\text{-GAL}$), 69,77 ($\text{C}_2\text{-GAL}$), 69,06 ($\text{C}_4\text{-GAL}$) 61,27 ($\text{C}_6\text{-GAL}$), 32,82-32,60 (C_{etil}).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Análise da galactose

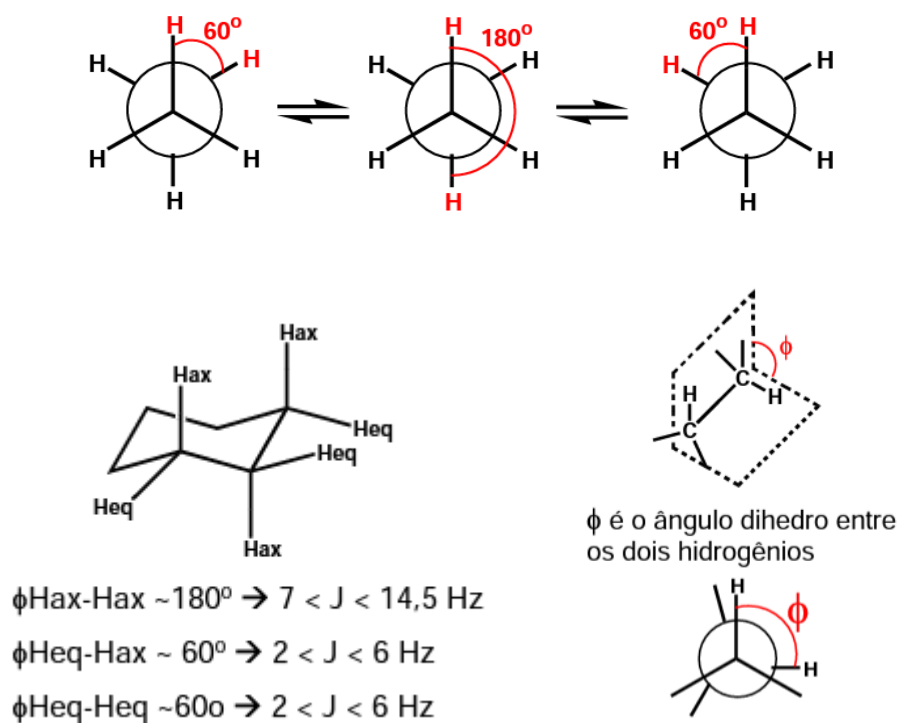
A molécula de galactose possui doze átomos de hidrogênio ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e ao analisar o espectro de RMN ^1H (ANEXO A), é verificado que a maioria dos sinais de hidrogênio apresenta deslocamento químico na região entre 3,6-4,3ppm. Quanto aos sinais em 4,80ppm e 5,48ppm observados, esses são indicativos do hidrogênio ligado ao carbono anomérico (C-1), os quais são mais desblindados devido a ligação ao carbono ligado a dois átomos de oxigênio.

O hidrogênio do carbono anomérico do ciclohexano na posição axial é mais blindado que o equatorial, pois está mais próximo do eixo do anel e, conseqüentemente da nuvem eletrônica dos átomos do anel. Adicionalmente, no anel pirano de carboidratos, hidrogênio do carbono anomérico na posição equatorial é mais desblindado, pois se encontra mais distante do eixo do anel.

Esse hidrogênio na posição anomérica pode estar na configuração axial, com uma constante de acoplamento maior (J 7,84 Hz), ou na configuração equatorial, com uma constante de acoplamento menor (J 3,51 Hz).

O acoplamento vicinal de dois hidrogênios em posição axial no anel pirano (ou ciclohexano) é próximo a 180° , angulação máxima pela regra de Karplus, gerando, portanto, uma constante de acoplamento maior ($7 < J < 14,5$ Hz). Quanto ao acoplamento vicinal entre um hidrogênio axial e outro equatorial, a angulação é mantida próxima a 60° , logo, a constante de acoplamento é menor ($2 < J < 6$ Hz) (figura 13). Assim, o valor da constante de acoplamento e o deslocamento químico do hidrogênio anomérico em C-1 auxilia na identificação do anômero obtido nas reações de glicosilação.

Figura 13 – Magnitude das constante de acoplamento



Fonte: <http://www.qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursormn3.pdf>

Com relação ao valor da integral para os sinais de H-1, é possível inferir que a proporção entre os anômeros α -galactose e β -galactose é de (1:2).

Além disso, o hidrogênio do carbono anomérico acopla apenas com um hidrogênio vicinal em C-2, sendo, portanto, um duplete (d). Logo, a galactose usada na reação para obtenção de **2**, devido ao efeito de mutarrotação, é uma mistura de isômeros alfa e beta, na proporção (1:2).

Como pode ser observado no espectro, sabendo-se que a galactose usada é uma mistura de isômeros, todos os outros hidrogênios, além do ligado ao carbono anomérico, tem mais de um sinal que corresponde ao anômero alfa e ao anômero beta, separadamente. Por exemplo, H-4 tem um sinal para o anômero α , cuja integral relativa é de 0,60 e outro para o anômero β com a integral de 0,99. Como o deslocamento químico desses hidrogênios é muito próximo, os sinais de 4,33-3,92ppm ficam sobrepostos, mas tem uma integral de 5.43 hidrogênios, que está relacionado aos H-2, H-3, H-4, H-5, H-6. -

2.4.2 Síntese de 1-amino-galactose (1) a partir de galactose

A primeira tentativa de otimização das condições reacionais do protocolo de Kochetkov (LIKHOSHERTOV *et al.*, 1986) foi feita com irradiação de 30 minutos a 70°C, em MeOH e foi observado que a mistura não ficou adequadamente solubilizada e a coloração ficou transparente. Posteriormente, o tempo de irradiação foi aumentado para 60 minutos e também não houve uma solubilização satisfatória em MeOH. Nesse sentido, o solvente DMF foi empregado para melhorar a solubilidade da galactose e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Considerando o uso de DMF como solvente da reação, foram testados alguns tempos de irradiação no microondas, como 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. A reação foi acompanhada com CCD, cuja fase móvel foi (Acetonitrila 85:AcOEt 20: Isopropanol 50: H₂O 50) e a revelação das placas foi realizada com Ninidrina (KAISER *et al.*, 1970) ou solução de ácido H₂SO₄.

Dessa maneira, foi verificado que o aumento do tempo de irradiação, causava coloração mais escura da mistura, no entanto, nos tempos de irradiação de 15 e 30 minutos, esta foi mantida mais estável. O teste de Kaiser (KAISER *et al.*, 1970), com revelação por ninidrina para as amostras irradiadas de 15 a 90 minutos apresentaram a cor púrpura no produto, indicando a presença de grupo amino livre.

Após concentrar essas amostras para remoção do DMF e enviar para análise por RMN ¹H, foi verificado que o tempo de irradiação de 30 minutos, 70°C e 300W foi satisfatório para dar seguimento a próxima etapa da reação, o acoplamento com o aminoácido Fmoc leucina ou anidrido succínico.

Tabela 1. Variações das condições reacionais para otimização da síntese de **1**, partindo de 100mg de galactose e de aproximadamente 270mg de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Reação	Solvente	°C	Tempo irradiação (min)
1.1	MeOH	45	60
1.2	MeOH	70	30
1.3	MeOH	70	60
1.4	DMF	70	15
1.5	DMF	70	30
1.6	DMF	70	45
1.7	DMF	70	60

1.8	DMF	70	90
-----	-----	----	----

Fonte: Lopes (2022).

A análise do espectro de 1-amino-galactose (ANEXO B) revelou a presença do hidrogênio anomérico em 4,08 ppm, ligado ao grupo amino, como um novo sinal mais blindado do que os sinais da galactose. É importante considerar que o nitrogênio tem um efeito mesomérico doador sobre o carbono C-1 e, portanto, blindo o hidrogênio, em comparação com o oxigênio de galactose. Além disso, a análise bidimensional gCOSY mostrou a correlação do hidrogênio anomérico em 4,08 ppm com o H-2 em 3,30-3,40 ppm, evidenciando a formação de 1-amino-galactose **1**, também com teste positivo de Kaiser, em reação com ninidrina.

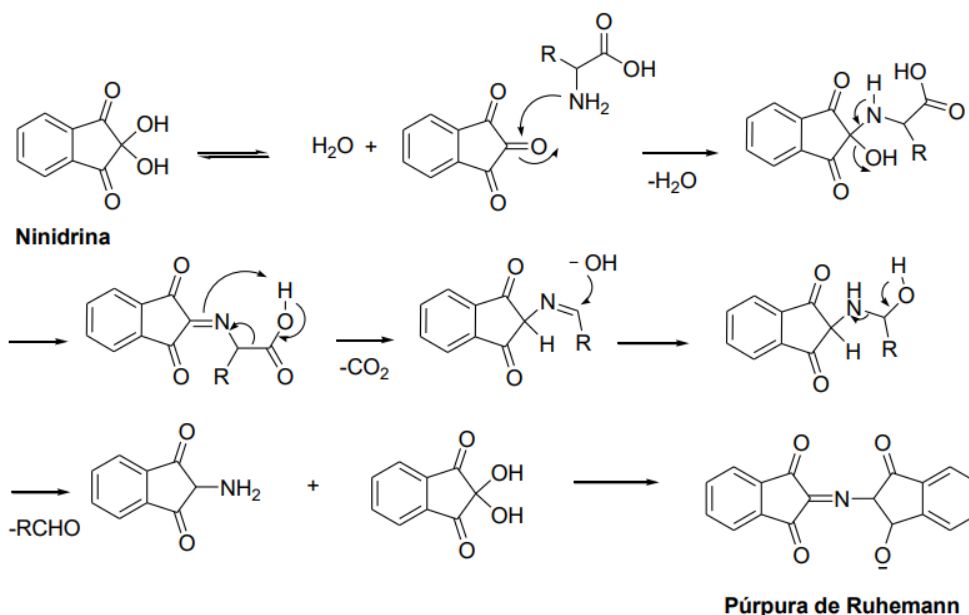
É possível perceber também que a galactose não foi totalmente consumida, pois os sinais em 5,10 ppm e 4,42 ppm são do hidrogênio ligado ao carbono anomérico do material de partida, mas ao aumentar o tempo de aquecimento, o produto pode se decompor, e, por isso, foi mantido a mistura de galactose e 1-amino-galactose **1** para acoplar com o aminoácido Fmoc leucina ou anidrido succínico.

Ao observar a integral dos sinais de H-1 da galactose e do H-1 da 1-amino-galactose **1** obtida na reação 1.5, há uma proporção maior de produto. Já nos tempos de irradiação de 15, 45, 60 e 90 minutos a proporção de produto obtido foi menor, com relação ao material de partida. Inclusive, na condição de 90 minutos de irradiação (reação 1.8), houve decomposição do material, com forte escurecimento da amostra e uma possível polimerização do açúcar, uma vez que os sinais não ficaram tão nítidos.

2.4.3 Teste de Kaiser

O teste de Kaiser (KAISER *et al.*, 1970), também conhecido como teste da ninidrina, consiste na reação do grupo amino livre com ninidrina, formando um produto com coloração púrpura ou azulada. Dessa forma, a presença dessa coloração indica que há a presença de grupo amino livre (JELLY *et al.*, 2010) e no caso da 1-amino-galactose **1**, que o produto esperado foi formado, esquema 16.

Esquema 16 – Mecanismo da reação entre ninidrina e grupo amino livre gerando o composto conhecido como púrpura de Ruhemann, que apresenta coloração púrpura ou azul.



Fonte: Jelly *et al.* (2010).

2.4.4 Síntese do derivado 1-amino-galactose peracetilado (**2**) a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila

Na primeira tentativa de síntese de **2**, a partir de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila, seguindo a mesma reação realizada por Parmenopoulou *et al.* (2014), foi possível obter o produto esperado.

A partir do espectro de RMN ^1H de **2** (ANEXO C), foi observado a manutenção da integral relativa de 7 hidrogênios e o deslocamento do hidrogênio anomérico de 4,61 ppm do precursor azido foi para próximo de 4,10 ppm, sobreposto aos sinais dos hidrogênios em C-6, isso ocorreu devido ao efeito de blindagem do grupo amino introduzido em C-1.

Além disso, ao analisar o espectro de infravermelho (ANEXO D) é possível visualizar a banda característica do material de partida em aproximadamente 2100cm^{-1} ausente no espectro de infravermelho do produto **2**, indicando que o grupo azido foi convertido em amina primária.

Dessa maneira, a partir da obtenção do produto **2**, foi possível dar continuidade à preparação dos produtos **3** e **4**, conforme descritos abaixo.

2.4.5 Síntese do derivado (3) a partir do acoplamento de Fmoc leucina com os precursores (1) ou (2)

O composto **3** possui uma função amida na posição anomérica ligado a leucina, como um aminoácido modelo e com cadeia lateral neutra para posterior preparação e condensação de outros aminoácidos contendo função de ácido carboxílico, como ácido glutâmico e aspártico. Estas últimas funções carboxílicas seriam empregadas para mimetizar a mesma função de ácido siálico.

Dessa maneira, algumas tentativas de síntese do derivado **3** a partir de **1** (esquema 6A) foram realizadas, com alterações nas condições reacionais e tipos de agentes de acoplamento, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Variações das condições reacionais da síntese de **3** a partir de **1**.

Reação/Amostra	Reagente de acoplamento	Tempo (horas)
3.1	DCC, HOBt	46
3.2	DCC, HOBt	98
3.3	PyBOP, HOBt	118

Fonte: Lopes (2022).

A primeira tentativa (reação **3.1**) de acoplamento entre o composto **1** e o aminoácido para formação de **3** foi feita na presença de Fmoc leucina (98,95mg; 0,28mmol; 1Eq), HOBt (37,83mg; 0,28mmol; 1Eq), DCC (57,77mg; 0,28mmol; 1Eq), 1-amino-galactose **1** (50mg; 0,28mmol; 1Eq) em 2mL de DMF. Como discutido anteriormente, apesar do produto **1** possuir proporção de D-galactose e, devido às dificuldades de purificação pela sua elevada solubilidade em água, para efeito de cálculos, foi considerado um rendimento de 100% de 1-amino-galactose **1** para os cálculos nas reações de acoplamento. A mistura reacional **3.1** foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 46 horas e foi acompanhada por CCD (AcOEt/MeOH 9:1). Em seguida, a amostra foi concentrada para remoção do DMF, solubilizada em DCM/MeOH e filtrada em bomba à vácuo, para a remoção do subproduto DCU.

Considerando que o indicativo de produto está na macha de menor fator de retenção (Rf) presente na CCD, devido ao caráter polar da molécula, a mistura foi purificada por uma coluna de Biotage de 10cm preenchida por sílica. O gradiente de

fase móvel utilizado foi (Hex/AeOEt 1:1; Hex/AcOEt 8:2; AcOEt 100%; AcOEt/MeOH 8:2). A purificação não foi eficiente para isolar a mancha de menor Rf, logo os tubos coletados foram reunidos, concentrados no rotaevaporador e foi realizado uma nova purificação em Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCD-PREP).

Na CCD-PREP a amostra foi solubilizada em DCM/MeOH e foi aplicado 30mg na placa. A fase móvel utilizada foi (AcOEt 100%), com saturação total da cuba. Foi verificado, pela lâmpada UV, a presença de duas manchas, uma próxima a origem (**3.1.A**) e a outra na extremidade superior (**3.1.B**), sendo as duas coletadas, solubilizadas em DCM/MeOH (8:2), filtradas em bomba à vácuo e concentradas para análise do RMN ^1H , (ANEXO E).

Analisando os espectros de RMN ^1H (ANEXO E), foi verificado apenas alguns sinais do grupo Fmoc Leucina, sendo os sinais de 7.38-7.88ppm dos grupos aromáticos de Fmoc e o sinal em 0.84ppm dos grupos metilas de leucina. No entanto, não foi possível visualizar os sinais da 1-amino-galactose **1** com clareza, incluindo o hidrogênio anomérico, mesmo diluindo os produtos em DMSO-d₆.

Em um segundo momento, outra CCD-PREP dessa mesma amostra foi realizada, mas com a fase móvel (AcOEt/MeOH 9:1), sendo obtido o mesmo perfil da anterior, com uma mancha próxima ao local de aplicação e outra na extremidade superior. As manchas foram coletadas, tratadas e enviadas para análise por RMN ^1H , no entanto, os espectros foram semelhantes aos anteriores. Sendo assim, outra tentativa para a reação de acoplamento foi realizada (**3.2**), em maior proporção e tempo reacional. A reação foi mantida sob agitação por 98 horas, sendo as primeiras 51 horas a temperatura ambiente e o restante em banho-maria a 40°C. Por volta de 72 horas após o início da reação, já no banho-maria, a reação apresentou aspecto escuro, diferentemente da primeira tentativa, que se manteve clara durante todo o tempo. A reação foi acompanhada por CCD (AcOEt/MeOH 9:1) e a mancha com menor Rf foi investigada como possível. Posteriormente, a amostra **3.2** foi concentrada no rotaevaporador, solubilizada em DCM/MeOH e foi realizado a filtração em bomba à vácuo, para a remoção do subproduto DCU.

Na tentativa de retirar impurezas da amostra **3.2**, foi realizado uma partição com DCM/H₂O, com o objetivo de que o produto ficasse na fase aquosa, devido ao seu caráter mais polar. Para acompanhar esse processo, foi feito CCD (FM:

AcOEt/MeOH 9:1) e foi observado que a mancha indicativa de produto ficou na fase aquosa, mas ao fazer uma CCD em (DCM/MeOH 8:2), verificou-se a presença de duas manchas. Com intuito de separar a mancha de menor Rf, foi realizado outra CCD-PREP, cuja fase móvel foi (DCM/MeOH 8:2). Após eluição da placa por duas vezes consecutivas, foi verificada a presença de várias manchas, sendo essas coletadas, lavadas com (DCM/MeOH 8:2), concentradas e enviadas para análise em RMN ^1H (ANEXO F).

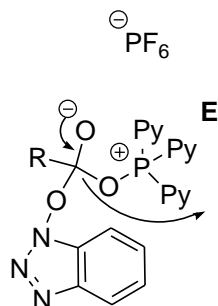
Ao analisar todos os espectros obtidos das frações separadas na CCD-PREP da amostra **3.2**, apenas o espectro da mancha com maior Rf (ANEXO F), apresentou sinais da Fmoc-leucina, mas não foi possível localizar os sinais da 1-amino-galactose **1**, logo, outra tentativa de síntese do produto foi realizada.

Nessa terceira tentativa, a reação **3.3** foi feita na presença de PyBOP ao invés do DCC, como reagente de acoplamento e, a reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 118 horas, sendo acompanhada por CCD, cuja fase móvel foi (AcOEt/MeOH 9:1). O perfil cromatográfico observado mostrou as manchas mais separadas, mas a mancha indicativa do produto foi a de menor Rf, sendo assim, a placa foi repetida outras vezes, com eluição da fase móvel (AcOEt/MeOH 8:2).

Posteriormente, foi realizado a purificação por cromatografia usando o aparelho Biotage, com a fase móvel (AcOEt/MeOH 8:2) para tentar isolar e caracterizar a mancha de menor Rf visualizada na CCD. Foram coletados 100 tubos e as frações de 85-100, que apresentaram menor Rf, e as frações 28-84, foram reunidas, concentradas e enviadas para análise por RMN ^1H (ANEXO G).

Ao analisar o espectro de RMN ^1H (ANEXO G) das frações 28-84 coletadas após purificação por Biotage da reação **3.3**, foi observado os sinais dos grupos aromáticos de Fmoc entre 7,34 ppm-8,10 ppm e das metilas de leucina em 0,90 ppm. Além disso, foi verificado a presença dos sinais do grupo pirrolidina de PyBOP em 3,12 ppm e em 1,66 ppm, com integral de aproximadamente 10 hidrogênios e apenas sinais fracos de 1-amino-galactose **1** entre aproximadamente 3,50-5,00 ppm. Dessa forma, suspeita-se que pode ter ocorrido a formação do intermediário (figura 14) da reação de acoplamento entre Fmoc leucina e PyBOP.

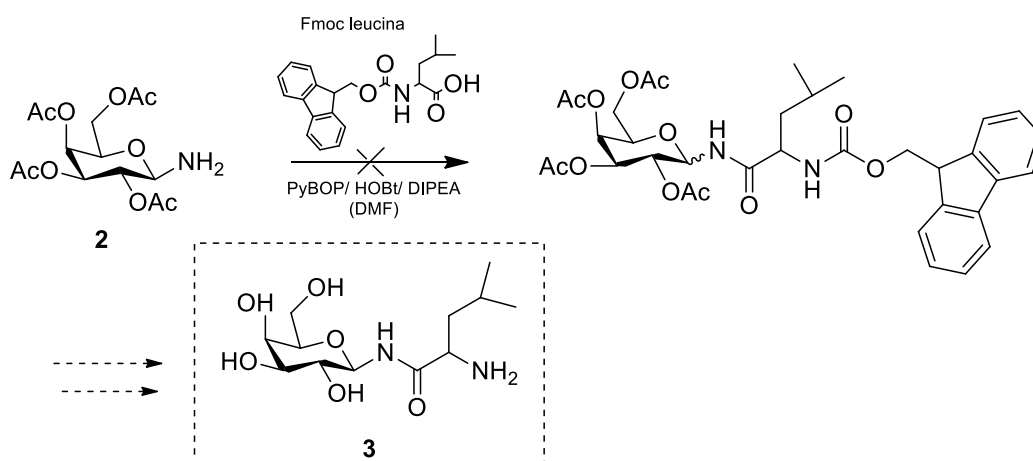
Figura 14- Intermediário reação de acoplamento envolvendo os reagentes PyBOP, HOBT e DIPEA



Fonte: Lima (2013).

Considerando as dificuldades anteriores empregando 1-amino-galactose (**1**), com as hidroxilas livres e os resultados insatisfatórios, a mesma reação foi realizada usando 1-amino-galactose peracetilada **2** (esquema 17).

Esquema 17 – Estratégia de síntese de **3** a partir de 1-amino-galactose peracetilada **2**, na presença de PyBOP, HOBT e DIPEA.



Fonte: Lopes (2022).

A utilização de PyBOP como agente de acoplamento forneceu uma mistura reacional que foi purificada em coluna cromatográfica (CCC) com a fase móvel (AcOEt/Tolueno 7:3), concentrada e enviada para análise por RMN ^1H (ANEXO H).

Ao analisar o espectro de RMN ^1H de **3** (ANEXO H), obtido a partir do acoplamento de Fmoc leucina com **2**, foi observado os sinais dos grupos aromáticos de Fmoc em 7,30-7,89 ppm e das metilas de leucina em 1,18 ppm, assim como dos grupos acetilas do açúcar em 1,95 ppm com integral de 12 hidrogênios. Além disso, entre 3,96-4,33 ppm é possível verificar sinais fracos dos hidrogênios do açúcar. Ademais, os outros sinais apresentados no espectro não foram possíveis de serem elucidados, uma vez que mesmo após a purificação por CCC, a amostra apresenta

impurezas de difícil elucidação, observadas também em CCD, com o aparecimento de mais de uma mancha na placa.

Finalmente, a purificação por cromatografia preparativa (CCD-PREP) permitiu isolar dois componentes da mistura, os quais foram concentrados e analisados por RMN ^1H . Até o momento, os dois produtos isolados não corresponderam à estrutura do produto **3** protegido. Novas tentativas deverão ser realizadas.

2.4.6 Síntese do derivado (4) a partir do acoplamento de anidrido succínico com (1) ou (2)

Considerando as dificuldades anteriores empregando 1-amino-galactose **1** e Fmoc leucina, outra estratégia substituindo o aminoácido por anidrido succínico, foi investigada, devido ao caráter mais reativo deste reagente, o qual não requer o emprego de agente de acoplamento. Neste caso, o grupo amino também poderia originar a função amida na posição anomérica e um grupo carboxílico terminal, separado por uma ponte etilênica, capaz de mimetizar a função carboxílica do substrato ácido siálico.

Dessa maneira foi realizado, primeiramente, uma tentativa para obtenção de **4** a partir de 1-amino-galactose **1** e excesso de anidrido succínico, esquema 6B. Após a etapa de liberação das hidroxilas com o uso da solução de NaOMe em MeOH, seguido do emprego de resina de troca iônica ácida, a mistura obtida foi enviada para análise em RMN ^1H . Ao analisar o espectro, o mesmo foi inconclusivo, com sinais de difícil elucidação, devido a formação de mistura complexa.

Resultados mais satisfatórios foram obtidos pelo acoplamento de 1-amino-galactose peracetilada **2** com anidrido succínico em DMF, no qual o produto desejado na forma protegida (O-acetil) foi isolado com rendimento de 68%, após purificação em coluna cromatográfica.

A análise do espectro de RMN ^1H de **4** protegido (ANEXO I) revelou a presença dos sinais dos grupos acetilas em 2,02-2,18 ppm, com integral de 12 hidrogênios, além dos sinais dos hidrogênios metilênicos (CH_2) do anidrido succínico em 2,50-2,78 ppm, com integral de 4 hidrogênios. Adicionalmente, foi verificado o sinal mais desblindado em 6,57 ppm, relacionado ao hidrogênio ligado ao nitrogênio, conforme mostrado no espectro bidimensional HSQC. Ademais, o duplete em 5,46 ppm foi atribuído a H-4, enquanto que H-2 foi identificado em 5,27 ppm como um tripleto, e H-

1 e H-3 como multiplete em 5,18-5,10ppm. Por fim, o multiplete em 4,16-4,04ppm foi atribuído a H-5 e H-6, com integral de 3 hidrogênios.

A reação final de remoção dos grupos O-protetores acetila foi realizada na presença de NaOMe e tratamento com resina. O produto foi obtido em 52% de rendimento. Comparativamente ao espectro do produto final (ANEXO I), foi observado o desaparecimento dos sinais dos grupos acetila, assim como a presença de duplete (d) em 4,78 ppm relativo ao sinal do hidrogênio anomérico. Além disso, o duplete em 3,85 ppm foi atribuído ao H-4, os demais sinais entre 3,67-3,49ppm como um multiplete, com integral de 5 hidrogênios em região de maior blindagem quando comparado ao precursor protegido. Isso ocorre devido à ausência dos grupos acetila eletronegativos, que atraem a nuvem eletrônica e desblindam os hidrogênios do açúcar.

Com relação ao espectro bidimensional HSQC de **4** desprotegido (ANEXO J), foi verificado que H-1 em 4,78 ppm tem correlação com C-1 em 80,11 ppm, enquanto H-4 tem correlação com C-4 em 69,77 ppm. Os hidrogênios H-2, H-3, H-5 do açúcar ficaram sobrepostos, mas os hidrogênios metilênicos H-6 foram atribuídos ao sinal de carbono em 61,27 ppm (visível no espectro de RMN ¹³C DEPT). E, por fim, os sinais dos hidrogênios da cadeia etilênica em 2,44-2,36 ppm tem correlação com carbono em 32,82-32,60 ppm.

A pureza do produto **4** desprotegido obtido foi confirmada conforme o cromatograma CLAE (ANEXO L), com tempo de retenção de 3,30 minutos e, espectro de RMN¹H (ANEXO M).

2.4.7 Ensaio biológico de inibição da atividade hidrolase da *trans*-sialidase

O ensaio de inibição da atividade hidrolase de TcTS foi realizado a partir do método fluorimétrico contínuo (NERES *et al.*, 2006), sendo que todos os resultados de fluorescência foram lidos no fluorímetro Spectra Max M2, Molecular Device usando o software Max Pro. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,0 (25 µL), solução da enzima *trans*-sialidase recombinante (25 µL) e solução do possível inibidor **4**, obtido a partir de **2**.

Essa mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 25°C e a reação teve início com adição do substrato ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-acetilneurâmico (25 µL

de uma solução 0,4 mM). A fluorescência liberada pelo composto foi monitorada a 25°C durante 10 minutos, nos comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão), e seus dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6.2 (San Diego, CA, USA).

O experimento foi realizado em triplicada, sendo gerado um gráfico que relaciona U.F e tempo de reação (gráfico 1), em que foi possível calcular a velocidade de reação (ângulo de inclinação de cada uma das retas) por regressão linear. O valor da porcentagem de inibição (tabela 3) foi calculado pelo emprego da equação: $\% = 100 \times [1 - (V_i / V_o)]$ onde V_i = velocidade da reação na presença do composto testado e V_o = velocidade da reação na ausência do possível inibidor (controle negativo).

Gráfico 1 – Resultado ensaio de inibição da atividade de TcTS

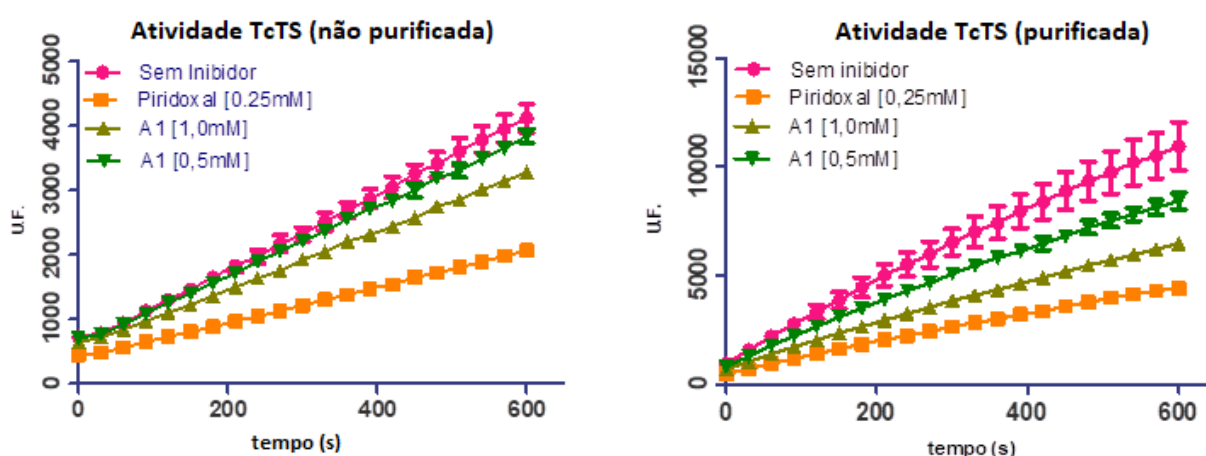


Tabela 3 - Valores de inibição da enzima TcTS pelo produto 4, resultados obtidos a partir da fórmula

$$\% = 100 \times [1 - (V_i / V_o)].$$

Composto teste [concentração]	% inibição enzima não purificada	% inibição enzima purificada
Piridoxal [0,25mM]	51	60
Produto 4 [1,0mM]	21	42
Produto 4 [0,5mM]	8	24

Fonte: Lopes (2022).

Logo, dentre as concentrações testadas, o produto 4 apresentou melhor atividade inibitória (42%) na concentração de 1,0mM, resultado importante que pode ser explorado realizando alterações na estrutura do composto.

3. CONCLUSÕES

A síntese dos derivados amidas de 1-amino-galactose ligada a unidade de leucina **3** e ácido succínico **4**, a partir de 1-amino-galactose livre **1** ou protegida **2**, foi testada em diversas condições reacionais. No entanto, várias dificuldades foram encontradas utilizando-se o precursor desprotegido **1**, tanto no acoplamento com Fmoc leucina, quanto na condensação com anidrido succínico, de modo que não foi possível obter os produtos propostos. A elevada solubilidade em água dificultou o isolamento de possíveis produtos e, além disso, foi observada certa instabilidade do material de partida durante à conversão aos produtos.

Por outro lado, o emprego de 1-amino-galactose protegida com grupos acetila apresentaram melhores resultados para obtenção do produto **4** protegido em bom rendimento, o qual foi facilmente desprotegido para obtenção do produto final. Com relação ao produto **3**, contendo unidade de leucina como modelo, os resultados não foram satisfatórios empregando PyBOP como agente de condensação. Devido ao prazo de cumprimento deste trabalho, esta reação ainda não foi repetida para maiores conclusões.

Sendo assim, o ensaio enzimático envolvendo a enzima *trans*-sialidase foi realizado com o produto **4**, após purificação em cromatografia CLAE, e apresentou melhor atividade inibitória (42%) na concentração de 1,0mM, resultado relevante que pode ser utilizado em outras modificações na estrutura do composto.

REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, R.; CANO, M.E.; CAGNONI, A.J.; KOVENSKY, J.; LEDERKREMER, R.M.; UHRIG, M.L. **Multivalent sialylation of β -thio-glycoclusters by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and analysis by high performance anion exchange chromatography.** Glycoconjugate Journal. 2016 (33): 809–818.

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

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

ANDRADE, S.G. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Bahiano.** Revista de Patologia Tropical, 3: 65121, 1974

Angata, T.; Varki, A.; **Chem. Rev.** 2002, 102, 439

BARKER, Robert; CHIANG, Chao-Kuo; TRAYER, Ian P.; HILL, Robert L.. **Monosaccharides attached to agarose.** In: **METHODS in Enzymology.** 34. ed. Academic Press, 1974. Cap. 29. p. 317-328.

Bejugam, M.; Flitsch, S.L. **An efficient synthetic route to glycoamino acid building blocks for glycopeptide synthesis.** Org. Lett. 2004, 6, 4001–4004

BENZNIDAZOL gera molécula mais eficaz contra Doença de Chagas. 2014. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/benznidazol-gera-molecula-mais-eficaz-contradoenca-de-chagas/#:~:text=Apesar%20de%20haver%20dois%20medicamentos,toxicidade%20do%20primeiro%20o%20inviabilizou.> Acesso em: 10 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde:** volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019.

Brun, M.A.; Disney, M.D.; Seeberger, P.H. **Miniaturization of microwave-assisted carbohydrate functionalization to create oligosaccharide microarrays.** ChemBioChem 2006, 7, 421–424.

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

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

BUSCHIAZZO, A; MUIÁ, R; LARRIEUX, N; PITCOVSKY, T; MUCCI, J; CAMPETELLA, O. **Trypanosoma cruzi trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors.** PLoS Pathog. 2012 Jan;8(1):e1002474. doi: 10.1371/journal.ppat.1002474. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22241998; PMCID: PMC3252381.

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

CAMARGO, Ricardo. **Interação Trypanosoma cruzi-hospedeiro: influência da infecção na via de apresentação de antígenos MHC de classe I.** 2014. 68 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

CAMPO V,L; MARTINS-TEIXEIRA M,B; CARVALHO, I. **Trypanosoma cruzi Invasion into Host Cells: A Complex Molecular Targets Interplay.** Mini Rev Med Chem. 2016;16(13):1084-97. doi: 10.2174/1389557516666160607230238. PMID: 27281167

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

CAMPO, Vanessa Leiria; SILVA, Carlos Henrique Tomich de Paula da; TAFT, Carlton Anthony; CARVALHO, Ivone. **Trypanosoma cruzi transsialidase: Mechanisms and synthetic application for drug design.** In: MODERN Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Kerala: Research Signpost, 2006. Cap. 3, p. 23.

Cardozo, Herbert M. *et al.* **Molecular Sieves Mediated Green Per-O-Acetylation of Carbohydrate Templates and Lipase Catalyzed Regioselective Alcoholysis of 2,3,5-Tri-O-Acetyl-D-Ribonolactone.** Journal of the Brazilian Chemical Society [online]. 2015, v. 26, n. 4 [Accessed 21 September 2022] , pp. 755-764. Available from: <<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150037>>. ISSN 1678-4790. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150037>.

CASTRO, Solange L de; SOEIRO, Maria de Nazaré C.. **Drogas tripanossomicidas: estudos pré-clínicos da doença de chagas. Estudos pré-clínicos da doença de Chagas.** 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

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

CLAYDEN, W.C.; WHITE, P.D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**, Oxford University Press, 2012.

CUERVO, H.; GUERRERO, N. A.; CARBAJOSA, S.; BESCHIN, A.; BAETSELIER, P.; GIRONÈS, N.; FRESNO, M. **Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection.** The Journal of Immunology, v. 187, p. 26562665, 2011.

CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ BARRETO, L. C. L.; LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; SALOMON, C. J. **Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas.** Brasília Med 2012;49(4):279-283

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

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction.** International Journal of Cell Biology, 2010.

DEGRAVE, Wim. **O genoma do *Trypanosoma cruzi*.** 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/biologia-molecular/>. Acesso em: 10 maio 2022.

DIAS, E. **Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 27:1-110, 1934.

DNDI, Drugs For Neglected Diseases Initiative. **O que é a doença de Chagas?** Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/#:~:text=O%20Chagas%20%C3%A9%20uma%20doen%C3%A7a,inseto%20vetor%20conhecido%20como%20barbeiro>. Acesso em: 25 abr. 2022

DO CAMPO, R. **Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease**. Current Pharmaceutical Design, v.7, p.1157-1164, 2002.

Fátima, Ângelo de *et al.* **Ácidos siálicos: da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe**. Química Nova [online]. 2005, v. 28, n. 2 [Acessado 24 Julho 2022] , pp. 306-316. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200023>>. Epub 04 Maio 2005. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200023>.

FERNANDES, M. C. et al. **Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion**. The Journal of Experimental Medicine, v. 208, n. 5, p. 909–21, 2011.

FIGUEREDO, A. S. **Síntese e avaliação biológica de glycoclusters com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas**. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

FIOCRUZ. **História da Doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/historia/>. Acesso em: 20 abr. 2022.

Fiona L. Lin, Helen M. Hoyt, Herman van Halbeek, Robert G. Bergman, and Carolyn R. Bertozzi Journal of the American Chemical Society 2005 127 (8), 2686-2695 DOI: 10.1021/ja044461m

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. **Protozoan encounter with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitismo**. Nature Ver. Immunol., 6: 895-906, 2006.

GIORGI, M, E; RATIER, L; AGUSTI, R; FRASCH, A, C; DE LEDERKREMER, R, M. **Synthesis of PEGylated lactose analogs for inhibition studies on T.cruzi trans-**

sialidase. Glycoconj J. 2010 Jul;27(5):549-59. doi: 10.1007/s10719-010-9300-7. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20645127.

HAM, S.; KIM, Y. **Recent development of peptide coupling reagentes in organic synthesis.** Tetrahedron, v. 60, p.2447-2467, 2004.

JELLY, R.; LEWISA, S. W.; LENNARDB, C.; LIM, K. F.; ALMOG, J. **Substituted naphthoquinones as novel amino acid sensitive reagents for the detection of latente fingerprints on paper surfaces.** Talanta, v. 82, p. 1717–1724, 2010.

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. **Doença de chagas: manual para experimentação animal** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 8585676-75-2. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>

JUNQUEIRA, G.G. **Síntese e avaliação de derivados galactosil-triazolo-benzenossulfonamidas como potenciais inibidores de *trans*-sialidades de *Trypanossoma cruzi*.** 2013. 145f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. **Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides.** Anal. Bioch, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KASSAB, Rima; FELIX, Caroline; PARROT-LOPPEZ, Hélen; BONALY, Roger. **Synthesis of cyclodextrin derivatives carrying bio-recognisable saccharide antennae.** Tetrahedron Letters. França, p. 7555-7558. 16 jul. 1997.

KOFOID, C.A, WOOD, F.D., MCNEIL, E. **The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle cell.** Unit Californian Publications in Zoology 41: 23-24, 1935

LEGUIZAMON, M. S. *et al.* ***Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo.** J. Infect. Dis., v. 180, n. 4, p. 1398-1402, 1999.

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

LIKHOSHERSTOV, L. M.; NOVIKOVA, O. S.; DEREVITSKAJA V. A.; KOCHETKOV, N. K. **A new simple synthesis of amino sugar β -D-glycosylamines**. Carbohydrate Research, v. 146, p. C1-C5, 1986.

Likhoshertov, L.M.; Novikova, O.S.; Shibaev, V.N. **New Efficient Synthesis of β -Glucosylamines of Monoand Disaccharides with the Use of Ammonium Carbamate**. Dokl. Chem. 2002, 4, 500–503.

Likhoshertov, L.M.; Novikova, O.S.; Shibaev, V.N. **New Synthesis of β -Glycosylamines of D-Mannose, 2- and 6-Deoxysugars, and D-Glucuronic Acid with the Use of Ammonium Carbamate**. Dokl. Chem. 2003, 4, 482–485.

Likhoshertov, L.M.; Novikova, O.S.; Zheltova, A.O.; Shibaev, V.N. **An improved procedure for the synthesis of N-bromoacetyl- β -glycopyranosylamines, derivatives of mono- and disaccharides**. Russ. Chem. Bull. 2004, 3, 709–713

LIMA, M. L. **Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído**. 2013. 136f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MAYA, J.D., *et al.* **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host**. Comp. Biochem. Physiol., 146: 601-620, 2007.

MELO, R.C. & BRENER, Z. **Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains**. Journal of Parasitology, 64: 475-482, 1978

MERRIFIELD, R. B. **Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide**. Journal of the American Chemical Society, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963. ISSN 0002-7863.

MEYER, H., XAVIER DE OLIVEIRA, M. **Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: A four year study**. Parasitology 39: 9194, 1948.

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

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

MUCCI, J. *et al.* **Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by *trans*-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, n. 6, p. 3896–3901, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6ª. Ed, 2014,

Neres J, Brewer ML, Ratier L, Botti H, Buschiazzo A, Edwards PN, Mortenson PN, Charlton MH, Alzari PM, Frasch AC, Bryce RA, Douglas KT. **Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase from in silico screening**. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Feb 1;19(3):589-96. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.12.065. Epub 2008 Dec 24. PMID: 19144516

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

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

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

NISHIMURA, S. **Handbook of heterogeneous catalytic hydrogenation for organic synthesis**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

NORRIS, K. A.; GALVÃO, L. M.; SCHRIMPF, J. E.; CANÇADO, J. R.; KRETTLI, A. U. **Humoral immune response to the *T. cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chaga's disease**. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 4072-4074, 1994

OLIVEIRA, A. C. S. **Caracterização biológica de tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de células deficientes em LAMP**. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 71. 2017.

PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** – Rio de Janeiro, 2009.

Parmenopoulou V, Kantsadi AL, Tsirkone VG, Chatzileontiadou DS, Manta S, Zographos SE, Molfeta C, Archontis G, Agius L, Hayes JM, Leonidas DD, Komiotis D. **Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase B. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl- β -d-glucopyranosylamines.** *Bioorg Med Chem.* 2014 Sep 1;22(17):4810-25. doi: 10.1016/j.bmc.2014.06.058. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25092521.

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

SANTILIANO, F., & ALMEIDA, B. (2012). **RESPOSTA IMUNE E MECANISMOS DE EVASÃO DESENVOLVIDOS PELO PROTOZOÁRIO PARASITA *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA DE CHAGAS.** *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, 8(14). Recuperado de <https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3983>

SATHLER-AVELAR, R.; *et al.* **Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 104(Suppl. I): 246-251, 2009

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

SILVA, V. L. **Aproveitamento sustentável do bagaço de cana de açúcar para obtenção do acetato de celulose.** UFRN, 2014.

Tang, J.S.J.; Schade, K.; Tepper, L.; Chea, S.; Ziegler, G.; Rosencrantz, R.R. **Optimization of the Microwave Assisted Glycosylamines Synthesis Based on a Statistical Design of Experiments Approach.** *Molecules* 2020, 25, 5121. <https://doi.org/10.3390/molecules25215121>

TARLETON, R.L. **Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*.** *Curr Opin Immunol.*, 19(4): 430-4, 2007.

TURCINSKI, Bruno; FELIX, Eduarda Garcia; ITO, Kimimaru José Alves. **AS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO PARA A CHAGAS: REVISÃO DA LITERATURA DOENÇA DE**. 2021. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biologia, Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, 2021.

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

VITELLI-AVELAR, D.M.; et al. **Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25High T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?** Clin. Exp. Immunol., 145: 81-92, 2006.

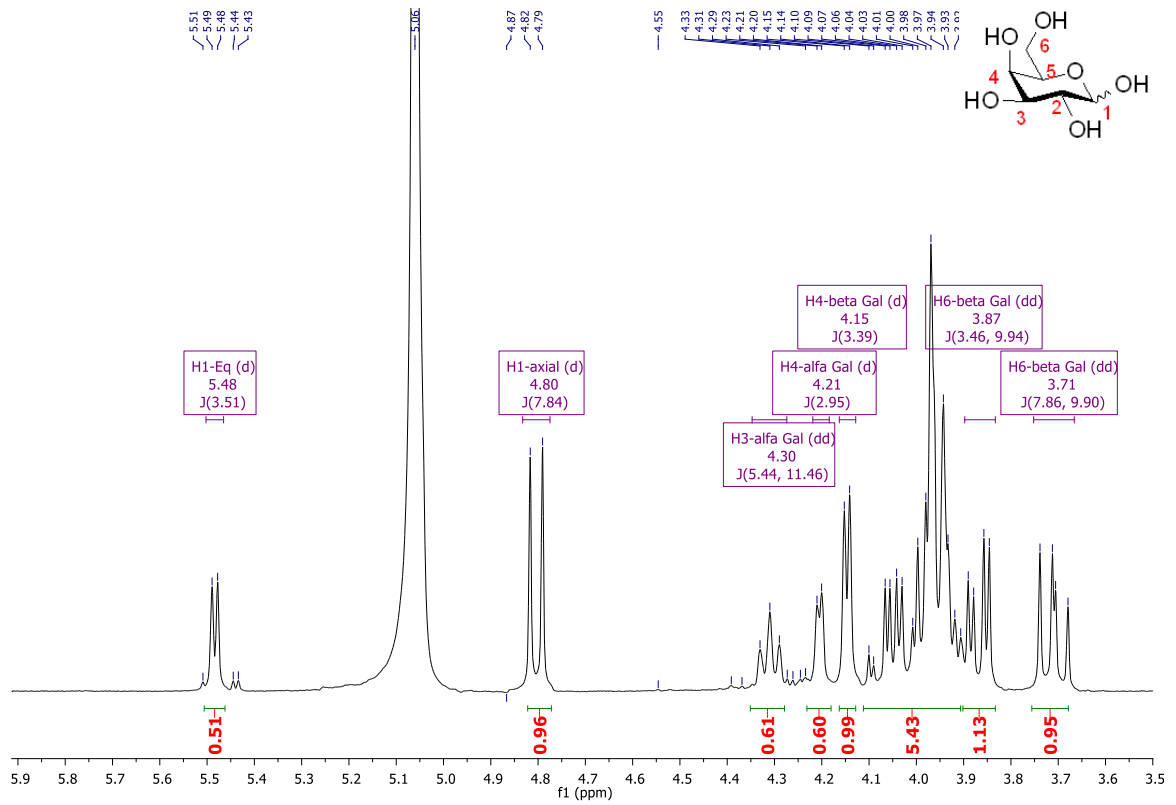
WALKER, D. M. et al. **Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites.** Cellular and Molecular Life Sciences, 2013.

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

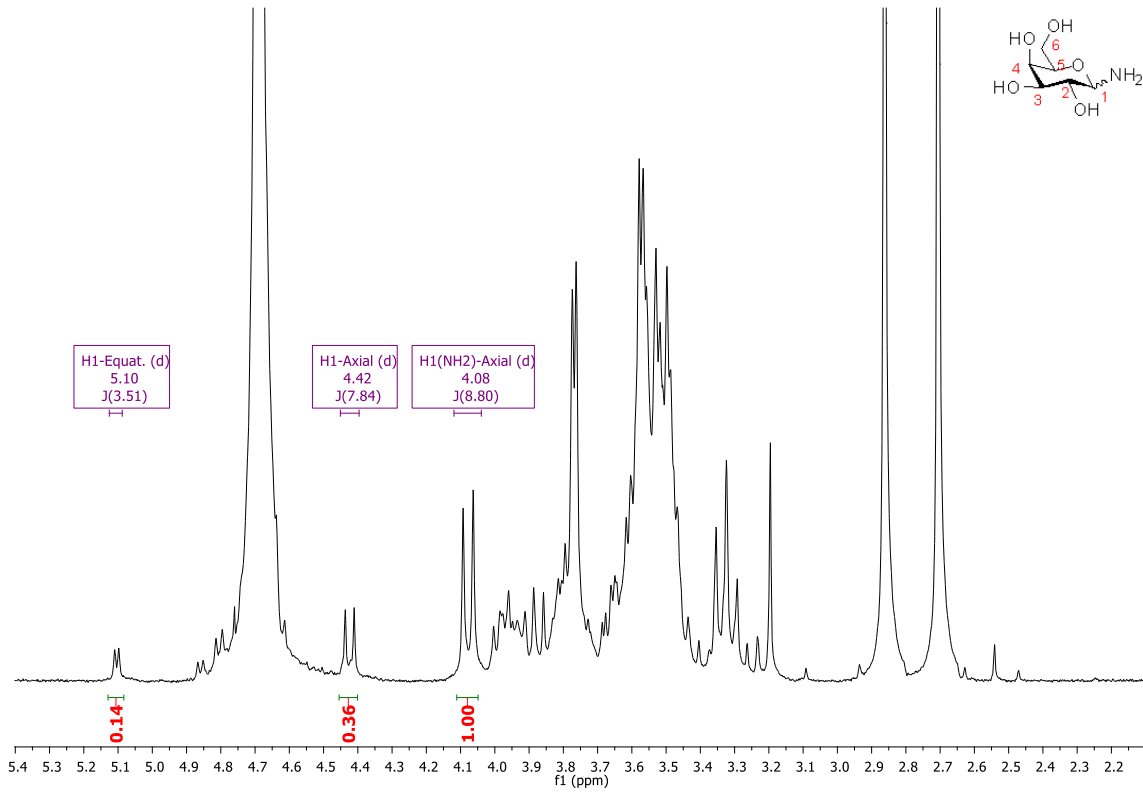
Wei Quan Tian and Yan Alexander Wang. The Journal of Organic Chemistry 2004 69 (13), 4299-4308 DOI: 10.1021/jo049702n

ANEXOS

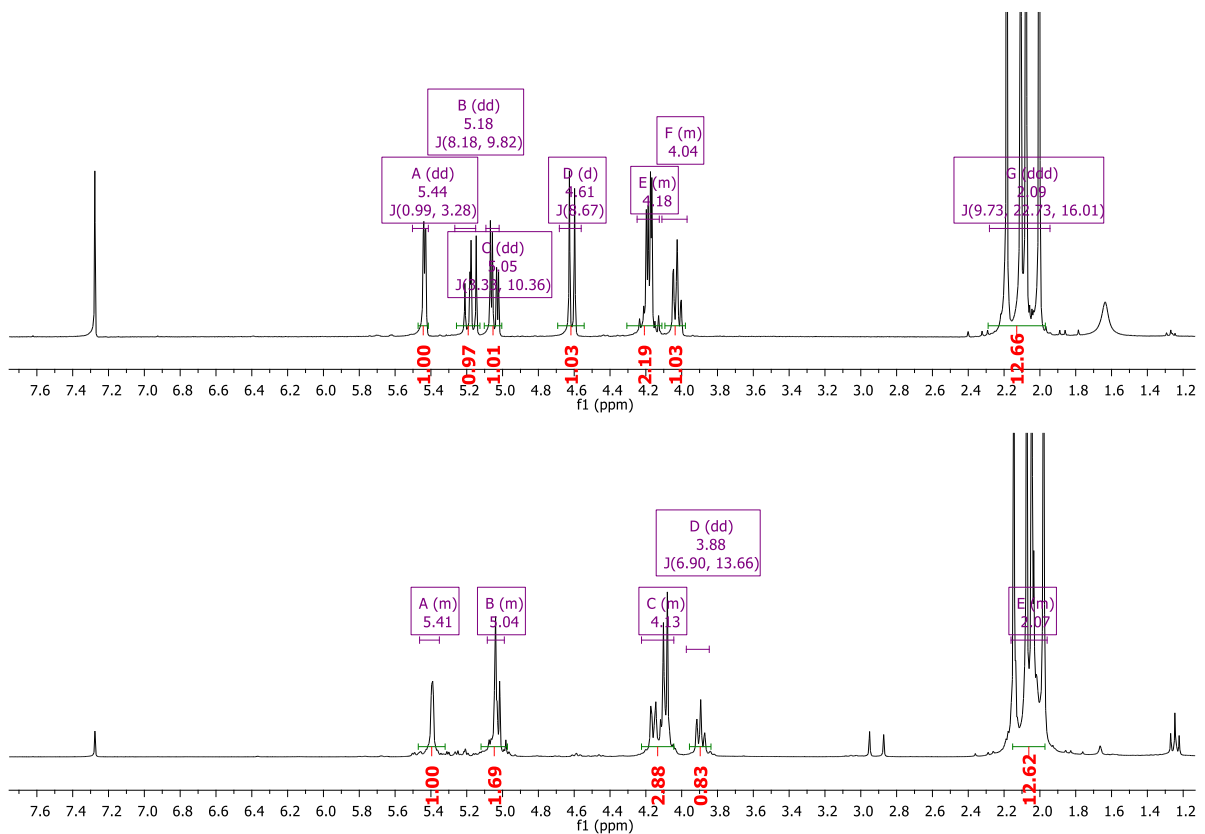
ANEXO A- Espectro de RMN ^1H (300 MHz; D_2O) de galactose.



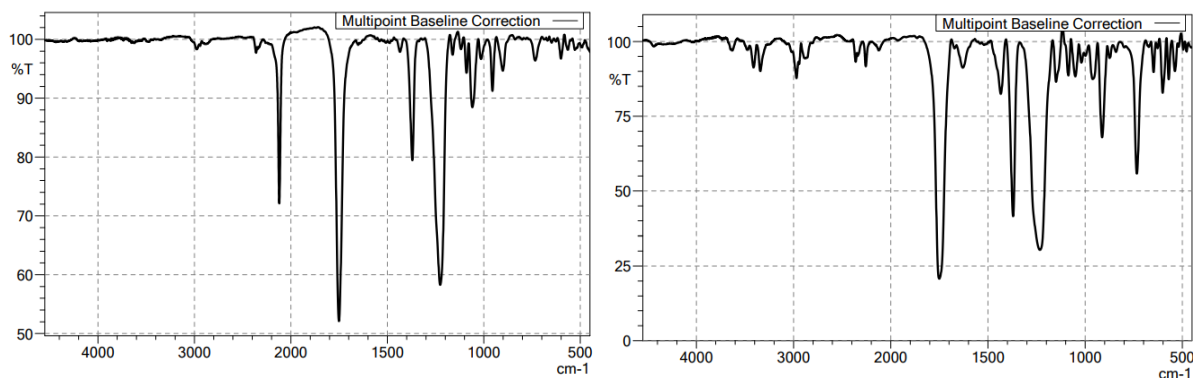
ANEXO B- Espectro de RMN ^1H (300 MHz; D_2O) da reação 1.5 para síntese do produto 1 a partir da galactose; MW 30min.



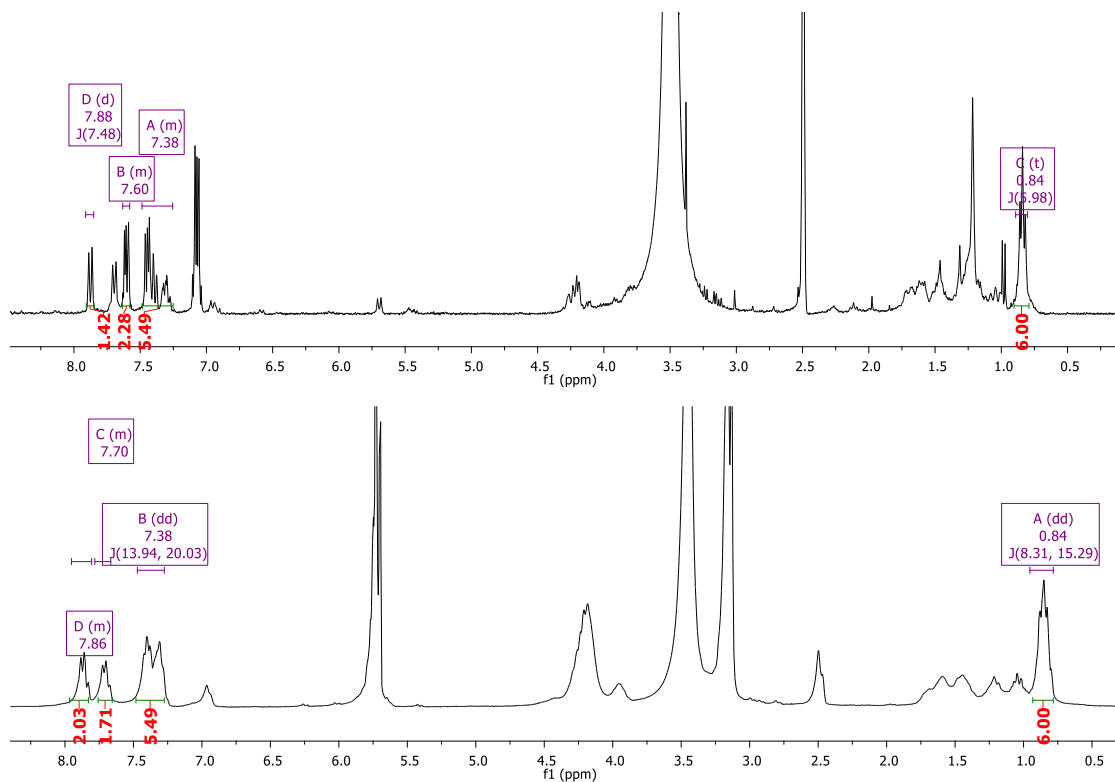
ANEXO C- Espectro de RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) de azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila (superior) e produto **2** (inferior).



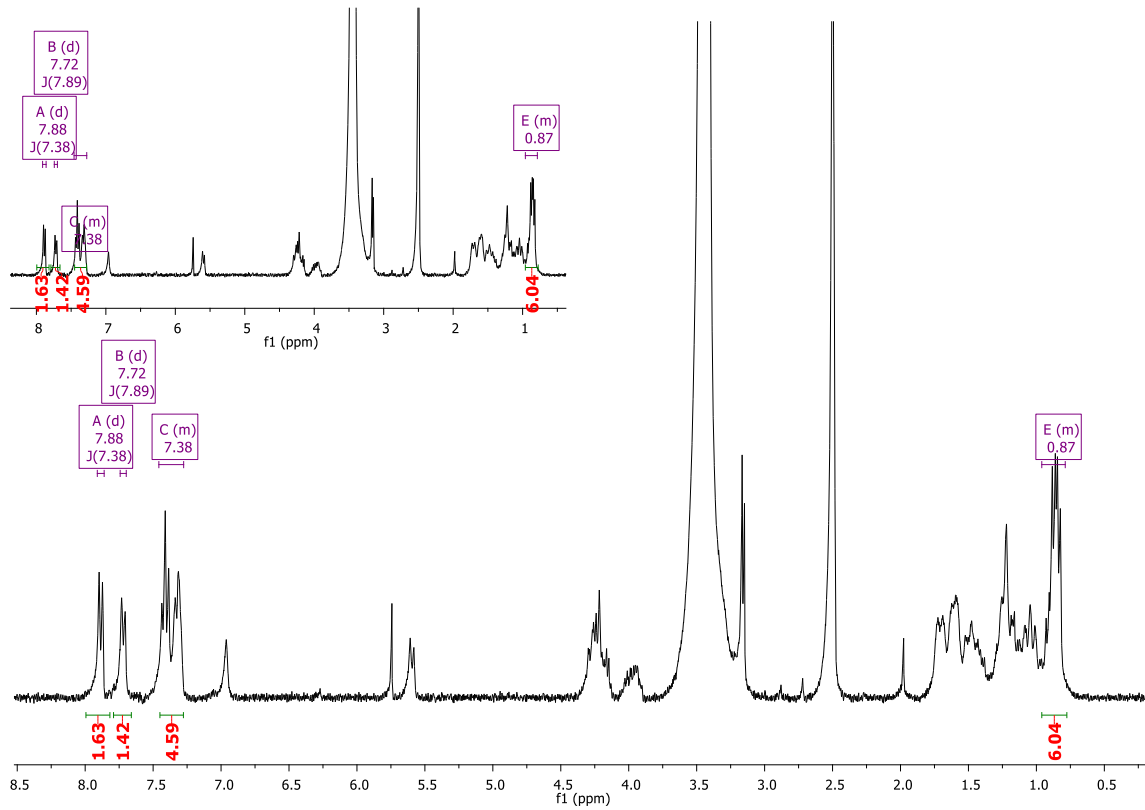
ANEXO D– Espectro de infravermelho do azido 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosila à esquerda e do produto **2**, à direita.



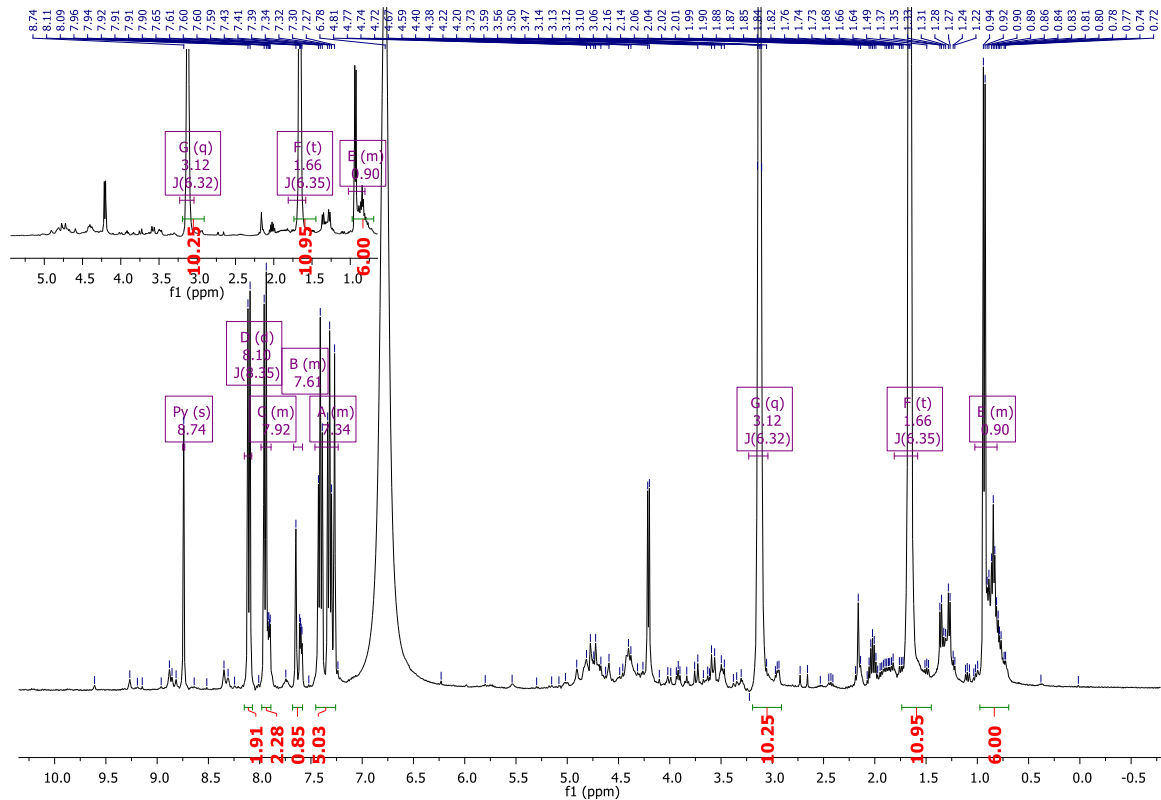
ANEXO E - Espectro de RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6) da mancha inferior e superior coletadas na CCD-PREP na reação **3.1** para síntese de **3**



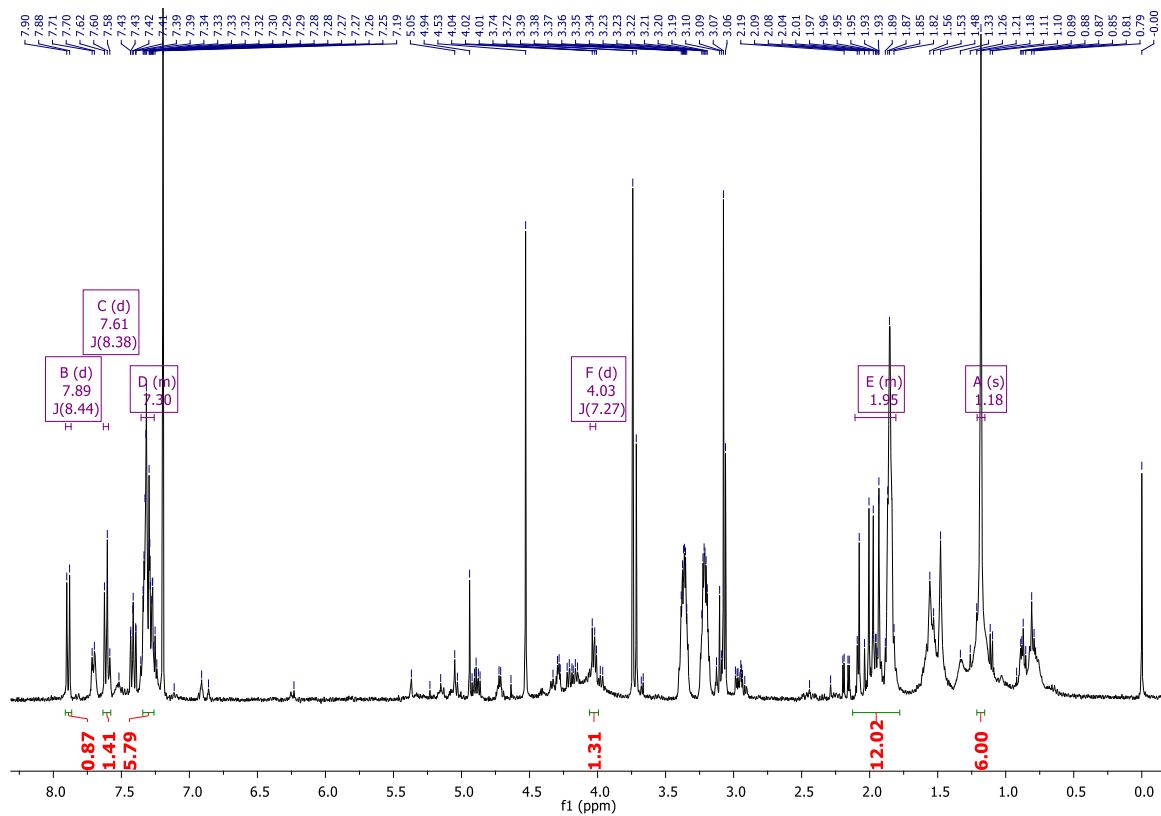
ANEXO F - Espectro de RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6) da mancha com maior R_f, coletada na CCD-PREP na reação **3.2** para síntese de **3**.



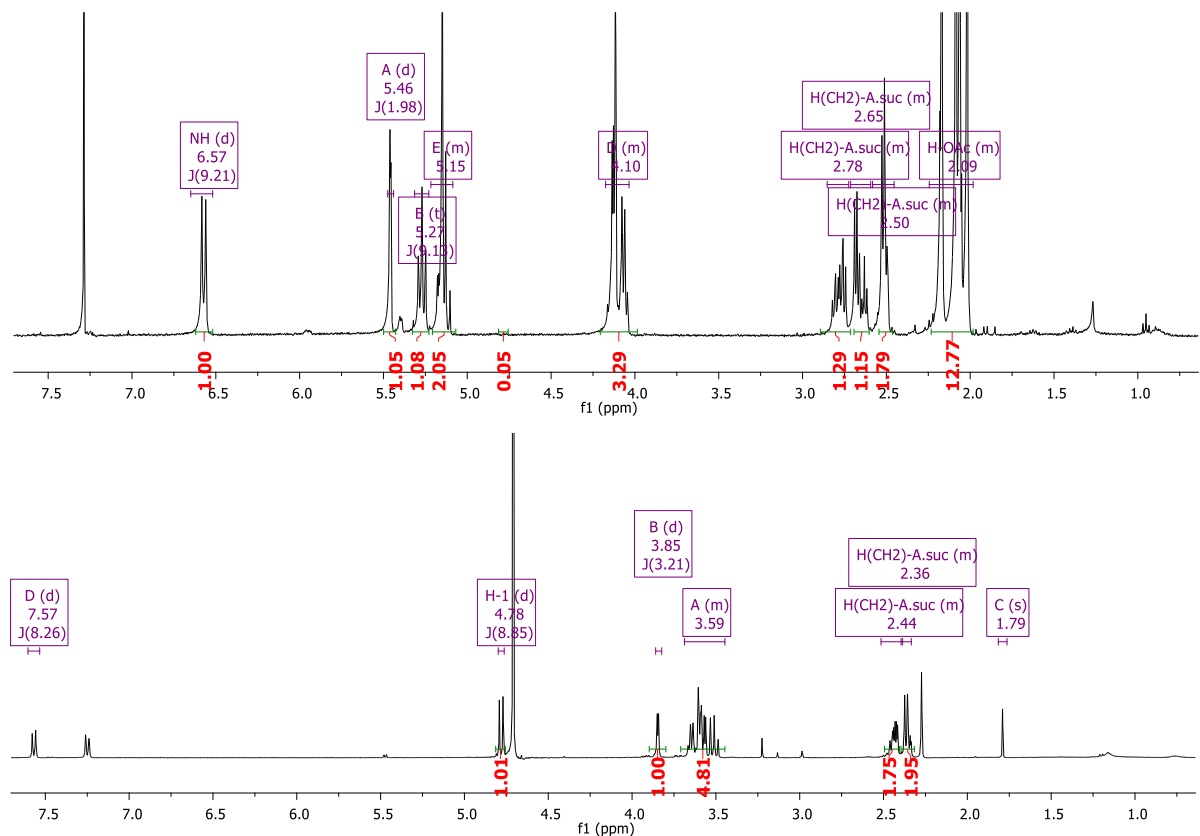
ANEXO G -Espectro de RMN ^1H (300 MHz; Py) das frações 28-84 coletadas pela purificação por Biotage da amostra **3.3**, para obtenção do produto **3**

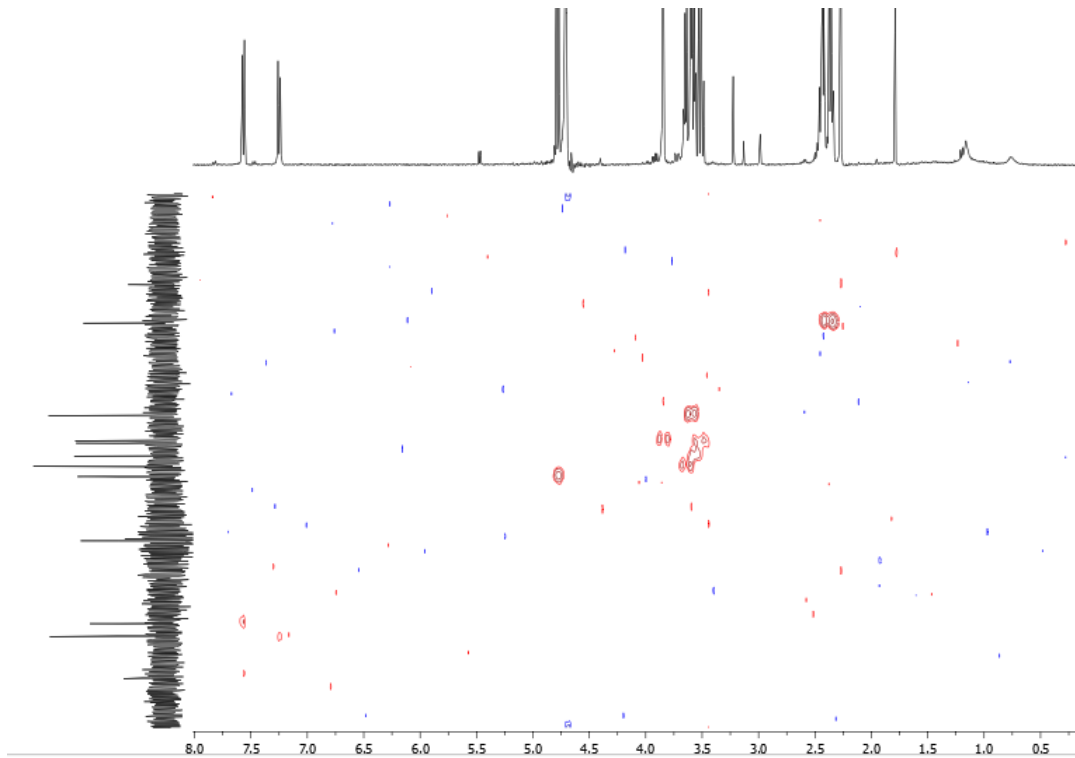
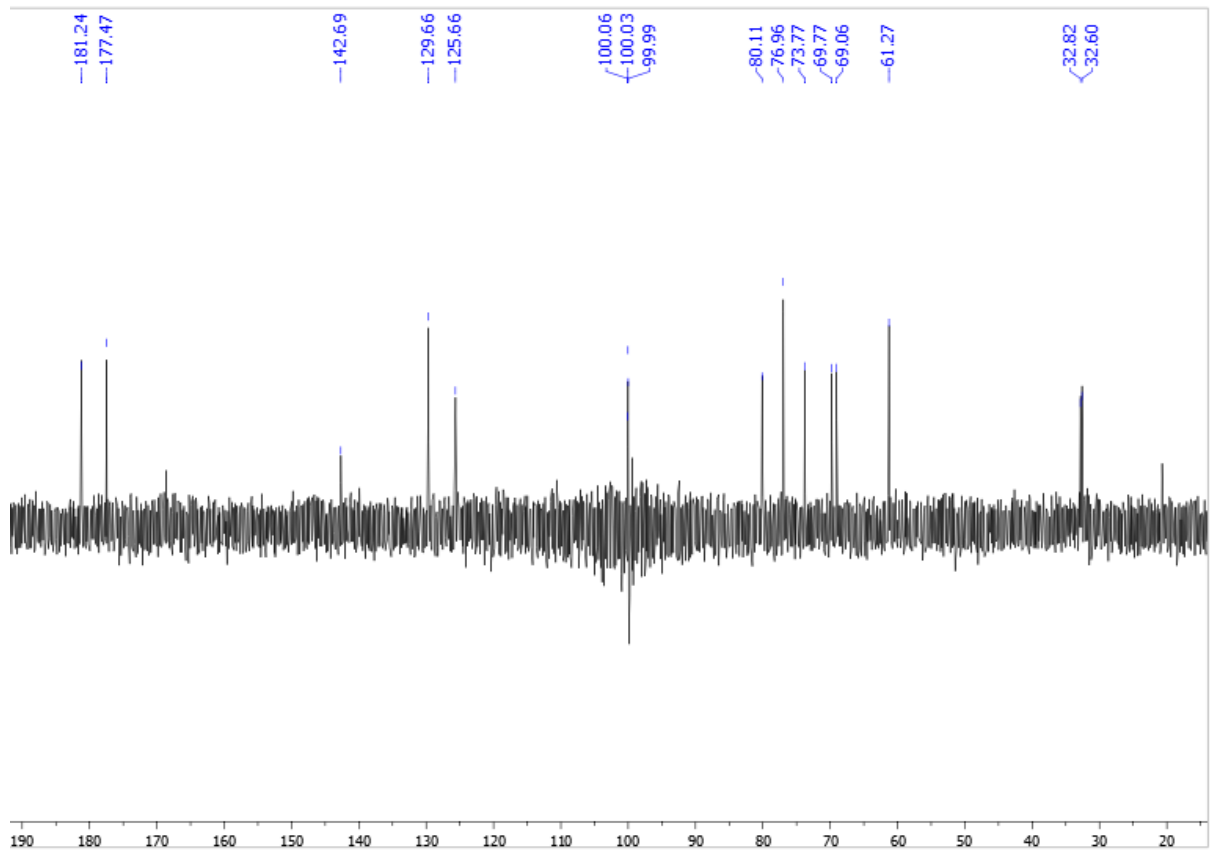


ANEXO H- Espectro de RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) do produto **3** a partir do acoplamento de Fmoc leucina com **2**.

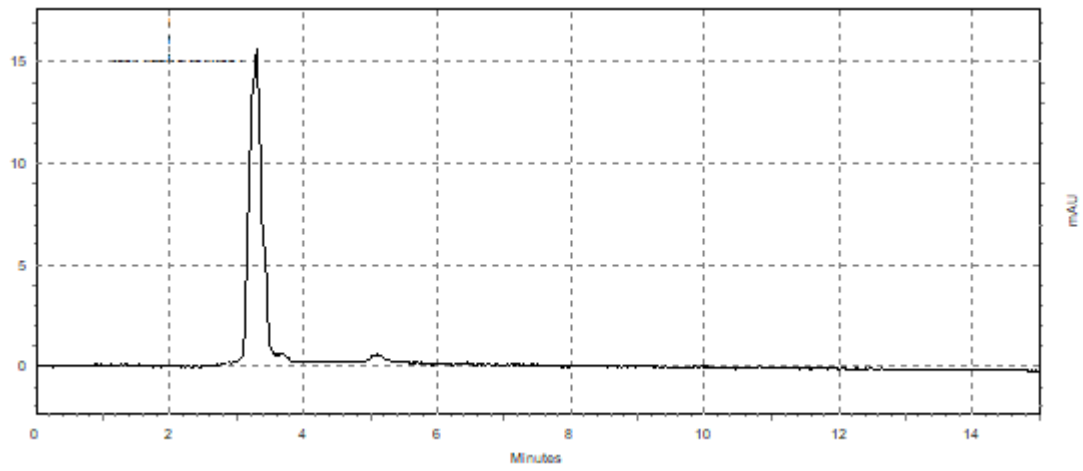


ANEXO I. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de **4**, obtido a partir de **2**, ainda com os grupos acetilas (superior) em CDCl_3 e com as hidroxilas livres (inferior) em D_2O .



ANEXO J - Espectro de HSQC (400 MHz; D₂O) de **4**, obtido a partir de **2**.ANEXO K – Espectro RMN ¹³C (D₂O-75MHz) do produto final **4** obtido a partir de **2**.

ANEXO L - Cromatograma de **4** após purificação por CLAE (TR = 3,30 min).



ANEXO L- Espectro de RMN ^1H (300 MHz; D_2O) de **4** após purificação por CLAE.

