

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

BRUNO LEONARDO SILVA

SÍNTESE DE GALACTOSÍDEOS DE ARILA INIBIDORES
POTENCIAIS DE TRANS-SIALIDASE DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI

Belo Horizonte – MG

2012

BRUNO LEONARDO SILVA

**SÍNTESE DE GALACTOSÍDEOS DE ARILA INIBIDORES
POTENCIAIS DE TRANS-SIALIDASE DE *TRYPANOSOMA*
*CRUZI***

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Ricardo José Alves

Belo Horizonte – MG

2012

S586s Silva, Bruno Leonardo.
Síntese de galactosídeos de arila inibidores potenciais de trans-
sialidase de *Trypanosoma cruzi* / Bruno Leonardo Silva. – 2012.
162 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Galactosídeos de arila –
Teses. 3. Inibidores enzimáticos – Teses. 4. Síntese orgânica –
Teses. 5. Modelagem molecular – Teses. 6. Chagas, Doença de –
Teses. I. Alves, Ricardo José. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.19

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNO LEONARDO SILVA

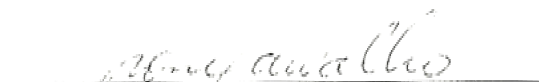

“Síntese de galactosídeos de arila inibidores potenciais de trans-sialidase de Trypanosoma Cruzi”

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e nove de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas - UFMG


Prof. Dra. Ivone Carvalho - USP
Prof. Dr. Ricardo José Alves - UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, Márcio e Marli, que me agraciaram com essa existência e me educaram com bases de amor incondicional e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Ricardo José Alves pelas lições acadêmicas e de vida que nortearam o meu caminhar como profissional e ser humano durante essa convivência. Obrigado por acreditar nas minhas potencialidades e investir nos meus talentos.

À minha irmã Aline pela alegria e otimismo dispensados que tornam mais prazerosa e suave a minha caminhada.

Aos meus padrinhos Marisa e Henrique pelos exemplos de afeto, dedicação e perseverança que deixam incessantemente para mim e para toda família.

À minha avozinha Francisca Natália que sempre lutou pelos valores da família e, durante décadas, batalha pela formação de pessoas de bem.

Aos demais familiares, tios e primos e avó materna, que me apoiaram nesta minha trajetória e me assistiram nos momentos de dificuldade.

Aos amigos Stefânia, Saulo Andrade, Saulo Braga, Marcela, Thiago, Lucas e Carol que viram no colega de bancada um amigo, abraçaram as dificuldades do grupo como suas e fizeram do ambiente de trabalho um local de respeito, alegria e amizade.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica, o meu obrigado pelo companheirismo e apoio.

À Lavina pela alegria matinal com que sempre me recebeu no laboratório e por seus exemplos de vida e respeito ao próximo.

Aos amigos do Departamento de Saúde da Fraternidade Espírita Irmão Glacus, que fortaleceram com seus verdadeiros exemplos de altruísmo o lado humano da minha formação.

Aos amigos da Campanha do Quilo Irmão Palminha pela amizade querida de anos.

Aos novos amigos Fernanda, Rafael e Lidiane pelo trabalho social inspirador que realizam e por me abrirem carinhosamente as portas do Centro Juvenil Salesiano.

Aos amigos de graduação Renan, Rogério e Lucas pela amizade sincera e divertida dos últimos anos.

Aos professores Thais, Renata e Basílio, que nos deram inúmeras lições de profissionalismo e zelaram pela construção de um grupo mais forte e melhor.

Ao professor Armando e ao Eduardo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que trabalham com afinco na melhoria do programa.

Ao professor Ronaldo Nagem por me oferecer sua amizade e por me aceitar um ano em seu laboratório, apresentando-me uma fantástica área do conhecimento: a cristalografia de proteínas.

Ao professor José Dias de Souza Filho pela ajuda inestimável na realização dos experimentos de RMN.

À professora Ivone Carvalho pela disposição em colaborar com o grupo e pela realização dos ensaios enzimáticos.

“Não há ciência alguma que tenha surgido completa do cérebro do homem; todas, sem exceção, são o produto de observações sucessivas, apoiadas nas observações precedentes, como em um ponto conhecido para chegar ao desconhecido.”

Alan Kardec

RESUMO

A trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) é uma enzima de superfície que catalisa a transferência de resíduos do monossacarídeo ácido siálico de sialogliconjugados do hospedeiro para proteínas mucinas amplamente distribuídas na superfície do parasita. Fisiologicamente a TcTS medeia ativamente mecanismos de escape da resposta imune contra *T. cruzi*, invasão celular e apoptose de células do tecido sanguíneo. Essa enzima, portanto, é essencial para o desenvolvimento da doença de Chagas, sendo reconhecidamente um alvo molecular bastante promissor para o desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, realizou-se neste trabalho o planejamento e a síntese de derivados de D-galactose inibidores potenciais de TcTS, utilizando estratégias de modificação molecular, especialmente simplificação molecular. Dez galactosídeos de arila modificados em C-3 foram sintetizados e caracterizados para serem ensaiados contra TcTS por espectrofluorimetria. Utilizando-se reações clássicas da química de carboidratos, foram sintetizados inicialmente o β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonilfenila e o β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila, a partir dos quais foram realizadas reações regioseletivas de O-alkilação em C-3. Foram utilizados como eletrófilos iodeto de metila, bromoacetato de terc-butila e bromoacetonitrila. A seletividade foi obtida pelo emprego da técnica do óxido de dibutilestanho, que forma complexos cíclicos estanilados com os galactosídeos e conduz, na presença de agentes alquilantes, aos produtos substituídos em C-3, geralmente com elevado rendimento e seletividade. Posteriormente, os derivados com os substituintes terc-butoxicarbonilmetila e cianometila foram modificados, obtendo-se derivados com os grupos carboximetila e 5-tetrazolilmetila em C-3.

Palavras-chave: trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*, ácido siálico, planejamento de inibidores, galactosídeos de arila, alquilação regioseletiva, óxido de dibutilestanho.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi trans-sialidase (TcTS) is a surface enzyme that catalyses the transfer of residues of the monosaccharide sialic acid from host sialoglycoconjugates to the mucins, abundant proteins expressed on the parasite surface. Physiologically TcTs actively participates of the mechanisms of evasion from the immune system, cell invasion and blood cell apoptosis. This enzyme is, therefore, essential for the development of Chagas Disease, and is considered a promising molecular target for drug design. Thus, the aim of the present work was the design and synthesis of D-galactose-derived potential inhibitors of TcTS using strategies of molecular modification, in special molecular simplification. Ten aryl galactosides modified at carbon-3 were synthesized and characterized for evaluation against TcTS by spectrofluorimetry. By using classical carbohydrate chemistry 4-methoxycarbonylphenyl β -D-galactopyranoside and 4-methoxycarbonyl-2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside were prepared. The regioselective 3-O-alkylation of both compounds was then carried out using methyl iodide, tert-butyl bromoacetate and bromoacetonitrile as electrophilic reagents. The regioselectivity was achieved by employing the dibutyltin oxide method, in which cyclic tin complexes are formed and, upon reaction with an alkyl halide, furnish 3-O-alkylated products, in general high yields and selectivity. The alkylated products bearing tert-butoxycarbonylmethyl or cyanomethyl groups were modified in order to obtain derivatives bearing at C-3 a carboxymethyl or a 5-tetrazolylmethyl group.

Key words: *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, sialic acid, drug design, aryl galactosides, regioselective alkylation, dibutyltin oxide.

LISTA DE FIGURAS

1	Fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.....	20
2	Estruturas do ácido neuramínico e seus derivados C-5-substituídos mais comuns.....	22
3	Rota biossintética simplificada de Neu5Ac.....	23
4	Atividade enzimática de sialidase, sialiltransferase e trans-sialidade.....	25
5	Principais eventos bioquímicos mediados pela TcTS decorrentes da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado.....	27
6	Mecanismo catalítico da trans-sialidase de <i>T. cruzi</i>	30
7	Estruturas do ácido siálico (1) e seus derivados miméticos DANA (2), zanamivir (4) e oseltamivir (5). Em (3), o cátion sialosil oxacarbênio, análogo do estado de transição da reação de hidrólise de sialosídeos.	31
8	Moléculas com maior atividade avaliadas por Neres e colaboradores e as respectivas CI_{50} para TcTS.....	33
9	Inibidor covalente avaliado por Carvalho e colaboradores.....	34
10	Estruturas do lactitol, ácido lactobiônico e lactotetrazol.	35
11	Galactosídeos fosfonatos avaliados por Busse e colaboradores e as respectivas constantes de inibição (K_i) para TcTS.	35
12	C-sialosídeos com maior atividade avaliados por Meinke e colaboradores e as respectivas constantes de dissociação (K_D) para TcTS.	36
13	Galactosídeos com maior atividade avaliados por Harrison e colaboradores e as respectivas porcentagens de inibição de TcTS a 1mM.	36
14	Glicosídeos triazólicos com maior atividade avaliados por Campo e colaboradores e as respectivas porcentagens de inibição de TcTS a 1mM.	37
15	Estrutura do gangliosídeo GM_3	37
16	Substâncias aromáticas hidroxiladas inibidores de TcTS e as respectivas CI_{50}	38
17	Derivados de lactose e D-galactose sintetizados no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e testados contra TcTS.....	39
18	Estratégias de modificação molecular utilizadas neste trabalho.	40
19	Galactosídeos de arila modificados em C-3 propostos para síntese.....	42
20	Esquema de síntese de 53 e 54 a partir de D-galactose.....	43
21	Proposta mecanística de desacetilação de 68 e 69 pelo método de Zemplén.	44
22	Espectro de RMN de 1H de 53 (200 MHz, $DMSO-d_6$).....	45

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

23	Reação de complexação entre grupos hidroxilas de um poliol e o óxido de dibutilestanho.....	46
24	Exemplos de modificação regioseletiva da hidroxila de C-3 de galactosídeos parcialmente protegidos.	47
25	Estrutura dimérica proposta para o organoestanho 77.....	48
26	Configuração dos organoestanhos formados pela complexação de glicosídeos desprotegidos com óxido de dibutilestanho.	49
27	Exemplos de modificação regioseletiva da hidroxila de C-3 de derivados galactosídicos totalmente desprotegidos.	50
28	Mecanismo simplificado proposto por Kaji e colaboradores para 3-O-glicosilação do galactosídeo de metila catalisada por Bu₄NF.	51
29	Etapas de 3-O-modificação dos galactosídeos 53 e 54.	51
30	Espectro de RMN de ¹H dos anômeros α e β de 59.....	52
31	Sinais de hidrogênios metilênicos α-tetrazólicos no espectro de RMN de ¹H de 64.....	54
32	Etapas de desproteção do éster terc-butílico dos galactosídeos 56 e 61.	57
33	Proposta mecanística de desproteção do éster terc-butílico dos galactosídeos 56 e 61.	59
34	Reação de obtenção dos galactosídeos 59 e 64.....	60
35	Estrutura do substrato MuNANA.....	62

LISTA DE TABELAS

1 Sialomiméticos testados contra TcTS.....	32
2 Proporção molar dos reagentes utilizados nas 3-O-alquilações dos galactosídeos 53 e 54.....	69
3 Condições empregadas nas 3-O-alquilações dos galactosídeos 53 e 54.....	70
4 Quantidades de reagentes e solventes utilizados na síntese de 59 e 64.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac	Acetila
ADP	Adenosina difosfato
All	Alila
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
Bn	Benzila
Bz	Benzoíla
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica-Gel
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% da atividade enzimática
CMP	Citidina 5-monofosfato
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	Dupleto
DANA	Ácido 2-desoxi-2,3-didesidro-D-N-acetilneuramínico
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Enzyme Commission
F.F.	Faixa de Fusão
FEP	Fosfoenolpiruvato
F.M.	Fórmula Molecular
GH	Glycoside Hydrolase
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
Glu	Ácido Glutâmico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
IV	Infravermelho

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
K_D	Constante de dissociação
KDN	Ácido 2-ceto-3-desoxinonônico
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução
Leu	Leucina
M.M.	Massa Molar
ManNAc	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -manosamina
ManNAc-6-P	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -manosamina-6-fosfato
<i>m</i>	Multiplete
MuNANA	Ácido 4-metilumbeliferil- α - <i>D</i> - <i>N</i> -acetilneuramínico
NANA	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
Neu2en5Ac	Ácido 2-desoxi-2,3-didesidro- <i>D</i> - <i>N</i> -acetilneuramínico
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P</i>	Coeficiente de partição óleo-água
P.A.	Para análise
P.E.	Ponto de ebulição
Pi	Fosfato inorgânico
PLC	Fosfolipase C
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simpleto
SAPA	<i>Shed Acute Phase Antigen</i>
Ser	Serina
S_N1	Substituição nucleofílica unimolecular
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
<i>t</i>	Triplete
TcTS	Trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
THF	Tetra-hidrofurano
Thr	Treonina
TBAI	Iodeto de tetrabutilamônio
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

Trp	Triptofano
TS	Trans-sialidase
Tyr	Tirosina
UDP	Uridina difosfato
Val	Valina
WHO	<i>World Health Organization</i>
Δv	Varição de deslocamento químico
δ	Deslocamento químico
$[\alpha]_D$	Poder rotatório específico
®	Marca registrada
$\bar{\nu}$	Número de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença de Chagas	19
1.2 Farmacoterapia convencional e novas perspectivas.....	20
1.3 Ácidos siálicos	21
1.4 Sialidases, sialiltransferases e trans-sialidases.....	24
1.5 Trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> : alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos	26
1.6 Estrutura, função e mecanismo de ação da TcTS.....	28
1.7 Inibidores da TcTS	30
2 OBJETIVOS	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Síntese dos galactosídeos 53 e 54	43
3.2 Alquilação 3-O-seletiva dos galactosídeos 53 e 54.....	45
3.3 Análise espectral dos produtos modificados em C-3	53
3.3.1 Caracterização dos galactosídeos 55 e 60.....	55
3.3.2 Caracterização dos galactosídeos 56 e 61.....	55
3.3.3 Caracterização dos galactosídeos 58 e 63.....	56
3.4 Síntese e caracterização dos galactosídeos 57 e 62.....	57
3.4.1 Caracterização dos galactosídeos 57 e 62.....	59
3.5 Síntese e caracterização dos galactosídeos 59 e 64.....	60
3.5.1 Caracterização dos galactosídeos 59 e 64.....	61
3.6 Ensaio enzimático	62
4 PARTE EXPERIMENTAL	65
4.1 Métodos gerais	65
4.2 Métodos de síntese	66
4.2.1 Procedimento de síntese de 53 e 54.....	66
4.2.2 Procedimento geral de 3-O-alquilação dos galactosídeos 53 e 54	69
4.2.3 Procedimento de síntese de 55.....	70
4.2.4 Procedimento de síntese de 60.....	72
4.2.5 Procedimento de síntese de 56.....	74
4.2.6 Procedimento de síntese de 61.....	75
4.2.7 Procedimento de síntese de 58.....	77

SUMÁRIO (continuação)

4.2.8 Procedimento de síntese de 63.....	78
4.2.9 Procedimento de síntese de 57 e 62.....	80
4.2.10 Procedimento de síntese de 59 e 64.....	83
4.3 Ensaios enzimáticos	86
5 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE A – Espectro no infravermelho de 53	97
APÊNDICE B – Espectro de RMN de ¹ H de 53 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 200 MHz)	98
APÊNDICE C – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 53 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 50 MHz)	99
APÊNDICE D – Espectro no infravermelho de 54	100
APÊNDICE E – Espectro de RMN de ¹ H de 54 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 200 MHz).....	101
APÊNDICE F – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 54 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 50 MHz).....	102
APÊNDICE G – Espectro no infravermelho de 55.....	103
APÊNDICE H – Espectro de RMN de ¹ H de 55 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz).....	104
APÊNDICE I – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 55 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 100 MHz).....	105
APÊNDICE J – Mapa de contornos COSY de 55 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz).....	106
APÊNDICE K – Mapa de contornos HMQC de 55 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz)	107
APÊNDICE L – Mapa de contornos HMBC de 55 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz)	108
APÊNDICE M – Espectro no infravermelho de 56.....	109
APÊNDICE N – Espectro de RMN de ¹ H de 56 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	110
APÊNDICE O – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 56 (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	111
APÊNDICE P – Mapa de contornos COSY de 56 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	112
APÊNDICE Q – Mapa de contornos HMQC de 56 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	113
APÊNDICE R – Mapa de contornos HMBC de 56 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	114
APÊNDICE S – Espectro no infravermelho de 57	115
APÊNDICE T – Espectro de RMN de ¹ H de 57 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	116
APÊNDICE U – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 57 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 100 MHz)	117

SUMÁRIO (continuação)

APÊNDICE V – Mapa de contornos COSY de 57 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz)	118
APÊNDICE X – Mapa de contornos HMQC de 57 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz)	119
APÊNDICE Y – Mapa de contornos HMBC de 57 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	120
APÊNDICE W – Espectro no infravermelho de 58	121
APÊNDICE Z – Espectro de RMN de ¹ H de 58 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	122
APÊNDICE AA – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 58 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 100 MHz).....	123
APÊNDICE BB – Mapa de contornos COSY de 58 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz)	124
APÊNDICE CC – Mapa de contornos HMQC de 58 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	125
APÊNDICE DD – Mapa de contornos HMBC de 58 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	126
APÊNDICE EE – Espectro no infravermelho de 59	127
APÊNDICE FF – Espectro de RMN de ¹ H de 59 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	128
APÊNDICE GG – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 59 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 100 MHz)	129
APÊNDICE HH – Mapa de contornos COSY de 59 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz)	130
APÊNDICE II – Mapa de contornos HMQC de 59 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	131
APÊNDICE JJ – Mapa de contornos HMBC de 59 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 400 MHz).....	132
APÊNDICE KK – Espectro no infravermelho de 60	133
APÊNDICE LL – Espectro de RMN de ¹ H de 60 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz).....	134
APÊNDICE MM – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 60 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 100 MHz)	135
APÊNDICE NN – Mapa de contornos COSY de 60 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz)	136
APÊNDICE OO – Mapa de contornos HMQC de 60 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz)	137
APÊNDICE PP – Mapa de contornos HMBC de 60 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 400 MHz)	138
APÊNDICE QQ – Espectro no infravermelho de 61	139
APÊNDICE RR – Espectro de RMN de ¹ H de 61 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	140
APÊNDICE SS – Espectro de RMN de ¹³ C e Subespectro DEPT-135 de 61 (CDCl ₃ ; 100 MHz).....	141
APÊNDICE TT – Mapa de contornos COSY de 61 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	142
APÊNDICE UU – Mapa de contornos HMQC de 61 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	143
APÊNDICE VV – Mapa de contornos HMBC de 61 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	144
APÊNDICE XX – Espectro no infravermelho de 62.....	145

SUMÁRIO (conclusão)

APÊNDICE YY – Espectro de RMN de ^1H de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	146
APÊNDICE WW – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 62 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)	147
APÊNDICE ZZ – Mapa de contornos COSY de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	148
APÊNDICE AAA – Mapa de contornos HMQC de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	149
APÊNDICE BBB – Mapa de contornos HMBC de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	150
APÊNDICE CCC – Espectro no infravermelho de 63	151
APÊNDICE DDD – Espectro de RMN de ^1H de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	152
APÊNDICE EEE – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 63 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)	153
APÊNDICE FFF – Mapa de contornos COSY de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	154
APÊNDICE GGG – Mapa de contornos HMQC de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	155
APÊNDICE HHH – Mapa de contornos HMBC de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	156
APÊNDICE III – Espectro no infravermelho de 64	157
APÊNDICE JJJ – Espectro de RMN de ^1H de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	158
APÊNDICE KKK – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 64 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)	159
APÊNDICE LLL – Mapa de contornos COSY de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	160
APÊNDICE MMM – Mapa de contornos HMQC de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	161
APÊNDICE NNN – Mapa de contornos HMBC de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)	162

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção parasitária crônica causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), essa doença tropical acomete 10 milhões de indivíduos e representa um risco para uma população de 25 milhões de pessoas da América Latina, geograficamente distribuídas desde o México até o sul da Argentina, onde a enfermidade tem caráter endêmico (WHO, 2010).

A existência de diferentes formas evolutivas do parasita bem como de um elevado número de reservatórios vertebrados e insetos triatomíneos que participam do ciclo de transmissão torna bastante complexa essa zoonose e, portanto, tem impossibilitado a sua erradicação. As estratégias para eliminação da doença de Chagas baseiam-se no controle dos vetores, triagem sistemática dos doadores de sangue em todos os países endêmicos, detecção e tratamento da transmissão congênita e tratamento de crianças infectadas e de casos agudos.

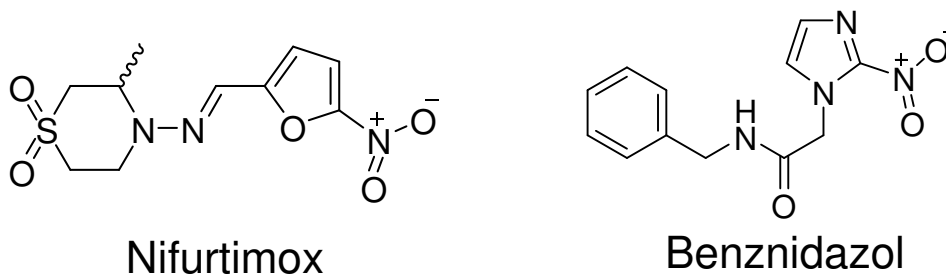
Nas duas últimas décadas, intervenções dessa natureza contribuíram significativamente para a interrupção da transmissão da infecção em importantes áreas de risco. Brasil, Chile e Uruguai declararam-se livres da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, o principal vetor domiciliar nesses países. Contudo, a prevalência da doença ainda permanece elevada. Em 2007, estimou-se a existência de 7.694.500 pessoas infectadas (1,448%) nos 21 países onde a doença de Chagas é endêmica. O número de novos casos anuais devido à transmissão vetorial e congênita são 41.200 e 14.385, respectivamente (WHO, 2007).

No Brasil, de 2006 a 2010 foram notificados 799 casos de doença de Chagas aguda, com índice de letalidade de 2,25%. No estágio crônico, onde está a maioria dos chagásicos, 30 a 40% dos casos evoluem para formas graves de cardiopatia e/ou megaformações digestivas, o que provoca grande impacto nos sistemas de saúde pública (SVS/MS, 2011).

1.2 Farmacoterapia convencional e novas perspectivas

Desde o final dos anos 1970, há somente dois fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox (Lampit[®]) e o benznidazol (Radanil[®] e Rochagan[®]) (**Figura 1**). Ambos os fármacos são tripanocidas contra as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* e reduzem consideravelmente os níveis de parasitemia, a gravidade e a letalidade na fase aguda da doença, obtendo-se curas parasitológicas em 80% dos casos. Entretanto, são bem menos eficazes na fase crônica, não se obtendo, nesse estágio, sucesso terapêutico em mais de 20% das pessoas tratadas (CANÇADO, 1999).

Figura 1 – Fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.



O nifurtimox é um 5-nitrofurano administrado por via oral, seus efeitos adversos são bastante comuns e cerca de 50% dos pacientes não toleram o tratamento até o fim. Seu modo de ação não está totalmente elucidado, mas provavelmente envolve a redução e oxidação cíclica do grupo nitro, produzindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais livres, justificando a reduzida seletividade do fármaco (DIAS *et al.*, 2009). O estresse oxidativo provocado por esse ciclo redox é responsável por danos em macromoléculas celulares como DNA, lipídeos de membrana e proteínas (FAIRLAMB, 2003). O nifurtimox apresenta sérios problemas de toxicidade e não se encontra mais disponível comercialmente, mas permanece na lista de medicamentos essenciais da OMS (WHO, 2010).

O benznidazol, um análogo nitroimidazólico, por outro lado, não atua através do ciclo redox e não está envolvido diretamente na formação de espécies reativas de oxigênio. Há evidências de que o efeito tripanocida do benznidazol deve-se principalmente à ação direta de nitro-radicais e metabólitos eletrofílicos do fármaco,

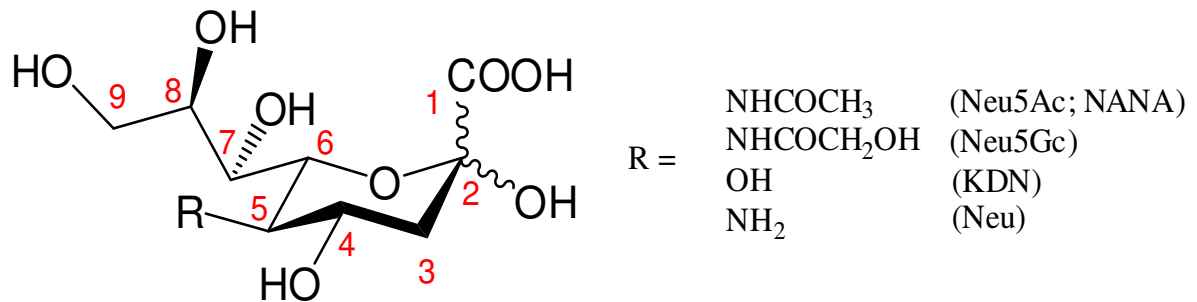
que se ligam covalentemente às macromoléculas do *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2009). Embora o tratamento com esse fármaco seja recomendado devido à falta de opção terapêutica, o benznidazol também causa efeitos adversos frequentemente graves tais como: reações de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, depressão da medula óssea, trombocitopenia e polineuropatia periférica (RODRIGUES-COURA e DE CASTRO, 2002).

Diante desse panorama típico de uma doença negligenciada, uma intensa busca por novas opções quimioterápicas mais efetivas e seguras para combater a doença de Chagas tem sido feita nos últimos anos. As principais estratégias exploradas para o planejamento racional de novos fármacos envolvem a inibição das seguintes vias bioquímicas do *Trypanosoma cruzi*: biossíntese *de novo* do ergosterol, proteólise mediada por cruzipaína, metabolismo do pirofosfato, síntese e metabolismo redox da tripanotona e recaptação de purinas. Atividade seletiva contra *T. cruzi* dos inibidores dessas vias já foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 2010 e 2003; WHO, 2007).

1.3 Ácidos siálicos

Os derivados do ácido neuramínico (**Figura 2**), conhecidos como ácidos siálicos, constituem uma família de monossacarídeos de nove carbonos derivados de hexose, amplamente distribuídos entre as glicoproteínas e os glicolipídeos de membrana. Eles são encontrados principalmente em posições terminais de cadeias oligossacarídicas da superfície celular e, ocasionalmente, de cadeias laterais de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esses açúcares também podem ocupar posições internas dentro de glicanas, sendo mais comum quando um resíduo do monossacarídeo é anexado a outro, muitas vezes em posição C-8. Além disso, resíduos internos podem ocorrer nas unidades de repetição de alguns polissacarídeos bacterianos e oligossacarídeos equinodermis (VARKI, 2009).

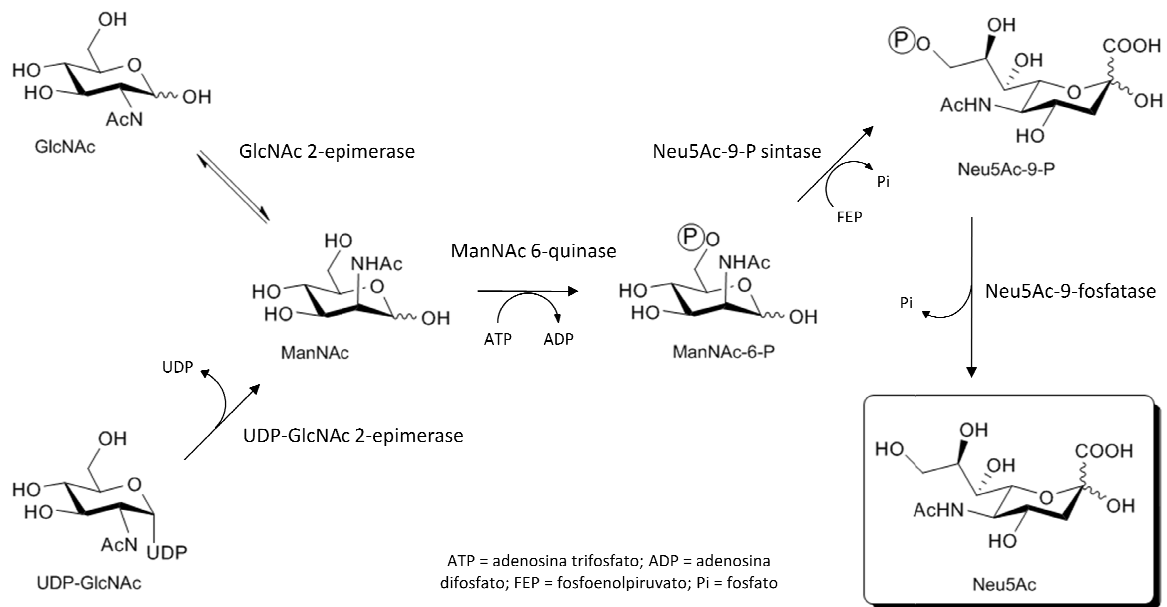
Figura 2 - Estruturas do ácido neuramínico e seus derivados C-5-substituídos mais comuns.



Grande variedade estrutural surge das modificações naturais do esqueleto carbônico desses carboidratos (**Figura 2**). C-5 pode ter um grupo *N*-acetil (Neu5Ac; NANA) ou uma hidroxila (como em KDN). O grupo 5-*N*-acetil também pode ser hidroxilado, originando o ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Menos comumente, o grupo 5-*N*-amino não é acilado, dando o ácido neuramínico (Neu). Cada uma destas quatro moléculas, Neu5Ac, Neu5Gc, KDN e Neu, pode conter um ou mais substituintes adicionais nas hidroxilas em C-4, C-7, C-8 e C-9 (*O*-acetil, *O*-metil-, *O*-sulfato, *O*-lactil ou grupos fosfato). Formas insaturada e anidra de ácido siálico livre também existem, 2-desoxi-2,3-didesidro-Neu5Ac (Neu2en5Ac) é a mais comum (VARKI, 2009). O ácido siálico mais abundante em eucariotos é o Neu5Ac, frequentemente chamado somente de “ácido siálico” (LEHNINGER, 2005).

Neu5Ac e Kdn são os principais precursores metabólicos dos ácidos siálicos de origem animal. Em organismos vertebrados, o ácido *N*-acetilneuramínico é obtido no citosol das células pela condensação de *N*-acetil-*D*-manosamina-6-fosfato (ManNAc-6-P) com fosfoenolpiruvato e subsequente desfosforilação. O precursor fosfatado ManNAc-6-P é produzido a partir de UDP-*N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilglicosamina em duas etapas: uma epimerização em C-2 e uma fosforilação na hidroxila de C-6 (**Figura 3**; DE FÁTIMA *et al.*, 2005).

Figura 3 – Rota biossintética simplificada de Neu5Ac.



O grupo ácido carboxílico dos ácidos siálicos está ionizado em pH fisiológico, mas pode também, em uma cadeia oligossacarídica, estar condensado na forma lactônica com uma hidroxila de carboidratos adjacentes ou na forma lactâmica com um grupo amino livre de C-5. Além dessa diversidade estrutural, diferentes conectividades podem ser obtidas pela formação da ligação α -glicosídica entre C-2 do ácido siálico e um açúcar adjacente, promovida por sialiltransferases específicas. As posições aceptoras mais comuns são os carbonos C-3 e C-6 de resíduos de galactose e C-6 de galactosamina (VARKI, 2009).

A diversidade química dos derivados do ácido neuramínico contribui para a enorme variedade de estruturas sacarídicas que compõem o glicocálice amplamente distribuído na superfície das células. Com efeito, esses monossacarídeos estão envolvidos em diversos processos biológicos, atuam como mediadores em interações específicas célula-célula e interações entre célula e componentes da matriz extracelular, uma vez que podem ser reconhecidos por anticorpos e lectinas específicas de origem endógena e exógena (SCHAUER, 2004).

A alta expressão de ácidos siálicos na superfície externa de membranas celulares e em glicoproteínas secretadas, como proteínas sanguíneas e mucinas, sugere que eles têm funções na estabilização das membranas. Eles protegem as células e

macromoléculas do ataque de proteases e glicosidades, estendendo seu tempo de vida e função (VARKI, 2009). Devido à carga dos grupos carboxilato, os ácidos siálicos estão envolvidos na ligação e no transporte de fármacos e íons, como cátions Ca^{2+} . A repulsão eletrostática das cargas negativas estabiliza as conformações de proteínas, incluindo enzimas, aumenta a viscosidade das mucinas e evita agregação de eritrócitos (IZUMIDA *et al.*, 1991).

1.4 Sialidases, sialiltransferases e trans-sialidases

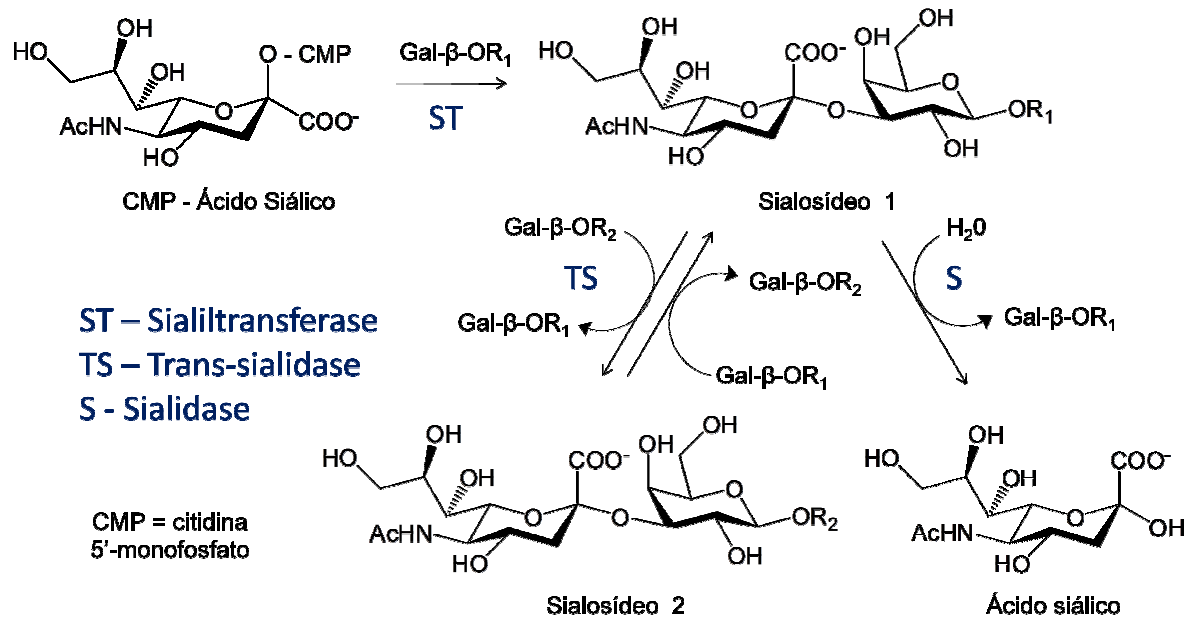
Sialidases ou neuraminidases são enzimas hidrolíticas (EC 3.2.1.18) que catalisam a remoção de resíduos terminais de ácido siálico da cadeia oligossacarídica de glicoconjugados (**Figura 4**). Fisiologicamente esse fenômeno leva à captura e degradação de glicoproteínas plasmáticas pelo fígado, que contém receptores de proteínas asialiladas (sem ácido siálico). Mecanismo semelhante é responsável pela depuração hepática dos eritrócitos, indicando que a desialilação de glicoconjugados de membrana constitui um método de marcação de células velhas e que, portanto, precisam ser renovadas (LEHNINGER, 2005).

O ácido siálico participa de muitos processos patológicos principalmente como sítio de reconhecimento de macromoléculas virais e bacterianas. As neuraminidases do vírus Influenza tipo A e B atuam no processamento de novos vírions sintetizados quando estes brotam de uma célula infectada e evitam a auto-aglutinação de vírus. Outro exemplo é a sialidase do *Vibrio cholerae*, que possui um papel muito bem definido no desenvolvimento da cólera. A sialidase remove unidades de ácido siálico de glicolipídeos das células da mucosa intestinal para criar GM_1 , o sítio de ligação da toxina colérica (TAYLOR, 1996).

Outra importante família de enzimas envolvidas no metabolismo dos sialosídeos, oligossacarídeos contendo ácido siálico, é formada pelas sialiltransferases (EC 2.4.99.X; **Figura 4**). Estas são glicosiltransferases que catalisam a transferência de ácido siálico de citidina 5-monofosfato de ácido siálico (CMP-ácido siálico; CMP-Neu5Ac) para glicoconjugados, usualmente em resíduos terminais de galactose, *N*-acetilgalactosamina ou outro resíduo de ácido siálico (CHEN e VARKI, 2010). Podem ser formadas ligações glicosídicas $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$, ou $\alpha 2,8$, dependendo da

especificidade da sialiltransferase envolvida na catálise (HARDUIN-LEPERS *et al.*, 2001).

Figura 4 – Atividade enzimática de sialidase, sialiltransferase e trans-sialidade.



Entre os eucariotos inferiores que também expressam sialidasas, um restrito grupo do reino Protozoa, incapaz de sintetizar o ácido siálico *de novo*, desenvolveu uma notável capacidade de adquiri-lo de sialoglicoconjugados do hospedeiro. O protozoário causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, incorpora resíduos de ácido siálico do hospedeiro em suas próprias moléculas de superfície por meio da trans-sialidase (TS; **Figura 4**) (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Essa enzima é uma sialidase modificada que, ao invés de remover o ácido siálico, transfere-o de sialoglicoconjugados do hospedeiro para proteínas mucinas extensamente distribuídas na superfície do parasito (PREVIATO *et al.*, 1985; FRASCH, 2000).

A trans-sialidase também foi encontrada em tripanosomatídeos africanos como *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodosiense* e *Trypanosoma congolense* (ENGSTLER *et al.*, 1993a; 1993b; 1995). Curiosamente, as espécies *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum* não expressam trans-sialidase ou sialidase, enquanto que *Trypanosoma rangeli* possui somente sialidase (ENGSTLER *et al.*, 1995; PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993; PEREIRA e MOSS, 1985).

1.5 Trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*: alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos

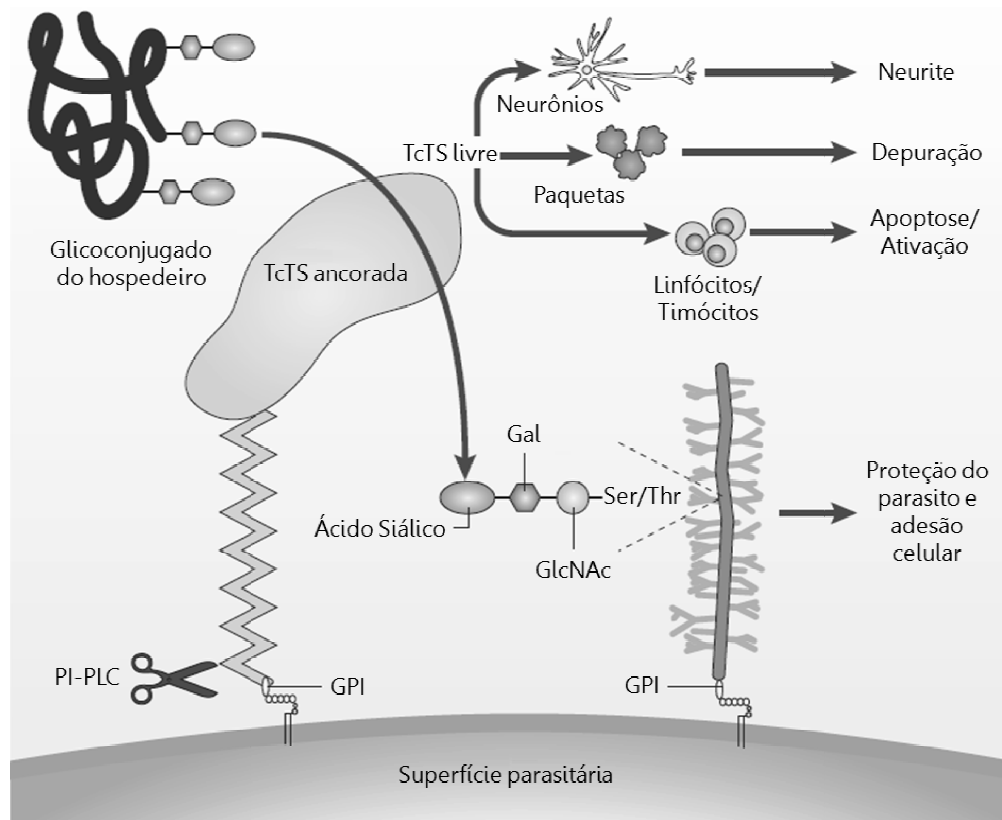
A atividade de neuraminidase exibida pelo *Trypanosoma cruzi*, encontrada nas formas tripomastigotas sanguíneas, mas ausente nas formas amastigotas intracelulares, foi pioneiramente descrita em 1983 (PEREIRA, 1983). Verificou-se, posteriormente, que o parasito também possui a atividade de trans-sialidase mediada por enzimas de membrana com âncora de GPI (PREVIATO *et al.*, 1985) e que ambas as atividades catalíticas são exercidas pela mesma enzima, a trans-sialidase do *Trypanosoma cruzi* (TcTS) (SCHENKMAN *et al.*, 1992).

A TcTS possui muitas características específicas que a tornam um bom alvo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas (NERES *et al.*, 2008). Trata-se de uma enzima de membrana essencial para o parasito, pois, como dito anteriormente, os tripanosomatídeos são incapazes de biossintetizar o ácido siálico e de adquiri-lo por vias alternativas. A expressão de trans-sialidases é significativamente maior em tripomastigotas, principalmente na forma sanguínea invasiva (ATWOOD III *et al.*, 2005), o que facilitaria o direcionamento de quimioterápicos para esse alvo.

A participação da trans-sialidase na patogênese da doença de Chagas é corroborada por um número cada vez maior de estudos (**Figura 5**). A TcTS está envolvida na evasão do protozoário da resposta imune mediada pelo complemento, permitindo imediata sobrevivência das formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea (TOMLINSON e RAPER, 1998). Outro mecanismo de defesa é a sialilação de glicoproteínas mucinas da superfície do parasito, produzindo uma cobertura de moléculas negativamente carregadas sobre o patógeno e protegendo-o da lise por anticorpos humanos anti- α -galactosídicos (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000).

A expressão da TcTS é consideravelmente aumentada em cepas do protozoário mais letais quando comparada com os níveis da enzima presentes em cepas menos letais (RISSO, 2004). Os fenótipos invasivos do protozoário são restritos a populações que expressam a trans-sialidase, o que torna a enzima um importante fator de virulência do *T. cruzi*. (PEREIRA *et al.*, 1996).

Figura 5 – Principais eventos bioquímicos mediados pela TcTS decorrentes da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado.



Adaptado de Buscaglia, 2006

O modo pelo qual a TcTS medeia a adesão e invasão celular não está totalmente esclarecido. A importância do ácido siálico na superfície das células hospedeiras para a invasão foi demonstrada em trabalhos independentes, através de experimentos com células de ovário de hamster deficientes de ácido siálico. Estas células são fracamente invadidas pelo patógeno quando comparadas com as células selvagens (CIAVAGLIA *et al.*, 1993; MING *et al.*, 1993; SCHENKMAN; EICHINGER, 1993a).

Por outro lado, há evidências de que unidades de ácido siálico na superfície do parasito também participam do processo de invasão celular. A incubação de tripomastigotas em meio contendo sialoglicoproteínas, aumenta a penetração do *T. cruzi* em cultura de fibroblastos (PIRAS *et al.*, 1987). Foi observado que uma significativa redução da adesão e invasão celular ocorre quando epítopos sialilados (Ssp-3) formados em tripomastigotas pela ação da trans-sialidase são neutralizados

por anticorpos monoclonais (SCHENKMAN *et al.*, 1991). Entretanto, vários estudos contrariam tais resultados, segundo os quais a remoção do ácido siálico na superfície do parasito ou sua neutralização por anticorpos é capaz de aumentar a infecção celular pelo *T. cruzi* (YOSHIDA *et al.*, 1997; PRIOLI *et al.*, 1990; CAVALLESCO *et al.*, 1988; VILLALTA *et al.*, 1984).

Uma vez que a TcTS possui uma âncora de GPI, esta pode ser clivada pela enzima fosfolipase C, ocorrendo a liberação da enzima exógena para a corrente sanguínea. A TcTS livre é capaz de remover resíduos de ácido siálico da superfície plaquetária, causando trombocitopenia na fase aguda da doença de Chagas (TRIBULATTI *et al.*, 2005), e de induzir apoptose em células do timo, baço e gânglios periféricos (MUCCI *et al.*, 2002; LEGUIZAMON *et al.*, 1999). Constatou-se ainda que a apoptose induzida pela TcTS no sistema imune é desencadeada pela sialilação das células alvo (MUCCI *et al.*, 2006).

1.6 Estrutura, função e mecanismo de ação da TcTS

A TcTS é codificada por genes de uma superfamília constituída de 1430 membros, a maior família do genoma diplóide do *Trypanosoma cruzi*, evidenciando a importância da modificação do perfil de sialilação do patógeno para a sua sobrevivência no hospedeiro. Deste total somente 12 membros codificam TS enzimaticamente ativas, 725 codificam proteínas do tipo TS enzimaticamente inativas e outros 693 membros são pseudogenes (EL SAYED *et al.*, 2005). Verificou-se por experimentos de sequenciamento que a perda de atividade enzimática da trans-sialidase deve-se a mutação pontual Tyr342His (CREMONA *et al.*, 1995). Contudo, membros do grupo enzimaticamente inativo conservam a afinidade pela β -galactose com idêntica especificidade àquela apresentada pela TcTS enzimaticamente ativa (CREMONA *et al.*, 1999).

A TcTS é um membro da família das glicosídeo-hidrolases GH33 (<http://www.cazy.org>) e foi classificada como uma α -sialidase (EC 3.2.1.18). No entanto, TcTS comporta-se como uma trans-sialidase *in vivo* e *in vitro* na presença de substratos adequados, açúcares doadores e aceptores de ácido siálico. TcTS catalisa a transferência de ácido siálico de α -2,3-sialoglicoconjugados β -galactose

terminal do hospedeiro para outras unidades β -galactosil de mucinas da superfície do parasita (**Figura 5**; AGUSTÍ *et al.*, 2004).

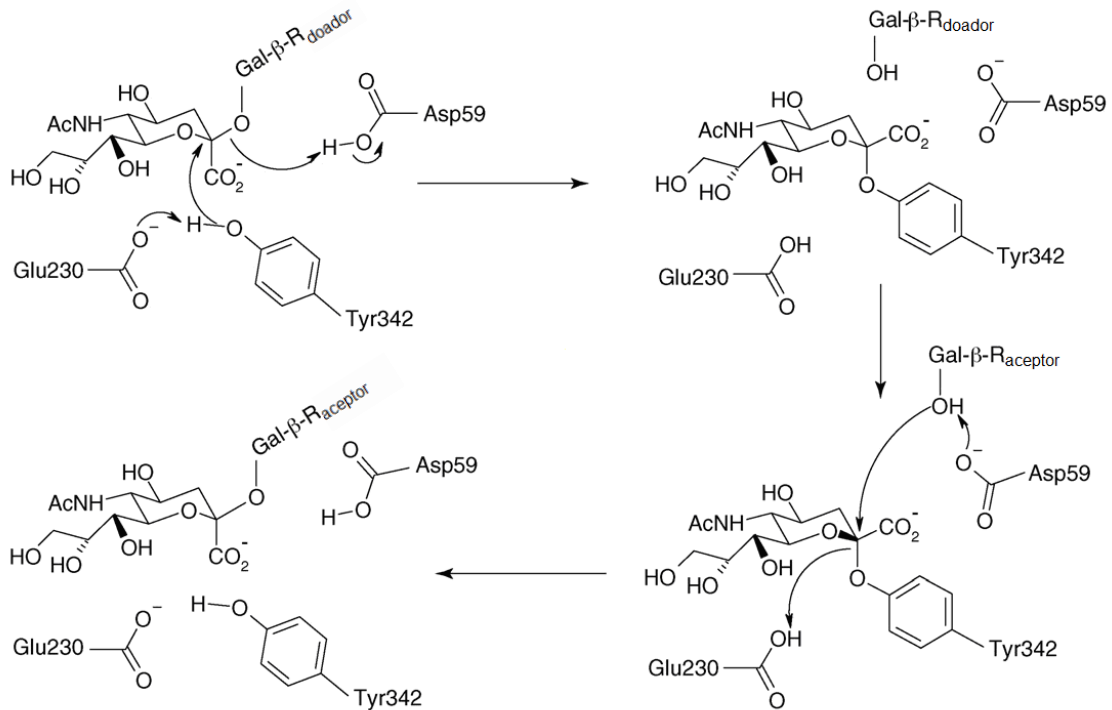
Estruturalmente a TcTS possui duas regiões principais: um domínio catalítico globular *N*-terminal com arranjo propulsor β de seis lâminas, conectado por uma longa α -hélice a um domínio antigênico C-terminal do tipo lectina, com sequências repetidas de 12 resíduos de aminoácidos que constituem o antígeno de fase aguda da trans-sialidase (*Shed acute phase antigen* - SAPA) (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002). A variabilidade da quantidade de repetições SAPA, assim como o tamanho do domínio *N*-terminal (entre 640 e 1000 aminoácidos), resultam em proteínas que variam de 85 a mais de 200 kDa de peso molecular (FRASCH, 2000).

A arquitetura molecular do sítio ativo da enzima conserva diversas características das sialidases microbianas: uma tríade de argininas (Arg 35, Arg245 e Arg314), que forma ligação iônica com o grupo carboxilato do ácido siálico, um ácido glutâmico (Glu357) que estabiliza a Arg35, um ácido aspártico essencial para a catálise (Asp 59), e dois resíduos (Tyr342 e Glu230) adequadamente posicionados no fundo sítio ativo para estabilizar as espécies reativas do estado de transição. Há um bolso hidrofóbico, conservado em todas as sialidases, que acomoda o grupo *N*-acetil do ácido siálico, definido pela cadeia lateral dos resíduos Val95, Leu176 e Trp120 (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

A TcTS possui dois (sub)sítios no centro ativo: o sítio de ligação ao ácido siálico e o sítio de ligação à galactose. O primeiro está presente em todas as sialidases, porém, ligeiramente modificado na TcTS; enquanto que o segundo está ausente em todas as sialidases e se forma somente com a ligação do substrato doador de ácido siálico. Induzindo o substrato tal modificação, o mecanismo catalítico inicia-se pelo ataque nucleofílico da Tyr342 reativa ao carbono anomérico do ácido siálico via reação S_N2 . Em seguida, via catálise geral ácido-base, o Glu230 ativador da Tyr342 capta o próton da hidroxila desse aminoácido e o Asp59 protona o resíduo de galactose abandonador (AMAYA *et al.*, 2004; BUSCHIAZZO *et al.*, 2000, 2002). Forma-se então um intermediário covalente sialil-enzima (WATTS *et al.*, 2003). Ocorre novamente uma etapa S_N2 para regeneração da enzima e formação do produto sialilado com retenção de configuração do carbono anomérico do resíduo de ácido siálico (TODESCHINI *et al.*, 2000). O nucleófilo, desta vez, é o grupo hidroxila

do carbono 3 do resíduo de galactose aceptor e os resíduos Glu230 e Asp59 novamente realizam a catálise geral ácido-base (**Figura 6**).

Figura 6 – Mecanismo catalítico da trans-sialidase de *T. cruzi*.



Adaptado de Neres, 2008

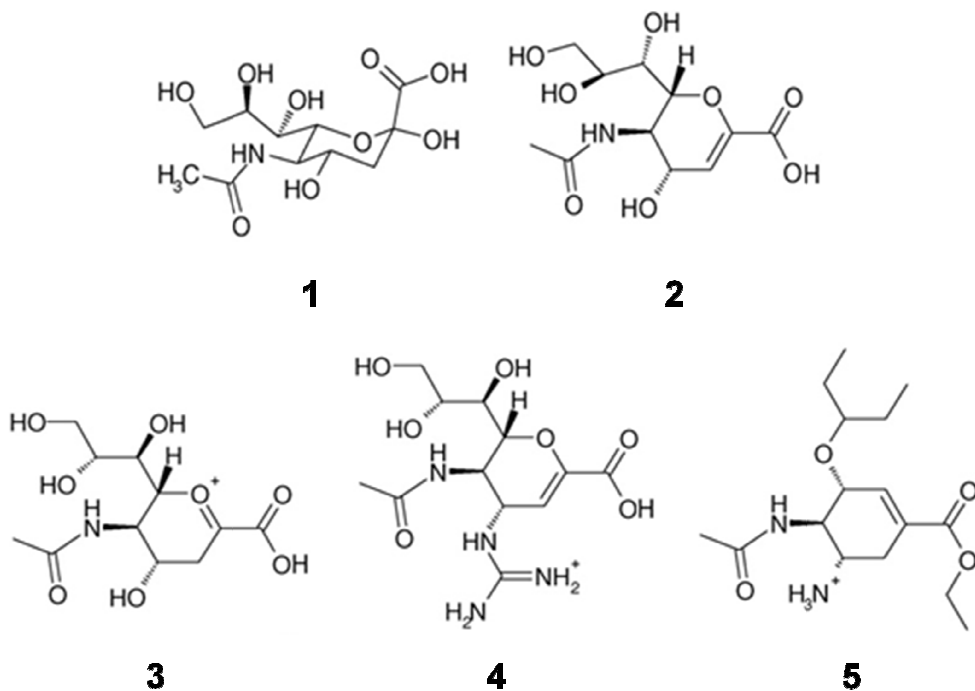
A reação bissubstrato catalisada pela TcTS acontece por um mecanismo de dupla troca ou Ping-Pong (DAMAGER *et al.*, 2008; AMAYA *et al.*, 2004), uma vez que o substrato aceptor, lactose por exemplo, somente se liga à enzima quando o ácido siálico já efetivamente ocupou o sítio ativo (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

1.7 Inibidores da TcTS

Acredita-se que a seletividade seja uma característica dos inibidores de TcTS, devido a ausência do alvo no organismo humano, capaz de sintetizar o ácido siálico. Tal suposição é corroborada pelo fato de que neuraminidases virais, homólogos relativamente distantes da TcTS, são seletivamente inibidas por fármacos miméticos do ácido siálico ou análogos do seu estado de transição, como o ácido 2-desoxi-2,3-

didesidro-D-N-acetilneuramínico **1** (DANA) (VON ITZTEIN *et al.*, 1993). Dentre esses, destacam-se o zanamivir **4** e o oseltamivir **5** (**Figura 7**), fármacos bastante seguros e potentes contra o vírus Influenza A e B, devido a sua seletividade pela sialidase viral (BRUNTON, 2006).

Figura 7 – Estruturas do ácido siálico (**1**) e seus derivados miméticos DANA (**2**), zanamivir (**4**) e oseltamivir (**5**). Em (**3**), o cátion sialosil oxacarbênio, análogo do estado de transição da reação de hidrólise de sialosídeos.

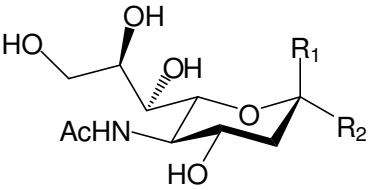
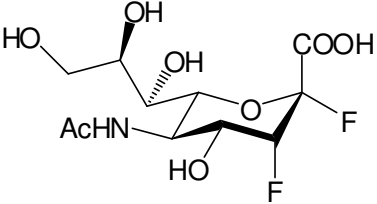
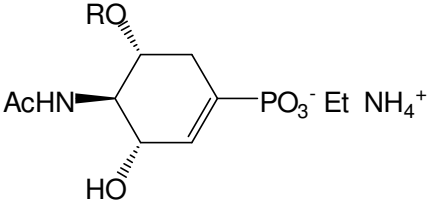
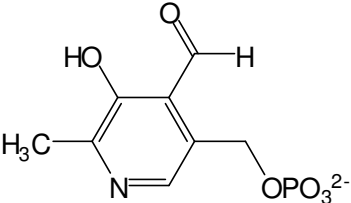
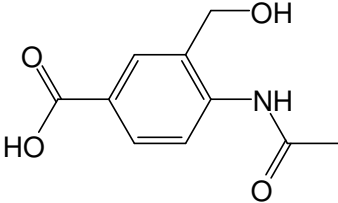
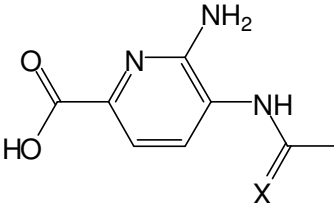


Apesar de todas as evidências anteriormente citadas, a TcTS não foi totalmente validada como alvo terapêutico, uma vez que a descoberta de pequenas moléculas, potentes inibidores da sua atividade enzimática, aconteceu somente a partir de 2009 e, portanto, a efetividade desses compostos no tratamento da doença de Chagas ainda não foi demonstrada. Os inibidores de sialidasas virais DANA ($K_i = 12,3 \text{ mM}$) e seus derivados, incluindo o zanamivir, falharam em inibir a TcTS (NERES *et al.*, 2007). Curiosamente, a sialidase de *Trypanosoma rangeli* é fortemente inibida por DANA ($K_i = 0,15 \text{ nM}$), a despeito de haver 70% de identidade na sequência do domínio catalítico dessa sialidase em relação a trans-sialidase homóloga do *Trypanosoma cruzi* (PARIS *et al.*, 2005).

Outros sialomiméticos, que conservam um grupo ácido para reproduzir a ligação iônica entre o ácido siálico e a tríade de argininas, foram ensaiados contra TcTS

(**Tabela 1**). Avaliou-se uma substituição bioisostérica do ácido carboxílico do ácido siálico por um grupo ácido fosfônico, obtendo-se excelentes inibidores de sialidases, mas não houve inibição de TcTS na concentração de 1mM (ENGSTLER *et al.*, 1994).

Tabela 1 – Sialomiméticos testados contra TcTS.

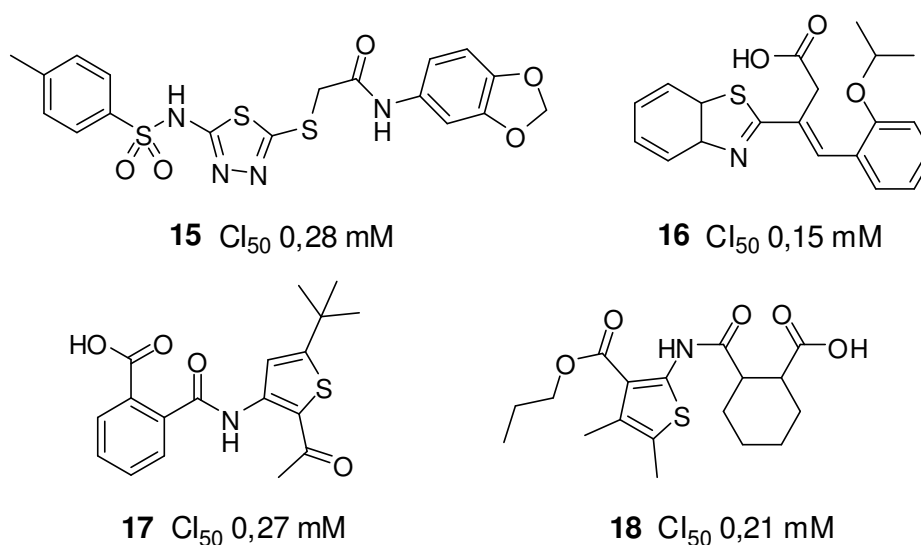
Sialomiméticos e inibição de TcTS		Referência
 <p>6 $R_1 = \text{PO}_3^{2-}$; $R_2 = \text{H}$ 7 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{PO}_3^{2-}$ (ambos, sem inibição a 1 mM)^a</p>	 <p>8 (completa inibição a 20 mM) inibidor covalente</p>	ENGSTLER, M. <i>et al.</i> , 1994 WATTS, A. G. <i>et al.</i> , 2003
 <p>9 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (Cl_{50} 4,7 mM)^a 10 $R_1 = \text{H}$ (Cl_{50} 5,7 mM)^a</p>	 <p>11 (K_i 7,3 mM)^a não-competitivo</p>	STREICHER, H.; BUSSE, H., 2006 FERRERO-GARCIA, M. A., 1993
 <p>12 ($K_i \sim 0,3$ mM - Cl_{50} 0,54 mM)^b não competitivo ou misto</p>	 <p>13 $X = \text{O}$ (Cl_{50} 0,44 mM)^b 14 $X = \text{S}$ (Cl_{50} 0,54 mM)^b</p>	NERES, J. <i>et al.</i> , 2007

a = Ensaio de transferência de ácido siálico; b = Ensaio de hidrólise de MuNANA.

Derivados monoésteres de ciclo-hexenofosfonato (derivados de DANA) também foram avaliados, mas não se observou atividade inibitória (STREICHER e BUSSE, 2006). O piridoxal fosfato **11** apresentou fraca inibição não-competitiva contra TcTS ($K_i = 7,3 \text{ mM}$), entretanto, seus análogos piridoxina, piridoxal e fosfato de piridoxamina são inativos (FERRERO-GARCIA *et al.*, 1993).

Neres e colaboradores, utilizando estratégias de simplificação molecular, sintetizaram sialomiméticos ácidos derivados de piridina e de ácido benzóico, porém os resultados foram demasiadamente modestos (**Tabela 1**; NERES *et al.*, 2007). Posteriormente, outras moléculas foram descobertas pelo grupo por meio de triagem *in silico*, com valores experimentais de Cl_{50} ligeiramente menores, porém da mesma ordem de grandeza (submilimolar) (**Figura 8**; NERES *et al.*, 2009)

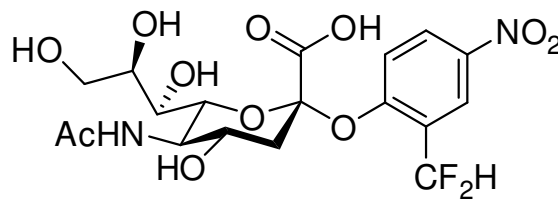
Figura 8 – Moléculas com maior atividade avaliadas por Neres e colaboradores e as respectivas Cl_{50} para TcTS.



Inibição covalente foi descrita para diferentes compostos fluorados. O ácido 2,3-difluorosiálico **8** apresenta perfil de inibição da TcTS tempo-dependente, resultante da formação de uma ligação covalente de C-2 com a hidroxila fenólica de Tyr342. Porém, completa inibição somente ocorre em elevadas concentrações do carboidrato (20 mM) e a enzima recobre atividade quando o excesso do ligante é eliminado (WATTS *et al.*, 2003). Mesmo perfil de inibição apresentou derivados de **8** acrescidos de grupos hidrofóbicos em C-9 (BUCHINI *et al.*, 2008). Por um mecanismo distinto, Carvalho e colaboradores relataram a inibição tempo-

dependente e irreversível por **19** (**Figura 9**), molécula capaz de inibir 50% da atividade enzimática a 0,6 mM após incubação e de reduzir em 34% a infecção de células LLC-MK2 a 1mM. Foi proposto que a aglicona do sialosídeo liga-se covalentemente aos resíduos Arg245 ou Asp247 (CARVALHO *et al.*, 2010a).

Figura 9 – Inibidor covalente avaliado por Carvalho e colaboradores.

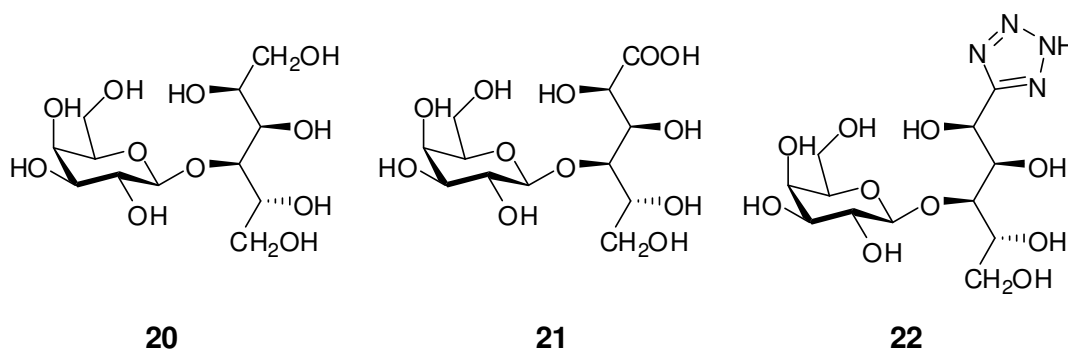


19

Uma vez que a trans-sialidase de *T. cruzi* possui um sítio de ligação à galactose, esse monossacarídeo constitui interessante modelo para proposição de derivados. O lactitol **20**, derivado de lactose constituído por uma galactose substituída em C-1 pelo polioliol glucitol (**Figura 10**), é um mimético do substrato acceptor de ácido siálico. Ocorre ávida competição do lactitol pela TcTS (K_i 0,57 mM), prevenindo a sialilação de lactose, *N*-acetil-lactosamina e β -D-galactopiranosídeo de 4-metilumbeliferila, um substrato fluorescente da TcTS (AGUSTÍ *et al.*, 2004). A sialilação de mucinas do *T. cruzi* é prevenida em concentrações milimolares pelo composto e a infecção de células mamíferas é reduzida em 20-27%. O lactitol, contudo, não é um inibidor efetivo, mas somente um substrato preferencial aos substratos convencionais (AGUSTÍ *et al.*, 2004).

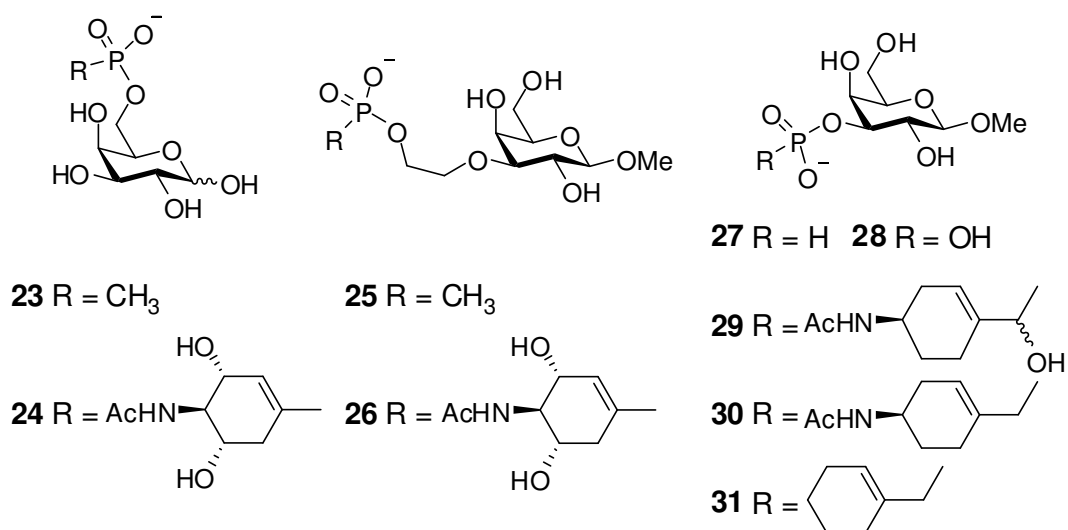
Derivados ácidos do lactitol, ácido lactobiônico **21** e lactotetrazol **22** (**Figura 10**) são inativos em ensaios de transferência de ácido siálico. Além disso, o ácido lactobiônico foi um bom substrato acceptor de ácido siálico nas condições experimentais utilizadas e, uma vez sialilado, também um bom substrato doador (AGUSTÍ *et al.*, 2004).

Figura 10 – Estruturas do lactitol, ácido lactobiônico e lactotetrazol.



Uma série de derivados fosfonatos de D-galactose **23-31** foram avaliados, mas não apresentaram boa atividade (**Figura 11**; BUSSE *et al.*, 2007).

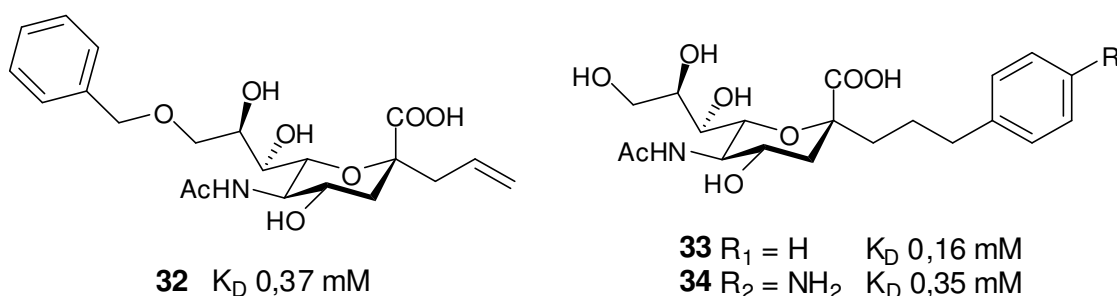
Figura 11 – Galactosídeos fosfonatos avaliados por Busse e colaboradores e as respectivas constantes de inibição (K_i) para TcTS.



Valores de K_i : **23**: >8 mM; **24**: sem inibição; **25**: ~3 mM; **26**: ~1,5 mM; **27**: >8 mM; **28**: >8 mM; **29**: ~8 mM; **30**: >8 mM; **31**: ~6 mM

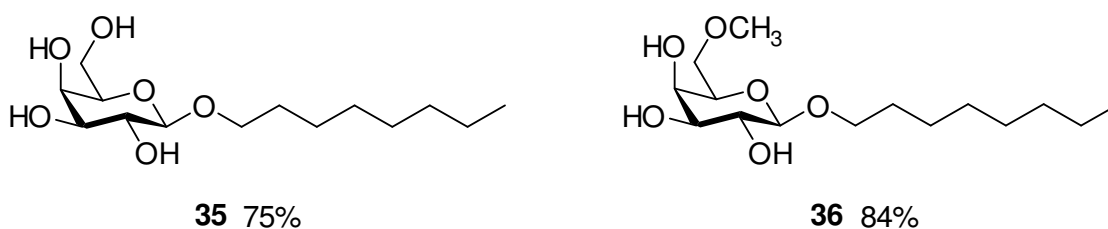
Inibição pouco maior, com valores de K_D submilimolares, foi observada para C-sialosídeos com resíduos aromáticos, sintetizados por metátase de olefinas e testados por ressonância plasmônica de superfície (**Figura 12**; MEINKE *et al.*, 2011).

Figura 12 – C-sialosídeos com maior atividade avaliados por Meinke e colaboradores e as respectivas constantes de dissociação (K_D) para TcTS.



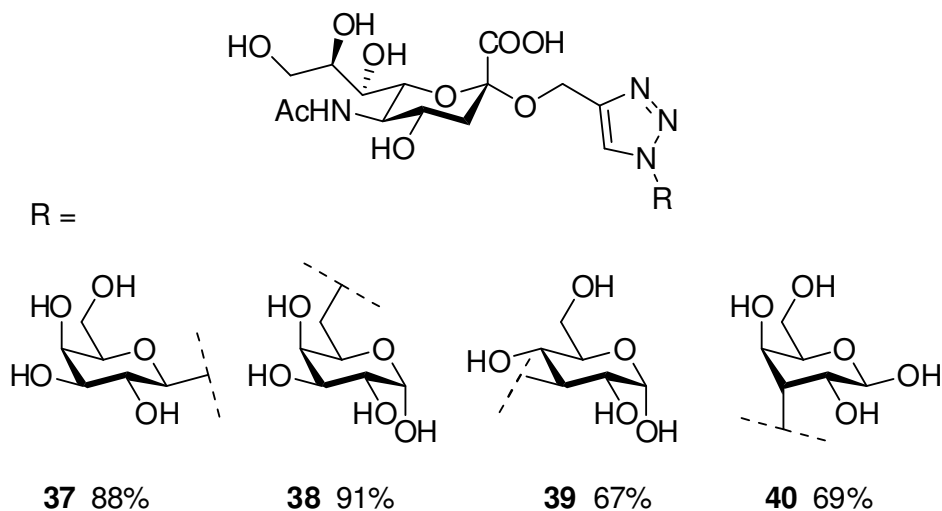
Uma biblioteca de galactosídeos, *N*-acetilactosaminas e tiogalactosídeos sistematicamente substituídos por diversos grupos químicos, foi avaliada quanto à atividade como inibidor e substrato de TcTS, por meio de ensaio radioquímico. Observou-se que o bloqueio ou substituição da hidroxila de C-3 é a modificação que mais reduz a capacidade aceptora de ácido siálico dessas moléculas, corroborando estudos anteriores. Quanto à atividade inibitória, os galactosídeos de octila não substituído **35** e o *O*-metilado em C-6 **36** (**Figura 13**) foram os melhores, apresentando 75 e 84% de inibição enzimática a 1 mM, respectivamente (HARRISON *et al.*, 2011).

Figura 13 - Galactosídeos com maior atividade avaliados por Harrison e colaboradores e as respectivas percentagens de inibição de TcTS a 1mM.



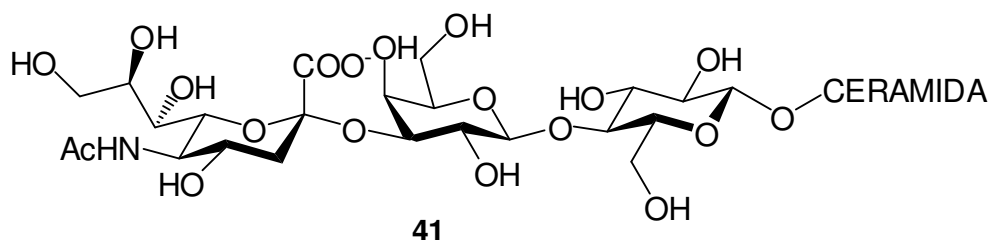
A avaliação de uma biblioteca de galactosídeos modificados em C-1 e C-6 e glicosídeos e gulosídeos modificados em C-3, contendo o núcleo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído, levou à descoberta de moléculas bastante promissoras (**Figura 14**). Esses compostos apresentaram altos índices de inibição na concentração 1 mM. A 0,5 mM o derivado **38** foi o mais ativo, inibindo 30% da atividade enzimática (CAMPO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2010b).

Figura 14 – Glicosídeos triazólicos com maior atividade avaliados por Campo e colaboradores e as respectivas porcentagens de inibição de TcTS a 1mM.



O gangliosídeo GM₃ **41** (**Figura 15**) é um bom substrato de TcTS e, interessante, análogos dessa molécula se mostraram bons inibidores de TcTS. O derivado desóxi em C-4 ou C-8 e o metóxi em C4 no resíduo de ácido siálico inibiram a trans-sialidase com valores de CI₅₀ que variam de 10-100 μM (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1992).

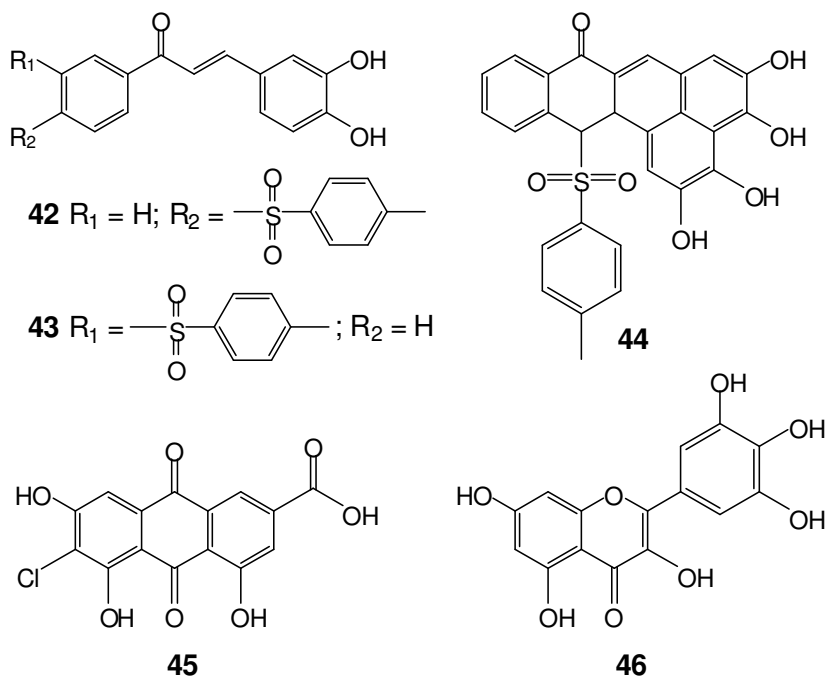
Figura 15 – Estrutura do gangliosídeo GM₃.



Em trabalhos independentes, substâncias poliaromáticas poliidroxiladas apareceram como potentes inibidores de TcTS, os mais promissores descobertos até o momento (**Figura 16**). Kim e colaboradores sintetizaram e ensaiaram chalconas hidroxiladas e quinolinas contendo sulfonamidas, obtendo-se CI₅₀ submicromolar (KIM *et al.*, 2009). Por meio de refinada triagem de um vasto banco de substâncias naturais, foi descoberto um grupo de flavonóides e antraquinonas, também com excelente

atividade inibitória sobre TcTS, sendo o composto **45** e a miricetina **46** os mais ativos de cada classe (ARIOKA *et al.*, 2010).

Figura 16 – Substâncias aromáticas hidroxiladas inibidores de TcTS e as respectivas CI_{50} .



Valores de CI_{50} – **42**: 2,5 μM ; **43**: 0,9 μM ; **44**: 0,6 μM ; **45**: 0,58 μM ; **46**: 17 μM

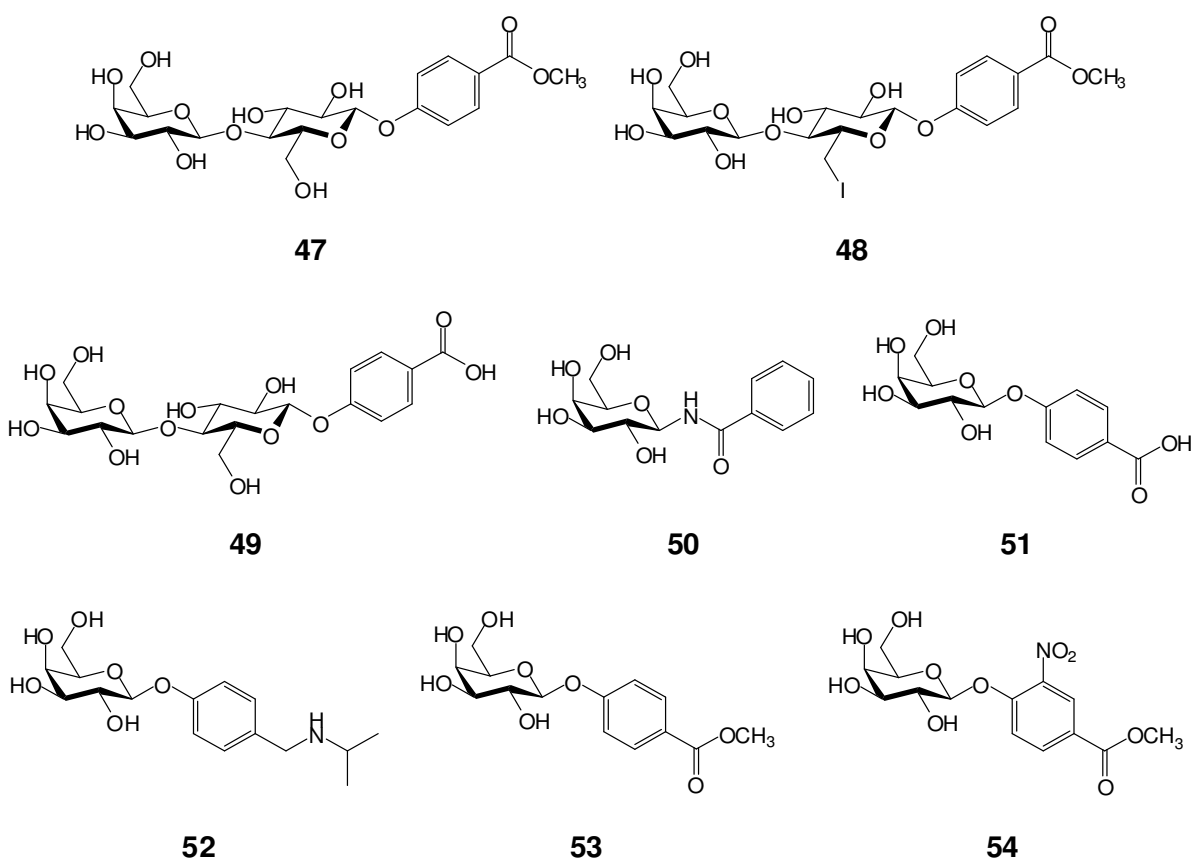
A despeito de muitos resultados negativos, importantes avanços foram feitos na busca de um inibidor, o que culminou na obtenção novos protótipos. Pode-se observar que a descoberta de potentes inibidores de TcTS está bastante desafiadora, pois nenhum planejamento racional foi totalmente inequívoco, apesar da elucidação de muitos aspectos estruturais da enzima. Isso é explicado, pelo menos em parte, pela complexidade e flexibilidade da macromolécula (DEMIR e ROITBERG 2009; NERES *et al.*, 2008), pois o encaixe induzido decorrente da interação ligante-enzima foi verificado desde a resolução da estrutura 3D da transialidase (AMAYA *et al.*, 2004; BUSCHIAZZO *et al.*, 2002) e tem sido paulatinamente melhor compreendido por meios de estudos cristalográficos e de modelagem molecular.

Os resíduos Tyr119 e Trp312 são apontados nos estudos como as principais subestruturas responsáveis pela plasticidade enzimática, pois estão em regiões de

loop, na entrada do sítio ativo e, devido a sua flexibilidade, modulam a afinidade dos ligantes pela macromolécula e vice-versa (BUSCHIAZZO *et al.*, 2012; MITCHELL *et al.*, 2010; DEMIR e ROITBERG, 2009). O primeiro aminoácido foi bloqueado pelo mais potente inibidor descrito de TcTS, um anticorpo monoclonal ($K_D \sim 0,72$ nM e $CI_{50} 0,056$ nM) (BUSCHIAZZO *et al.*, 2012).

No contexto do presente trabalho, derivados de lactose e D-galactose **47-54** sintetizados no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG (**Figura 17**) foram ensaiados com TcTS por espectrofluorimetria contínua, em colaboração com a Dra. Ivone Carvalho da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto. Não houve inibição significativa, os derivados mais ativos foram os compostos **49** e **54**, com 13 e 14% de inibição, respectivamente, na concentração de 1mM.

Figura 17 – Derivados de lactose e D-galactose sintetizados no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e testados contra TcTS.

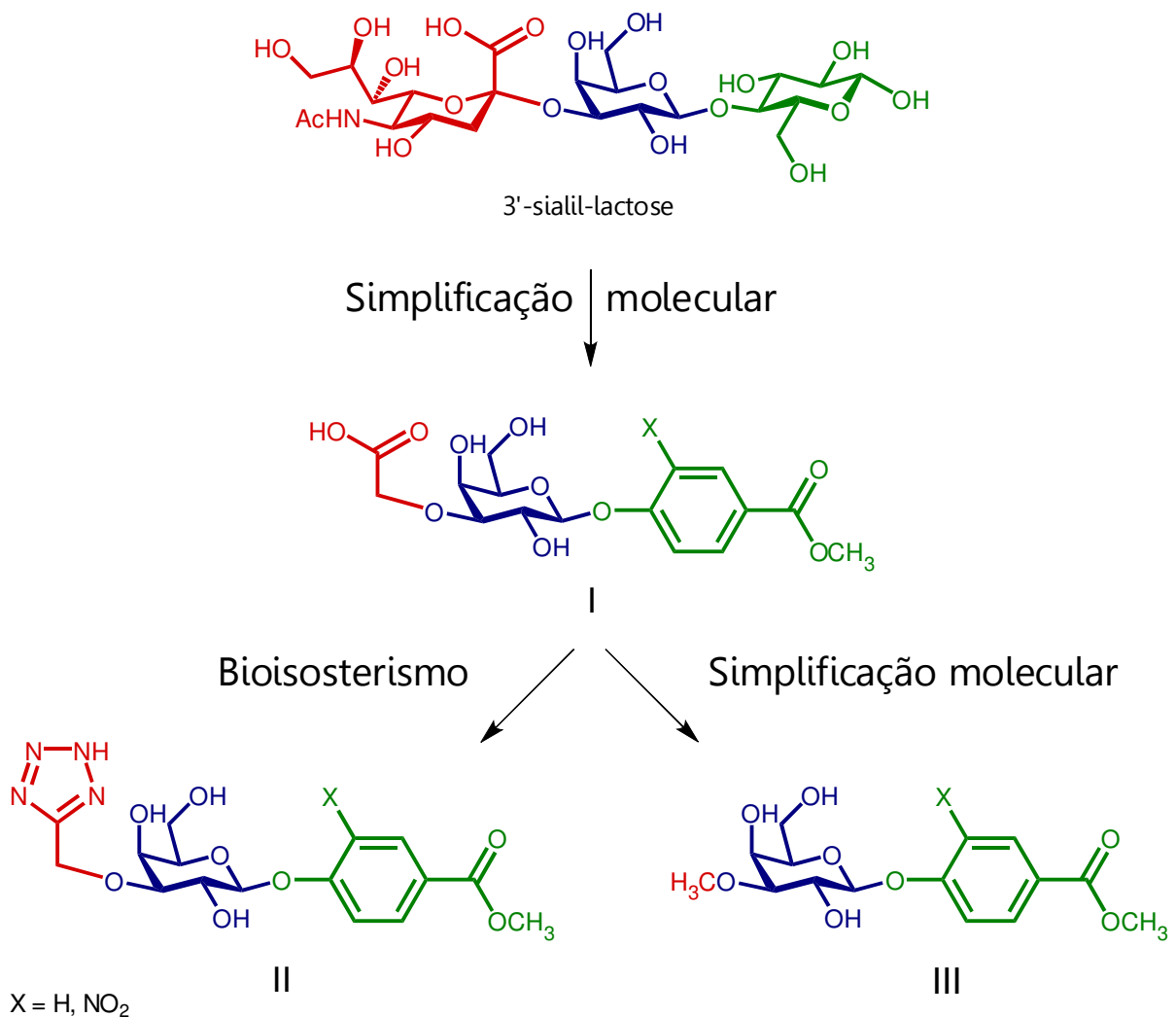


2 OBJETIVOS

Objetivou-se neste trabalho sintetizar e caracterizar espectrometricamente galactosídeos de arila 3-*O*-substituídos inibidores potenciais de TcTS. Almejou-se ainda avaliar a atividade inibitória dessas substâncias por meio de ensaio enzimático de hidrólise de MuNANA por espectrofluorimetria contínua (DOUGLAS *et al.*, 2006).

A estratégia utilizada para proposição de inibidores potenciais de TcTS com fácil acesso sintético consistiu em modificações moleculares do substrato doador de ácido siálico 3'-sialil-lactose (**Figura 18**). O núcleo de *D*-galactose, como discutido anteriormente, é um interessante arcabouço (*scaffold*) para proposição de inibidores e, portanto, foi mantido.

Figura 18 – Estratégias de modificação molecular utilizadas neste trabalho.



Por outro lado, o resíduo de glicose parece não ser essencial para uma boa interação do substrato com o sítio catalítico. Por análise do modo como a lactose interage com TcTS, por meio de cristalografia de raios-X do complexo enzima-ligante, pode-se observar que a glicose do dissacarídeo interage minimamente com a macromolécula, pois o resíduo está pouco penetrado na fenda catalítica. Somente uma ligação de hidrogênio mediada por água da hidroxila de C-3 da glicose com Arg311 foi encontrada (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002). Com efeito, esse pressuposto é corroborado por estudo de análogos de lactose que falharam em inibir a TcTS (AGUSTÍ *et al.*, 2004). Logo, foi proposta a substituição da porção correspondente à lactose por galactosídeos de arila, ou seja, planejou-se a troca do resíduo de glicose por um grupo aromático hidrofóbico.

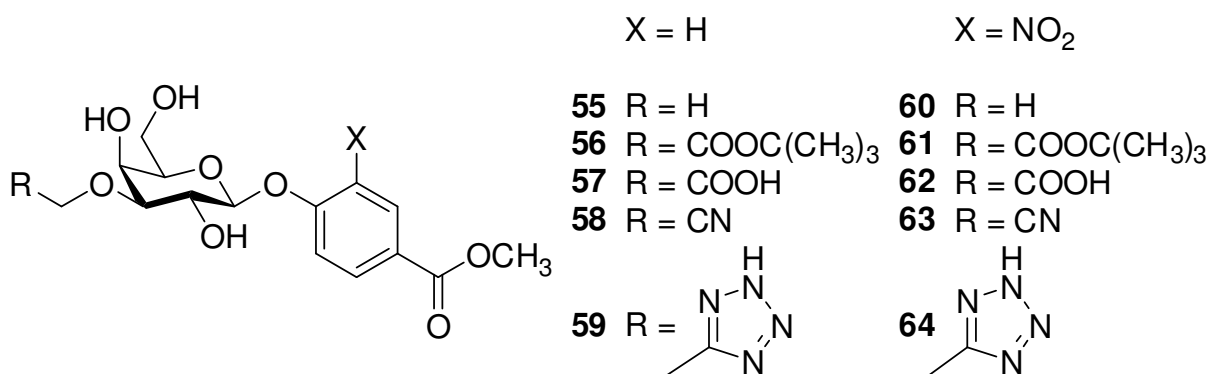
Foi proposta uma simplificação molecular da porção sialil do substrato, eliminando-se todos os centros quirais do resíduo de ácido siálico e originando estruturas do tipo I (**Figura 18**). A subestrutura foi substituída por um grupo carboximetila, o mais simples fragmento capaz de mimetizar a ligação iônica entre o grupo ácido carboxílico do substrato e a tríade de argininas (Arg 35, Arg245 e Arg314) do sítio catalítico enzimático. Planejou-se também a substituição bioisostérica do grupo carboxilato do fragmento carboximetila por um grupo 5-tetrazolil, originando estruturas do tipo II, com o intuito de se investigar a relevância de tal modificação para a atividade.

A adição de um grupo metila ao oxigênio de C-3, conforme estruturas do tipo III (**Figura 18**), foi proposta para se avaliar a importância do bloqueio dessa posição. Sem um grupo ácido, será possível avaliar a importância da ligação iônica acima citada para a ancoragem dos ligantes. Justificando ainda a seleção dessas estruturas, é importante ressaltar que, uma vez substituído, o oxigênio de C-3 perde seu caráter nucleofílico, logo nenhuma das estruturas propostas pode ser substrato aceptor de ácido siálico (**Figura 6**).

Assim colocado, foram propostos para síntese 10 galactosídeos de arila modificados em C-3 (**Figura 19**). A aglicona selecionada é o 4-hidroxibenzoato de metila (nipagin), que é facilmente disponível e contribui para o caráter hidrofóbico das substâncias. O grupo nitro foi adicionado porque o derivado galactosídico nitrado **50** previamente testado foi o que apresentou melhor inibição (**Figura 16**). Essas

agliconas aumentam a lipossolubilidade e o log *P* dos galactosídeos e contribuem para o balanço das propriedades hidrofílicas e lipofílicas das moléculas. Assim, pode-se explorar mais consistentemente o efeito hidrofóbico decorrente da interação ligante-enzima.

Figura 19 – Galactosídeos de arila modificados em C-3 propostos para síntese.



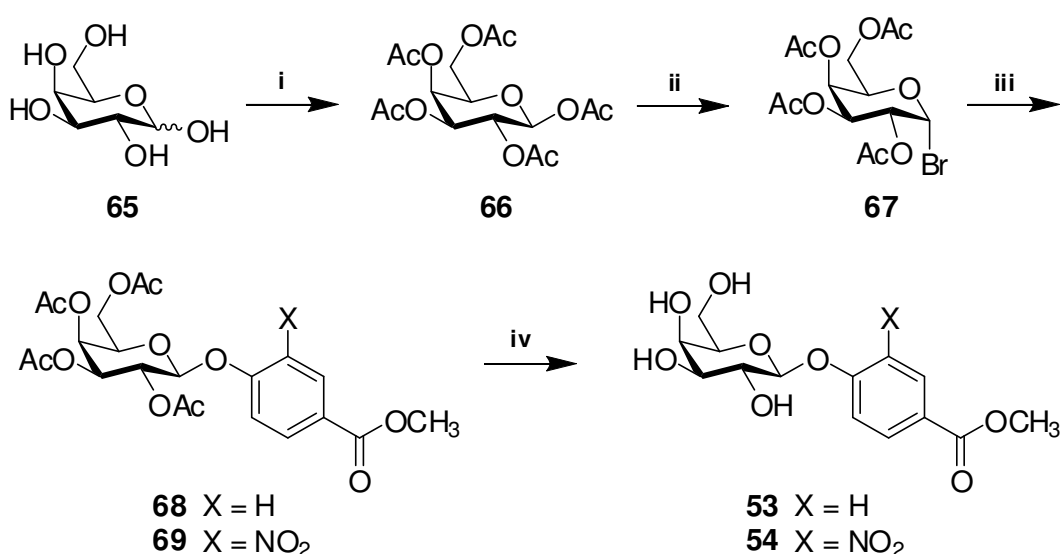
As substâncias **56**, **61**, **58** e **63**, que não se aplicam às estruturas tipo I, II ou III do planejamento anteriormente exposto, são intermediários de síntese, porém é objetivo neste trabalho realizar seus ensaios enzimáticos em conjunto com os outros galactosídeos sintetizados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese dos galactosídeos **53** e **54**

A síntese de **53** e **54** foi feita a partir de D-galactose, conforme mostrado na rota de síntese a seguir.

Figura 20 – Esquema de síntese de **53** e **54** a partir de D-galactose.



i) Ac₂O, AcONa, 100 °C; ii) HBr, Ac₂O, CH₂Cl₂, temperatura ambiente; iii) fenol correspondente, LiOH, acetona/H₂O, temperatura ambiente; iv) MeONa/MeOH, 0 °C

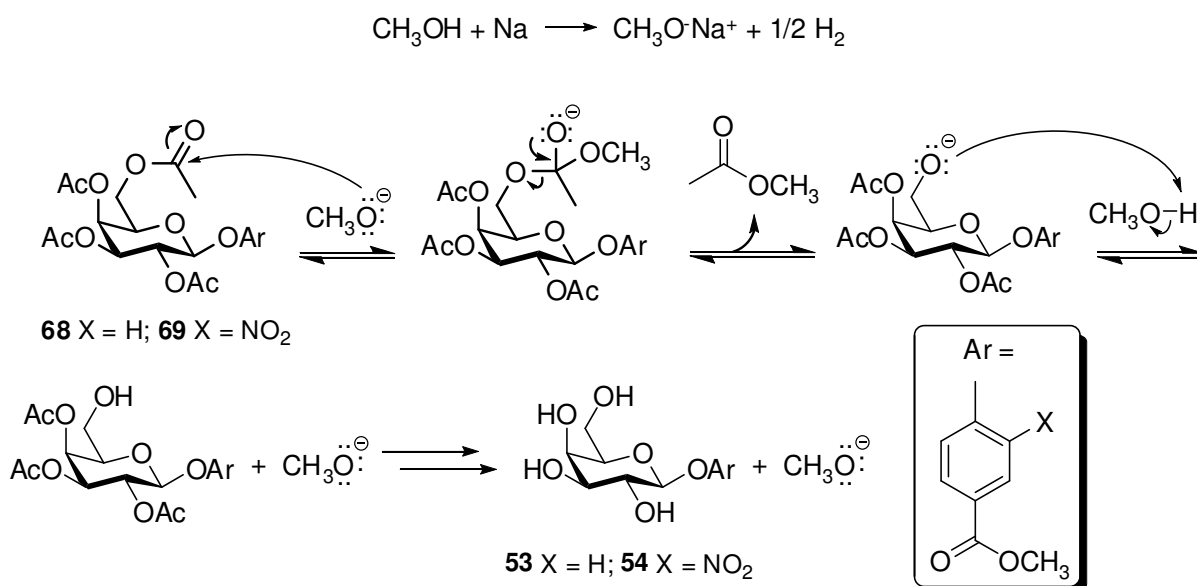
Utilizaram-se as condições experimentais estabelecidas no laboratório por Carvalho e colaboradores, que relataram a síntese de **53** e **54** (CARVALHO, 2008). Inicialmente, foi feita a peracetação de D-galactose com anidrido acético e acetato de sódio anidro, condições que produzem majoritariamente a forma anomérica β do produto, obtendo-se **66** com rendimento de 45%, após recristalização. Em seguida, produziu-se o brometo de galactopiranosila peracetilado **67** por meio da reação de **66** com solução acética de brometo de hidrogênio. O intermediário **67** foi obtido com 98% de rendimento.

Os haletos de O-acilglicosila são intermediários bastante úteis na síntese de glicosídeos de alquila/arila, sendo os brometos de acetilglicosila os mais comumente

utilizados, uma vez que eles são mais reativos do que os cloretos e mais estáveis do que os iodetos correspondentes (COLLINS e FERRIER, 1995). O haleto **67** foi utilizado imediatamente na etapa posterior, a síntese dos galactopiranosídeos de arila peracetilados por meio da reação de glicosilação de fenóis em meio alcalino (CONCHIE *et al.*, 1957). Os produtos **68** e **69** foram obtidos com rendimentos de 69 e 53%, respectivamente, após recristalização.

A síntese dos galactosídeos desacetilados **53** e **54** foi feita empregando-se o método de Zemplén (CONCHIE *et al.*, 1957), que consiste em uma transesterificação dos grupos ésteres do carboidrato com metóxido de sódio em metanol (**Figura 21**).

Figura 21 – Proposta mecanística de desacetilação de **68** e **69** pelo método de Zemplén.



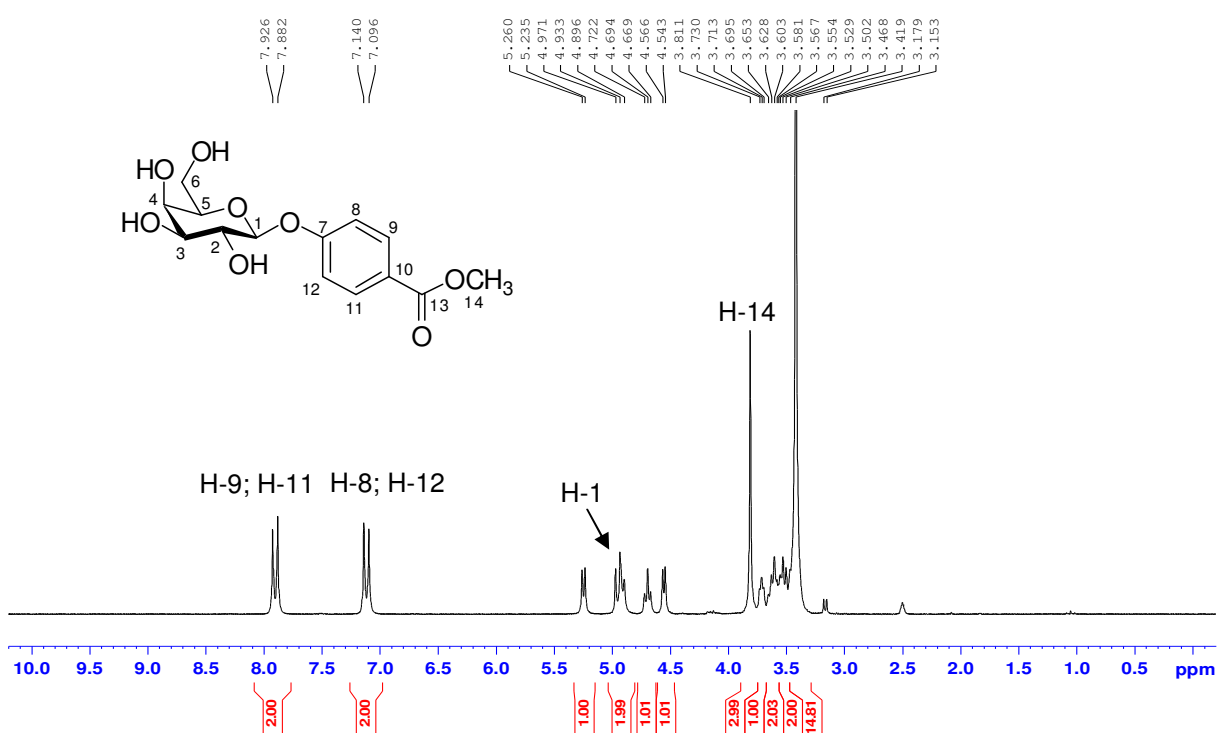
Por esse método, as reações são realizadas em condições brandas e fornecem os produtos com rendimento e pureza elevados. Os materiais de partida acetilados **68** e **69** são consumidos em apenas 15 minutos, quando ocorre precipitação parcial do produto correspondente, facilitando a percepção do término da reação. Os produtos **53** e **54** foram obtidos com rendimentos de 91 e 86%, respectivamente.

Os galactosídeos desprotegidos foram caracterizados por ponto de fusão, $[\alpha]_D$, espectrometria no infravermelho, de RMN de ¹H, ¹³C e subespectro DEPT-135. No espectro no infravermelho (páginas 97 e 100, para os derivados **53** e **54**, respectivamente), observam-se bandas de estiramento de ligação C=C e C=O (1674

cm⁻¹ para **53**; 1725 cm⁻¹ para **54**), compatíveis com a estrutura da aglicona. No espectro do galactosídeo nitrado também são observadas bandas de estiramento do grupo nitro em 1532 e 1361 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H (páginas 98 e 101, para os derivados **53** e **54**, respectivamente) podem ser identificados os sinais da metoxila e dos hidrogênios aromáticos, compatíveis com o padrão de substituição do anel benzênico. Há um duplete correspondente ao hidrogênio anomérico com deslocamento químico em torno de 5 ppm e constante de acoplamento $J_{1,2}$ de 7,6 Hz, o que confirma a obtenção dos produtos **53** e **54** na forma anomérica β, como pode ser observado na **Figura 22**.

Figura 22 – Espectro de RMN de ¹H de **53** (200 MHz, DMSO-*d*₆).



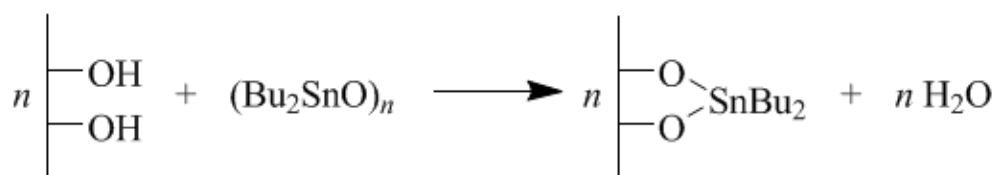
3.2 Alquilação 3-*O*-seletiva dos galactosídeos **53** e **54**

A alquilação regiosseletiva da hidroxila de C-3 dos galactosídeos **53** e **54** foi realizada via compostos organoestanho como intermediários. Sabe-se que a complexação de grupos hidroxila com óxido de dibutilestanho aumenta a nucleofilia dos átomos de oxigênio envolvidos e os tornam mais reativos do que hidroxilas livres

na presença de reagentes eletrofílicos. Logo, a complexação seletiva de hidroxilas específicas de poliois pode, conseqüentemente, modificar as reatividades relativas desses grupos, permitindo a realização de alquilações, acilações e oxidações regioseletivas em substâncias poliidroxiladas como os carboidratos. Assim, evita-se ou minimiza-se o uso das técnicas de bloqueio/desbloqueio de grupos que não estão envolvidos diretamente na reação de interesse (COLLINS e FERRIER, 1995).

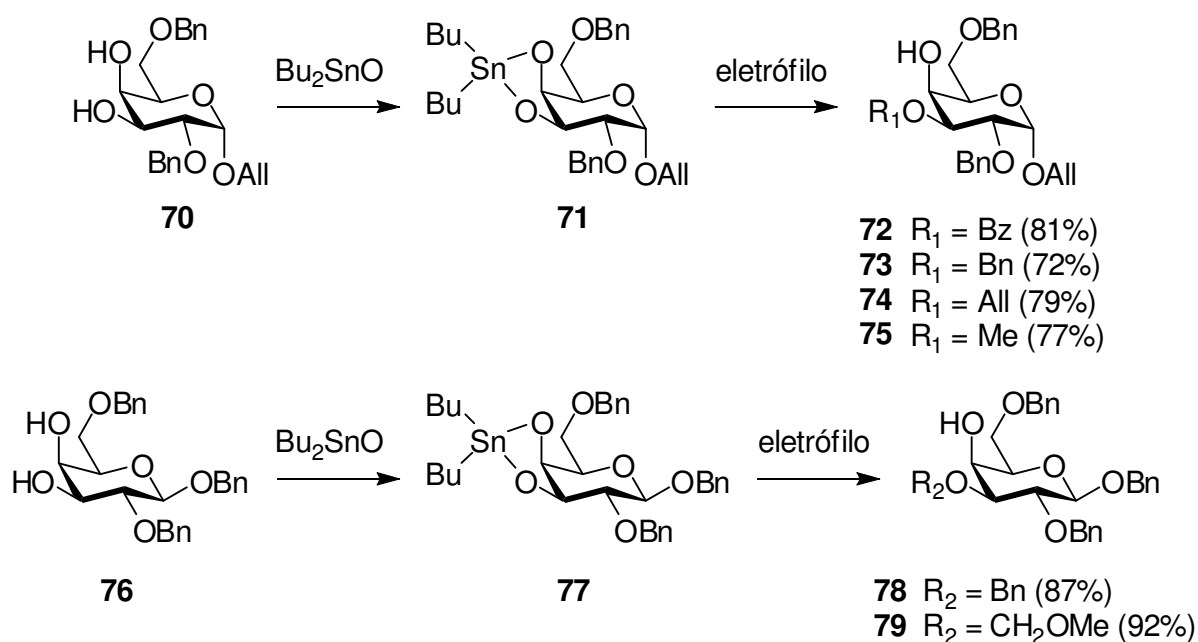
Hidroxilas de carboidratos são queladas pelo óxido de dibutilestanho produzindo derivados cíclicos estanilados. O complexo é obtido quantitativamente preparando-se em metanol sob refluxo uma mistura do material de partida hidroxilado com o óxido de dibutilestanho, em quantidades estequiométricas, conforme a reação a seguir (DAVID e HANESSIAN, 1985).

Figura 23 – Reação de complexação entre grupos hidroxilas de um poliol e o óxido de dibutilestanho.



O óxido de dibutilestanho, empregado inicialmente em acilações seletivas de ribonucleosídeos, tem importante aplicabilidade em modificações seletivas de monossacarídeos hexapiranosídicos, incluindo β -galactosídeos de alquila. Descobriu-se que galactosídeos parcialmente protegidos com somente as hidroxilas de C-3 e C-4 livres complexam com o óxido de dibutilestanho e o complexo obtido reage com eletrófilos, originando majoritariamente produtos modificados em C-3 com elevado rendimento (**Figura 24**; DAVID *et al.*, 1981; NASHED e ANDERSON, 1976).

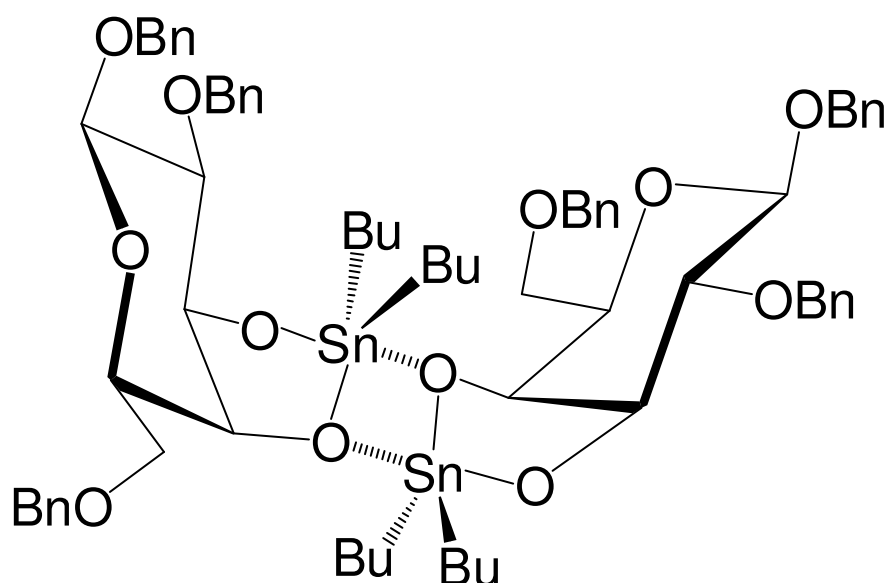
Figura 24 – Exemplos de modificação regioseletiva da hidroxila de C-3 de galactosídeos parcialmente protegidos.



Bz = benzoíla; Bn = benzila; All = alila; Me = metila

A regioseletividade observada nessas reações é explicada conjuntamente por uma série de fatores estruturais característicos do intermediário organometálico (DAVID e HANESSIAN, 1985). Verificou-se que o óxido de dibutilestanho complexa preferencialmente com hidroxilas vicinais dos monossacarídeos formando um anel de cinco membros, como pode ser observado nas estruturas **71** e **77**. Em solventes apolares, contudo, propõe-se que o derivado estanilado exista em equilíbrio com uma forma dimérica, na qual o átomo de estanho é pentacoordenado e possui um arranjo de bipirâmide trigonal (**Figura 25**).

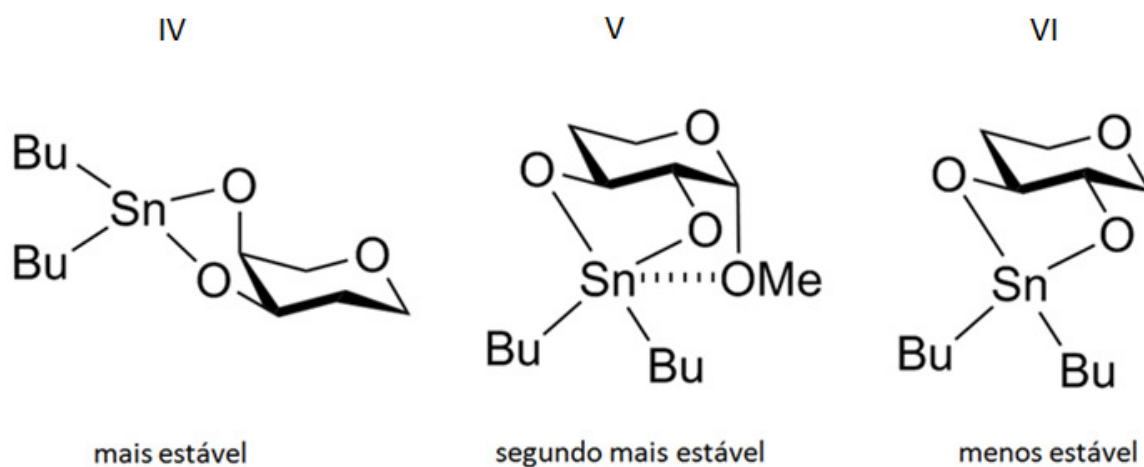
Figura 25 – Estrutura dimérica proposta para o organoestanho 77.



Nesse dímero os átomos de oxigênio de C-3 são bicoordenados e estão em posições apicais, ao passo que os átomos de oxigênio de C-4 são tricoordenados e estão em posições equatoriais com relação ao átomo de estanho. Os primeiros são estericamente menos impedidos e aceptores de maior densidade eletrônica proveniente da ligação Sn-O do que os segundos, logo o caráter nucleofílico dos oxigênios de C-3 é maior do que os de C-4 (DAVID e HANESSIAN, 1985). A estrutura dimérica foi confirmada para diferentes complexos estanilados de monossacarídeos por experimentos de cristalografia de raios-X e de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{119}Sn em solução (CAMERON *et al.*, 1992; GRINDLEY e THANGARASA, 1990; SMITH *et al.*, 1972).

O método do óxido de dibutilestanho também foi utilizado em modificações seletivas de glicosídeos totalmente desprotegidos, destacando-se o estudo abrangente de Haque e colaboradores (HAQUE *et al.*, 1985; TSUDA *et al.*, 1983; MUNAVU e SZMANT, 1976; GONÇALVES *et al.*, 2005; DAVID *et al.* 1991). Devido à presença de vários grupos hidroxilas nesses carboidratos, complexos com diferentes arranjos podem ser obtidos. Constatou-se, entretanto, que aqueles que possuem as hidroxilas queladas com configuração cis (axial-equatorial) são mais estáveis e, portanto, formam-se preferencialmente (**Figura 26**).

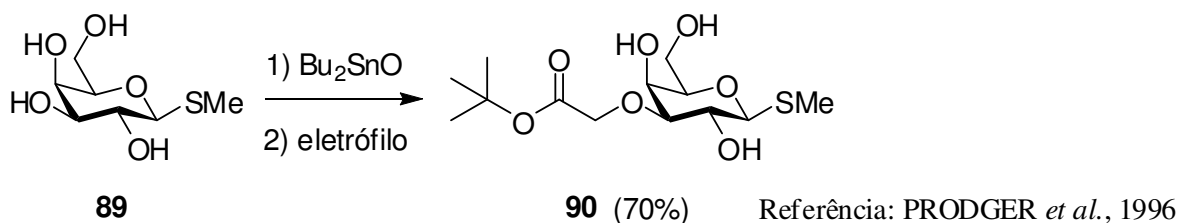
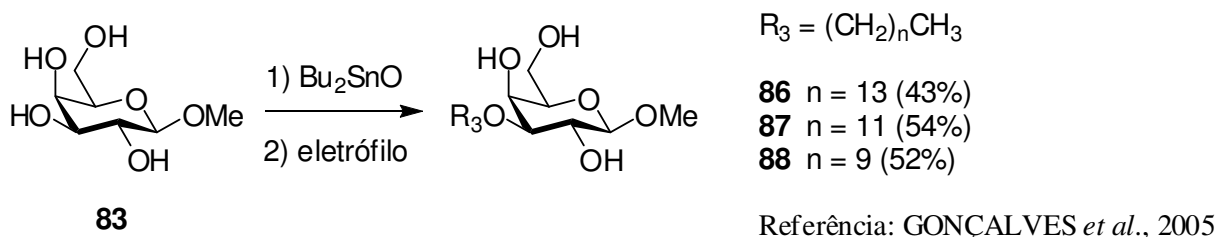
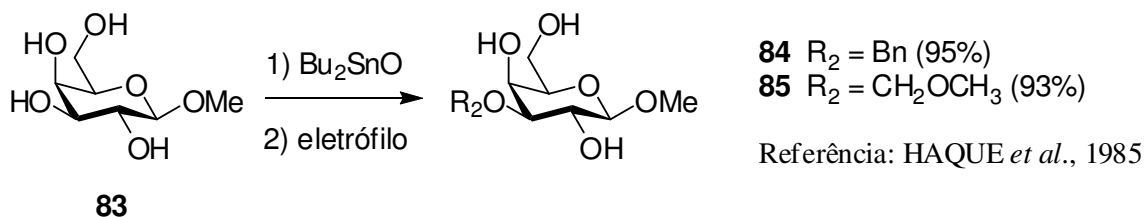
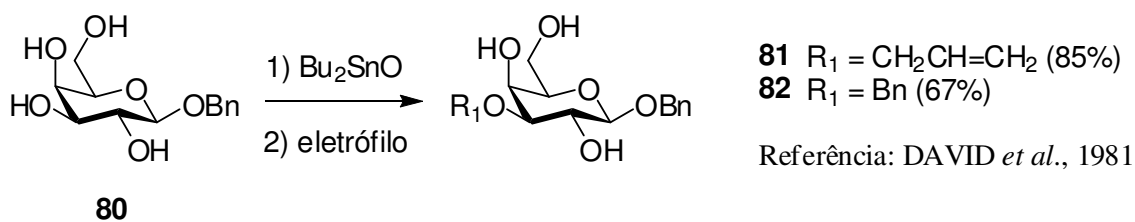
Figura 26 – Configuração dos organoestanhos formados pela complexação de glicosídeos desprotegidos com óxido de dibutilestanho.



A estrutura sacarídica foi simplificada para facilitar a visualização

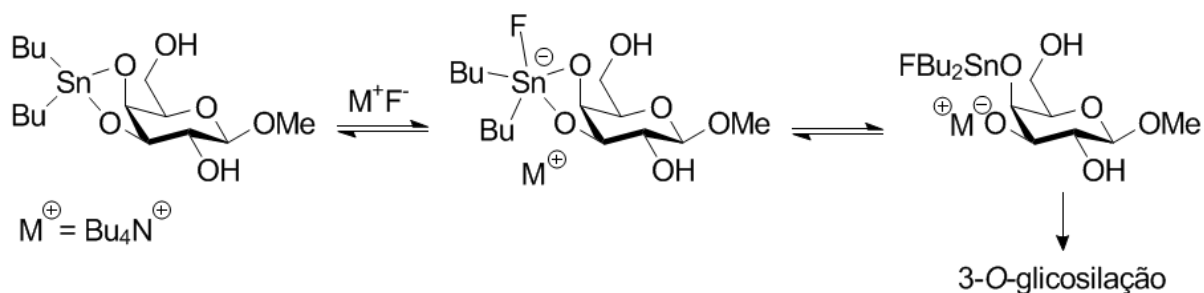
Observou-se também que todos os complexos do tipo IV, ativam seletivamente o oxigênio equatorial (localizado na posição apical do dímero) em reações de substituição nucleofílica, corroborando a proposta dimérica apresentada anteriormente. Logo, galactosídeos totalmente desprotegidos também são modificados seletivamente em C-3 pelo método do óxido de dibutilestanho. Este foi bastante eficiente em reações de alquilação 3-O-seletivas em β -galactopiranosídeos de metila e benzila (**Figura 27**).

Figura 27 – Exemplos de modificação regioseletiva da hidroxila de C-3 de derivados galactosídicos totalmente desprotegidos.



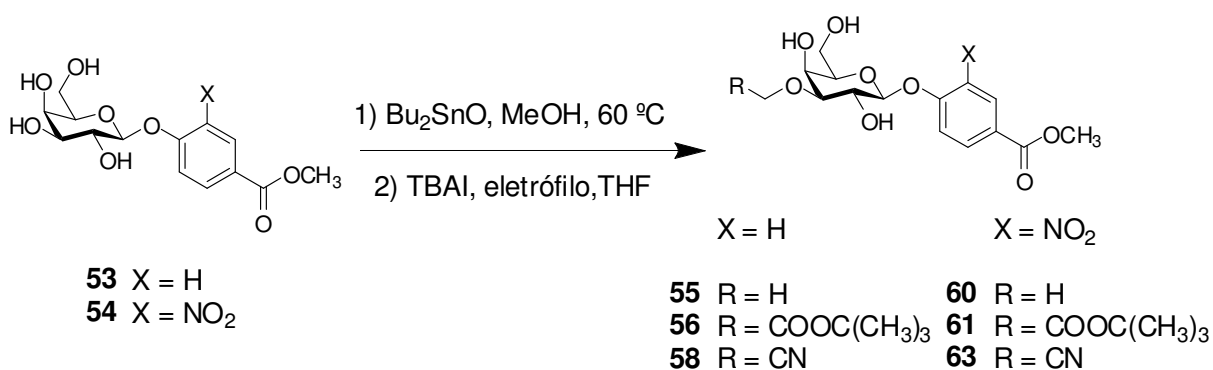
Alais e Veyrières relataram um aumento da velocidade da reação de alquilação seletiva de derivados manopiranosídicos pelo uso de 0,1-0,3 equivalente de haletos de tetrabutilamônio (ALAIS e VEYRIÈRES, 1981). O uso de sais de flúor como catalisador em reações em que se utilizam óxido de dibutilestanho também foi relatado (NAGASHIMA e OHNO, 1991). Foi proposto, então, que os ânions haleto coordenam com o estanho no complexo estanilado formando um par iônico e, posteriormente, um ânion alcóxido nucleofílico (**Figura 28**; ALAIS e VEYRIÈRES, 1981; NAGASHIMA e OHNO, 1991; DAVID *et al.*, 1981; KAJI *et al.*, 2003).

Figura 28 – Mecanismo simplificado proposto por Kaji e colaboradores para 3-*O*-glicosilação do galactosídeo de metila catalisada por Bu₄NF.



Neste trabalho, os produtos de 3-*O*-alquilação dos galactosídeos **53** e **54** foram obtidos pelo método do óxido de dibutilestanho nas condições experimentais relatadas por Prodger e colaboradores (**Figura 29**; PRODGER *et al.*, 1996). A complexação de **53** e **54** com Bu₂SnO foi realizada em metanol e ocorreu com variação da turbidez da reação, conforme descrito na literatura (HAQUE *et al.*, 1985). Os meios de reação, inicialmente turvos, ficaram totalmente límpidos após uma hora aproximadamente. Ao término da reação, o metanol foi removido, uma vez que a etapa posterior de alquilação é feita em THF, um solvente aprótico. Foi obtido um sólido branco (complexo de **53**) ou amarelo (complexo de **54**), utilizado em seguida sem purificação e caracterização. Para a alquilação propriamente dita foram adicionados ao complexo estanilado THF anidro, o eletrófilo correspondente e, como catalisador, iodeto de tetrabutilamônio (TBAI).

Figura 29 – Etapa de 3-*O*-modificação dos galactosídeos **53** e **54**.

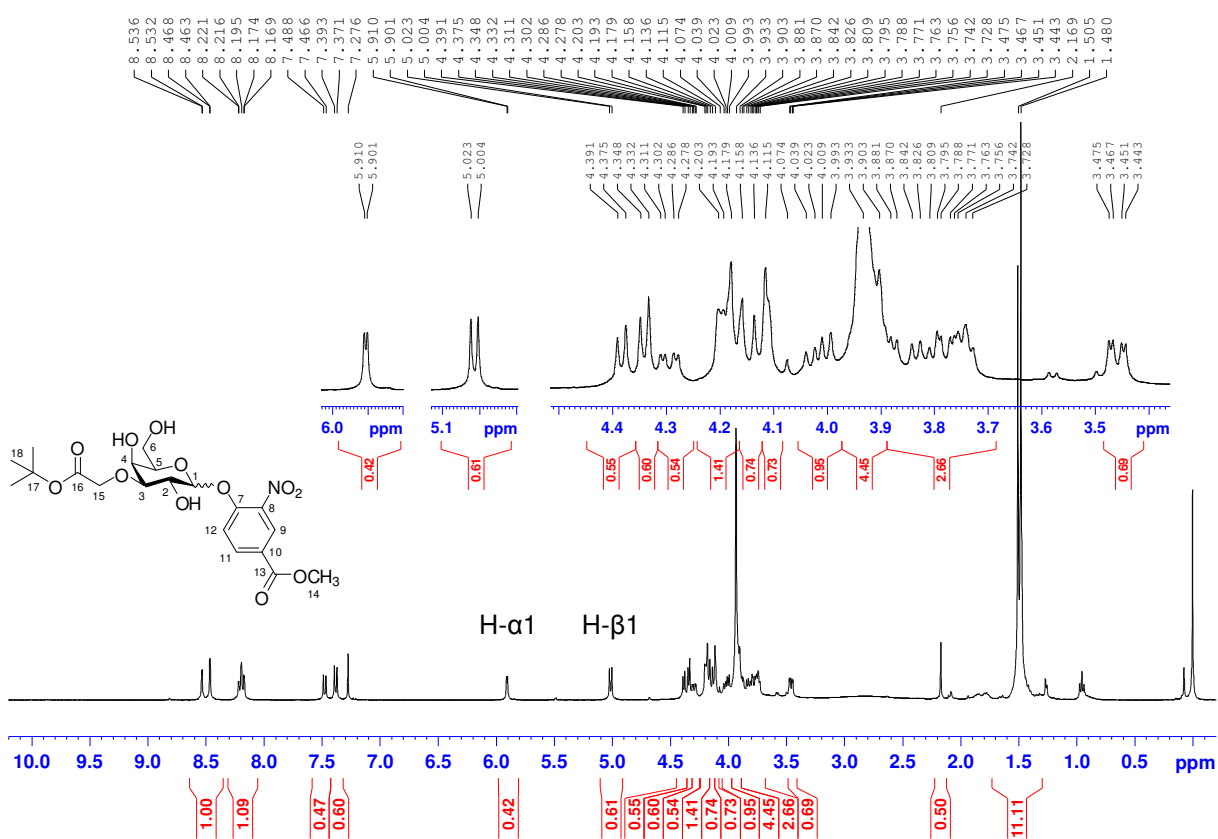


Foram obtidos rendimentos modestos a elevados: **55** (54%), **60** (32%), **56** (82%), **61** (73%), **58** (61%), **63** (64%). Os produtos foram obtidos com elevada pureza por CCS

do material bruto de reação, porém as nitrilas **58** e **63** e os derivados metilados **55** e **60** precisaram ser recromatografados para eliminação de contaminação residual. Esta foi atribuída, com base nos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos materiais contaminados, ao iodeto de tetrabutilamônio. O contaminante, que em CCD revela positivamente em vapores de iodo, foi removido por CCS adicional (eluente: acetato de etila).

Apesar de a etapa de alquilação ser realizada em solução diluída em THF a $60\text{ }^\circ\text{C}$, condições bastante suaves, ocorreu anomerização nas reações dos derivados nitrados, como pode ser observado no espectro de RMN de ^1H de **61** após purificação por CCS. (**Figura 30**).

Figura 30 – Espectro de RMN de ^1H dos anômeros α e β de **59**.



Esse resultado foi contornado com o abaixamento da temperatura de reação para temperatura ambiente, o que resultou em um aumento de cerca de 100% do tempo de reação. No entanto, ambas as reações de metilação, tanto a síntese do derivado

nitrado **60**, quanto do não-nitrado **55**, foram conduzidas por tempos iguais. Assim, atribui-se à diferença de temperatura, a grande diferença de rendimento observada na síntese desses compostos.

As reações de metilação foram bastante lentas e não houve consumo completo do material de partida. Após 4 dias de reação, quando não mais se observou por CCD progresso significativo da reação, decidiu-se elaborá-las. Esses resultados são concordantes com os de Haque e colaboradores, que realizaram metilações pelo mesmo método, porém em condições mais drásticas de reação do que outras alquilações, como temperatura elevada (100 °C) e grande excesso do agente alquilante (até 30 equivalentes de iodeto de metila) (HAQUE *et al.*, 1985).

Em termos mecanísticos, os eletrófilos utilizados, iodeto de metila, bromoacetato de terc-butila e bromoacetonitrila, reagem via S_N2. Porém, na reação do eletrófilo α -bromocarbonílico, o estado de transição é estabilizado pela carbonila, devido à sobreposição do orbital molecular antiligante π^* da ligação C=O com o orbital p ocupado do oxigênio nucleofílico (CLAYDEN *et al.*, 2001). Esse efeito ativador do caráter eletrofílico do carbono ligado ao halogênio ocorre similarmente no bromoacetonitrila, mas não ocorre no iodeto de metila. Justifica-se, assim, a menor reatividade deste eletrófilo, a despeito do seu menor impedimento estérico.

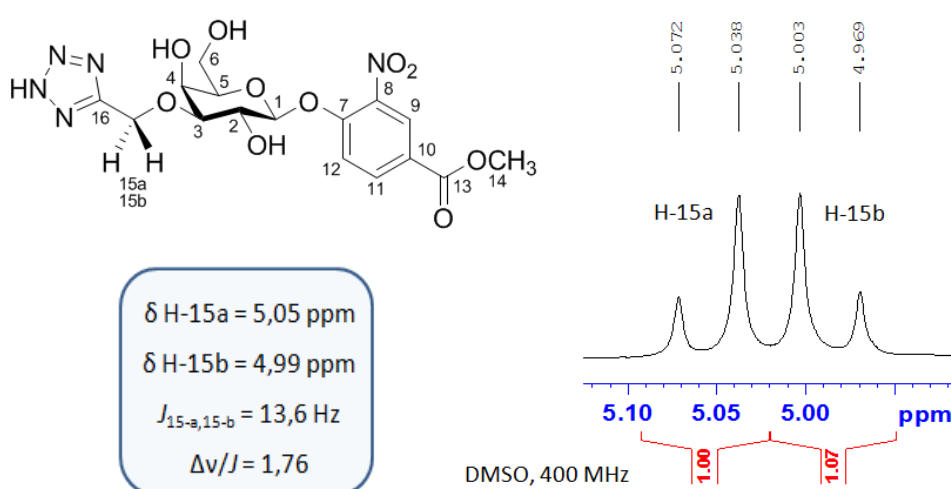
3.3 Análise espectral dos produtos modificados em C-3

Os produtos modificados em C-3 foram caracterizados por faixa de fusão, $[\alpha]_D$, espectrometria no infravermelho, de RMN de ¹H, ¹³C, subespectro DEPT-135, mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC. Todos tiveram sua identidade química confirmada pelos métodos espectrométricos. Para facilitar a análise espectral dos compostos, atribuiu-se, em todas as moléculas, o número 15 ao grupo (metila ou metileno) diretamente ligado ao oxigênio de C-3.

Algumas características espectrais importantes na identificação dos compostos são comuns nos espectros dessas substâncias. Nos mapas de contornos HMBC são observadas as correlações H-3xC-15 e H-15xC-3. Conclui-se, assim, que as alquilações ocorreram seletivamente na posição 3, conforme descrito na literatura.

Os espectros de RMN de H^1 dos produtos que possuem um metileno na posição 15 contêm sinais espectrais de segunda ordem. Os sinais desses hidrogênios metilênicos (H-15a e H-15b) são dupletos com constantes de acoplamento geminal elevadas de 14-17 Hz. Eles formam um sistema de acoplamento de spin do tipo AB e o valor da razão $\Delta\nu/J$ é bem reduzido, logo o “efeito telhado” é bastante pronunciado nesses sinais (**Figura 31**).

Figura 31 – Sinais de hidrogênios metilênicos α -tetrazólicos no espectro de RMN de 1H de **64**.

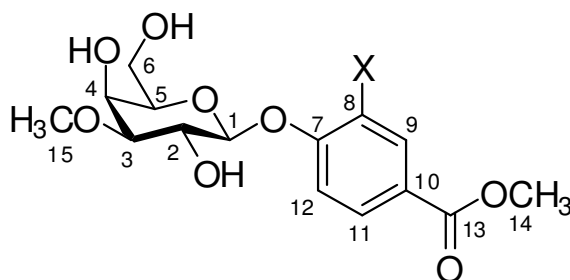


O deslocamento químico dos sinais de H-15 variou bastante conforme a vizinhança. O sinal de H-15a (hidrogênio metilênico mais desprotegido) do derivado tetrazólico **64** está a δ 5,05 ppm, ao passo que o sinal correspondente do derivado ácido **55** está a δ 3,79 ppm. Os hidrogênios H-15 de **64** estão no cone de desproteção do anel tetrazólico, que possui um efeito de anisotropia diamagnética bastante intenso, enquanto que o efeito anisotrópico da carbonila sobre os hidrogênios H-15 de **55** é mais fraco.

Observou-se também que não houve acoplamento eficiente entre os hidrogênios H-4 e H-5. Em todos os espectros de RMN de 1H , somente a constante de acoplamento $J_{4,3}$ foi encontrada no sinal de H-4, com exceção dos espectros de **58** e **63** nos quais também se observou acoplamento entre H-4 e OH-4. Além disso, corroborando esses achados, não se observa correlação entre H-4 e H-5 no mapa de contornos COSY dos produtos modificados em C-3. De acordo com esse resultado, o valor da

constante de acoplamento $J_{4,5}$ do galactopiranosídeo de metila encontrado na literatura é bastante reduzido, de apenas 0,8 Hz (BOCK e THØGERSEN, 1982).

3.3.1 Caracterização dos galactosídeos 55 e 60

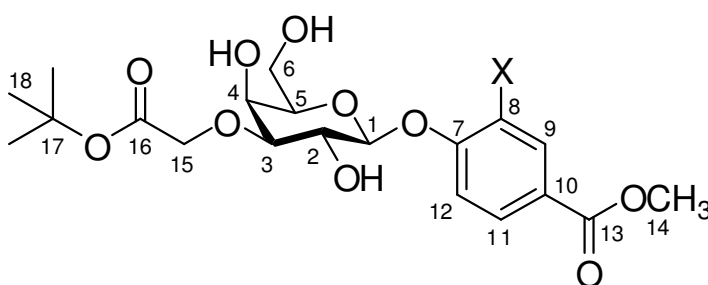


55 X = H; **60** X = NO₂

No espectro de RMN de ¹H do produto **55** (página 104) são observados dois simples a δ 3,77 e 3,60 ppm, que correspondem às metoxilas da molécula. No espectro de RMN de ¹H do produto nitrado **60** (página 134) os sinais dos grupos metoxila estão a δ 3,79 e 3,60 ppm. O sinal de maior deslocamento químico corresponde à metoxila do éster aromático, devido ao efeito anisotrópico da carbonila.

Diferentemente, no espectro de RMN de ¹³C o sinal de maior deslocamento químico corresponde à metoxila do carboidrato. No espectro de RMN de ¹³C de **55** (página 105) os sinais dos referidos grupos estão a δ 57,3 e 51,7 ppm, enquanto que, no espectro de RMN de ¹³C de **60** (página 135), esses sinais estão a δ 57,3 e 52,3 ppm.

3.3.2 Caracterização dos galactosídeos 56 e 61



56 X = H; **61** X = NO₂

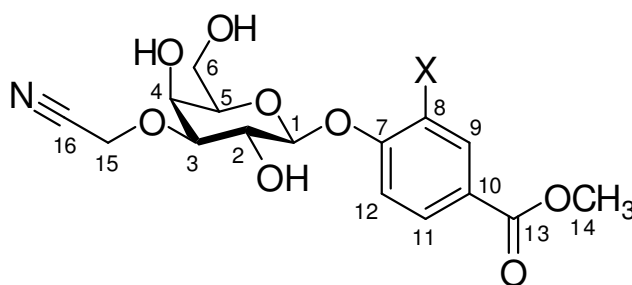
No espectro no infravermelho de **56** e **61** (páginas 108 e 138, respectivamente) há duas bandas de estiramento C=O, uma da carbonila alifática e outra da aromática, sendo que a primeira é observada em maior frequência (1721 e 1697 cm^{-1} , para o derivado **56**; 1730 e 1718 cm^{-1} , para o derivado **61**).

No espectro de RMN de ^1H de ambas as moléculas (página 109, para o derivado **56**; página 139, para o derivado **61**) observa-se o simpleto relativo aos hidrogênios terc-butílicos com integral correspondendo a nove átomos a δ 1,49 ppm. São observados também dois dupletos parcialmente sobrepostos ao sinal de H-2, que correspondem aos hidrogênios metilênicos H-15a e H-15b do substituinte em C-3. Eles estão a δ 4,26 e 4,15 ppm no espectro do composto **56** e a δ 4,36 e 4,16 ppm no espectro do composto nitrado **61**. Nesses sinais, há uma constante de acoplamento elevada $J_{15a,15b}$ de 17,2 Hz, característica de acoplamento de hidrogênios geminais.

No subespectro DEPT-135 de **56** e **61** (páginas 111 e 141, respectivamente), os sinais de C-15 estão a δ 68,1 e 68,7 ppm, respectivamente. Devido ao efeito anisotrópico da carbonila adjacente ao metileno, tanto os hidrogênios quanto o carbono desse grupo são mais desprotegidos do que os respectivos átomos do metileno 6 do núcleo de D-galactose.

No espectro de RMN de ^{13}C de **56** e **61** (páginas 111 e 141, respectivamente), os sinais de C-16 e C-18 foram observados a δ 171,5 e 28,3 ppm, para ambos os compostos. O sinal de C-17 de **56** e **61** está a δ 83,5 e 83,3 ppm, respectivamente. Assim, pela análise conjunta dos sinais e bandas mencionados, confirma-se a identidade desses produtos.

3.3.3 Caracterização dos galactosídeos 58 e 63



58 X = H; **63** X = NO_2

Não é observada banda de estiramento de nitrila no espectro no infravermelho de **58** e **63** (páginas 121 e 151, respectivamente). No espectro de RMN de ^1H desses compostos (página 122, para o derivado **58**; página 152, para o derivado **63**) os dupletos de H-15a e H-15b são observados a δ 4,62 e 4,58 ppm para o produto **58** e a δ 4,62 e 4,57 para o produto **63**. Há nesses sinais uma constante de acoplamento geminal $J_{15a,15b}$ de 16,4 e 16,2 Hz, para os compostos **58** e **63**, respectivamente.

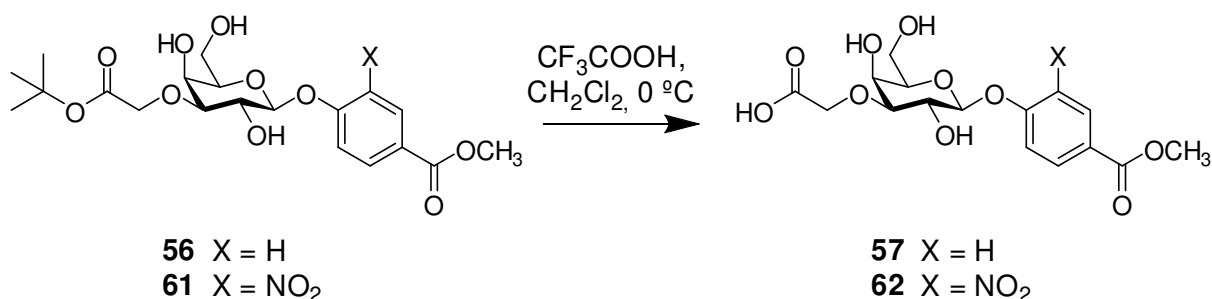
No subespectro DEPT-135 de **58** e **63** (páginas 123 e 153, respectivamente) o sinal de C-15 está a δ 54,7 ppm. Contrariamente ao que é observado para os compostos **56** e **61**, esse carbono está localizado em uma região de proteção do grupo nitrila, logo seu sinal pode ser observado mais próximo ao sinal do TMS do que o sinal de C-6 do núcleo de D-galactosse e com um deslocamento químico 14 ppm menor do que o deslocamento químico de C-15 de **56** e **61**.

Para ambos os galactosídeos, o sinal do carbono da nitrila no espectro de RMN de ^{13}C (página 123, para o derivado **58**; página 153, para o derivado **63**) aparece a δ 117,7 ppm, um valor que está em um intervalo de deslocamento químico característico desse grupo funcional.

3.4 Síntese e caracterização dos galactosídeos **57** e **62**

Esses derivados foram obtidos conforme a reação a seguir.

Figura 32 – Etapa de desproteção do éster terc-butílico dos galactosídeos **56** e **61**.



A reação de desproteção dos ésteres terc-butílicos foi realizada com ácido trifluoracético/diclorometano 1:1 em banho de gelo, que são condições

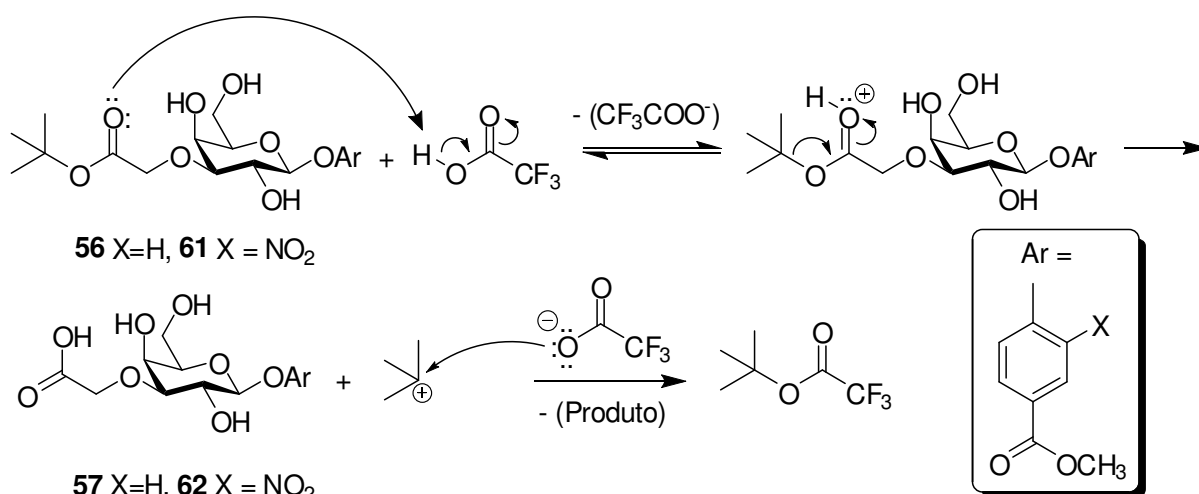
experimentais otimizadas a partir de relato de Gong e colaboradores (GONG *et al.*, 2009). O material de partida é consumido totalmente em duas horas.

Ao final da reação, o excesso de ácido trifluoroacético foi removido por meio de coevaporações, de forma rápida e eficiente. Utilizou-se convenientemente diclorometano nesse processo, pois o solvente já faz parte do meio reacional e pode ser eliminado facilmente a baixa temperatura. Além disso, por ser um solvente de baixa polaridade, ocorre cristalização do produto polar à medida que o ácido trifluoroacético é removido.

Os produtos **57** e **62** foram purificados por CCS e obtidos com 75 e 76% de rendimento, respectivamente. Foi observado que ambos os compostos são deliquescentes e, portanto, após a obtenção na forma cristalina, a exposição dessas substâncias ao ar foi evitada ao máximo.

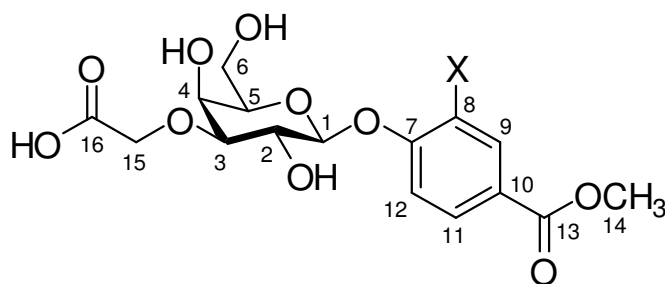
É proposto que a síntese dos galactosídeos ácidos se processa por um mecanismo S_N1 no qual se produz o cátion terc-butílico, de forma semelhante à desproteção de aminas protegidas por pelo grupo terc-butoxicarbonila (**Figura 33**). Pelo uso sistemático dessa técnica em síntese de peptídeos, descobriu-se que a principal forma de neutralização do cátion terc-butílico é o ataque nucleofílico do ânion trifluoroacetato formando o trifluoroacetato de terc-butila (SURESHBABU e NARENDRA, 2011; LUNDT, *et al.*, 1978). Esse mecanismo é coerente com a observação experimental de que a reação não ocorre com quantidades catalíticas de ácido trifluoroacético.

Figura 33 – Proposta mecânica de desproteção do éster terc-butílico dos galactosídeos 56 e 61.



3.4.1 Caracterização dos galactosídeos 57 e 62

Os produtos carboxilados foram caracterizados por faixa de fusão, $[\alpha]_D$, espectrometria no infravermelho, de RMN de ^1H , ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC.



57 X = H; **62** X = NO₂

No espectro no infravermelho dos produtos ácidos (página 115, para o produto **57**; página 145, para o produto **62**) as bandas são mais alargadas do que as dos compostos anteriores e somente uma banda de carbonila foi observada (1706 cm^{-1} para **57**; 1720 cm^{-1} para **62**).

No espectro de RMN de ^1H de **57** (página 116) os dupletos de H-15a e H-15b são observados a δ 3,79 e 3,70 ppm. Há nesses sinais uma constante de acoplamento

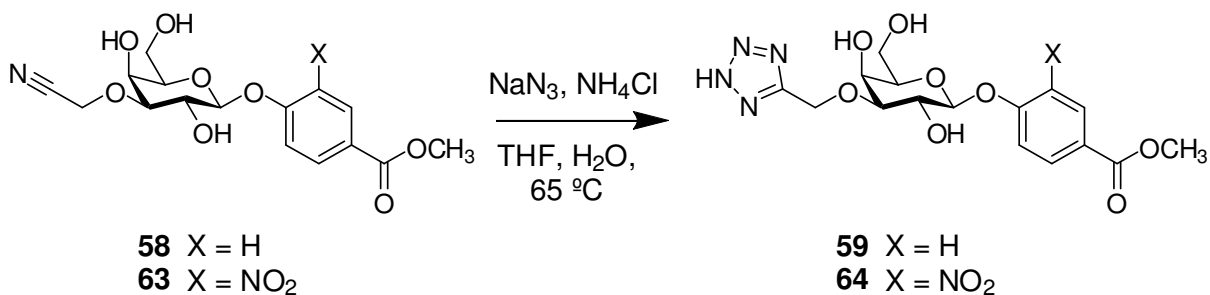
geminal $J_{15a,15b}$ de 16,0 Hz. No subespectro DEPT-135 de **57** e **62** (páginas 117 e 147, respectivamente) o sinal de C-15 está a δ 69,2 e 68,7 ppm, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C de **57** e **62** (páginas 117 e 147, respectivamente), o sinal de C-16 de **57** e **62** é observado a δ 174,4 e 174,6 ppm, respectivamente. Esses valores estão num intervalo de deslocamento químico característico de carbono carbonílico de ácido carboxílico e são ligeiramente maiores do que os valores de deslocamento químico do sinal do carbono das carbonilas correspondentes dos ésteres de **56** e **61**. Não são observados os sinais de C-17 e C-18 do grupo terc-butílico citados na caracterização dos respectivos precursores, os galactosídeos **56** e **61**. Com todas essas observações espectrométricas confirma-se que a reação de desproteção dos ésteres terc-butílicos foi realizada com êxito.

3.5 Síntese e caracterização dos galactosídeos **59** e **64**

Esses derivados foram obtidos conforme a reação a seguir.

Figura 34 – Reação de obtenção dos galactosídeos **59** e **64**.



A síntese dos derivados tetrazólicos foi realizada sob condições experimentais adaptadas do relato de Viana e colaboradores (VIANA, 2007). Realizou-se a reação sob aquecimento, com largo excesso de azida de sódio e cloreto de amônio e um volume bastante reduzido de uma mistura de THF/ H_2O 1:1, o solvente da reação. Nessas condições o consumo do material partida se completa em aproximadamente 60 horas.

Ao final da reação o meio é acidificado até pH 1 e o solvente orgânico é eliminado. O procedimento extrativo com acetato de etila descrito na referência utilizada não foi

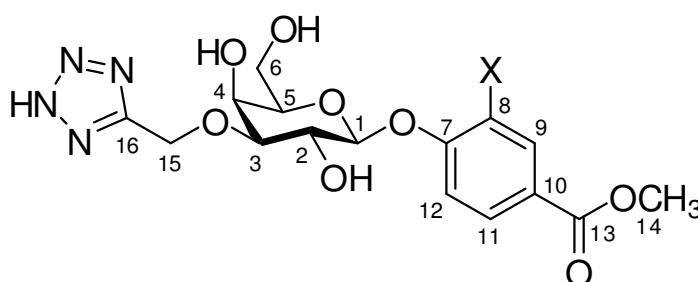
adequado, pois **59** e **64** são bastante polares. Dessa forma, os produtos não se transferem eficientemente para a fase orgânica e o rendimento diminui consideravelmente. Logo, procurou-se otimizar as condições de elaboração da reação para favorecer a precipitação do produto isento de sal.

Na síntese do produto **59**, o volume de água adicionado por meio do HCl utilizado para acidificação do meio foi suficiente para solubilizar o material inorgânico e permitir, após evaporação do THF, a precipitação do produto. Foi necessária uma recristalização para se obter **59** espectrometricamente puro, obtendo-se, então, o produto com 51% de rendimento.

A síntese do derivado nitrado foi mais difícil, pois, utilizando o mesmo procedimento adotado na obtenção de **59**, houve cocristalização de azida de sódio, detectada no infravermelho pela presença de uma banda em 2118 cm^{-1} . Assim, decidiu-se fazer uma extração exaustiva com acetato de etila em pequena escala. A contaminação foi eliminada e o produto **64** foi obtido com 32% de rendimento.

3.5.1 Caracterização dos galactosídeos **59** e **64**

Os produtos tetrazólicos foram caracterizados por faixa de fusão, $[\alpha]_D$, espectrometria no infravermelho, de RMN de ^1H , ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC.



59 X = H; **64** X = NO₂

No espectro de RMN de ^1H de **59** e **64** (páginas 128 e 158, respectivamente) observam-se os dupletos de H-15a e H-15b a δ 5,06 e 5,01 ppm para o produto **59** e a δ 5,05 e 4,99 para o produto **64**. Esses sinais estão, em média, 0,4 ppm mais distantes do sinal do TMS do que os respectivos sinais dos seus precursores, os

galactosídeos **58** e **63**. Percebe-se, portanto, que a vizinhança do grupo metileno em questão foi modificada, como se propõe na reação acima. Há nesses sinais há uma constante de acoplamento geminal $J_{15a,15b}$ de 13,6 Hz, para ambos os produtos.

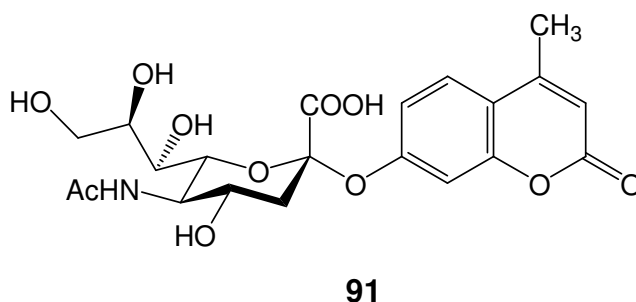
No subespectro DEPT-135 de **59** e **64** (páginas 129 e 159, respectivamente) o sinal do metileno C-15 está a δ 69,2 e 68,7 ppm, respectivamente. Esses sinais estão, em média, 14,3 ppm mais distantes do sinal do TMS do que os respectivos sinais dos galactosídeos de partida.

No espectro de RMN de ^{13}C de **59** e **64** (páginas 129 e 159, respectivamente) é observado o sinal do carbono do anel tetrazólico a δ 154,3 e 154,5 ppm, respectivamente. Além disso, não se observa o sinal do carbono da nitrila de **56** e **61**, confirmando-se, juntamente com os outros sinais analisados, o consumo do material de partida e a formação efetiva dos produtos **59** e **64**.

3.6 Ensaios enzimáticos

Os galactosídeos **53-64** sintetizados neste trabalho foram testados contra a TcTS em colaboração com a Dr. Ivone Carvalho da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-Ribeirão Preto. Utilizou-se a técnica espectrofluorimétrica contínua desenvolvida por Douglas e colaboradores (DOUGLAS *et al.*, 2006) que consiste em um ensaio de hidrólise do substrato ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico **91** (MuNANA; **Figura 35**) pela TcTS. Quando não há inibição da enzima, ocorre hidrólise da ligação sialosídica, liberação da aglicona fluorescente e, conseqüentemente, detecção de maiores unidades de fluorescência. Em caso de inibição enzimática, menores unidades de fluorescência são observadas.

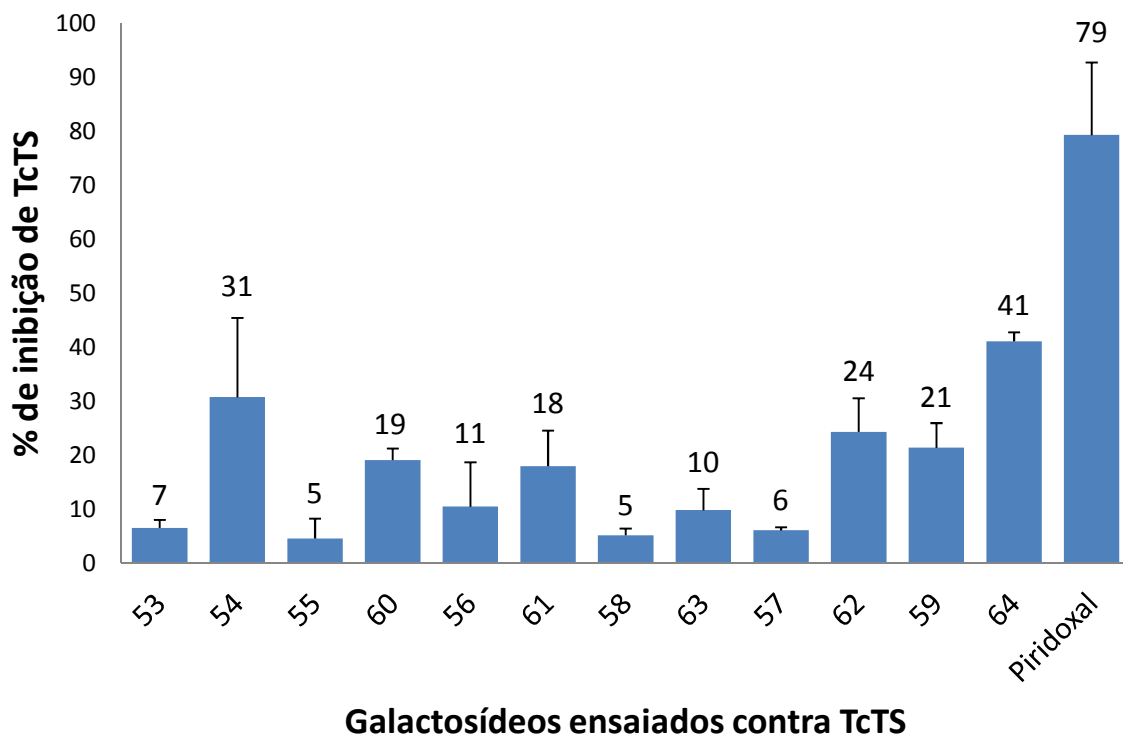
Figura 35 - Estrutura do substrato MuNANA.



Os derivados de D-galactose planejados e sintetizados apresentaram baixa atividade inibitória de TcTS na concentração de 1mM, com porcentagens de inibição inferior àquela apresentada pelo controle positivo piridoxal fosfato **11**. O composto mais ativo foi o galactosídeo **64**, que inibiu com 41% da atividade enzimática (**Gráfico 1**). Os derivados ácidos **62** e **64** também foram ensaiados na concentração de 500 μ M e apresentaram 16 e 23% de inibição de TcTS, respectivamente, ao passo que o controle positivo exibiu 56% de inibição.

Apesar da impossibilidade dos galactosídeos obtidos atuarem como substratos de TcTS, observa-se que a introdução de um grupo metila ou cianometila no oxigênio de C-3 dos galactosídeos diminui a atividade inibitória de TcTS. Esses resultados são concordantes com os de Harrison e colaboradores que verificaram que o derivado 3-O-metilado do galactosídeo de octila apresenta apenas 13% de inibição de TcTS a 1 mM, ao passo que o respectivo galactosídeo não modificado exibiu 75% de inibição na mesma concentração (HARRISON *et al.*, 2011).

Gráfico 1 – Porcentagem de inibição de TcTS pelos galactosídeos 53-64 a 1mM.



Os derivados ácidos **57** e **62** também apresentaram atividades inibitórias inferiores a dos galactosídeos não modificados **53** e **54**, sugerindo-se, assim, que a contribuição da ligação iônica com a tríade de argininas para a ancoragem dos ligantes foi superestimada e/ou que o gasto energético com a dessolvatação do grupo ácido carboxílico foi muito elevado. Corroborando tais resultados, muitas substâncias ácidas testadas contra a TcTS foram inativas, como mostrado na introdução deste trabalho, ou seja, a essencialidade da referida ligação iônica para a ancoragem dos ligantes não foi demonstrada.

Observa-se, contudo, que a substituição bioisostérica do grupo ácido carboxílico pelo grupo tetrazol e a introdução do grupo nitro na aglicona foram substituições moleculares que aumentaram a atividade dos galactosídeos. As bases moleculares que elevaram a esse incremento de atividade devem ser investigadas mais acuradamente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Métodos gerais

Utilizaram-se solventes P.A. sem tratamento prévio ou a fração média dos respectivos destilados simples, conforme está descrito em cada experimento. A obtenção de tetra-hidrofurano (THF) anidro foi feita por meio de desidratação química: 100 mL de uma suspensão 5% m/V de sódio metálico finamente dividido em THF foi deixada em repouso por 24 horas. Em seguida, adicionou-se uma ponta de espátula do indicador benzofenona e a mistura foi refluxada até viragem de cor amarela para azul escuro persistente. Frações do solvente destilado, coletado em funil de adição, foram adicionadas diretamente no(s) meio(s) de reação.

Faixas de fusão (F.F.) foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF 301 e não foram corrigidas.

Valores de poder rotatório específico, $[\alpha]_D$, foram determinados em polarímetro ADP220 Bellinghan + Stanley Ltd., a 20° C.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos pela técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) em aparelho de Spectrum One, Perkin-Elmer.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros DPX 200 e DPX 400, ambos da Bruker. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente deuterado como padrão interno. Os valores de deslocamento químico (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J), em hertz.

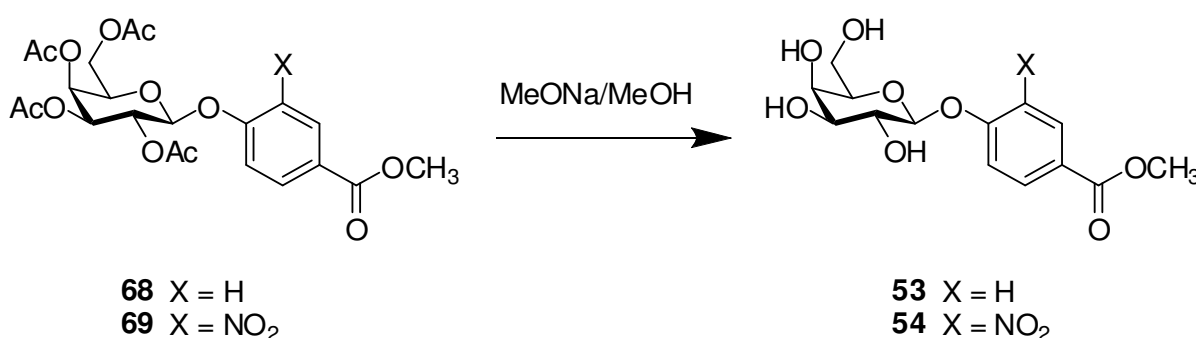
A evolução das reações foi acompanhada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) em placas confeccionadas no próprio laboratório com sílica gel 60 G Merck. Os sistemas de eluentes empregados estão especificados em cada experimento. Os reveladores utilizados foram vapores de iodo e solução etanólica de ácido sulfúrico 15% V/V, com aquecimento a 150 °C logo após aplicação.

Em cromatografia em coluna de sílica (CCS), foi utilizada sílica gel 60 Merck com intervalo granulométrico de 0,040-0,063 mm. Os sistemas de eluentes empregados estão especificados em cada experimento.

Os experimentos de RMN foram conduzidos no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG. Todos os demais, excetuando os ensaios biológicos, foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.2 Métodos de síntese

4.2.1 Procedimento de síntese de **53** e **54**



Em um balão de 125 mL foi preparada uma solução de metóxido de sódio pela adição de cerca de 30 mg de sódio metálico a 80 mL de metanol destilado, com resfriamento em banho de gelo e água. A esta solução adicionou-se o galactosídeo tetra-*O*-acetilado correspondente (2,00 g (4,14 mmol) de **68** ou 1,95 g (3,70 mmol) de **69**) e ao balão foi acoplado um tubo com cloreto de cálcio. O resfriamento foi mantido durante a reação, realizada sob agitação magnética e acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 9:1). Ao fim da reação, a mistura foi neutralizada até pH 7 com resina ácida Amberlite® IRA 120 previamente lavada com metanol, ligeiramente aquecida em banho-maria até completa solubilização do produto parcialmente insolúvel e filtrada para remoção da resina. O solvente foi removido em evaporador rotatório. Os galactosídeos **53** e **54** foram obtidos com rendimentos de 91 e 86%, respectivamente.

4.2.1.1 Dados de caracterização de β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonilfenila (53)

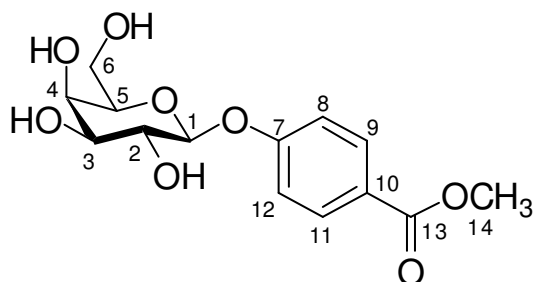
Sólido branco [1,19 g (3,79 mmol; 91%) a partir de 2,00 g (4,14 mmol) de **68**]

F.M.: C₁₄H₁₈O₈

M.M.: 314,29 g.mol⁻¹

F.F.: 183,6 - 184,9 °C [literatura: 153,5 - 155 °C (CARVALHO, 2008)]

[α]_D²⁰ -44 (c 0,5 MeOH)



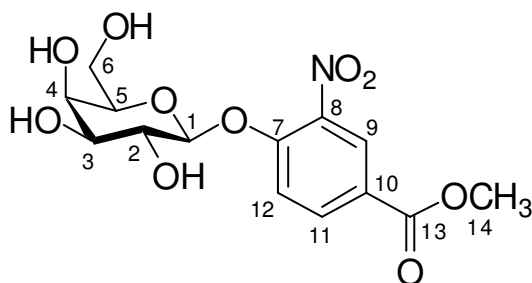
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3580, 3378, 3205 (v O-H); 1674 (v C=O); 1606, 1514, 1439 (v C=C); 1250 (v C-O da aglicona); 1085, 1057, 1031, 1023 (v C-O do carboidrato)

RMN de ¹H (δ/ppm ; J/Hz ; DMSO-*d*₆; 200 MHz): 7,90 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,12 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 5,25 (d; 1H; J 5,0 Hz; OH); 4,95 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 4,92 (d; 1H; OH); 4,69 (t; 1H; $J_{\text{OH-6,6a}}$ 5,4 Hz, $J_{\text{OH-6,6b}}$ 5,4 Hz; OH-6); 4,56 (d; 1H; J 4,6 Hz; OH); 3,81 (s; 3H; H-14); 3,71 (m; 1H; H-4); 3,65-3,42 (m; H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b)

RMN de ¹³C (δ/ppm ; J/Hz ; DMSO-*d*₆; 50 MHz): 165,94 (C-13); 161,29 (C-7); 131,14 (C-9, C-11); 122,92 (C-10); 116,09 (C-8, C-12); 100,45 (C-1); 75,67 (C-5); 73,27 (C-3); 70,24 (C-2); 68,15 (C-4); 60,37 (C-6); 51,98 (C-14)

Os espectros no IV, de RMN de ¹H, de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **53** estão nas páginas 97-99, respectivamente.

4.2.1.2 Dados de caracterização de β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (54)



Sólido branco [1,14 g (3,17 mmol; 86%) a partir de 1,95 g (3,70 mmol) de **69**]

F.M.: C₁₄H₁₇NO₁₀

M.M.: 359,29 g.mol⁻¹

F.F.: 180,7 - 182,5 °C decompõe

[literatura: 198 °C decompõe

(CARVALHO, 2008)]

[α]_D²⁰ -90 (c 0,4 MeOH) [literatura: [α]_D²⁰ -88 (c 0,4 MeOH) (CARVALHO, 2008); [α]_D²⁰ -90 (c 0,4 MeOH) (KRÖGER e THIEM, 2007)]

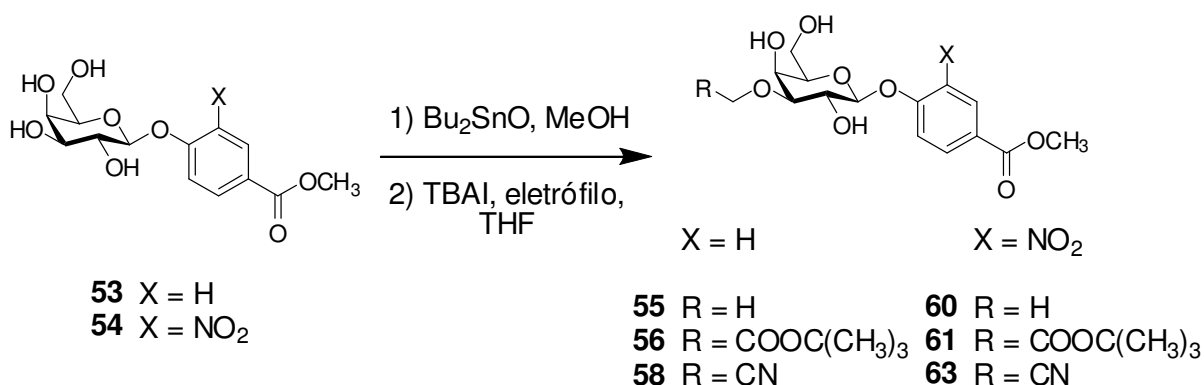
IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3547, 3374 (v O-H); 1725 (v C=O); 1617, 1498, 1436 (v C=C); 1532, 1361 (v NO₂); 1275 (v C-O da aglicona); 1063, 1019 (v C-O do carboidrato)

RMN de ¹H (δ /ppm; *J*/Hz; DMSO-*d*₆; 200 MHz): 8,33 (d; 1H; *J*_{9,11} 2,0 Hz; H-9); 8,14 (dd; 1H; *J*_{11,9} 2,0 Hz, *J*_{11,12} 8,8 Hz; H-11); 7,54 (d; 1H; *J*_{12,11} 8,8 Hz; H-12); 5,31 (d; 1H; *J* 2,8 Hz; OH); 5,17 (d; 1H; *J*_{1,2} 7,4 Hz; H-1); 4,99 (d; 1H; *J* 4,8 Hz; OH); 4,79 (m; 1H; OH-6); 4,69 (d; 1H; *J* 3,4 Hz; OH); 3,85 (s; H-14); 3,73-3,55 (m; H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b)

RMN de ¹³C (δ /ppm; *J*/Hz; DMSO-*d*₆; 50 MHz): 164,59 (C-13); 153,29 (C-7); 139,74 (C-8); 134,79 (C-11); 126,05 (C-9); 123,01 (C-10); 117,28 (C-12); 101,01 (C-1); 76,10 (C-5); 73,43 (C-3); 70,18 (C-2); 68,18 (C-4); 60,48 (C-6); 52,75 (C-14)

Os espectros no IV, de RMN de ¹H, de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **54** estão nas páginas 100-102, respectivamente.

4.2.2 Procedimento geral de 3-O-alkilação dos galactosídeos **53** e **54**



A um balão de 125 mL foram adicionados 30 mL de metanol destilado, 0,300 g do galactosídeo correspondente (0,95 mmol de **53**; 0,83 mmol de **54**) e óxido de dibutilestanho. Ao balão acoplou-se um tubo com cloreto de cálcio e essa mistura foi submetida à agitação magnética e aquecimento a 60 °C em banho de óleo por uma hora e meia. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotatório.

Ao mesmo balão onde foi feita a síntese do complexo de estanho, adicionaram-se 28 mL de THF anidro para síntese dos derivados não-nitrados ou 16 mL para síntese dos nitrados, o catalisador iodeto de tetrabutilamônio e o agente alquilante (**Tabela 2**), manipulado somente em capela. Acoplou-se um tubo com cloreto de cálcio ao balão e a mistura reagente foi submetida à agitação magnética.

Tabela 2 – Proporção molar dos reagentes utilizados nas 3-O-alkilações dos galactosídeos **53** e **54**.

Material de partida (MP)	Eletrófilo	Proporção molar – MP/Bu ₂ SnO/TBAI/eletrófilo	Produto (Rendimento)
53	MeI	1/1,1/0,5/11,6	55 (54%)
54	MeI	1/1,1/0,5/11,6	60 (32%)
53	BrCH ₂ COOC(CH ₃) ₃	1/1,5/0,5/5,8	56 (82%)
54	BrCH ₂ COOC(CH ₃) ₃	1/1,5/0,5/5,8	61 (73%)
53	BrCH ₂ CN	1/1,5/0,5/5,8	58 (61%)
54	BrCH ₂ CN	1/1,5/0,5/5,8	63 (53%)

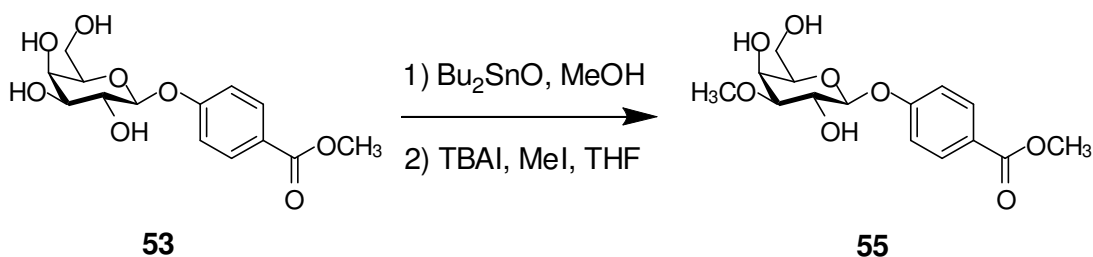
As alquilações de **53** foram feitas sob aquecimento a 60 °C em banho de óleo e as alquilações de **54** foram feitas à temperatura ambiente. Uma vez detectado por CCD o término ou, exclusivamente na síntese de **55** e **60**, a não-evolução da reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório, formando-se um óleo castanho. Esse material foi diretamente purificado por CCS.

Tabela 3 – Condições empregadas nas 3-O-alquilações dos galactosídeos 53 e 54.

Produto	Eluente da CCD (3 eluições)	Tempo de reação (horas)	Temperatura
55	diclorometano/MeOH 93:7	24	60 °C
60	diclorometano /MeOH 93:7	48	ambiente
56	diclorometano /MeOH 96,5:3,5	24	60 °C
61	diclorometano /MeOH 96,5:3,5	48	ambiente
58	diclorometano /MeOH 95:5	96	60 °C
63	diclorometano /MeOH 95:5	96	ambiente

Ambas as etapas de formação do intermediário organometálico e alquilação propriamente dita, foram feitas mais de uma vez, exceto a síntese de **55**. Na maioria delas, realizou-se escalonamento para maiores quantidades, como será citado em cada procedimento de síntese, porém a proporção molar dos reagentes, temperatura e tempo de reação acima citados foram mantidos.

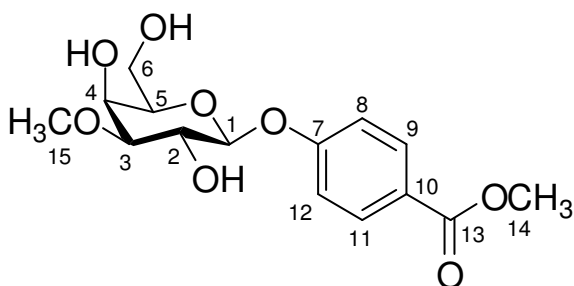
4.2.3 Procedimento de síntese de 55



O derivado **55** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-*O*-alquilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas, com três modificações. Primeiramente, optou-se por modificar o sistema de reação, colocando um condensador entre o balão e o tubo com cloreto de cálcio, para minimizar a perda do iodeto de metila por volatilização. A segunda alteração foi o modo de adição do agente alquilante, acrescentado de duas vezes. Iniciou-se a reação com 5,8 equivalentes de iodeto de metila e, após 24 horas, devido ao andamento modesto da reação e à volatilidade do eletrófilo (p.e. 42,5 °C), foram adicionados mais 5,8 equivalentes. A última modificação foi o momento de adição do catalisador, adicionado somente após 32 horas de reação. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,300 g (0,95 mmol) de **53**, 0,257 g (1,05 mmol) de Bu₂SnO, 30 mL de metanol, 0,176 g de Bu₄NI (0,48 mmol), 2 x 0,35 mL (11,08 mmol) de iodeto de metila e 28 mL de THF anidro.

Após 96 horas, mesmo sem completo consumo do material de partida, elaborou-se a reação. Foi feita CCS (eluente: diclorometano/ metanol 94,5:5,5) do material bruto de reação. Obtiveram-se duas frações de interesse, uma contendo 0,143 g de produto contaminado com TBAI e outra contendo 0,125 g de produto contaminado com quantidade residual de TBAI e um subproduto com polaridade muito próxima ao produto, possivelmente, resultado de anomerização. A primeira foi recromatografada por CCS (eluente: acetato de etila), obtendo-se 0,118 g do derivado metilado desejado. A segunda foi recristalizada em MeOH/éter etílico, produzindo 0,057 g de produto puro. Ao final de toda elaboração, foi obtido 0,169 g (54%) do produto **55**.

4.2.3.1 *Dados de caracterização de 3-O-metil-β-D-galactopiranosídeo de 4-metoxycarbonilfenila (55)*



Sólido branco [0,169 g (0,51 mmol; 54%) a partir de 0,300 g (0,95 mmol) de **53**]

F.M.: C₁₅H₂₀O₈

M.M.: 328,31 g.mol⁻¹

F.F.: 161,6 - 164,0 °C

[α]_D²⁰ -36 (c 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3416 (v O-H); 1713 (v C=O); 1604, 1586, 1432 (v C=C); 1238 (v C-O da aglicona); 1050 (v C-O do carboidrato)

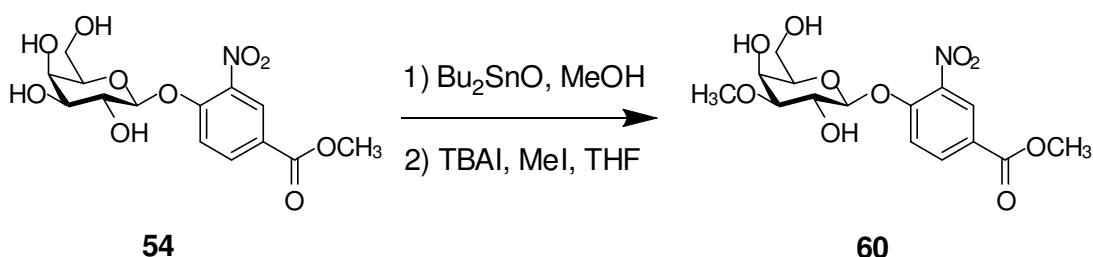
RMN de ^1H (δ/ppm ; J/Hz ; piridina- d_5 ; 400 MHz): 8,07 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,36 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 5,65 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,7 Hz; H-1); 4,79 (dd; 1H; $J_{2,1}$ 7,7 Hz, $J_{2,3}$ 9,3 Hz; H-2); 4,68 (d; 1H; $J_{4,3}$ 3,0 Hz; H-4); 4,48 (m; 2H; H-6a, H-6b); 4,25 (m; 1H; H-5); 3,77 (s; 3H; H-14); 3,72 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,3 Hz, $J_{3,4}$ 3,0 Hz; H-3); 3,60 (s; 3H; H-15)

RMN de ^{13}C (δ/ppm ; J/Hz ; piridina- d_5 ; 100 MHz): 166,58 (C-13); 162,20 (C-7); 131,83 (C-9, C-11); 124,10 (C-10); 116,57 (C-8, C-12); 102,13 (C-1); 84,81 (C-3); 77,49 (C-5); 70,66 (C-2); 65,83 (C-4); 62,27 (C-6); 57,28 (C-15); 51,74 (C-14)

HMBC (piridina- d_5 ; 400 MHz): H-3x C -15; H-15x C -3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **55** estão nas páginas 103-108, respectivamente.

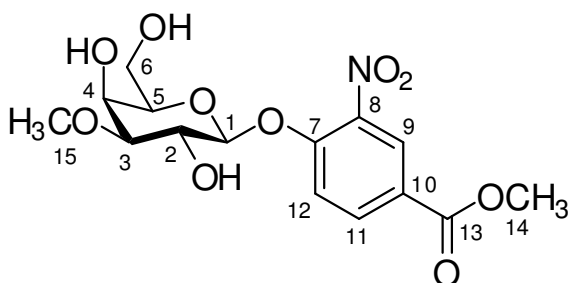
4.2.4 Procedimento de síntese de **60**



O derivado **60** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-O-alkilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas, com as modificações citadas no procedimento de síntese de **53**, exceto pelo uso de condensador. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,350 g (0,97 mmol) de **54**, 0,272 g (1,09 mmol) de Bu_2SnO , 35 mL de metanol, 0,182 g (0,49 mmol) de Bu_4NI , 2 x 0,36 mL (11,45 mmol) de iodeto de metila e 19 mL de THF anidro.

Após 96 horas, mesmo sem completo consumo do material de partida, elaborou-se a reação. Foi feita CCS (eluente: diclorometano/ metanol 94,5:5,5) do material bruto de reação, obtendo-se 0,130 g de produto contaminado com TBAI. Esse material foi recromatografado por CCS (eluente: acetato de etila), obtendo-se 0,115 g (32%) de produto **60**.

4.2.4.1 Dados de caracterização de 3-O-metil- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (**60**)



Sólido amarelo pálido [0,115 g (0,31 mmol; 32%) a partir de 0,350 g (0,97 mmol) de **54**]

F.M.: C₁₅H₁₉NO₁₀

M.M.: 373,31 g.mol⁻¹

F.F.: 150,7 – 151,9 °C

[α]_D²⁰ –76 (c 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3525, 3347 (v O-H); 1700 (v C=O); 1619, 1440 (v C=C); 1537, 1352 (v NO₂); 1264 (v C-O da aglicona); 1075, 1053 (v C-O do carboidrato)

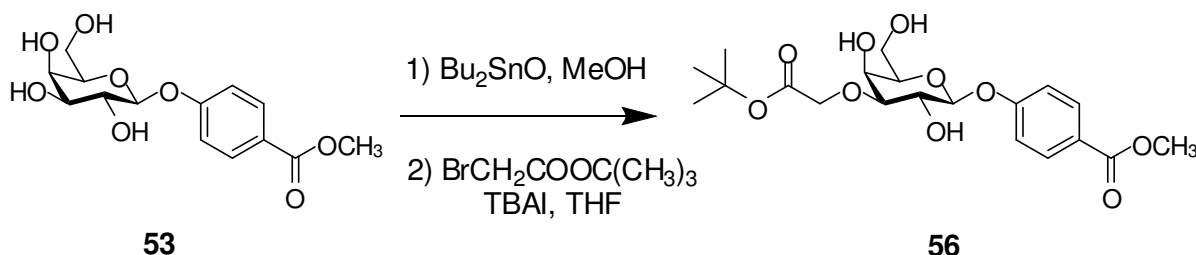
RMN de ¹H (δ /ppm; *J*/Hz; piridina-*d*₅; 400 MHz): 8,53 (d; 1H; *J*_{9,11} 2,0 Hz; H-9); 8,07 (dd; 1H; *J*_{11,9} 2,0 Hz, *J*_{11,12} 8,8 Hz; H-11); 7,89 (m; 1H; OH); 7,79 (d; 1H; *J*_{12,11} 8,8 Hz; H-12); 6,87 (m; 1H; OH); 6,60 (m; 1H; OH); 5,80 (d; 1H; *J*_{1,2} 8,0 Hz; H-1); 4,82 (m; 1H; H-2); 4,64 (d; 1H; *J*_{4,3} 2,9 Hz; H-4); 4,53 (dd; 1H; *J*_{6a,5} 6,8 Hz, *J*_{6a,6b} 11,2 Hz; H-6a); 4,43 (dd; 1H; *J*_{6b,5} 4,8 Hz, *J*_{6b,6a} 11,2 Hz; H-6b); 4,30 (m; 1H; H-5); 3,79 (s; 3H; H-14); 3,72 (dd; 1H; *J*_{3,2} 9,4 Hz, *J*_{3,4} 2,9 Hz; H-3); 3,60 (s; 3H; H-15)

RMN de ¹³C (δ /ppm; *J*/Hz; piridina-*d*₅; 100 MHz): 164,83 (C-13); 154,26 (C-7); 140,57 (C-8); 134,92 (C-11); 126,72 (C-9); 122,99 (C-10); 117,67 (C-12); 102,80 (C-1); 84,83 (C-3); 78,10 (C-5); 70,16 (C-2); 65,74 (C-4); 62,26 (C-6); 57,30 (C-15); 52,30 (C-14)

HMBC (piridina-*d*₅; 400 MHz): H-3x C-15; H-15x C-3

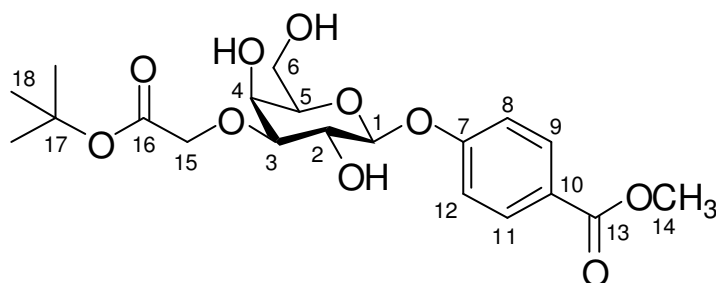
Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **60** estão nas páginas 133-138, respectivamente.

4.2.5 Procedimento de síntese de **56**



O derivado **56** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-O-alkilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,400 g (1,27 mmol) de **53**, 0,475 g (1,91 mmol) de Bu_2SnO , 40 mL de metanol, 0,235 g (0,64 mmol) de Bu_4NI , 1,09 mL (7,38 mmol) de bromoacetato de terc-butila e 37 mL de THF anidro. O material bruto de reação foi elaborado por CCS (eluente: acetato de etila), obtendo-se 0,448 g (82%) do produto **56**.

4.2.5.1 Dados de caracterização de 3-O-(terc-butoxicarbonilmetil)- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxycarbonilfenila (**56**)



Sólido branco [0,448 g (1,04 mmol; 82%) a partir de 0,400 g (1,27 mmol) de **53**]

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$

M.M.: $428,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

F.F.: $83,2 - 84,8 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20}$ -44 (c 0,5 CHCl_3)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3531, 3405 (v O-H); 1721 (v C=O éster alifático); 1697 (v C=O éster aromático); 1605, 1508, 1437 (v C=C); 1245 (v C-O da aglicona); 1062 (v C-O do carboidrato)

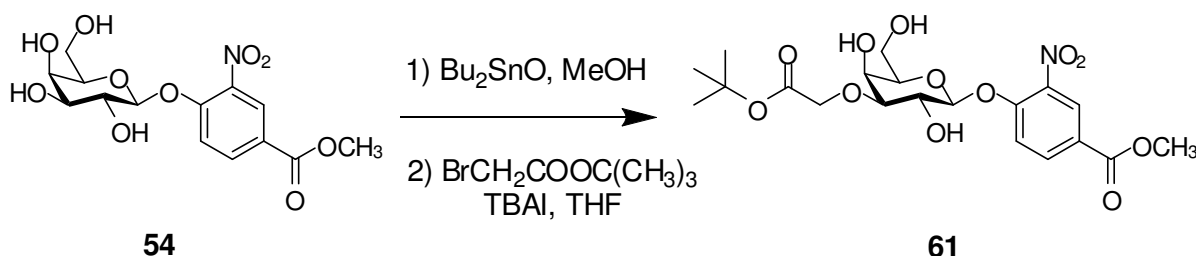
RMN de ^1H (δ /ppm; J /Hz; CDCl_3 ; 400 MHz): 7,98 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,07 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 5,01 (d; 1H; $J_{1,2}$ 8,0 Hz; H-1); 4,26 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 17,2 Hz; H-15a); 4,15 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 17,2 Hz; H-15b); 4,13 (m; 1H; H-2); 4,06 (d; 1H; $J_{4,3}$ 2,8 Hz; H-4); 4,00 (dd; 1H; $J_{6a,5}$ 6,6 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,8 Hz; H-6a); 3,88 (s; 3H; H-14); 3,86 (dd; 1H; $J_{6b,5}$ 4,8 Hz, $J_{6b,6a}$ 11,8 Hz; H-6b); 3,68 (m; 1H; H-5); 3,41 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,6 Hz, $J_{3,4}$ 2,8 Hz; H-3); 1,49 (s; 9H; H-18)

RMN de ^{13}C (δ /ppm; J /Hz; CDCl_3 ; 100 MHz): 171,54 (C-16); 166,89 (C-13); 160,85 (C-7); 131,74 (C-9, C-11); 124,61 (C-10); 116,30 (C-8, C-12); 100,55 (C-1); 84,06 (C-3); 83,53 (C-17); 74,92 (C-5); 70,00 (C-2); 68,14 (C-15); 66,80 (C-4); 62,52 (C-6); 52,18 (C-14); 28,27 (C-18)

HMBC (CDCl_3 ; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **56** estão nas páginas 109-114, respectivamente.

4.2.6 Procedimento de síntese de **61**

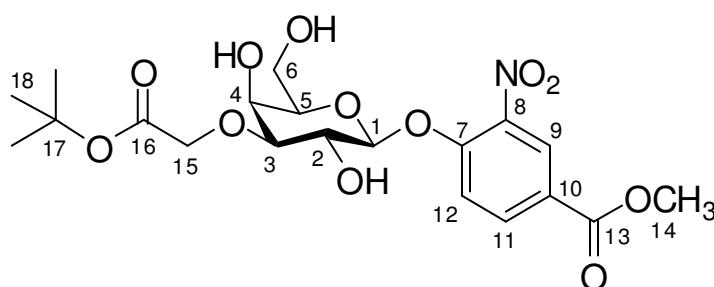


O derivado **61** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-O-alkilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas. Devido ao escalonamento, os volumes de metanol e THF foram proporcionalmente reduzidos em 30%. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,710 g (1,98 mmol) de **54**, 0,735 g (2,96 mmol) de Bu_2SnO , 50 mL de metanol, 0,364 g (0,99 mmol) de Bu_4NI , 1,69 mL (11,5 mmol) de bromoacetato de terc-butila e 26 mL de THF anidro.

O material bruto de reação foi elaborado por CCS (eluente: clorofórmio/metanol 98:2), obtendo-se 0,686 g (73%) do produto **61**. Formou-se um material resinoso, porém conseguiu-se a cristalização do galactosídeo após solubilização do produto

em volume mínimo de acetona, adição de éter etílico e atrito nas paredes do balão com uma espátula. Os solventes foram removidos em evaporador rotatório e o produto se conservou no estado cristalino.

4.2.6.1 *Dados de caracterização de 3-O-(terc-butoxicarbonilmetil)-β-D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (61)*



Sólido branco [0,686 g (1,45 mmol; 73%) a partir de 0,710 g (1,98 mmol) de **54**]

F.M.: C₂₀H₂₇NO₁₂

M.M.: 473,43 g.mol⁻¹

F.F.: 136,5 - 137,4 °C

[α]_D²⁰ +36 (c 0,5 CHCl₃)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3523, 3391 (ν O-H); 1730 (ν C=O éster alifático); 1718 (ν C=O éster aromático); 1618, 1436 (ν C=C); 1529, 1349 (ν NO₂); 1259 (ν C-O da aglicona); 1244, 1059 (ν C-O do carboidrato)

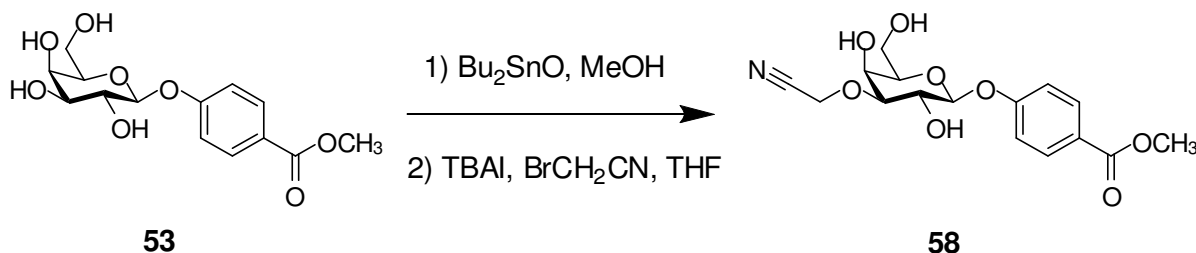
RMN de ¹H (δ/ppm; J/Hz; CDCl₃; 400 MHz): 8,49 (d; 1H; *J*_{9,11} 2,0 Hz; H-9); 8,19 (dd; 1H; *J*_{11,9} 2,0 Hz, *J*_{11,12} 8,8 Hz; H-11); 7,39 (d; 1H; *J*_{12,11} 8,8 Hz; H-12); 5,01 (d; 1H; *J*_{1,2} 7,8 Hz; H-1); 4,36 (d; 1H; *J*_{15a,15b} 17,2 Hz; H-15a); 4,19 (dd; 1H; *J*_{2,1} 7,8 Hz, *J*_{2,3} 9,3 Hz; H-2); 4,16 (d; 1H; *J*_{15b,15a} 17,2 Hz; H-15b); 4,11 (d; 1H; *J*_{4,3} 2,9 Hz; H-4); 4,04 (dd; 1H; *J*_{6a,5} 6,4 Hz, *J*_{6a,6b} 12,0 Hz; H-6a); 3,94 (s; 3H; H-14); 3,91 (dd; 1H; *J*_{6b,5} 4,4 Hz, *J*_{6b,6a} 12,0 Hz; H-6b); 3,75 (m; 1H; H-5); 3,47 (dd; 1H; *J*_{3,2} 9,3 Hz, *J*_{3,4} 2,9 Hz; H-3); 1,49 (s; 9H; H-18)

RMN de ¹³C (δ/ppm; J/Hz; CDCl₃; 100 MHz): 171,47 (C-16); 164,90 (C-13); 153,74 (C-7); 140,27 (C-8); 135,52 (C-11); 127,30 (C-9); 125,00 (C-10); 117,98 (C-12); 102,69 (C-1); 83,25 (C-17); 83,06 (C-3); 75,44 (C-5); 70,26 (C-2); 68,66 (C-15); 67,16 (C-4); 62,56 (C-6); 52,83 (C-14); 28,27 (C-18)

HMBC (CDCl₃; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **61** estão nas páginas 139-144, respectivamente.

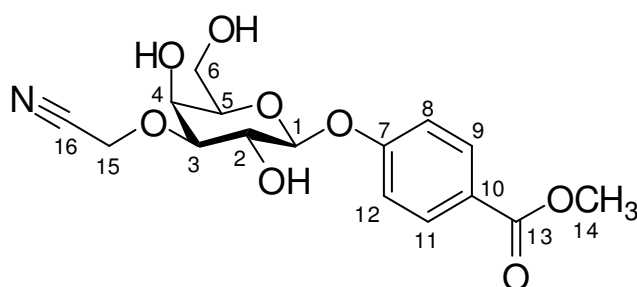
4.2.7 Procedimento de síntese de **58**



O derivado **58** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-*O*-alquilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,300 g (0,95 mmol) de **53**, 0,356 g (1,43 mmol) de Bu_2SnO , 30 mL de metanol, 0,176 g (0,48 mmol) de Bu_4NI , 0,40 mL (5,54 mmol) de bromoacetonitrila e 28 mL de THF anidro.

O material bruto de reação foi elaborado por CCS (elute: diclorometano/metanol 97:3), obtendo-se 0,260 g de produto contaminado com TBAI. Esse material foi recromatografado por CCS (elute: acetato de etila), obtendo-se 0,206 g (61%) do produto **58**.

4.2.7.1 Dados de caracterização de 3-*O*-(cianometil)- β -*D*-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonilfenila (**58**)



Sólido branco [0,206 g (0,58 mmol; 61%) a partir de 0,300 g (0,95 mmol) de **53**]

F.M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_8$

M.M.: $353,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

F.F.: $171,4 - 171,8 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20}$ -36 (*c* 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3525, 3182 (v O-H); 1709 (v C=O); 1607, 1584, 1514, 1442 (v C=C); 1244 (v C-O da aglicona); 1069, 1052 (v C-O do carboidrato)

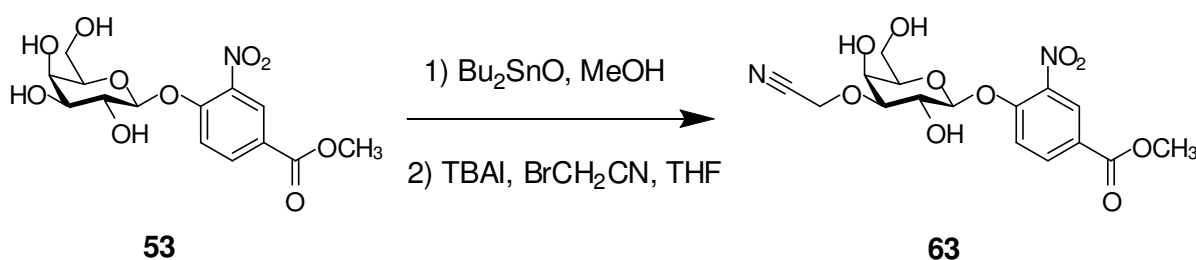
RMN de ^1H (δ/ppm ; J/Hz ; DMSO- d_6 ; 400 MHz): 7,91 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,13 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 5,58 (d; 1H; $J_{\text{OH-2,2}}$ 5,6 Hz; OH-2); 5,05 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 4,84 (d; 1H; $J_{\text{OH-4,4}}$ 5,4 Hz; OH-4); 4,73 (t; 1H; $J_{\text{OH-6,6a}}$ 5,6 Hz, $J_{\text{OH-6,6b}}$ 5,6 Hz; OH-6); 4,62 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 16,4 Hz; H-15a); 4,58 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 16,4 Hz; H-15b); 3,99 (dd; 1H; $J_{4,\text{OH-4}}$ 5,4 Hz, $J_{4,3}$ 3,2 Hz; H-4); 3,82 (s; 3H; H-14); 3,75 (ddd; 1H; $J_{2,\text{OH-2}}$ 5,6 Hz, $J_{2,1}$ 7,6 Hz, $J_{2,3}$ 9,6 Hz; H-2); 3,66 (m; 1H; H-5); 3,56 (qn; 1H; $J_{6a,\text{OH-6}}$ 5,6 Hz, $J_{6a,5}$ 5,6 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz; H-6a); 3,49 (qn; 1H; $J_{6b,\text{OH-6}}$ 5,6 Hz, $J_{6b,5}$ 5,7 Hz, $J_{6b,6a}$ 11,2 Hz; H-6b); 3,47 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,6 Hz, $J_{3,4}$ 3,2 Hz; H-3)

RMN de ^{13}C (δ/ppm ; J/Hz ; DMSO- d_6 ; 100 MHz): 165,79 (C-13); 161,03 (C-7); 131,06 (C-9, C-11); 123,02 (C-10); 117,72 (C-16); 116,03 (C-8, C-12); 100,00 (C-1); 81,82 (C-3); 75,17 (C-5); 68,94 (C-2); 64,20 (C-4); 59,94 (C-6); 54,75 (C-15); 51,88 (C-14)

HMBC (DMSO- d_6 ; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **58** estão nas páginas 121-126, respectivamente.

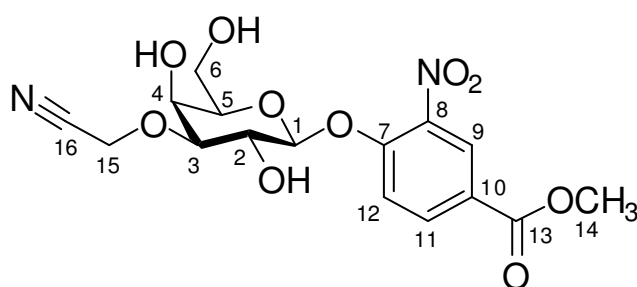
4.2.8 Procedimento de síntese de **63**



O derivado **63** foi sintetizado utilizando-se o procedimento geral de 3-O-alkilação dos galactosídeos **53** e **54** e as condições anteriormente citadas. As quantidades de reagentes e solventes foram estas: 0,400 g (1,11 mmol) de **54**, 0,416 g (1,67 mmol) de Bu_2SnO , 40 mL de metanol, 0,205 g (0,56 mmol) de Bu_4NI , 0,46 mL (6,46 mmol) de bromoacetonitrila e 21 mL de THF anidro.

O material bruto de reação foi elaborado por CCS (eluente: clorofórmio/metanol 96,5:3,5), obtendo-se 0,303 g de produto contaminado com TBAI. Esse material foi recromatografado por CCS (eluente: acetato de etila), obtendo-se 0,286 g (64%) do produto **63**.

4.2.8.1 Dados de caracterização de 3-O-(cianometil)- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (**63**)



Sólido branco [0,286 g (0,72 mmol; 64%) a partir de 0,400 g (1,11 mmol) de **54**]

F.M.: C₁₆H₁₈N₂O₁₀

M.M.: 398,32 g.mol⁻¹

F.F.: 160,5 – 161,4 °C

[α]_D²⁰ –76 (c 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$ /cm⁻¹): 3527, 3482, 3236 (v O-H); 1696 (v C=O); 1650, 1618, 1443 (v C=C); 1535, 1330, (v NO₂); 1273 (v C-O da aglicona), 1053 (v C-O do carboidrato)

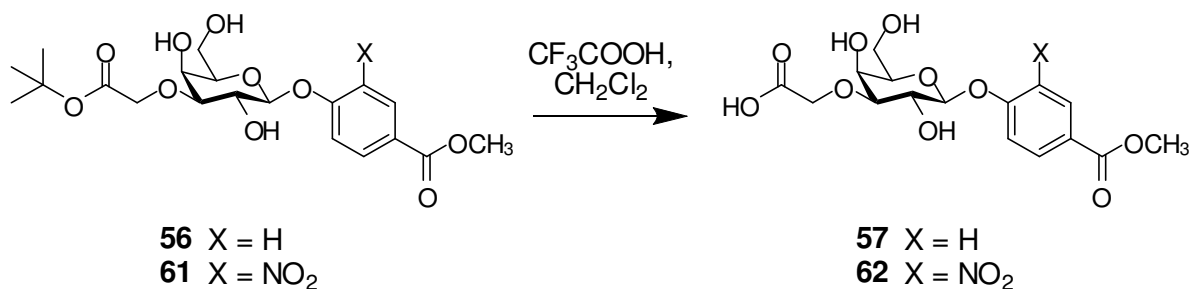
RMN de ¹H (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 400 MHz): 8,37 (d; 1H; $J_{9,11}$ 2,0 Hz; H-9); 8,17 (dd; 1H; $J_{11,12}$ 8,8 Hz, $J_{11,9}$ 2,0 Hz; H-11); 7,57 (d; 1H; $J_{12,11}$ 8,8 Hz; H-12); 5,64 (d; 1H; $J_{\text{OH-2,2}}$ 5,6 Hz; OH-2); 5,28 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 4,94 (d; 1H; $J_{\text{OH-4,4}}$ 5,0 Hz; OH-4); 4,76 (t; 1H; $J_{\text{OH-6,6a}}$ 5,6 Hz, $J_{\text{OH-6,6b}}$ 5,6 Hz; OH-6); 4,62 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 16,2 Hz; H-15a); 4,57 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 16,2 Hz; H-15b); 4,00 (dd; 1H; $J_{4,\text{OH-4}}$ 5,0 Hz, $J_{4,3}$ 3,2 Hz; H-4); 3,87 (s; 3H; H-14); 3,76 (ddd; 1H; $J_{2,\text{OH-2}}$ 5,6 Hz, $J_{2,1}$ 7,6 Hz, $J_{2,3}$ 9,4 Hz; H-2); 3,73 (m; 1H; H-5); 3,57 (qn; 1H; $J_{6a,\text{OH-6}}$ 5,6 Hz, $J_{6a,5}$ 5,7 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,2 Hz; H-6a); 3,51 (qn; 1H; $J_{6b,\text{OH-6}}$ 5,6 Hz, $J_{6b,5}$ 5,6 Hz, $J_{6b,6a}$ 11,2 Hz; H-6b); 3,48 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,4 Hz, $J_{3,4}$ 3,2 Hz; H-3)

RMN de ¹³C (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 100 MHz): 164,31 (C-13); 152,91 (C-7); 139,64 (C-8); 134,51 (C-11); 125,87 (C-9); 122,98 (C-10); 117,67 (C-16); 117,07 (C-12); 100,41 (C-1); 81,79 (C-3); 75,51 (C-5); 68,68 (C-2); 64,00 (C-4); 59,85 (C-6); 54,73 (C-15); 52,51 (C-14)

HMBC (DMSO-*d*₆; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **63** estão nas páginas 151-156, respectivamente.

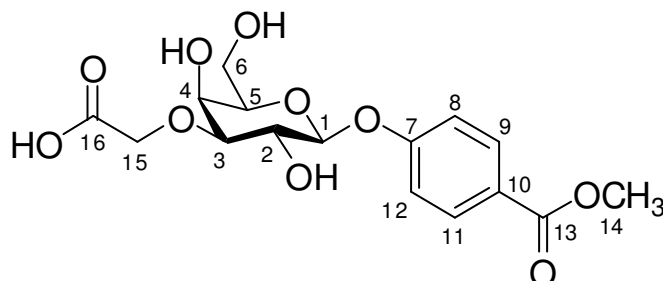
4.2.9 Procedimento de síntese de **57** e **62**



A um balão de 100 mL foram adicionados 1,5 mL de diclorometano destilado e o éster terc-butílico correspondente nestas quantidades: 0,152 g de **56** (0,35 mmol) ou 0,158 g de **61** (0,33 mmol). A mistura foi submetida à agitação magnética e resfriamento a 0 °C em banho de gelo e água, condições mantidas até o final do experimento. Após completa solubilização do material de partida, adicionou-se 1,5 mL (20 mmol) de ácido trifluoroacético gota a gota e acoplou-se um tubo com cloreto de cálcio ao balão. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila, 3 eluições) e tem duração de duas horas.

Ao término da reação verteram-se 75 mL de diclorometano no balão e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório a 35 °C até aproximadamente um quarto do volume. Repetiu-se o procedimento duas vezes, porém na última evaporação o solvente foi eliminado completamente. O material sólido obtido foi purificado por CCS (eluente: acetato de etila), obtendo-se 0,098 g (0,26 mmol) de **57** ou 0,106 g (0,25 mmol) de **62**, com 75 e 76% de rendimento, respectivamente.

4.2.9.1 Dados de caracterização de 3-O-(carboximetil)- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonilfenila (57)



Sólido branco [0,098 g (0,26 mmol; 75%) a partir de 0,152 g (0,35 mmol) de **56**]

Substância deliquescente

F.M.: C₁₆H₂₀O₁₀

M.M.: 372,32 g.mol⁻¹

F.F.: 142,4 – 145,7 °C

$[\alpha]_D^{20}$ –36 (c 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3361 (v O-H); 1706 (v C=O); 1605, 1509, 1435 (v C=C); 1241 (v C-O da aglicona); 1065 (v C-O do carboidrato)

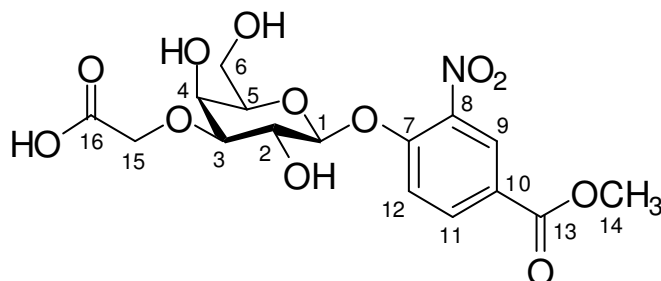
RMN de ¹H (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 400 MHz): 7,90 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,20 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 4,95 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 3,82 (s; 4H; H-14, H-4); 3,79 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 16,0 Hz; H-15a); 3,70 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 16,0 Hz; H-15a); 3,68 (m; 1H; H-2); 3,61 (m; 1H; H-5); 3,57-3,47 (m; 2H; H-6a, H-6b); 3,25 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,6 Hz, $J_{3,4}$ 2,8 Hz; H-3)

RMN de ¹³C (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 100 MHz): 174,41 (C-16); 165,83 (C-13); 161,17 (C-7); 131,03 (C-9, C-11); 122,78 (C-10); 115,98 (C-8, C-12); 100,71 (C-1); 83,12 (C-3); 75,34 (C-5); 69,17 (C-15); 68,52 (C-2); 64,62 (C-4); 60,42 (C-6); 51,85 (C-14)

HMBC (DMSO-*d*₆; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ¹H, de ¹³C, subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **57** estão nas páginas 115-120, respectivamente.

4.2.9.2 Dados de caracterização de 3-O-(carboximetil)- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (**62**)



Sólido branco [0,106 g (0,25 mmol; 76%) a partir de 0,158 g (0,33 mmol) de **61**]

Substância deliquescente

F.M.: C₁₆H₁₉NO₁₂

M.M.: 417,32 g.mol⁻¹

F.F.: 137,2 – 138,6 °C decompõe

$[\alpha]_D^{20}$ –56 (c 0,5 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$ /cm⁻¹): 3359 (v O-H); 1720 (v C=O); 1617, 1436 (v C=C); 1534, 1356 (v NO₂); 1269 (v C-O da aglicona); 1055 (v C-O do carboidrato)

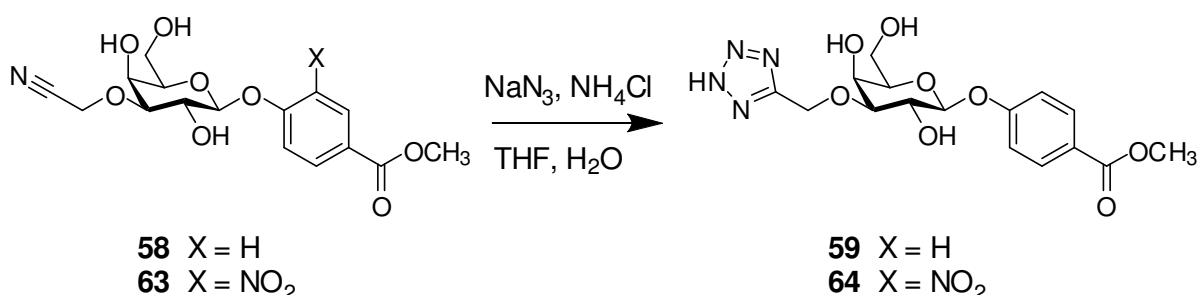
RMN de ¹H (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 400 MHz): 8,34 (d; 1H; $J_{9,11}$ 2,1 Hz; H-9); 8,14 (dd; 1H; $J_{11,9}$ 2,1 Hz, $J_{11,12}$ 9,1 Hz; H-11); 7,56 (d; 1H; $J_{12,11}$ 9,1 Hz; H-12); 5,19 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 3,90-3,80 (m; 6H; $J_{15b,15a}$ 16 Hz; H-4, H-14, H-15a, H-15b); 3,72-3,67 (m; 2H; H-2, H-5); 3,56 (dd; 1H; $J_{6a,5}$ 5,6 Hz, $J_{6a,6b}$ 10,8 Hz; H-6a); 3,50 (dd; 1H; $J_{6b,5}$ 6,4 Hz, $J_{6b,6a}$ 10,8 Hz; H-6b); 3,30 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,4 Hz, $J_{3,4}$ 2,6 Hz; H-3)

RMN de ¹³C (δ /ppm; J/Hz; DMSO-*d*₆; 100 MHz): 174,60 (C-16); 164,33 (C-13); 152,99 (C-7); 139,63 (C-8); 134,47 (C-11); 125,76 (C-9); 122,82 (C-10); 117,16 (C-12); 101,19 (C-1); 82,87 (C-3); 75,70 (C-5); 68,72 (C-15); 68,45 (C-2); 64,46 (C-4); 60,20 (C-6); 52,49 (C-14)

HMBC (DMSO-*d*₆; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ¹H, de ¹³C, subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **62** estão nas páginas 145-150, respectivamente.

4.2.10 Procedimento de síntese de 59 e 64



A um balão de 50 mL foram adicionados a nitrila correspondente, o cloreto de amônio e a azida de sódio na proporção molar de 1:14:14. Adicionou-se um volume inicial de 1 mL de uma mistura de THF/H₂O 1:1, acoplou-se ao balão um condensador de refluxo e submeteu-se a mistura à agitação magnética e aquecimento a 65 °C em banho de óleo. Uma vez estabelecido equilíbrio térmico entre o meio reacional e a fonte de aquecimento, adicionaram-se ao balão quantidades adicionais de THF/H₂O 1:1 em incrementos de 0,5 mL até solubilização completa dos reagentes. O aquecimento, a agitação magnética e o fluxo de água no condensador foram mantidos durante toda a reação, que foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 9:1).

Tabela 4 – Quantidades de reagentes e solventes utilizados na síntese de 59 e 64.

Nitrila	NH ₄ Cl	NaN ₃	THF/H ₂ O 1:1
0,100 g (0,28 mmol) de 58	0,210 g (3,93 mmol)	0,256 g (3,93 mmol)	2 mL
0,150 g (0,38 mmol) de 63	0,280 g (5,23 mmol)	0,340 g (5,23 mmol)	3 mL

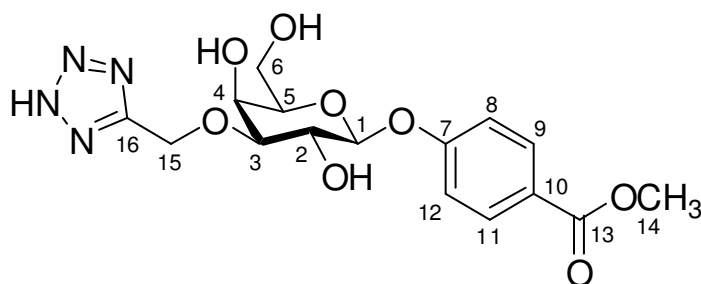
Ao longo da reação ocorreu redução do volume de solvente e, naturalmente, deposição de material insolúvel nas paredes do balão. Nesses momentos, volumes adicionais de 0,5 mL do mesmo solvente foram adicionados até que houvesse agitação homogênea de todo conteúdo reacional. Ambas as reações tem duração de aproximadamente 60 horas.

Após consumo do material de partida, foi feita acidificação do meio com HCl 3 mol/L até pH 1. Em seguida, o balão foi exposto a fluxo de ar comprimido para evaporação de THF. Ocorreu precipitação de produto que foi filtrado e lavado com diclorometano.

Na síntese do derivado tetrazólico não nitrado **59**, obteve-se um resíduo de 80 mg. Esse sólido foi recristalizado em DMSO/diclorometano, obtendo-se 57 mg (0,10 mmol) de **59**. O rendimento da recristalização e da reação foram 71 e 51% respectivamente.

Na síntese do derivado tetrazólico nitrado **64**, obteve-se um resíduo de 135 mg, porém contaminado com azida de sódio. Foi feita, então, uma extração exaustiva em pequena escala. Adicionaram-se a um frasco de penicilina o resíduo obtido, 3 mL de água e 3 mL de acetato de etila. Tampou-se o frasco com uma tampa de borracha, agitou-se a mistura vigorosamente e, após separação das fases, retirou-se com uma pipeta pasteur o maior volume possível de fase orgânica. Adicionou-se volume de acetato de etila suficiente para completar o volume inicial de 6 mL e repetiu-se o procedimento extrativo. Ao todo foram feitas 20 extrações e as frações orgânicas foram reunidas em um balão de 100 mL. O solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se 46 mg (0,10 mmol) de **64**. O rendimento da extração e da reação foram 34 e 28%, respectivamente.

4.2.10.1 *Dados de caracterização de 3-O-(5-tetrazolimetil)-β-D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonilfenila (59)*



Sólido branco [0,057 g (0,10 mmol; 51%) a partir de 0,100 g (0,28 mmol) de **58**]

F.M.: C₁₆H₂₀N₄O₈

M.M.: 396,35 g.mol⁻¹

F.F.: 198,1 – 199,8 °C

[α]_D²⁰ –13 (c 0,3 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3524, 3274 (ν O-H); 1701, 1689 (ν C=O); 1605, 1509, 1438 (ν C=C); 1250 (ν C-O da aglicona); 1115, 1065 (ν C-O do carboidrato)

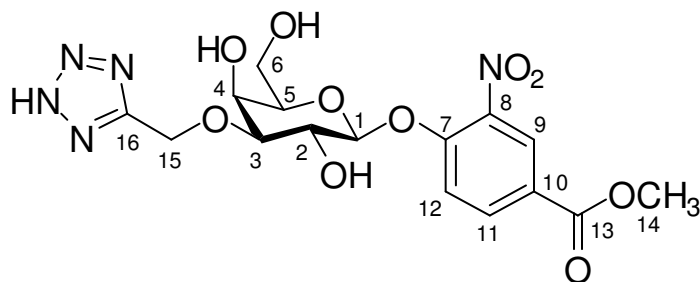
RMN de ^1H (δ /ppm; J /Hz; DMSO- d_6 ; 400 MHz): 7,91 (d; 2H; $J_{9,8; 11,12}$ 8,8 Hz; H-9, H-11); 7,13 (d; 2H; $J_{8,9; 12,11}$ 8,8 Hz; H-8, H-12); 5,06 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 13,6 Hz; H-15a); 5,04 (1H; H-1); 5,01 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 13,6 Hz; H-15b); 4,03 (d; 1H; $J_{4,3}$ 3,0 Hz; H-4); 3,82 (s; 3H; H-14); 3,82-3,79 (1H; H-2); 3,65 (m; 1H; H-5); 3,58 (m; 1H; $J_{6a,5}$ 5,6 Hz; H-6a); 3,53-3,49 (1H; H-6b); 3,51 (dd; 1H; $J_{3,2}$ 9,6 Hz, $J_{3,4}$ 3,0 Hz; H-3)

RMN de ^{13}C (δ /ppm; J /Hz; DMSO- d_6 ; 100 MHz): 165,80 (C-13); 161,03 (C-7); 154,31 (C-16); 131,07 (C-9, C-11); 123,02 (C-10); 116,06 (C-8, C-12); 100,01 (C-1); 81,96 (C-3); 75,25 (C-5); 69,26 (C-2); 64,64 (C-4); 60,52 (C-15); 60,02 (C-6); 51,89 (C-14)

HMBC (DMSO- d_6 ; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **59** estão nas páginas 127-132, respectivamente.

4.2.10.2 *Dados de caracterização de 3-O-(5-tetrazolimetil)- β -D-galactopiranosídeo de 4-metoxicarbonil-2-nitrofenila (64)*



Sólido amarelo [0,046 g (0,10 mmol; 28%) a partir de 0,150 g (0,38 mmol) de **63**]

F.M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_{10}$

M.M.: 441,35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

F.F.: 163,9 – 164,9 $^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D^{20}$ –47 (c 0,3 MeOH)

IV ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$ / cm^{-1}): 3363 (v O-H); 1727 (v C=O); 1619, 1439 (v C=C); 1535, 1348 (v NO_2); 1269 (v C-O da aglicona); 1052 (v C-O do carboidrato)

RMN de ^1H (δ /ppm; J /Hz; DMSO- d_6 ; 400 MHz): 8,36 (d; 1H; $J_{9,11}$ 2,1 Hz; H-9); 8,16 (dd; 1H; $J_{11,9}$ 2,1 Hz, $J_{11,12}$ 8,9 Hz; H-11); 7,58 (d; 1H; $J_{12,11}$ 8,9 Hz; H-12); 7,27 (m; 2H; OH); 5,26 (d; 1H; $J_{1,2}$ 7,6 Hz; H-1); 5,05 (d; 1H; $J_{15a,15b}$ 13,6 Hz; H-15a); 4,99 (d; 1H; $J_{15b,15a}$ 13,6 Hz; H-15b); 4,79 (s; 1H; OH); 4,05 (d; 1H; $J_{4,3}$ 2,8 Hz; H-4); 3,87 (s; 3H; H-14); 3,81 (m; 1H; H-2); 3,72 (m; 1H; H-5); 3,58 (dd; 1H; $J_{6a,5}$ 5,8 Hz, $J_{6a,6b}$ 10,6 Hz; H-6a); 3,54-3,51 (m; 2H; H-6b, H-3)

RMN de ^{13}C (δ /ppm; J /Hz; DMSO- d_6 ; 100 MHz): 164,32 (C-13); 154,46 (C-16); 152,93 (C-7); 139,65 (C-8); 134,52 (C-11); 125,85 (C-9); 122,95 (C-10); 117,17 (C-12); 100,51 (C-1); 82,00 (C-3); 75,59 (C-5); 69,03 (C-2); 64,35 (C-4); 60,67 (C-15); 59,91 (C-6); 52,51 (C-14)

HMBC (DMSO- d_6 ; 400 MHz): H-3xC-15; H-15axC-3; H-15bxC-3

Os espectros no IV, de RMN de ^1H , de ^{13}C , subespectro DEPT-135, mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC de **64** estão nas páginas 157-162, respectivamente.

4.3 Ensaios enzimáticos

Utilizou-se o método espectrofluorimétrico desenvolvido por Douglas e colaboradores (DOUGLAS *et al.*, 2006) e condições experimentais adaptadas por Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al.*, 2010b).

Inicialmente foram preparadas soluções dos galactosídeos a 4 mM contendo 5% de DMSO em volume. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço foram adicionados 25 μL de tampão fosfato pH 7,4, 25 μL de solução diluída da enzima recombinante trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* e 25 μL de solução 4,0 mM de inibidor. O meio reacional foi incubado por 10 minutos a 25 $^\circ\text{C}$ e, em seguida, adicionou-se 25 μL de solução de substrato MuNANA a 0,4 mM. Uma vez que o volume final em cada poço foi 100 μL , a concentração final de amostra e de substrato foi 1 e 0,1 mM, respectivamente. Os derivados nitrados **62** e **64** também foram ensaiados na concentração de 500 μM , sob as mesmas condições citadas.

A liberação do fluoróforo ocorreu normalmente no meio reacional sem inibidor (50 μL de tampão + 25 μL de enzima + 25 μL de MuNANA), o controle negativo. Por outro lado, no meio reacional contendo o piridoxal fosfato (25 μL de tampão + 25 μL de enzima + 25 μL de piridoxal fosfato a 4mM + 25 μL de MuNANA), o controle positivo, a liberação do fluoróforo foi inibida. A fluorescência foi monitorada durante 10 minutos a 25 $^\circ\text{C}$, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460

nm, respectivamente. Foram realizados 3 três experimentos em dias distintos e todas as reações foram feitas em triplicata.

Os dados foram analisados no programa Prisma 4.0 e o valor da porcentagem de inibição enzimática foi calculado empregando-se a equação $\% I = 100 \times [1 - (V_i / V_0)]$, em que V_i é a velocidade da reação na presença de inibidor e V_0 é a velocidade da reação na ausência de inibidor (controle negativo).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados 10 galactosídeos de arila modificados em C-3, sendo todos inéditos. Uma vez otimizadas as condições experimentais, as reações de alquilação utilizando óxido de dibutilestanho foram eficientes e seletivas. Esses achados são compatíveis com os resultados igualmente positivos da literatura. Conclui-se, assim, que o método de óxido de dibutilestanho também tem aplicabilidade em reações de alquilação 3-*O*-seletivas de galactosídeos de arila, relatadas pioneiramente neste trabalho.

Os rendimentos dessas reações foram de modestos a elevados; somente a síntese do derivado **55** foi inferior a 50%. A eficiência das reações variou conforme o eletrófilo utilizado, sendo observada a seguinte ordem de reatividade: bromoacetato de terc-butila > bromoacetonitrila > iodeto de metila.

O planejamento de galactosídeos de arila inibidores potenciais de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* logrou pouco êxito, uma vez que os produtos obtidos não inibiram sensivelmente a enzima. O simples bloqueio da posição 3 dos galactosídeos **53** e **54** ou mesmo a introdução do grupo ácido carboximetil não incrementaram a atividade biológica dessas moléculas.

Observou-se, entretanto, que a introdução de um grupo nitro na aglicona hidrofóbica e a substituição bioisostérica do grupo ácido carboxílico por um grupo tetrazol nos compostos **57** e **62** são modificações moleculares que aumentam significativamente a atividade inibitória de TcTS dos galactosídeos de arila e que podem ser exploradas mais consistentemente.

Têm-se como perspectivas sintetizar e ensaiar novos galactosídeos de arila, derivados tetrazólicos modificados em diferentes posições do núcleo de D-galactose e com outras agliconas contendo o grupo nitro. Assim, será possível planejar outro grupo de moléculas com maior potencial inibitório de TcTS e estabelecer relações estrutura-atividade mais confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTÍ, R. *et al.* Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 659-670, 2004.
- ALAIS, J.; VEYRIÈRES, A. Synthesis of *O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-mannose, a postulated trisaccharide of human erythrocyte membrane sialoglycoprotein. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 377-381, 1981.
- AMAYA, M. F. *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Structure**, v. 12, n. 5, p. 775–784, 2004.
- ARIOKA, S. *et al.* Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, n. 4, p. 1633-1640, 2010.
- ATWOOD III, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, p. 473–476, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: fev. 2012.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. McGraw-Hill: New York, 2006.
- BOCK, K.; THØGERSEN, H. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of mono and oligosaccharides. **Annu. Rep. NMR Spectrosc.**, v. 13, p. 1-57, 1982.
- BUCHINI, S.; BUSCHIAZZO, A.; WITHERS, S. G. A new generation of specific *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 47, n. 14, p. 2700-2703, 2008.
- BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2006.
- BUSCHIAZZO, A. *et al.* Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. **EMBO J.**, v. 19, n. 1, p. 16–24, 2000.
- BUSCHIAZZO, A. *et al.* The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Mol. Cell**, v. 10, n. 4, p. 757–768, 2002.
- BUSCHIAZZO, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. **Plos Pathog.**, v. 8, n. 1, e1002474, 2012.
- BUSSE, H. *et al.* Galactose-phosphonates as mimetics of the sialyltransfer by trypanosomal sialidases. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 26, n. 3, p. 159–194, 2007.

CAMERON, T. S. *et al.* The crystal structure of methyl 4,6-*O*-benzylidene-2,3-*O*-dibutylstannylene- α -D-glucopyranoside. **Can. J. Chem.**, v. 70, n. 6, p. 1618-1622, 1992.

CAMPO, V. L. *et al.* Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 1, p. 145-156, 2012.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl. 1, p. 331–336, 1999.

CARVALHO, D. T. **Síntese de derivados de D-galactose inibidores potenciais de interação lectina-carboidrato**. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CARVALHO, S. T. *et al.* A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiology**, v. 20, n. 8, p. 1034-1045, 2010a.

CARVALHO, I. *et al.* 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, n. 7, p. 2412-2427, 2010b.

CAVALLESCO, R.; PEREIRA, M. E. Antibody to *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection *in vitro* and identifies a subpopulation of trypomastigotes. **J. Immunol.**, v. 140, n. 2, p. 617-625, 1988.

CHEN, X.; VARKI, A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. **ACS Chem. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 163-176, 2010.

CIAVAGLIA, M. C.; CARVALHO, T. U.; SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 193, n. 2, p. 718-721, 1993.

CLAYDEN, J. *et al.* **Organic Chemistry**. New York: Oxford, 2001. 1508 p.

COLLINS, P.; FERRIER, R. **Monosaccharides**: Their chemistry and their roles in natural products. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 574 p.

CONCHIE, J.; LEVVY, G. A.; MARSH, C. A. Methyl and phenyl glycosides of the common sugars. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 12, p. 157-187, 1957.

CREMONA, M. L. *et al.* A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. **Gene**, v. 160, n. 1, p. 123–128, 1995.

CREMONA, M. L. *et al.* Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display β -galactose binding activity. **Glycobiology**, v. 9, n. 6, p. 581–587, 1999.

DAMAGER, I. *et al.* Kinetic and mechanistic analysis of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase reveals a classical ping-pong mechanism with acid/base catalysis. **Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 3507-3512, 2008.

DAVID, S.; THIEFFRY, A.; VEYRIÈRES, A. A mild procedure for the regiospecific benzylation and allylation of polyhydroxy-compounds *via* their stannylene derivatives in non-polar solvents. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 1793-1801, 1981.

DAVID, S.; HANESSIAN, S. Regioselective manipulation of hydroxyl groups via organotin derivatives. **Tetrahedron**, v. 41, n. 4, p. 643-663, 1985.

DE FÁTIMA, A. *et al.* Ácidos siálicos: da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. **Quím. Nova**, v. 28, n. 2, p. 306-316, 2005.

DEMIR, O.; ROITBERG, A. E. Modulation of catalytic function by differential plasticity of the active site: case study of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and *Trypanosoma rangeli* sialidase. **Biochemistry**, v. 48, n. 15, p. 3398-3406, 2009.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2447, 2009.

DOUGLAS, K. T. *et al.* Continuous fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **Anal. Biochem.**, v. 357, n. 2, p. 302-304, 2006.

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

ENGSTLER, M.; SCHAUER, R. Sialidases of african trypanosomes. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 6, p. 222-225, 1993a.

ENGSTLER, M.; REUTER, G.; SCHAUER, R. The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 61, n. 1, p. 1-14, 1993b.

ENGSTLER, M. *et al.* *N*-(4-nitrophenyl)oxamic acid and related *N*-acylanilines are non-competitive inhibitors of *Vibrio cholerae* sialidase but do not inhibit *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei* trans-sialidases. **Helv. Chim. Acta**, v. 77, p. 1166-1174, 1994.

ENGSTLER, M.; SCHAUER, R.; BRUN, R. Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. **Acta Trop.**, v. 59, n. 2, p. 117-129, 1995.

FAIRLAMB, A. H. Chemotherapy of human african trypanosomiasis: current and future prospects. **Trends. Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 488-494, 2003.

FERRERO-GARCIA, M. A. *et al.* The effect of pyridoxal 5'-phosphate and related compounds on *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **An. Asoc. Quím. Arg.**, v. 81, p. 127-132, 1993.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the *trans*-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, n. 16, v. 7, p. 282–286, 2000.

GONÇALVES, A. G. *et al.* Regioselective synthesis of long-chain ethers and their sulfates derived from methyl β -D-galactopyranoside and derivatives via dibutylstannylene acetal intermediates. **Carbohydr. Res.**, v. 340, n. 14, p. 2245-2250, 2005.

GONG, Y.; SUN, H.; XIE, J. Synthesis of oligosaccharide mimetics with glycoaminoxy acids. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2009, n. 34, p. 6027-6033, 2009.

GRINDLEY, T. B.; THANGARASA, R. The structures and reactions of stannylene acetals from carbohydrate-derived *trans*-diols. Part I. In the absence of added nucleophiles. **Can. J. Chem.**, v. 68, n. 7, p. 1007-1019, 1990.

HAQUE, M. E. *et al.* Regioselective monoalkylation of non-protected glycopyranosides by the dibutyltin oxide method. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 6, p. 2243-2255, 1985.

HARDUIN-LEPERS, A. *et al.* The human sialyltransferase family. **Biochimie.**, v. 83, n. 8, p. 727-737, 2001.

HARRISON, J. A. *et al.* Probing the acceptor substrate binding site of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase with systematically modified substrates and glycoside libraries. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, n. 5, p. 1653-1660, 2011.

IZUMIDA, Y.; AKITOSHI, S.; MAEDA, M. Erythrocyte aggregation: bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1067, n. 2, p. 221-226, 1991.

KAJI, E.; SHIBAYAMA, K.; IN, K. Regioselectivity shift from β -(1 \rightarrow 6)- to β -(1 \rightarrow 3)-glycosylation of non-protected methyl β -D-galactopyranosides using the stannylene activation method. **Tetrahedron Lett.**, v. 44, n. 26, p. 4881-4885, 2003.

KIM, J. H. *et al.* Development of new and selective *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors from sulfonamide chalcones and their derivatives. **Chembiochem**, v. 10, n. 15, p. 2475-2479, 2009.

KRÖGER, L.; THIEM, J. Synthesis and evaluation of glycosyl donors with novel leaving groups for transglycosylations employing β -galactosidase from bovine testes. **Carbohydr. Res.**, v. 342, n. 3-4, p. 467-481, 2007.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.

LUNDT, B. F. *et al.* Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. Mechanisms, biproduct formation and evaluation of scavengers. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v. 12, n. 5, p. 258-268, 1978.

MEINKE, S.; SCHROVEN, A.; THIEM, J. Sialic acid C-glycosides with aromatic residues: investigating enzyme binding and inhibition of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, n. 12, p. 4487-4497, 2011.

MING, M. *et al.* Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 243-252, 1993.

MITCHELL, F. L. *et al.* Tryptophan as a molecular shovel in the glycosyl transfer activity of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Biophys. J.**, v. 98, n. 9, L38-40, 2010.

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.

MUCCI, J. *et al.* The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. **Cellular Microbiol.**, v. 8, n. 7, p. 1086-1095, 2006.

MUNAVU, R. M.; SZMANT, H. H. Selective formation of 2 esters of some methyl α -D-hexopyranosides via dibutylstannylene derivatives. **J. Org. Chem.**, v. 41, n. 10, p. 1832-1836, 1976.

NAGASHIMA, N., OHNO, M. Selective monoalkylation of acyclic diols by means of dibutyltin oxide and fluoride salts. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 8, p. 1972-1982, 1991.

NASHED, M. A.; ANDERSON, L. Organotin derivatives and the selective acylation and alkylation of the equatorial hydroxy group in a vicinal, equatorial-axial pair. **Tetrahedron Lett.**, v. 17, n. 39, p. 3503-3506, 1976.

NERES, J. *et al.* Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 5, p. 2106-2119, 2007.

NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug-design in parasitology: trans-sialidase as a case of study for Chagas disease. **Drug Disc. Today**, v. 13, n. 3-4, p. 110-117, 2008.

NERES, J. *et al.* Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase from *in silico* screening. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, n. 3, p. 589-596, 2009.

PARIS, G. *et al.* A sialidase mutant displaying trans-sialidase activity. **J. Mol. Biol.**, v. 345, n. 4, p. 923-934, 2005.

PEREIRA, M. E. A. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Science**, v. 219, p. 1444–1446, 1983.

PEREIRA, M. E. A.; MOSS, D. Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 15, n. 1, p. 95-103, 1985.

PEREIRA, M. E. A. *et al.* Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 9, p. 3884-3892, 1996.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 1299–1307, 2000.

PIRAS, M. M.; HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R. The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 22. n. 2-3, p. 135-143, 1987.

PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma rangeli* lacks trans-sialidase activity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p. 19-26, 1993.

PREVIATO, J. O. *et al.* Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules – a proposal for a new metabolic route. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 16, n. 1, p. 85-96, 1985.

PRIOLI, R. P.; MEJIA, J. S.; PEREIRA, M. E. Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection *in vitro*. **J. Immunol.**, v. 144, n. 11, p. 4384-4391, 1990.

PRODGER, J. C.; *et al.* Mimics of the sialyl Lewis X tetrasaccharide. Replacement of the *N*-acetylglucosamine sugar with simple C₂-symmetric 1,2-Diols. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 4. n. 6, p. 793-801, 1996.

RISSO, M. G. *et al.* Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 12, p. 2250-2259, 2004.

RODRIGUES-COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97. n. 1, p. 3-24, 2002.

SCHAUER, R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. **Zoology**. v. 107, n. 1, p. 49-64, 2004.

SCHENKMAN, S. *et al.* A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1117–1125, 1991.

SCHENKMAN, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.**, v. 175, n. 2, p. 567-575, 1992.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 6, p. 218–225, 1993a.

SCHENKMAN, R. P.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 898–902, 1993b.

SCHENKMAN, S. *et al.* Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994.

SMITH, P. J.; WHITE, R. F. M.; SMITH, L. A ^{119}Sn NMR and Mössbauer study of some di- and tri-alkyltin(IV) alcoxides. **J. Organometal. Chem.**, v. 40, n. 2, p. 341-353, 1972.

STREICHER, H.; BUSSE, H. Building a successful structural motif into sialylmimetics cyclohexenephosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 4, p. 1047-1057, 2006.

SURESHBADU, V. V.; NARENDRA, N. Protection reactions. In: HUGHES, A. B. (Ed.). **Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. vol. 4, cap. 1, 1-97.

TAYLOR, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 830-837, 1996.

TODESCHINI, A. R. *et al.* Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* catalyzes sialoside hydrolysis with retention of configuration. **Glycobiology**, v. 10, n. 2, p. 213, 221, 2000.

TOMLINSON, S.; RAPER, J. Natural human immunity to trypanosomes. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 9, p. 354–359, 1998.

TRIBULATTI, M. V. *et al.* The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 201–207, 2005.

TSUDA, Y.; HAQUE, M. E.; YOSHIMOTO, K. Regioselective monoacylation of some glycopiranosides via cyclic tin intermediates. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 5, p. 1612-1624, 1983.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop.**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

VANDEKERCKHOVE, F. *et al.* Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 2, n. 6, p. 541-548, 1992.

VARKI, A.; SCHAUER, R. Sialic acids. In: VARKI, A. *et al* (Ed.). **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2009. cap 14, p. 199-218.

VIANA, R. M. R. **Síntese de derivados da D-arabinose e investigação da sua atividade antifúngica**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM; F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 119, n. 1, p. 228-235, 1984.

VON ITZSTEIN, M. *et al.* Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. **Nature**, v. 363, p. 418–423, 1993.

YOSHIDA, N. *et al.* Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 84, n. 1, p. 57-67, 1997.

WATTS, A. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: tyrosine is the catalytic nucleophile. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, n. 25, p. 7532–7533, 2003.

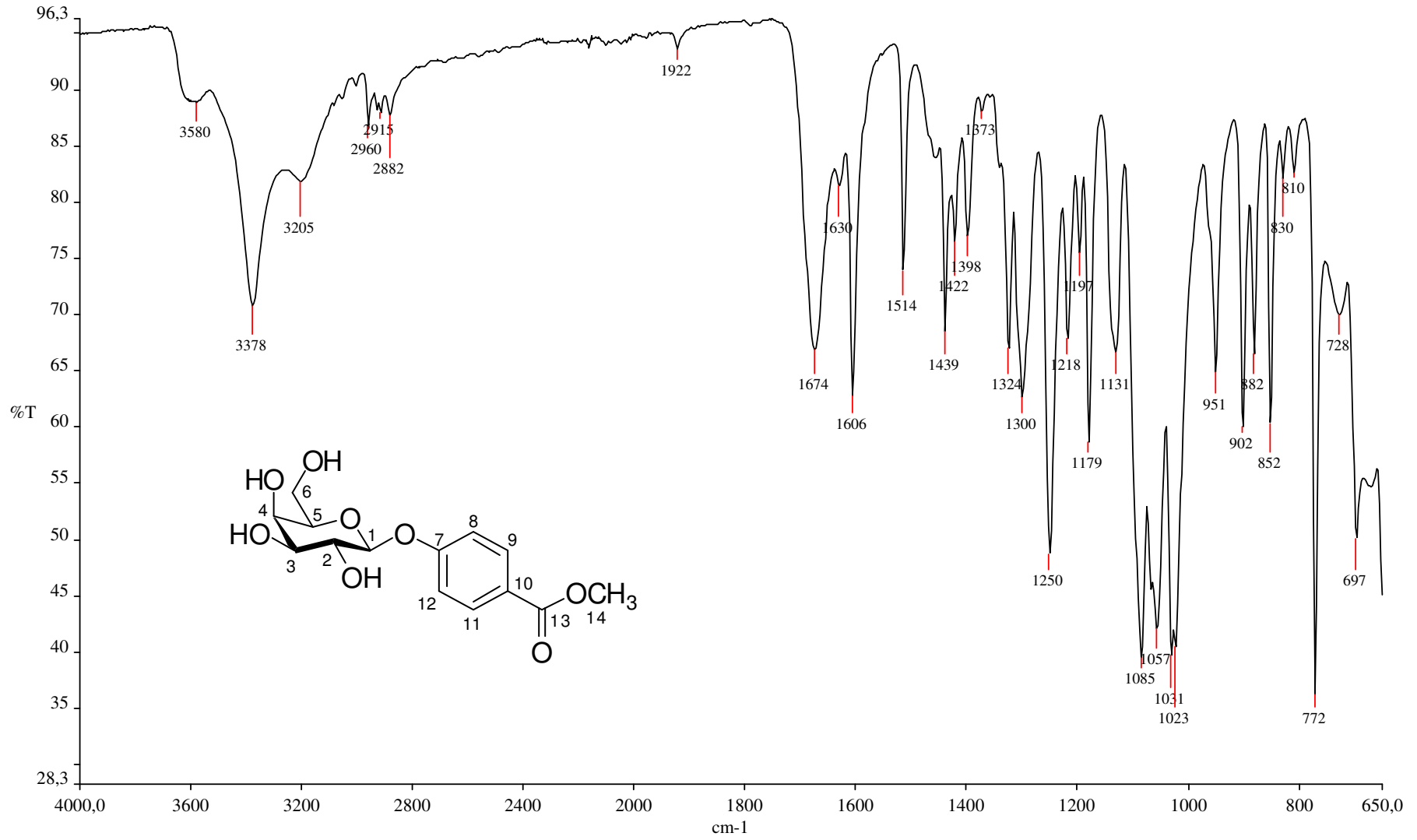
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reporte sobre la Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires, 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reportes-enfermedad-chagas/en/index.html>>. Acesso em: fev. 2010.

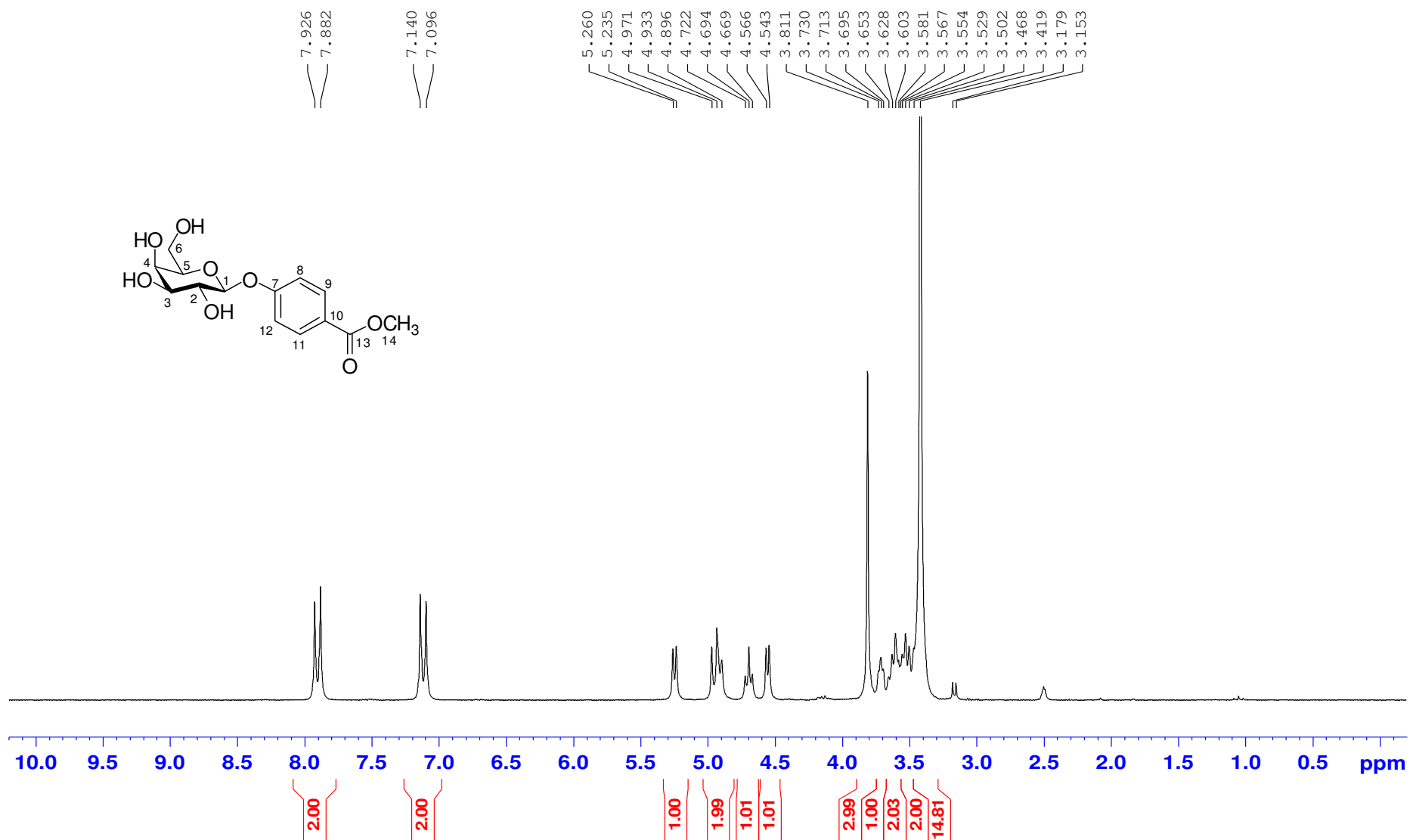
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em jan. 2012.

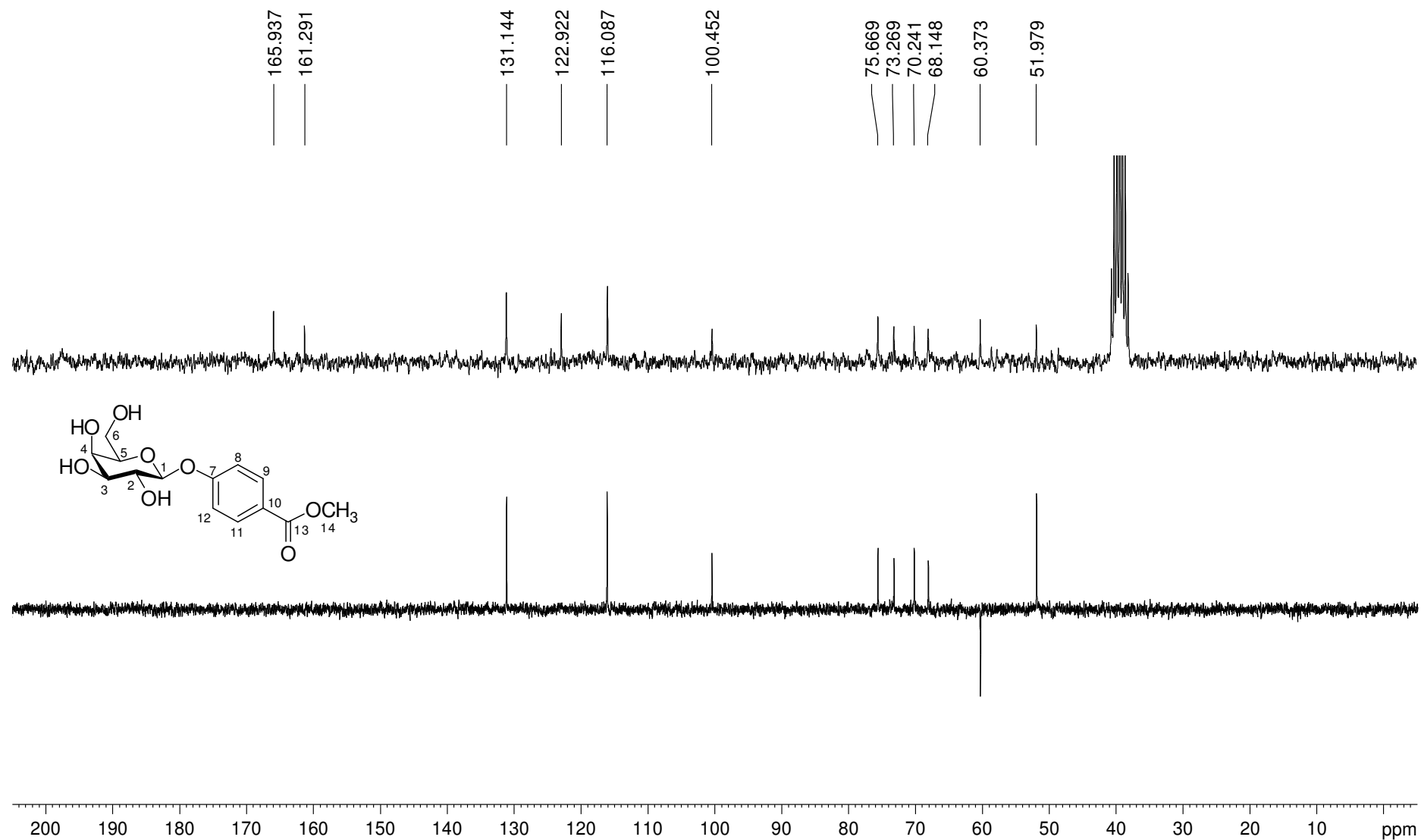
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO model list of essential medicines**. 16th ed (updated), march 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>>. Acesso em: fev. 2010.

<<http://www.cazy.org>>. Acesso em: mar. 2010.

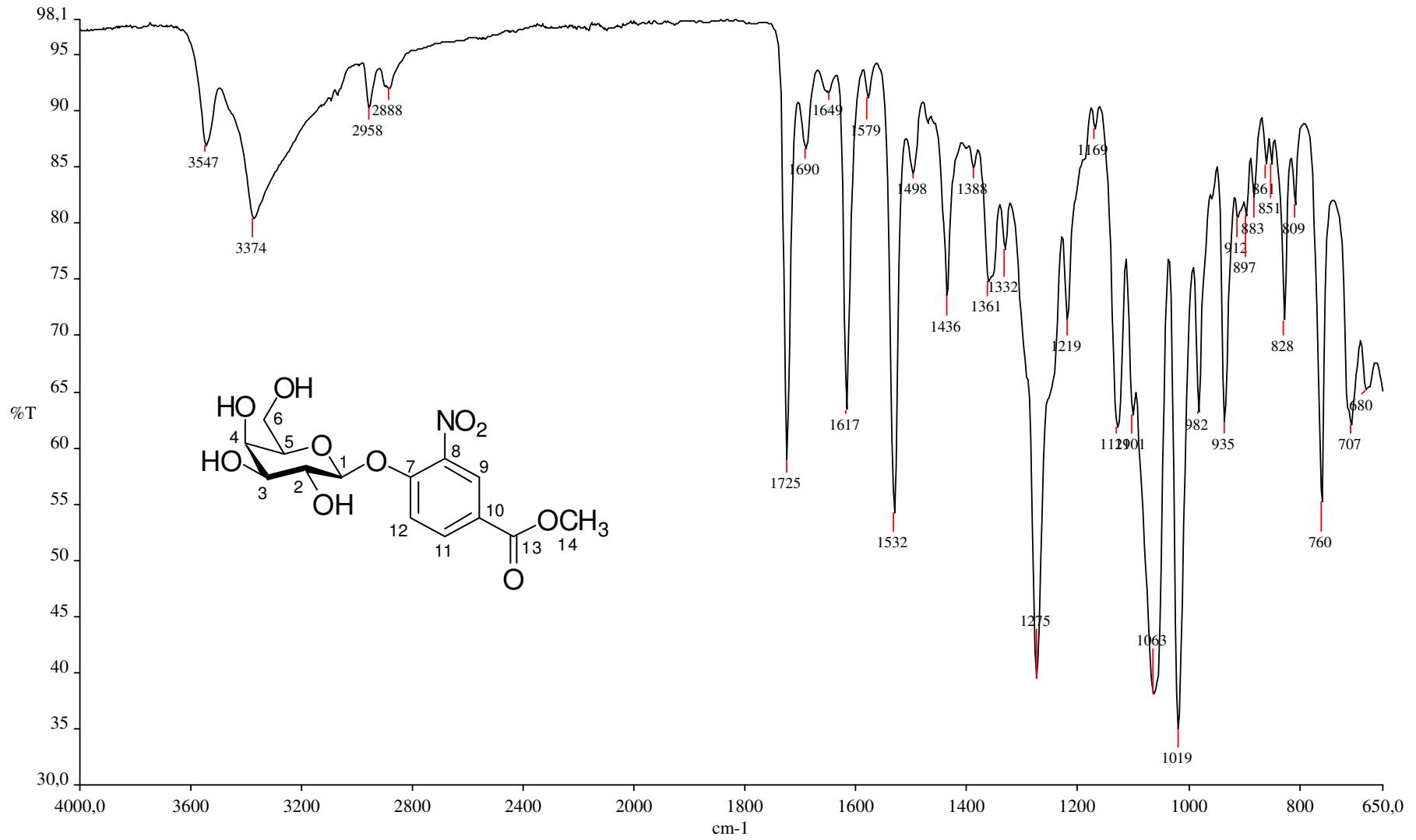
APÊNDICE A – Espectro no infravermelho de 53

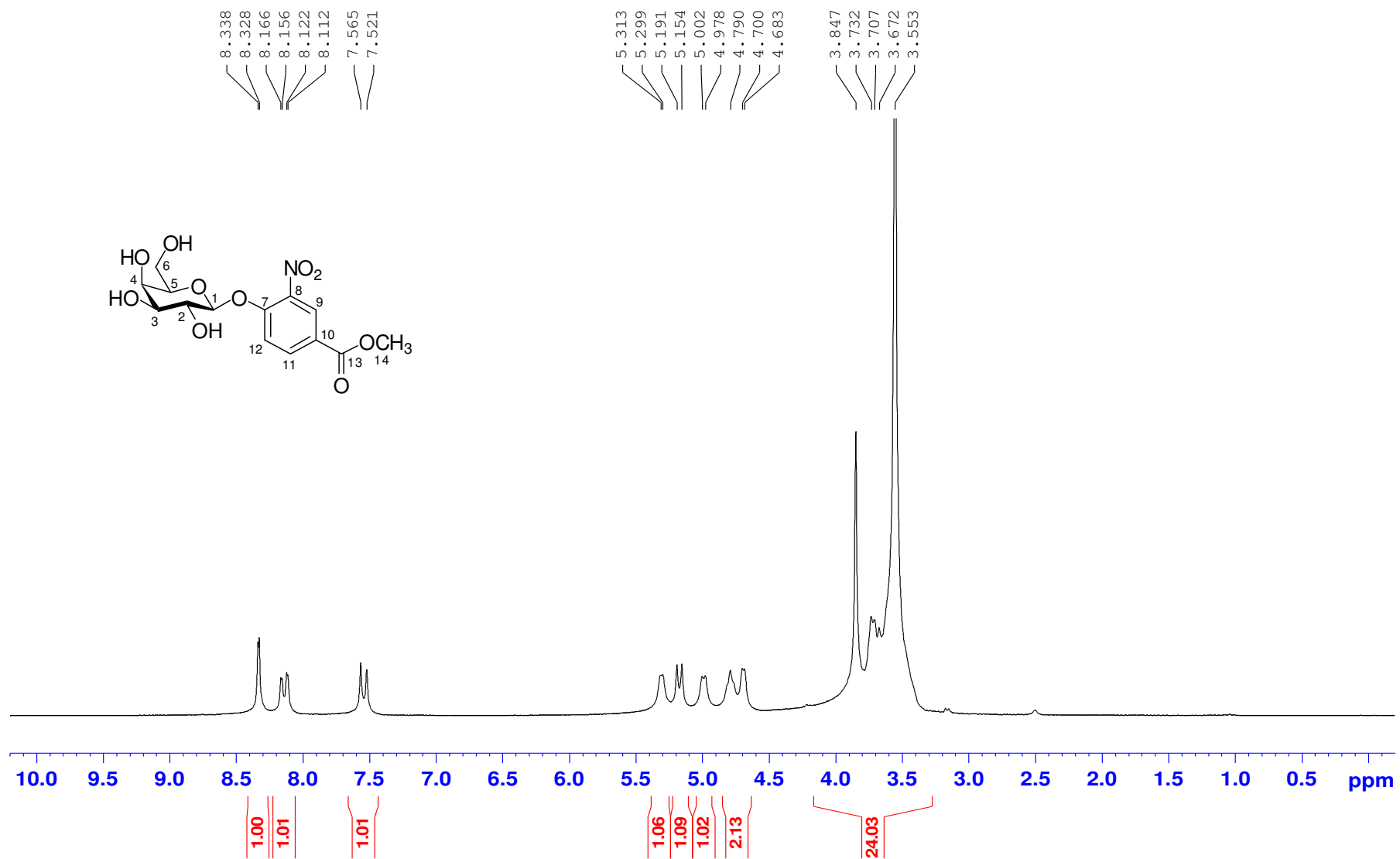


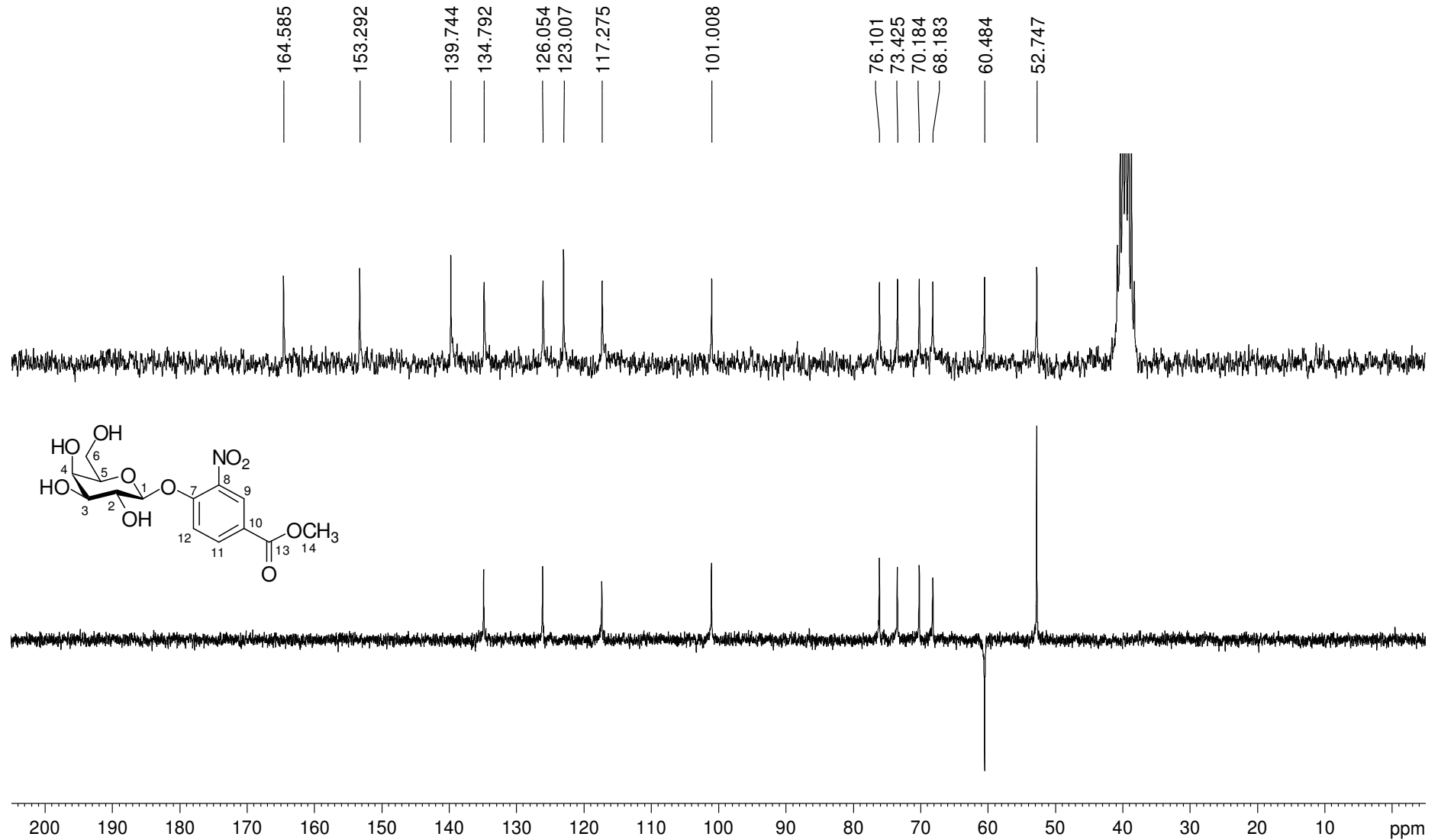
APÊNDICE B – Espectro de RMN de ^1H de 53 (DMSO- d_6 ; 200 MHz)

APÊNDICE C – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 53 (DMSO- d_6 ; 50 MHz)

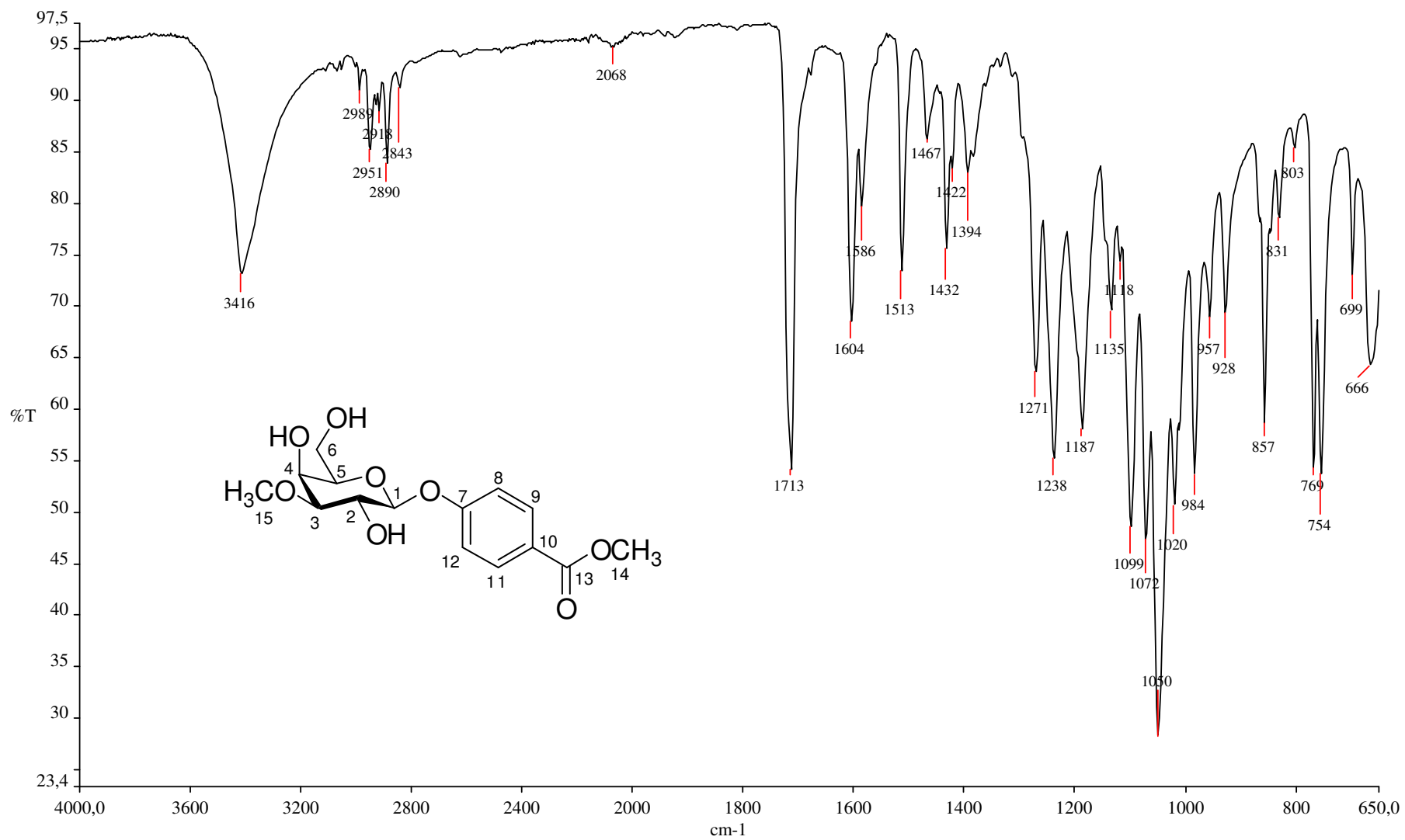
APÊNDICE D – Espectro no infravermelho de 54

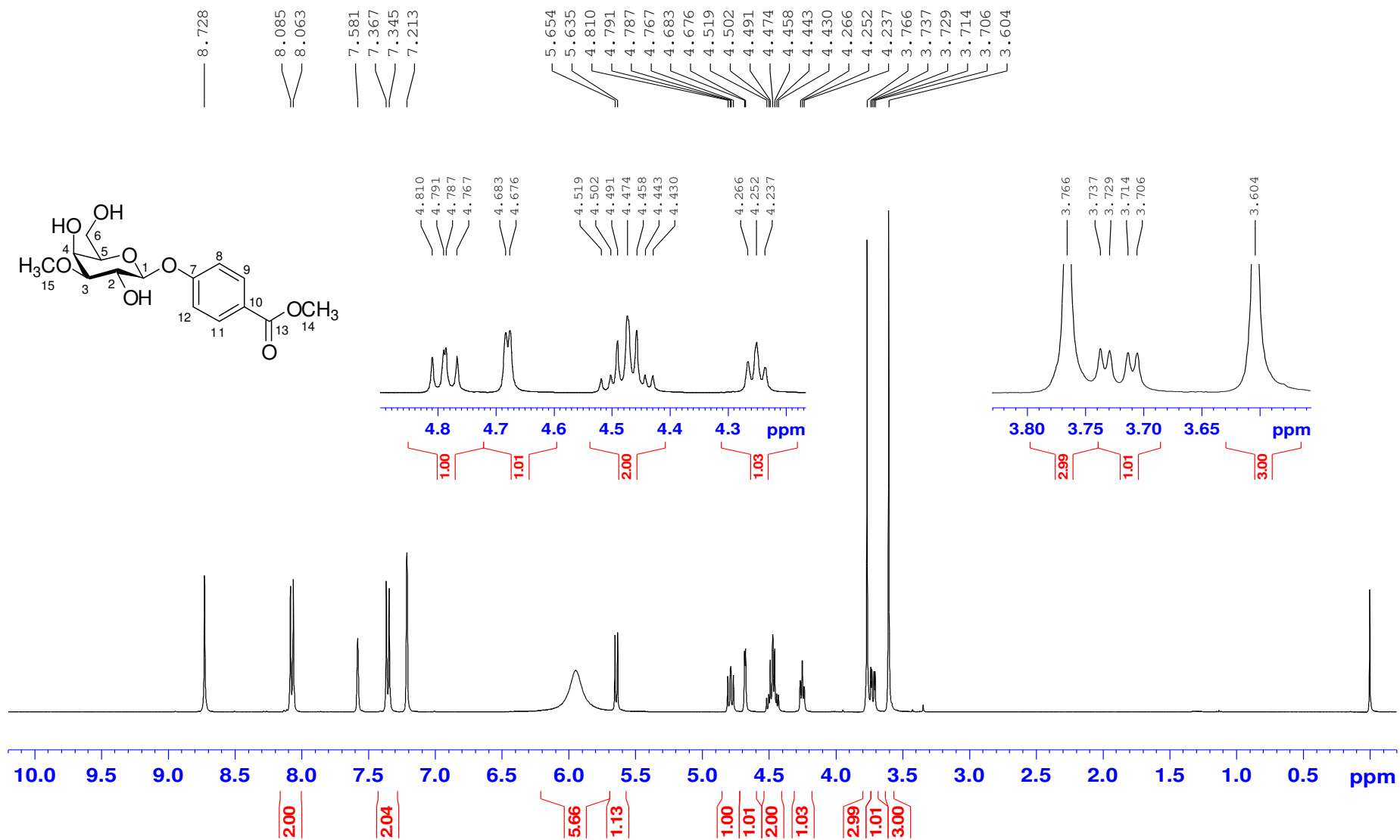


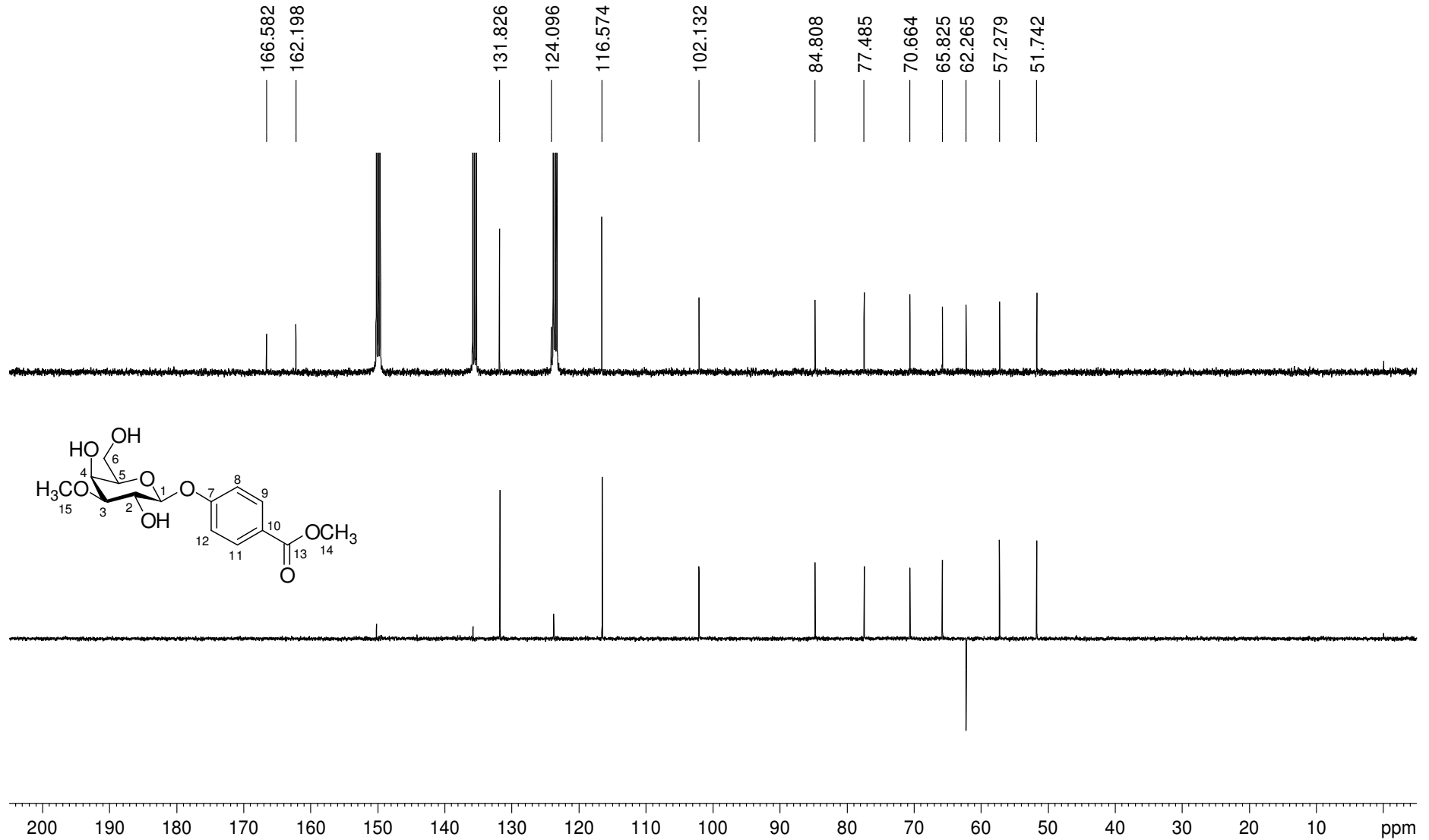
APÊNDICE E – Espectro de RMN de ^1H de 54 (DMSO- d_6 ; 200 MHz)

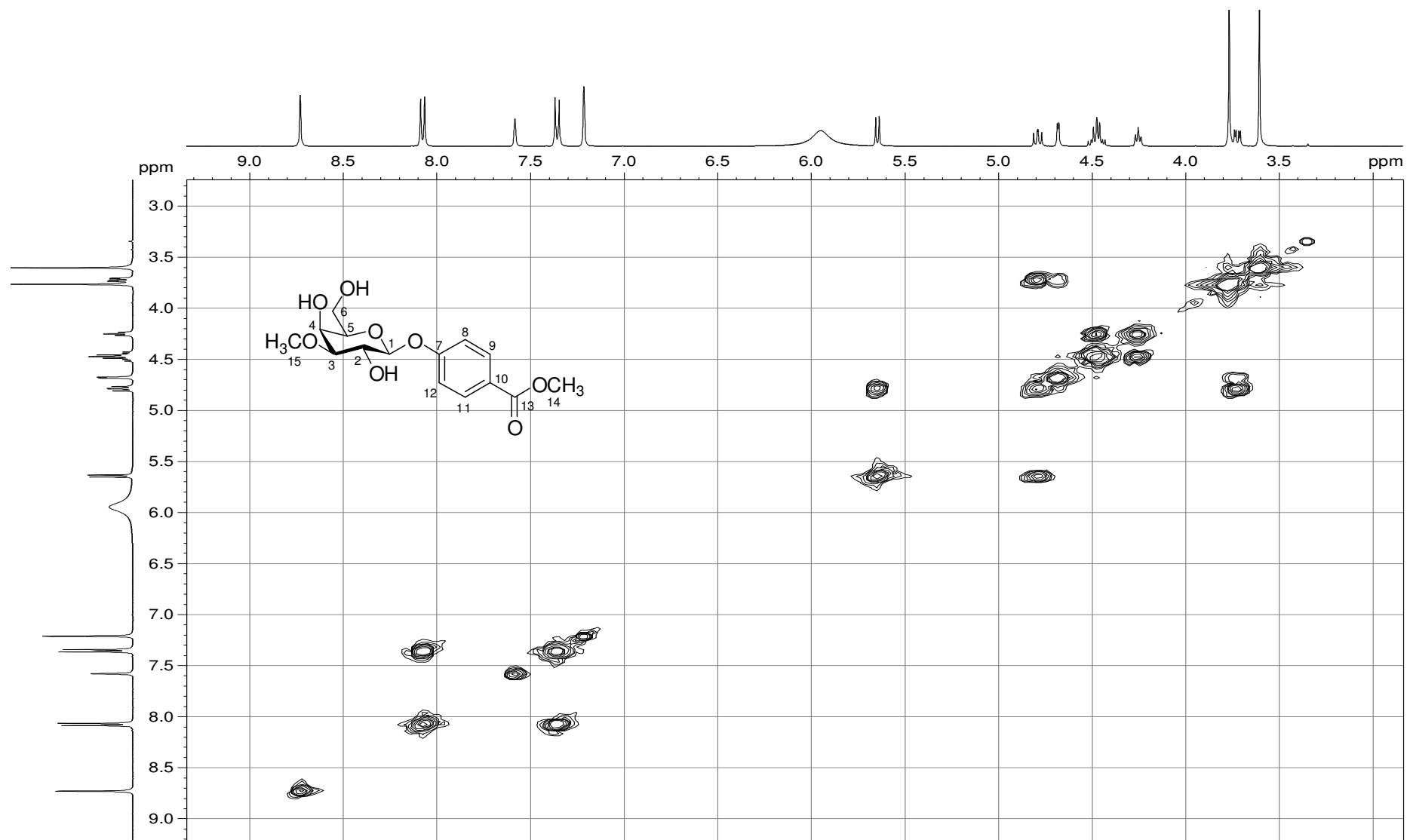
APÊNDICE F – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 54 (DMSO- d_6 ; 50 MHz)

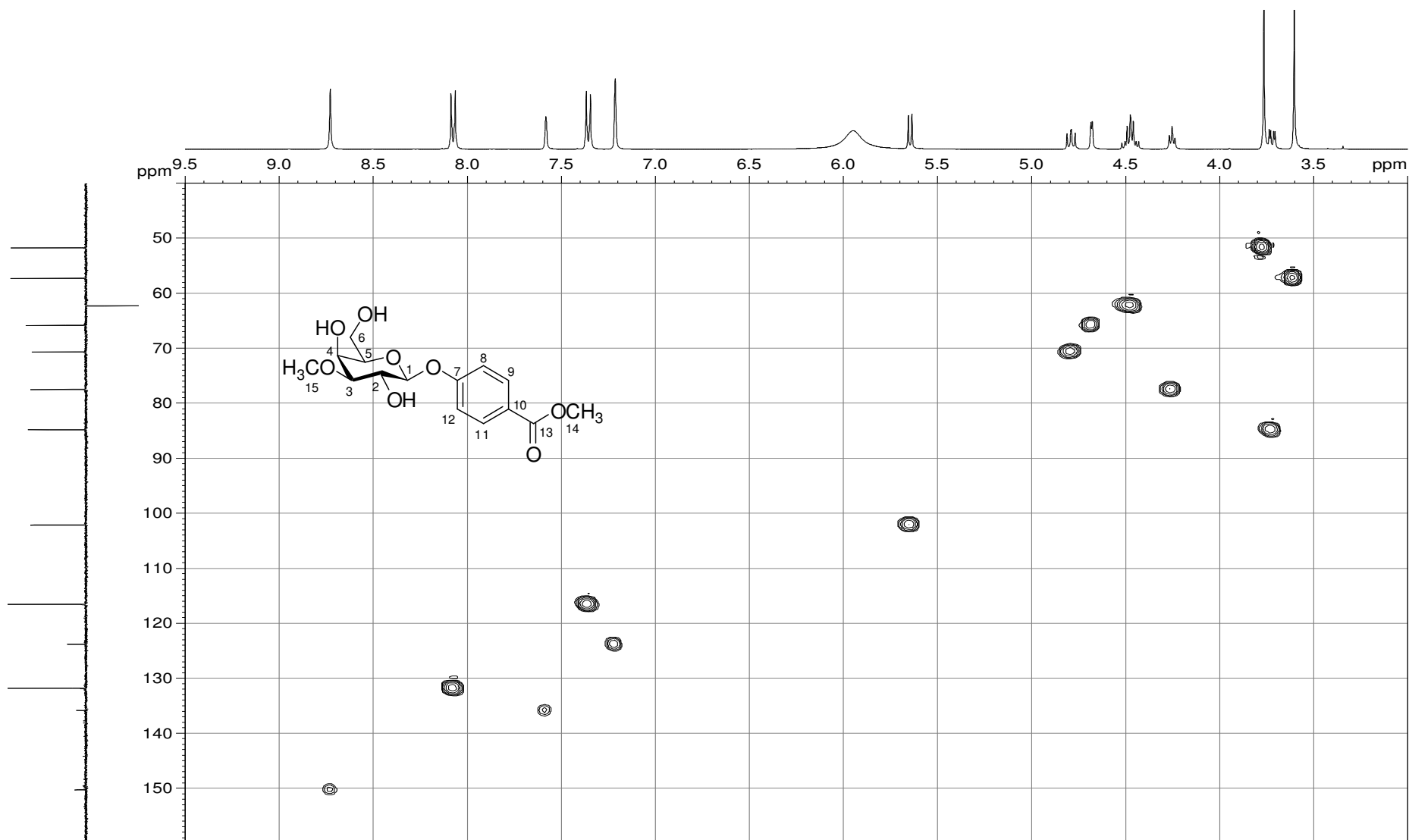
APÊNDICE G – Espectro no infravermelho de 55

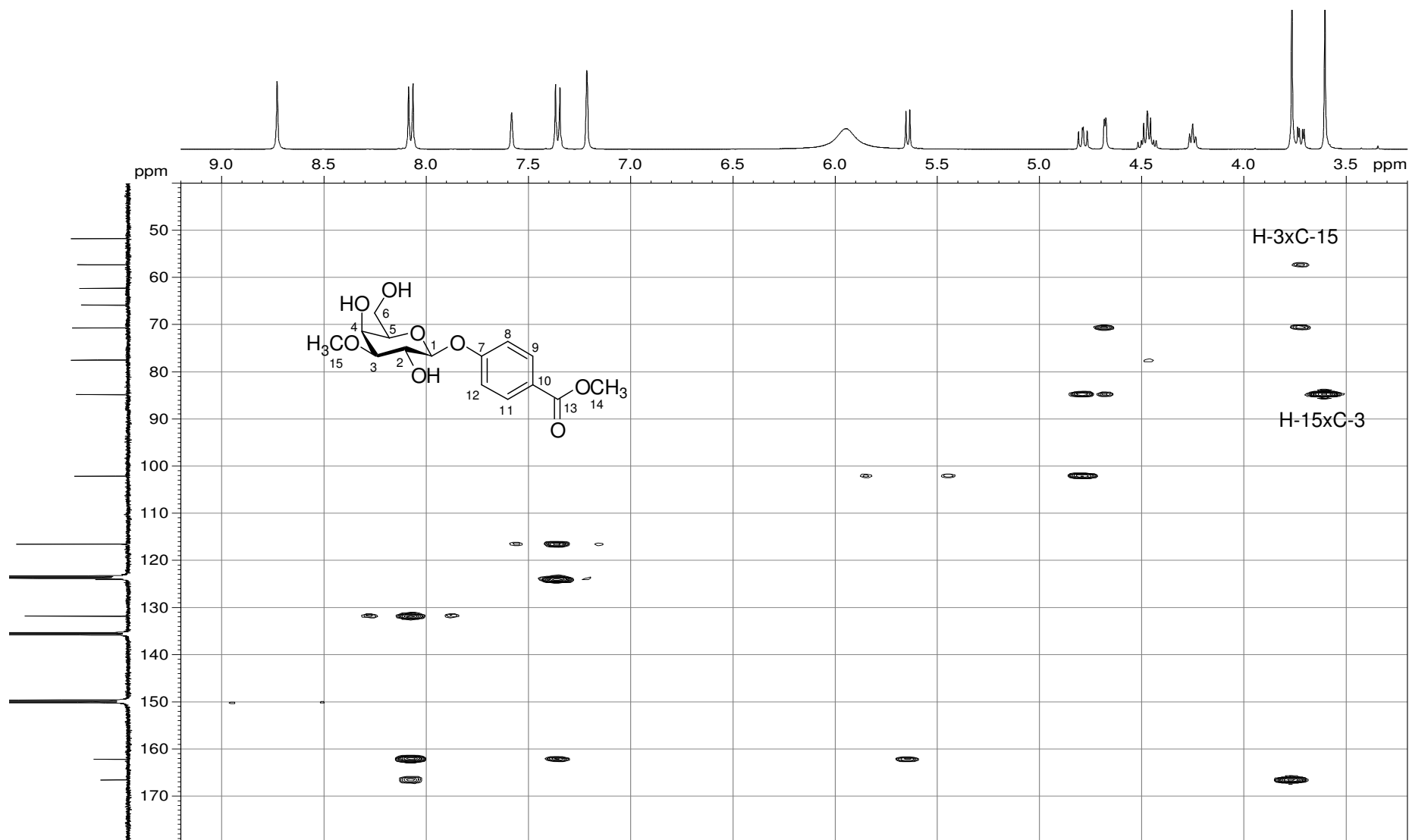


APÊNDICE H – Espectro de RMN de ^1H de 55 (piridina- d_5 ; 400 MHz)


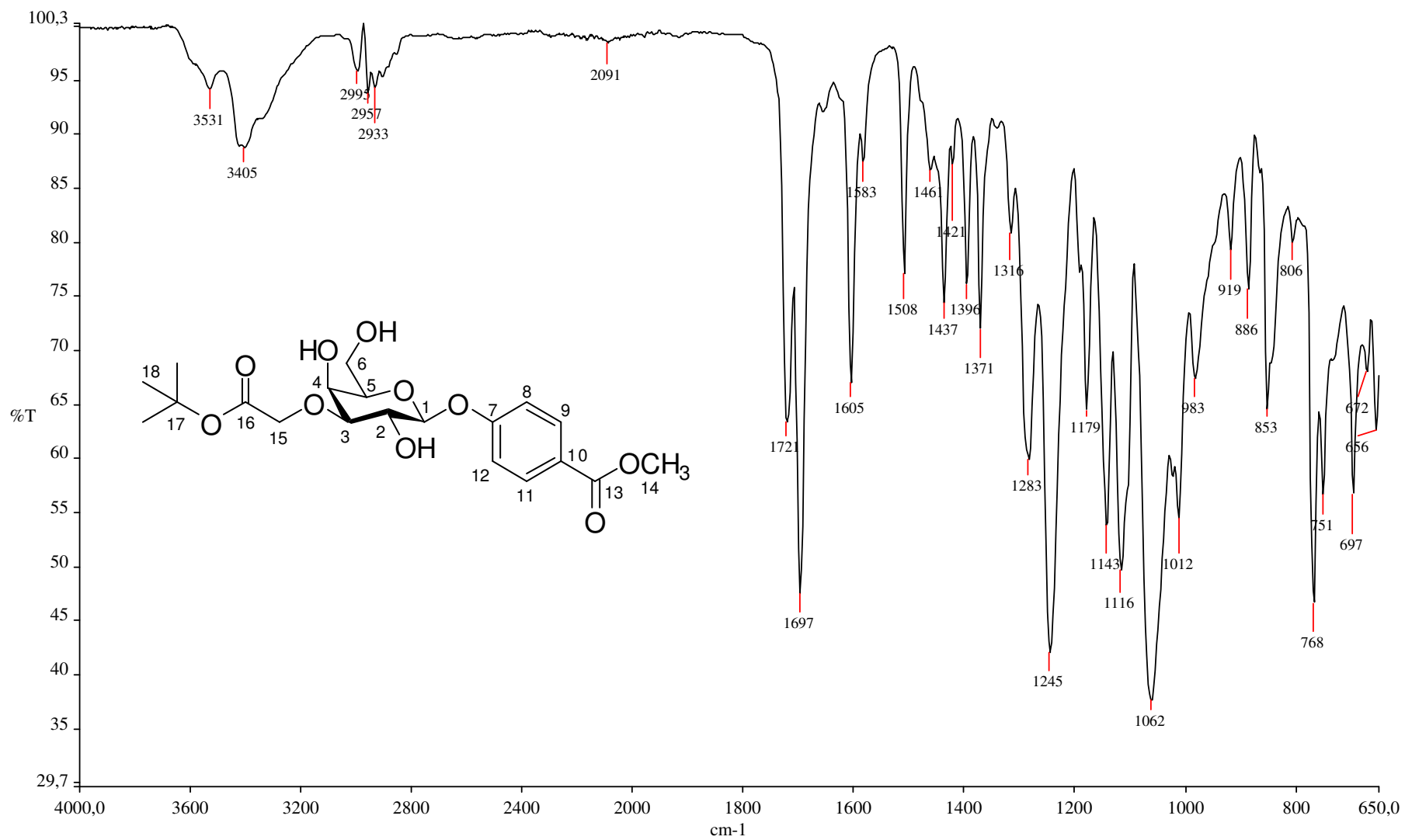
APÊNDICE I – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 55 (piridina- d_5 ; 100 MHz)

APÊNDICE J – Mapa de contornos COSY de 55 (piridina- d_5 ; 400 MHz)

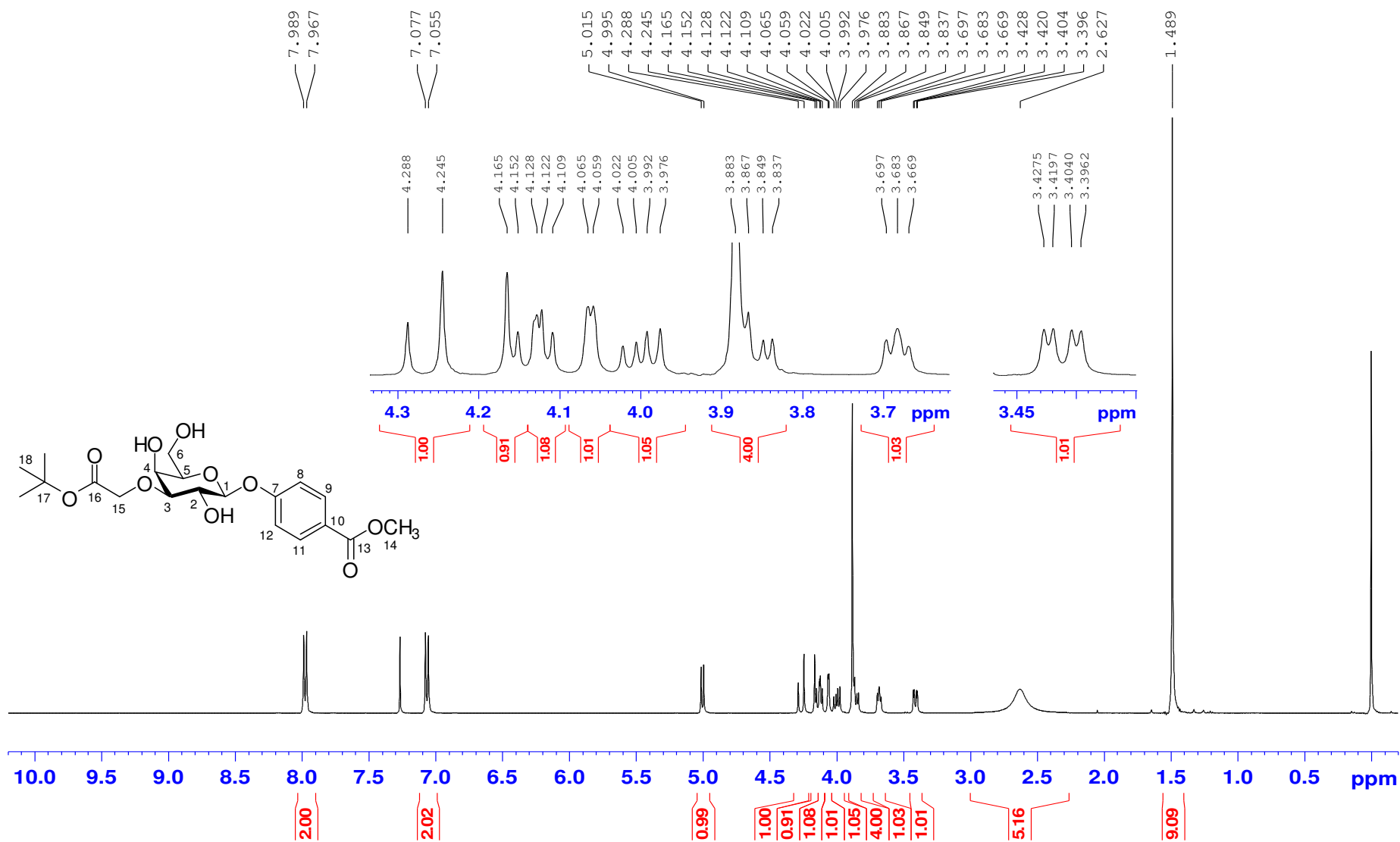
APÊNDICE K – Mapa de contornos HMQC de 55 (piridina- d_5 ; 400 MHz)

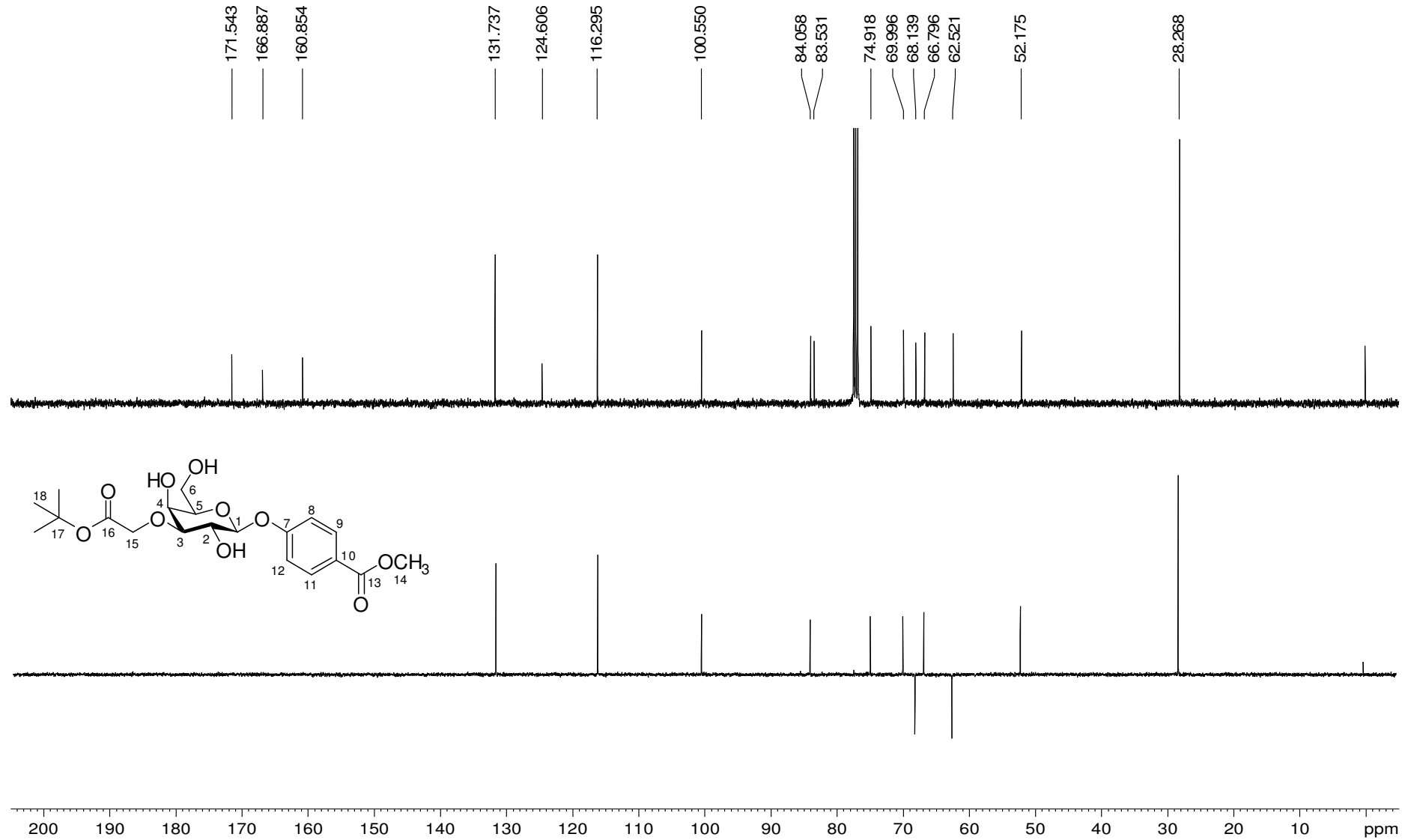
APÊNDICE L – Mapa de contornos HMBC de 55 (piridina- d_5 ; 400 MHz)

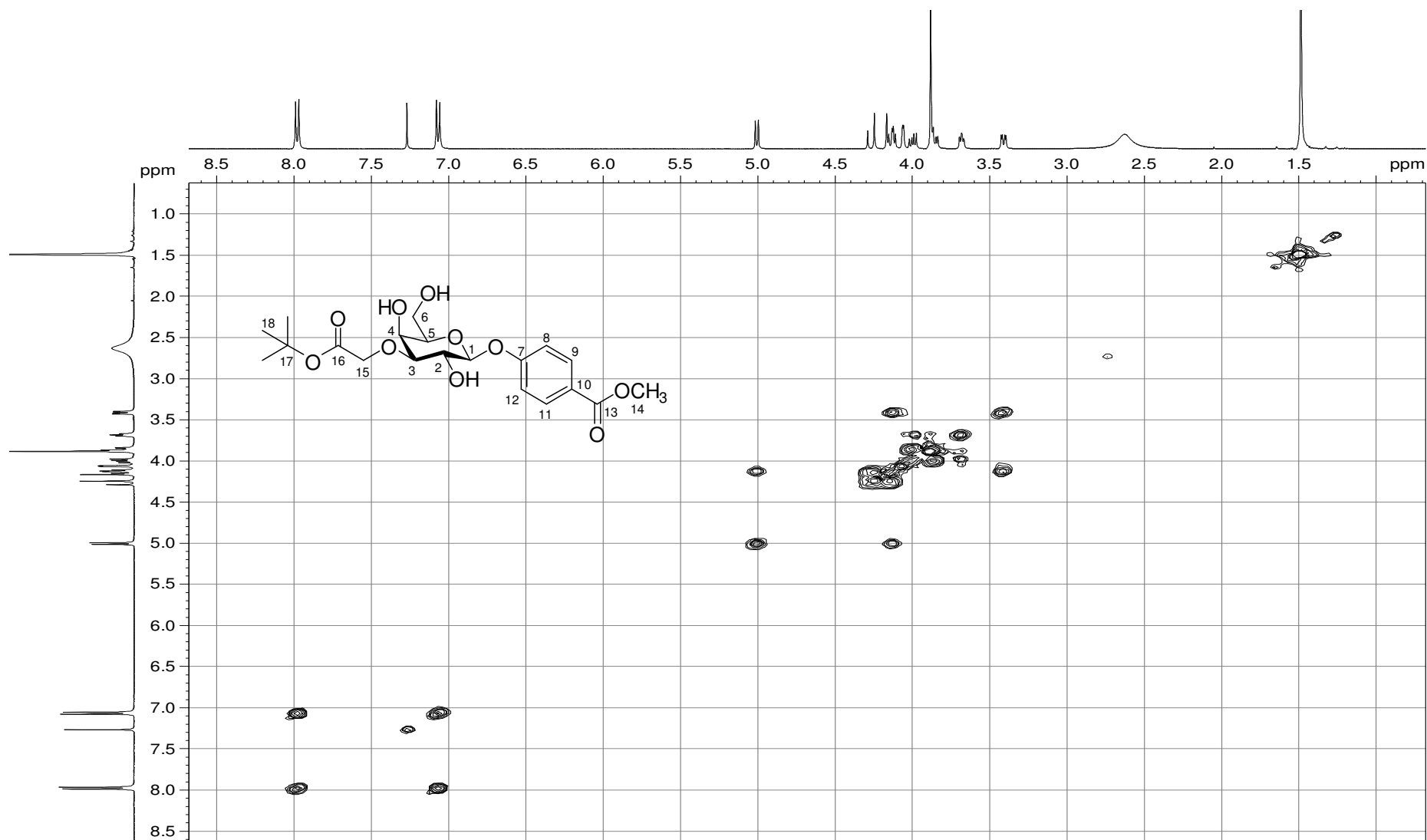
APÊNDICE M – Espectro no infravermelho de 56

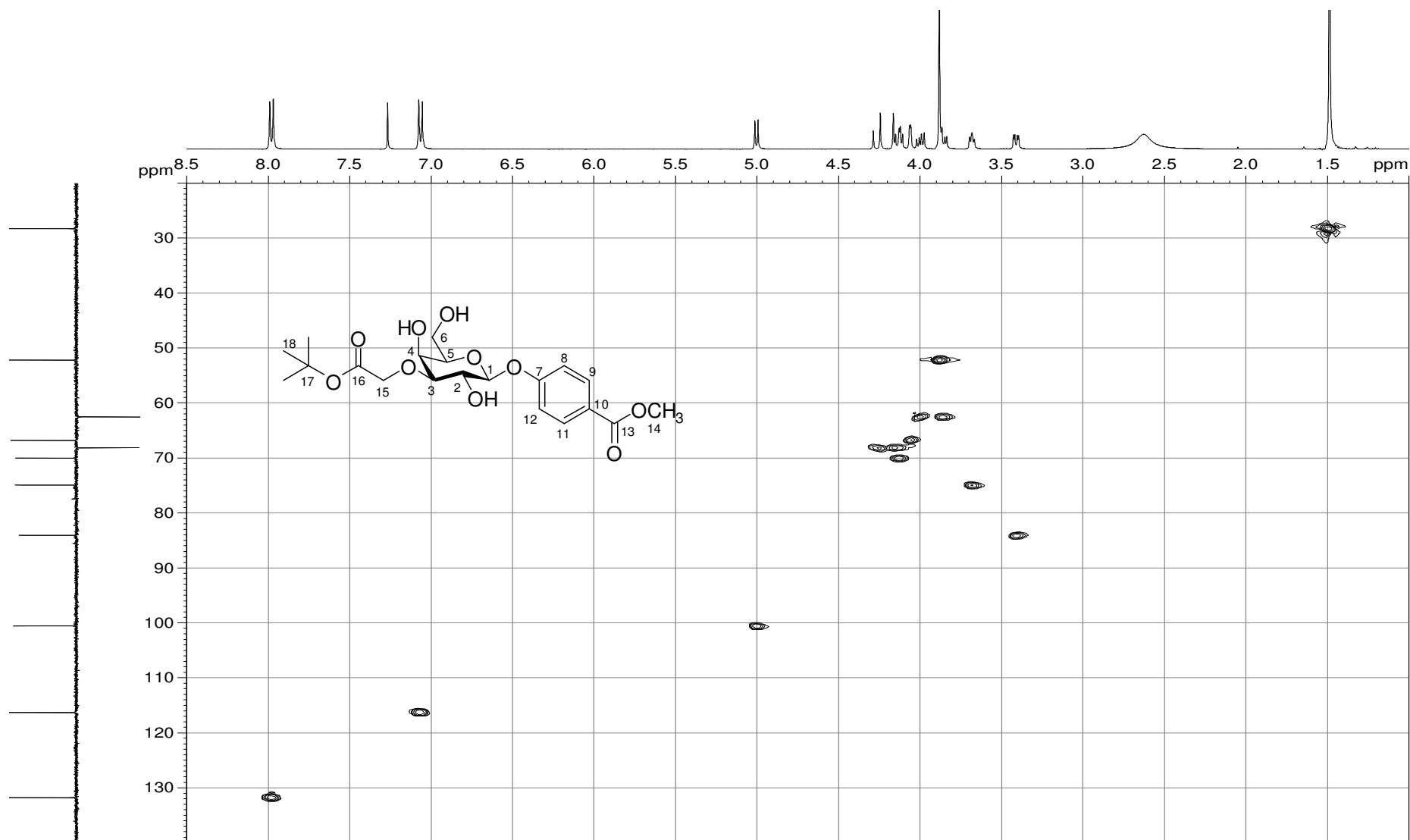


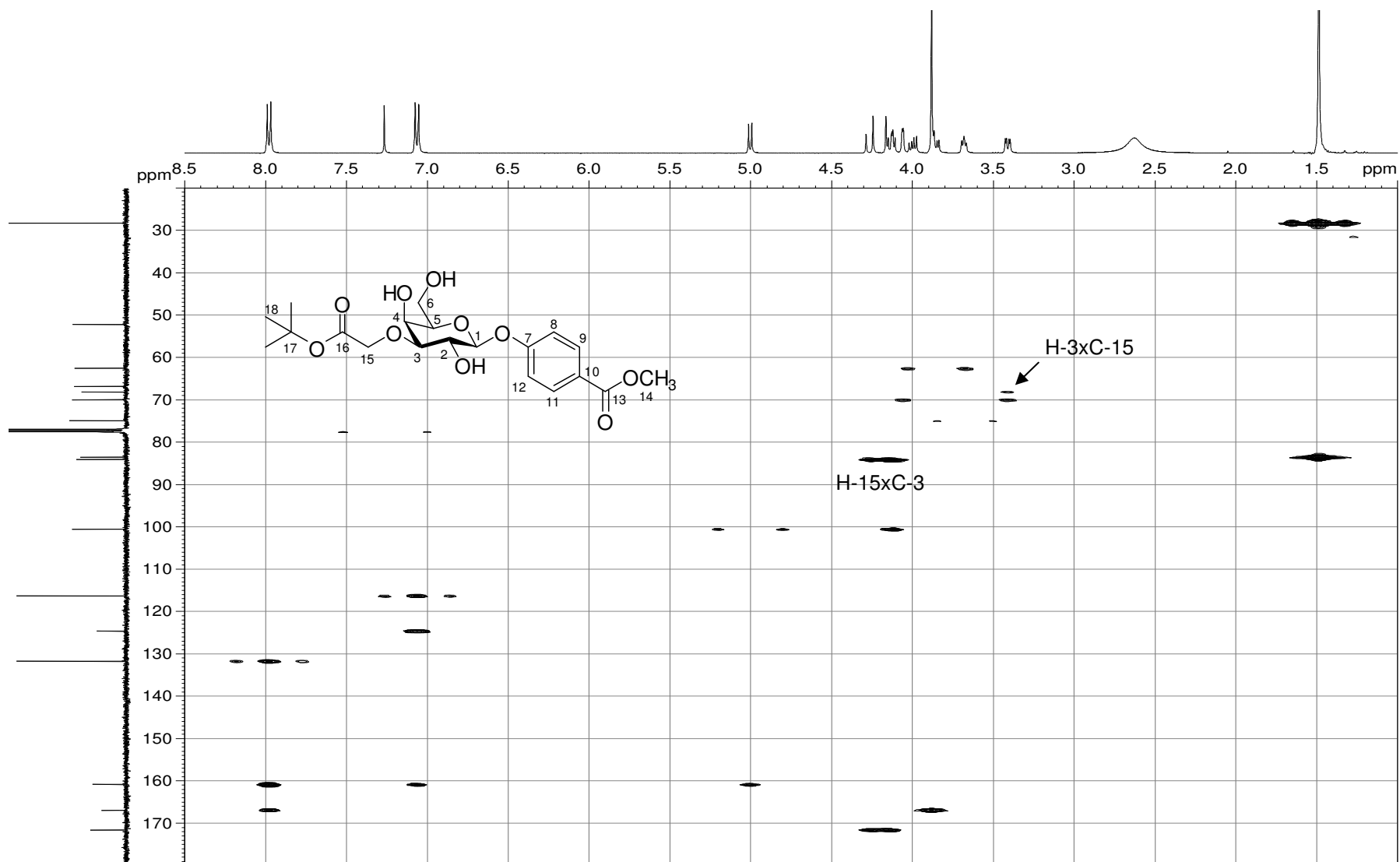
APÊNDICE N – Espectro de RMN de ^1H de 56 (CDCl_3 ; 400 MHz)



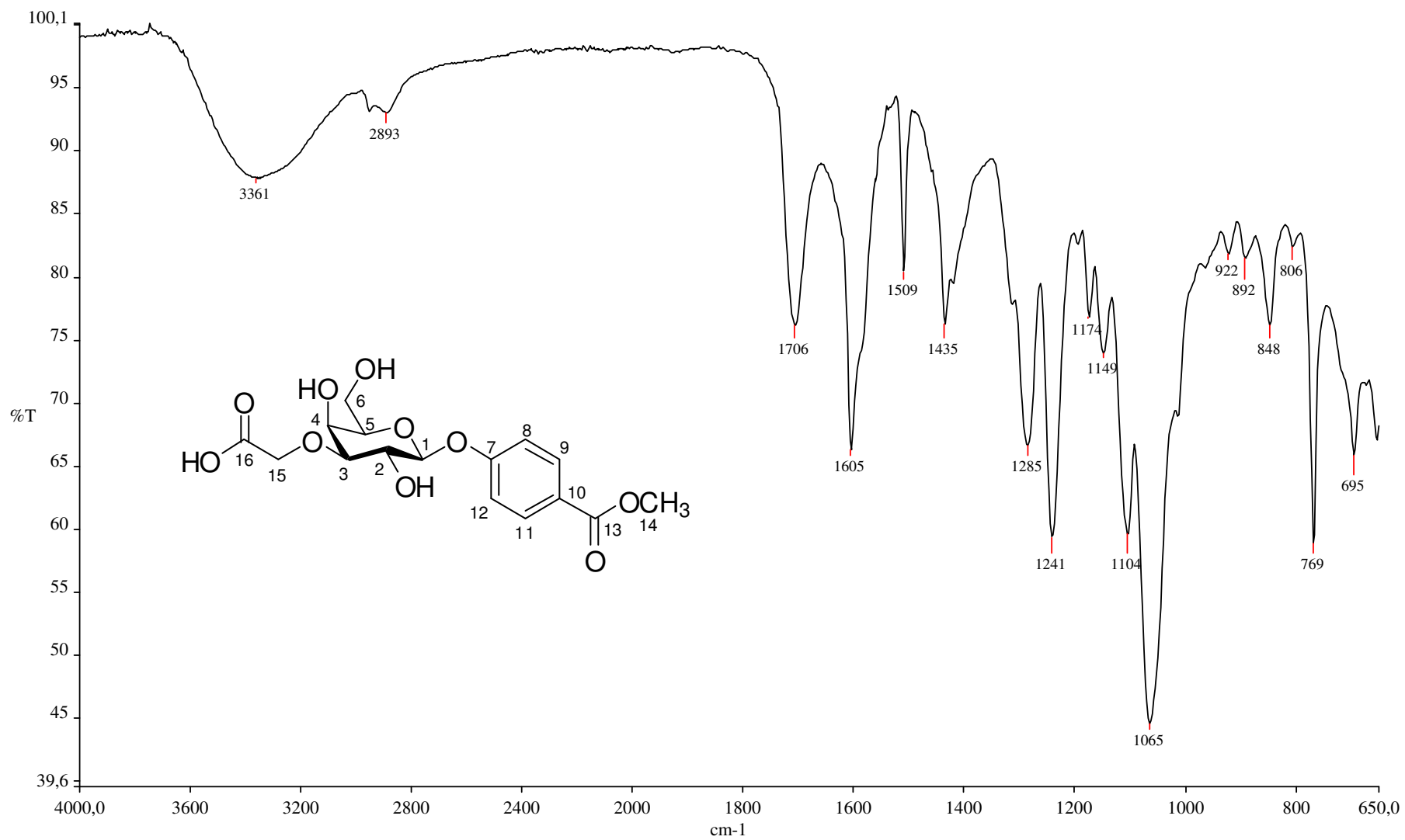
APÊNDICE O – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 56 (CDCl_3 ; 100 MHz)

APÊNDICE P – Mapa de contornos COSY de 56 (CDCl₃; 400 MHz)

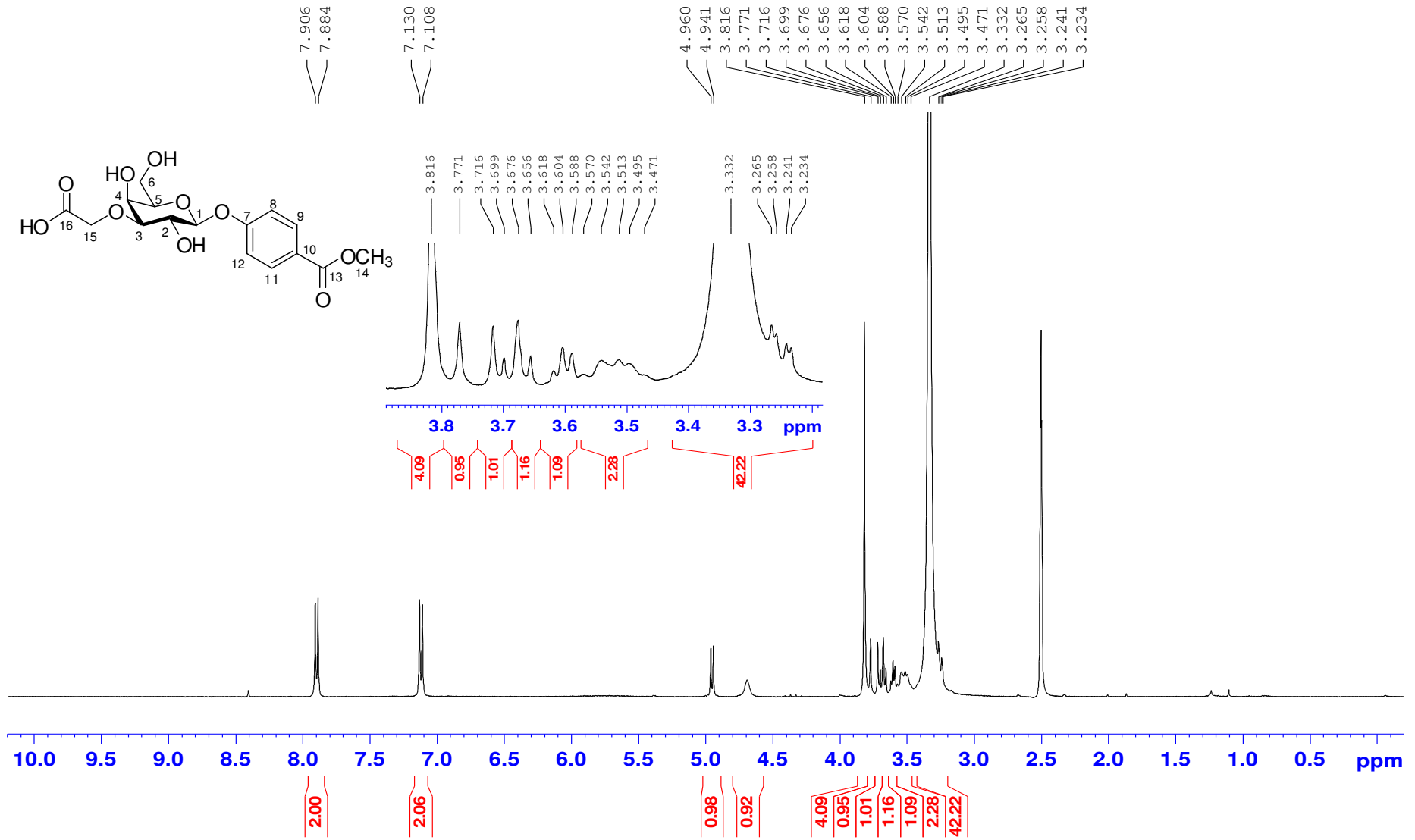
APÊNDICE Q – Mapa de contornos HMQC de 56 (CDCl₃; 400 MHz)

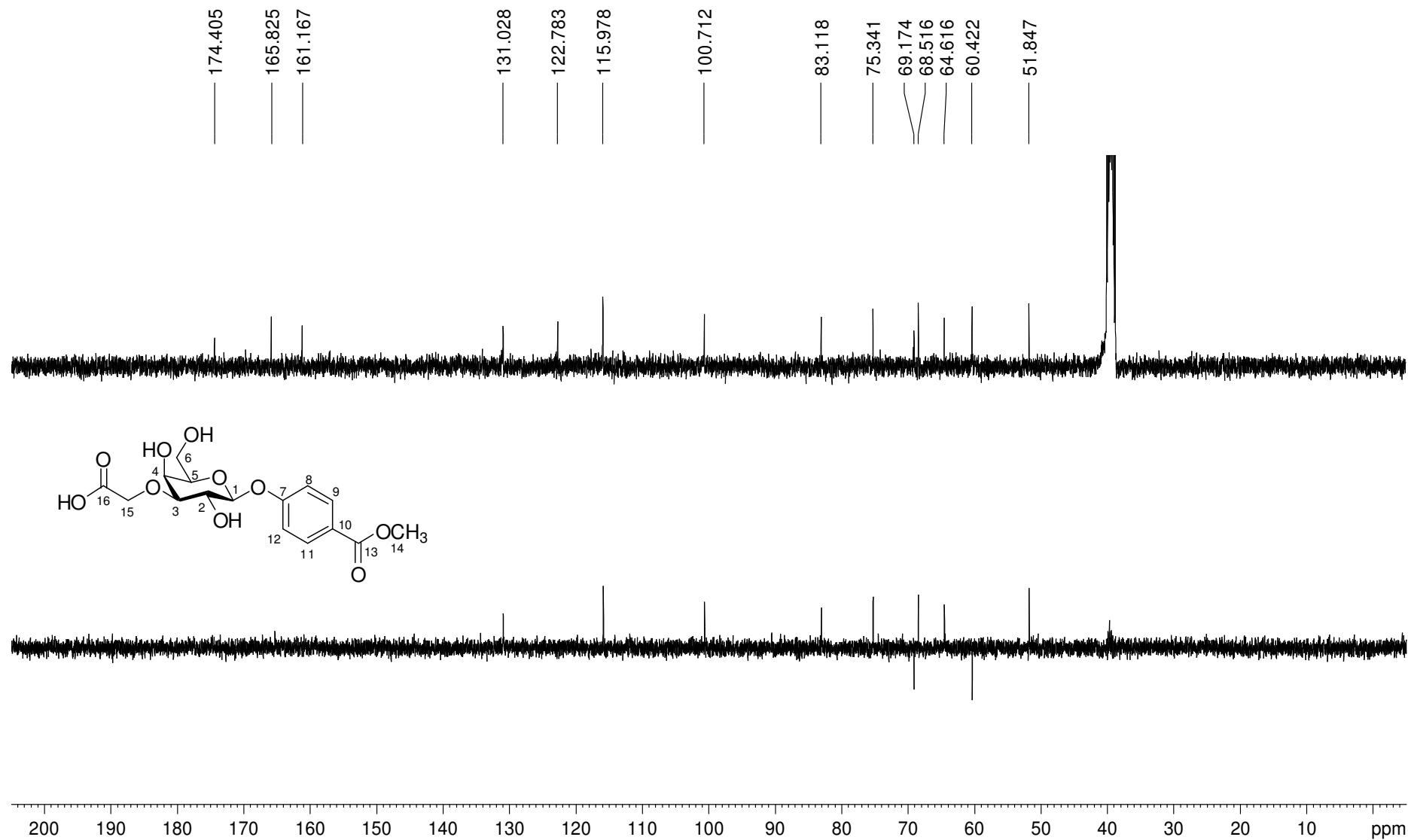
APÊNDICE R – Mapa de contornos HMBC de 56 (CDCl₃; 400 MHz)

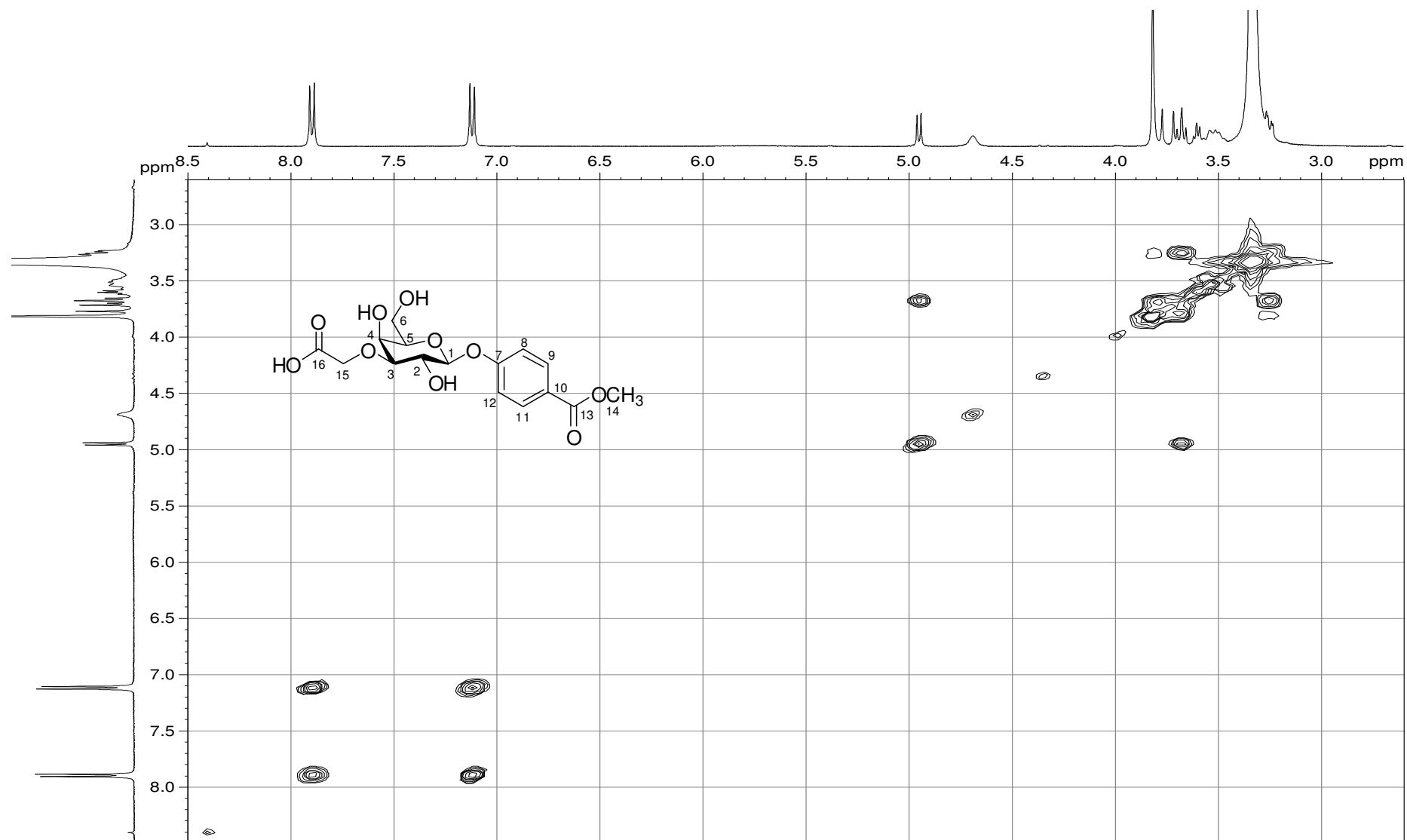
APÊNDICE S – Espectro no infravermelho de 57

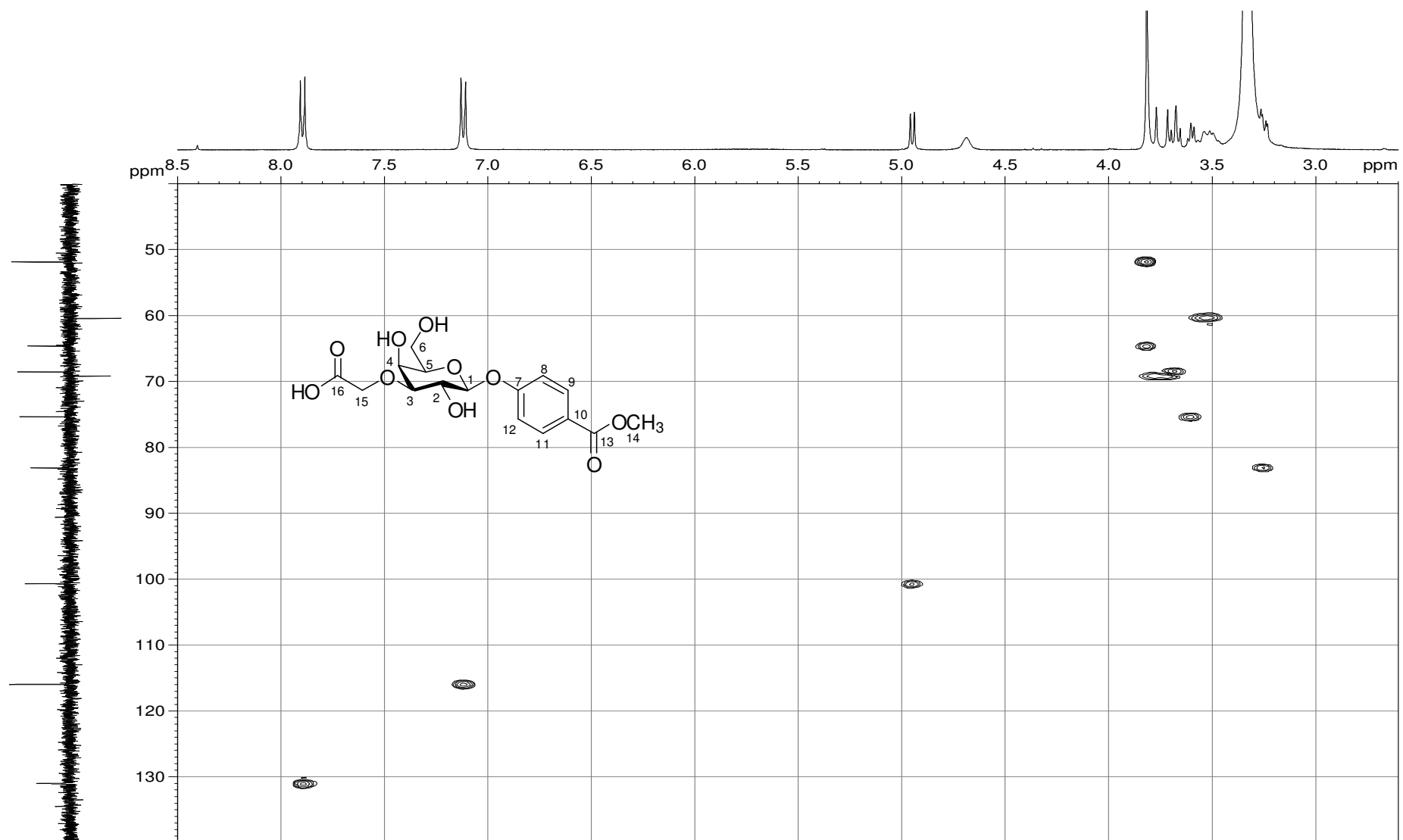


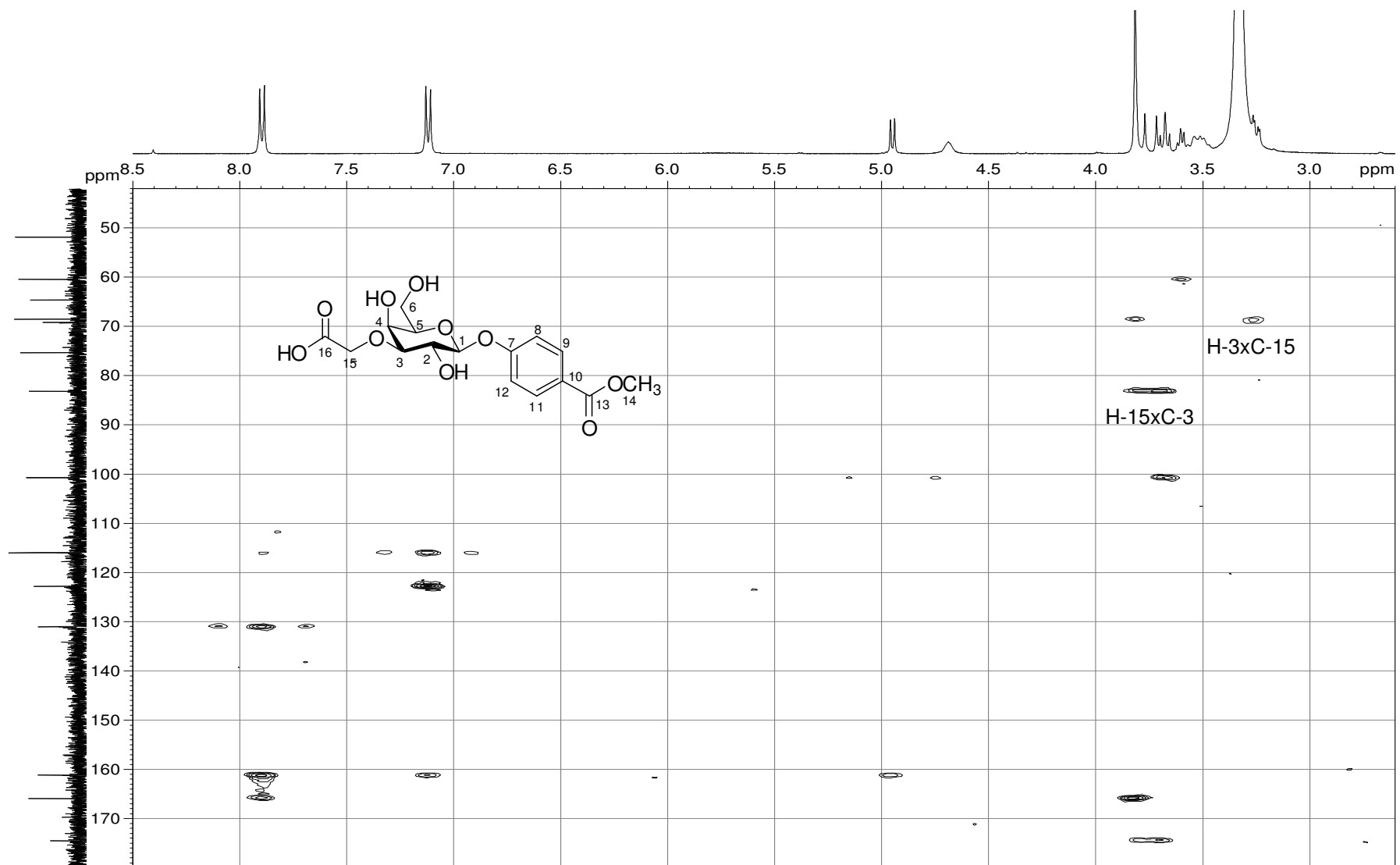
APÊNDICE T – Espectro de RMN de ^1H de 57 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



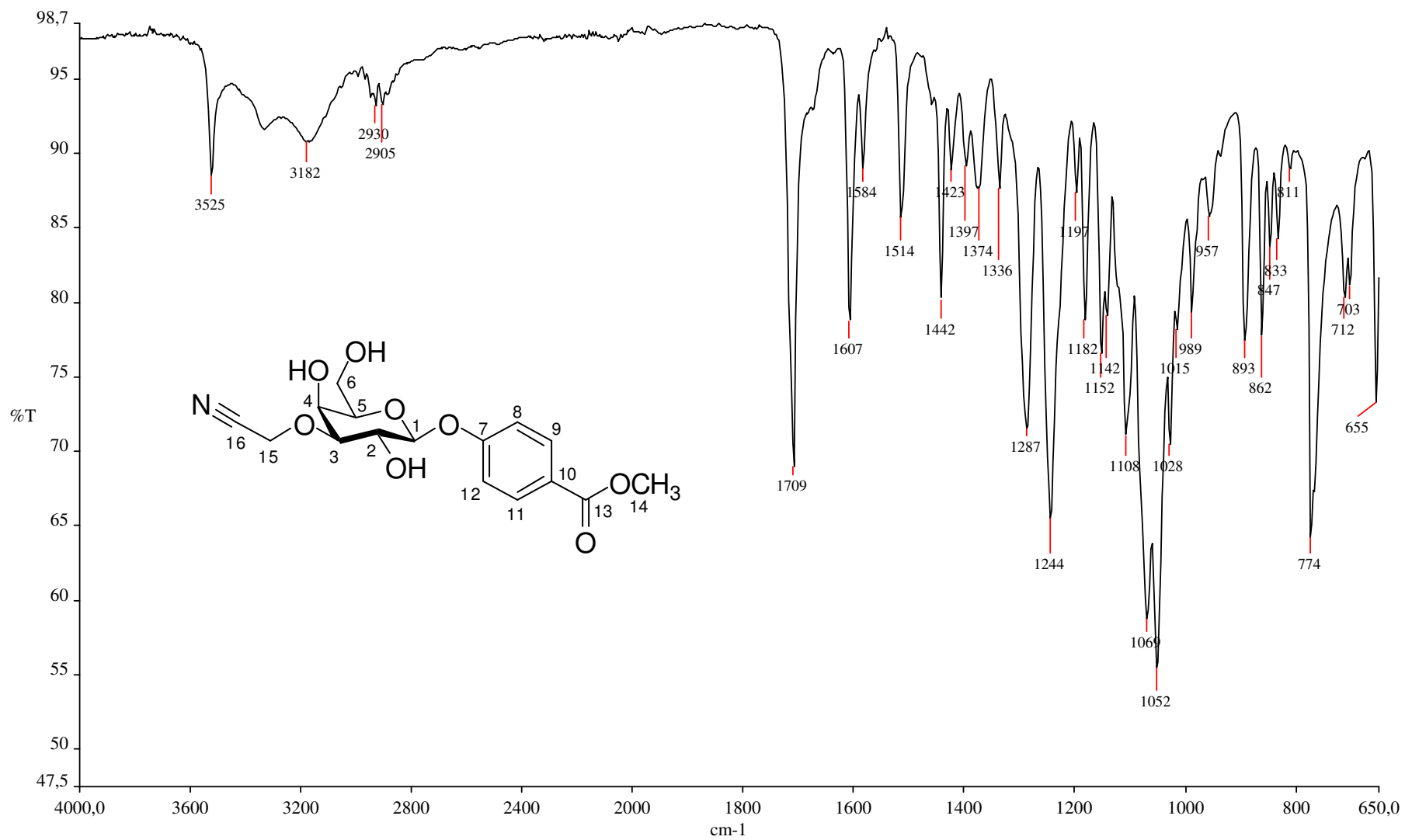
APÊNDICE U – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 57 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE V – Mapa de contornos COSY de 57 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

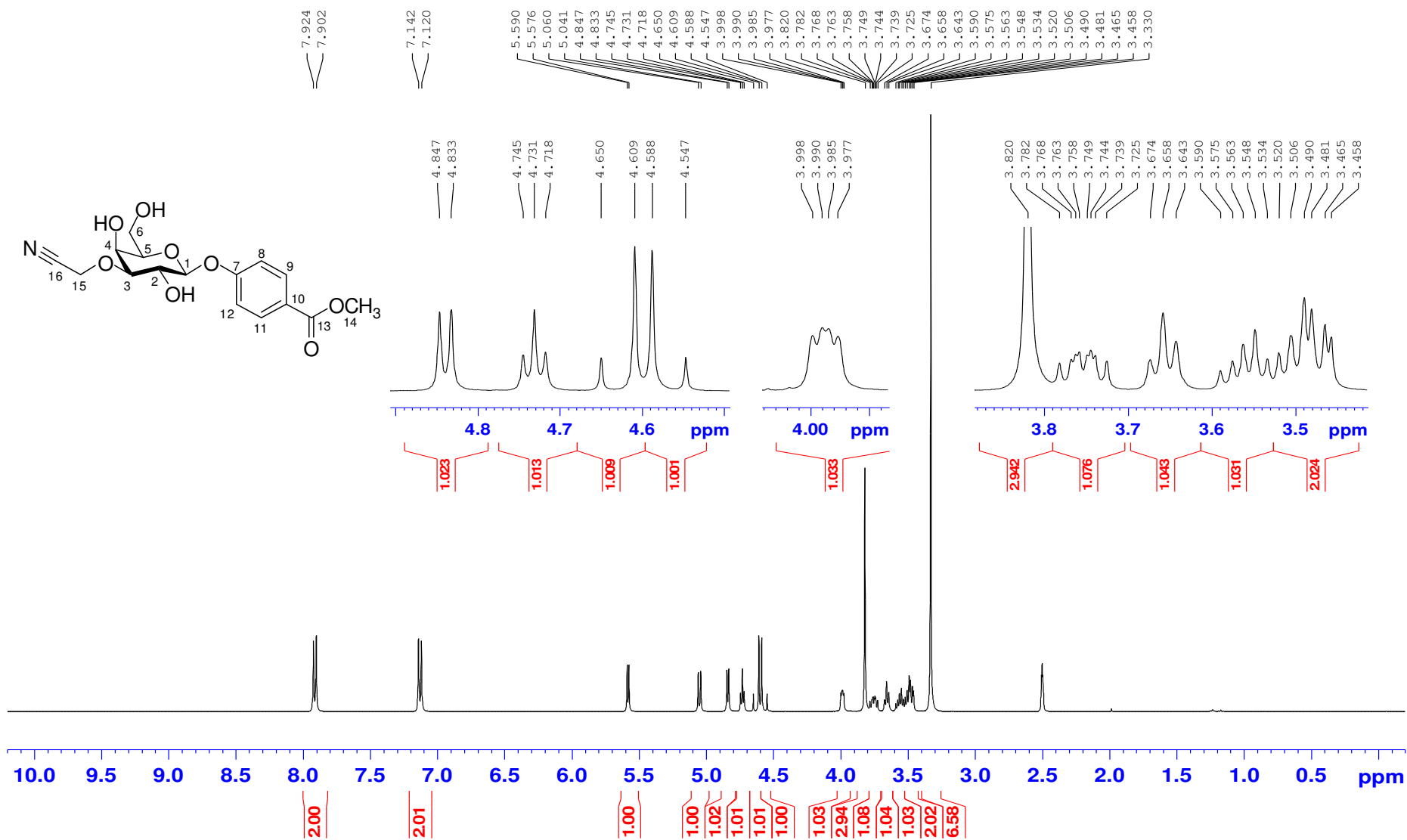
APÊNDICE X – Mapa de contornos HMQC de 57 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

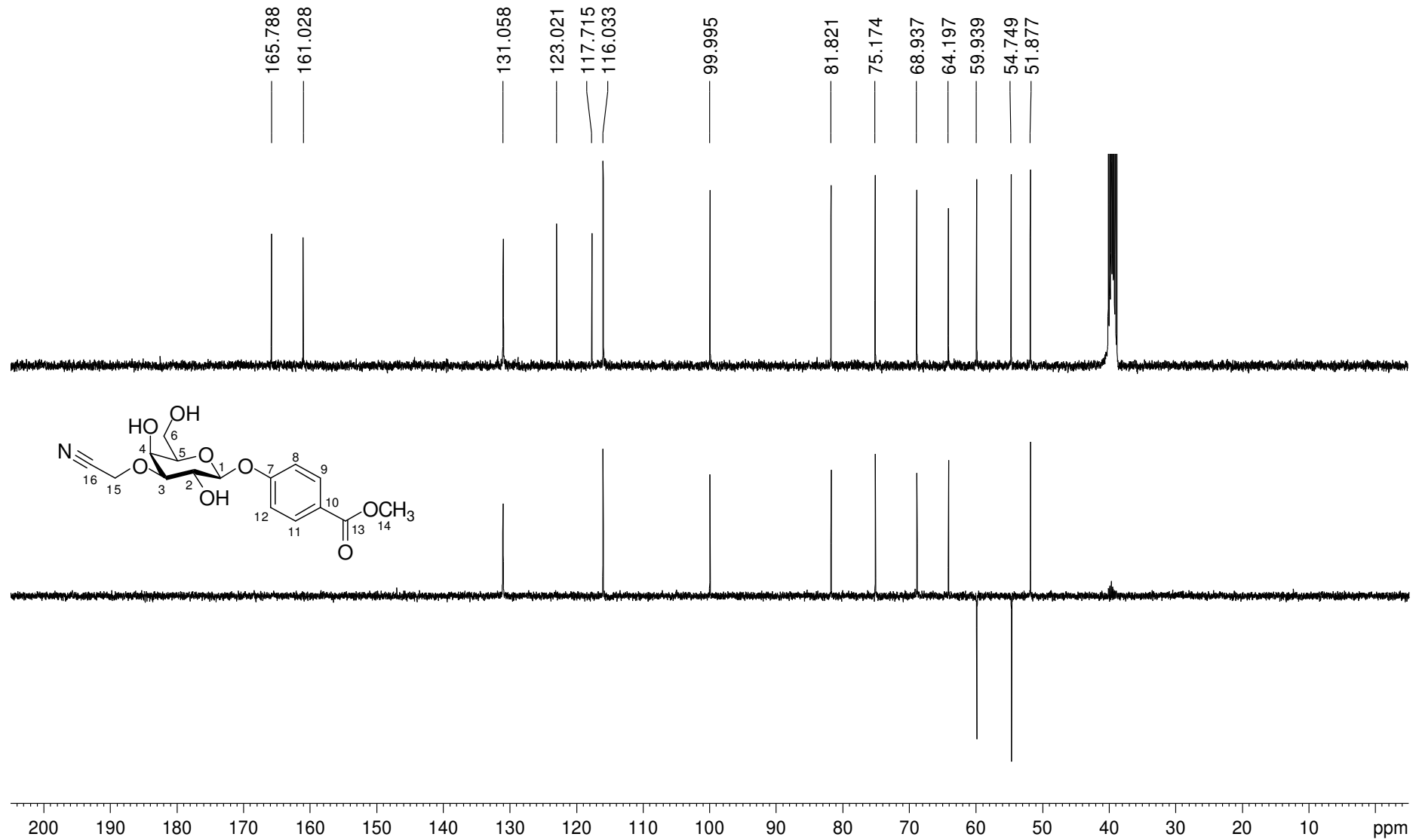
APÊNDICE Y – Mapa de contornos HMBC de 57 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

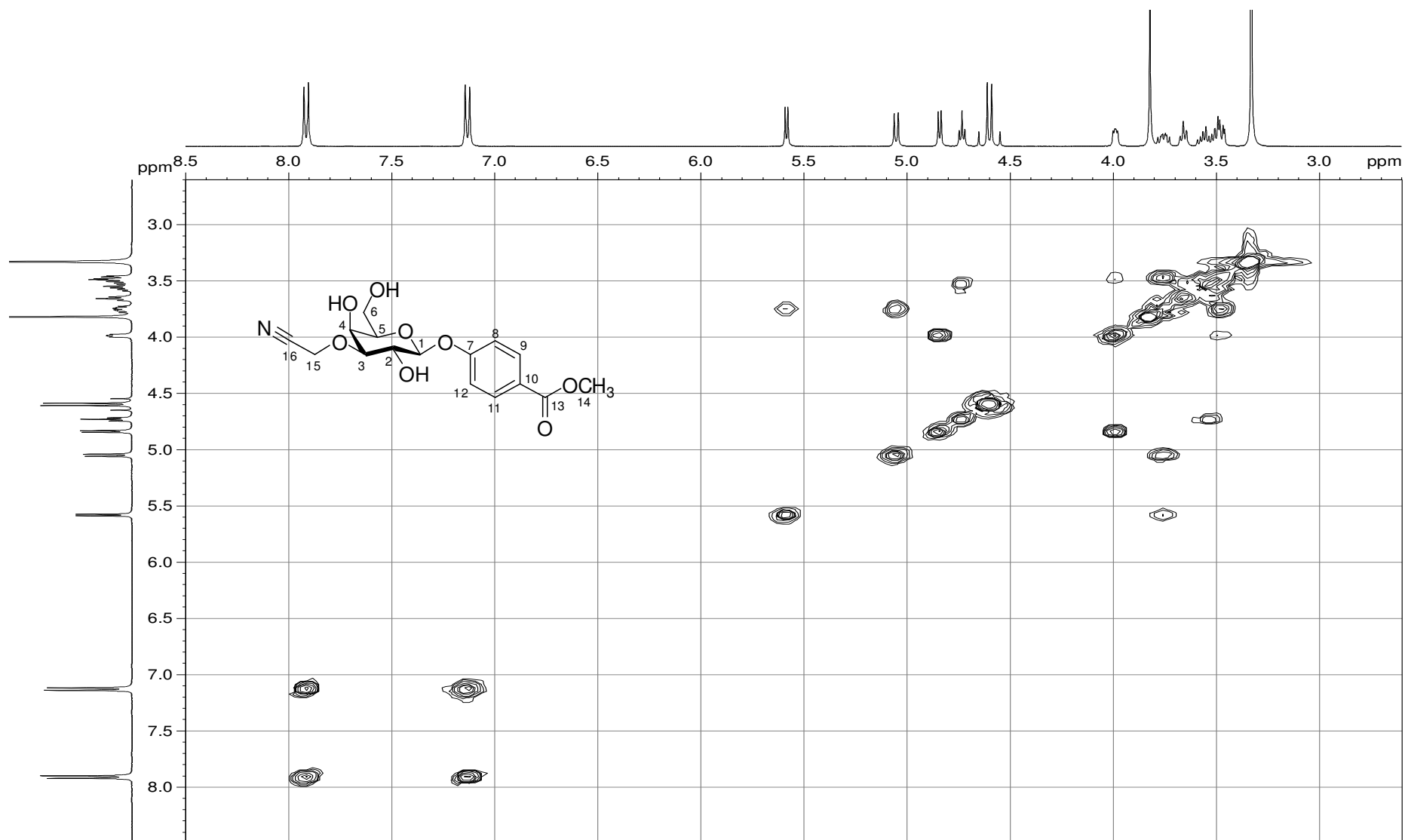
APÊNDICE W – Espectro no infravermelho de 58

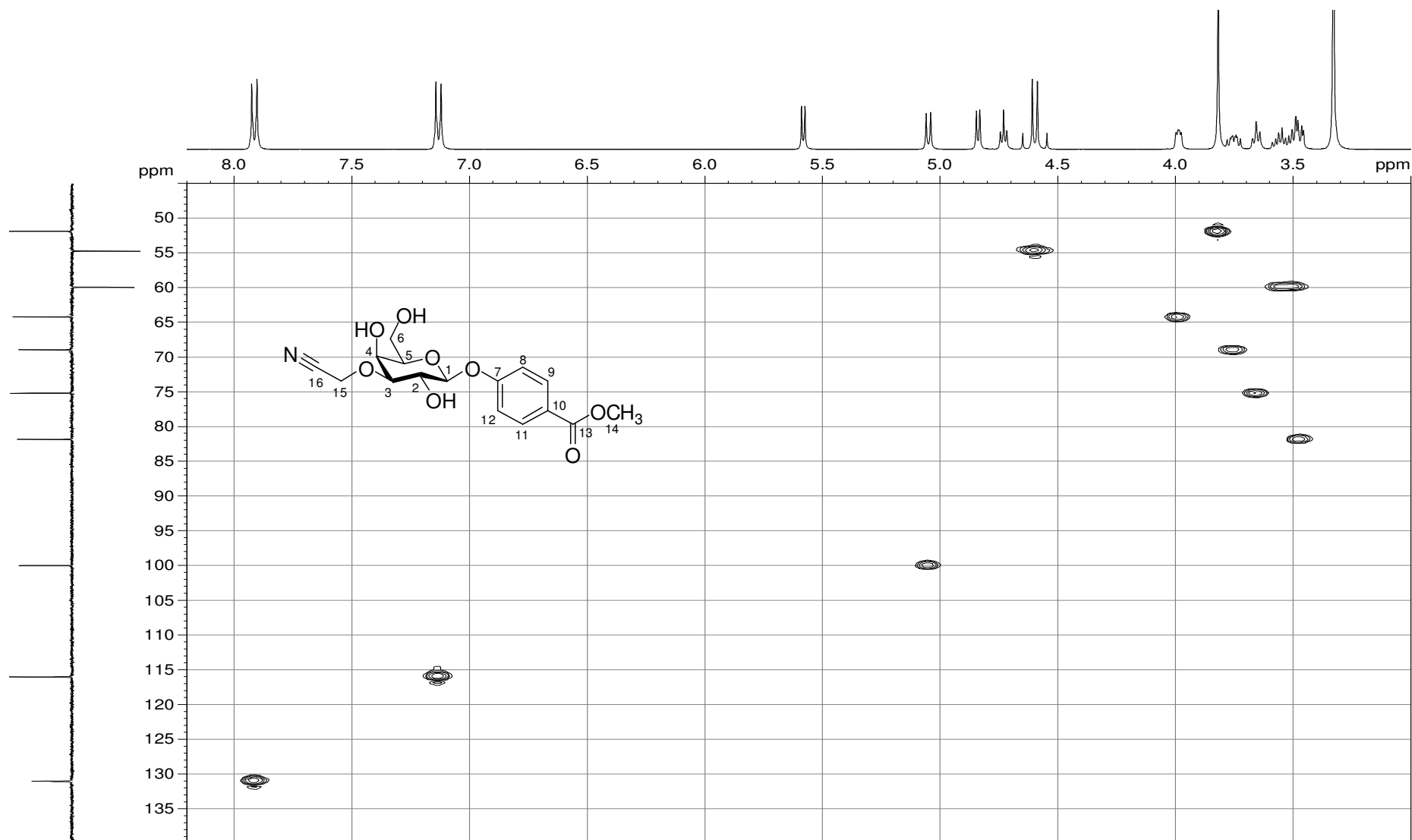


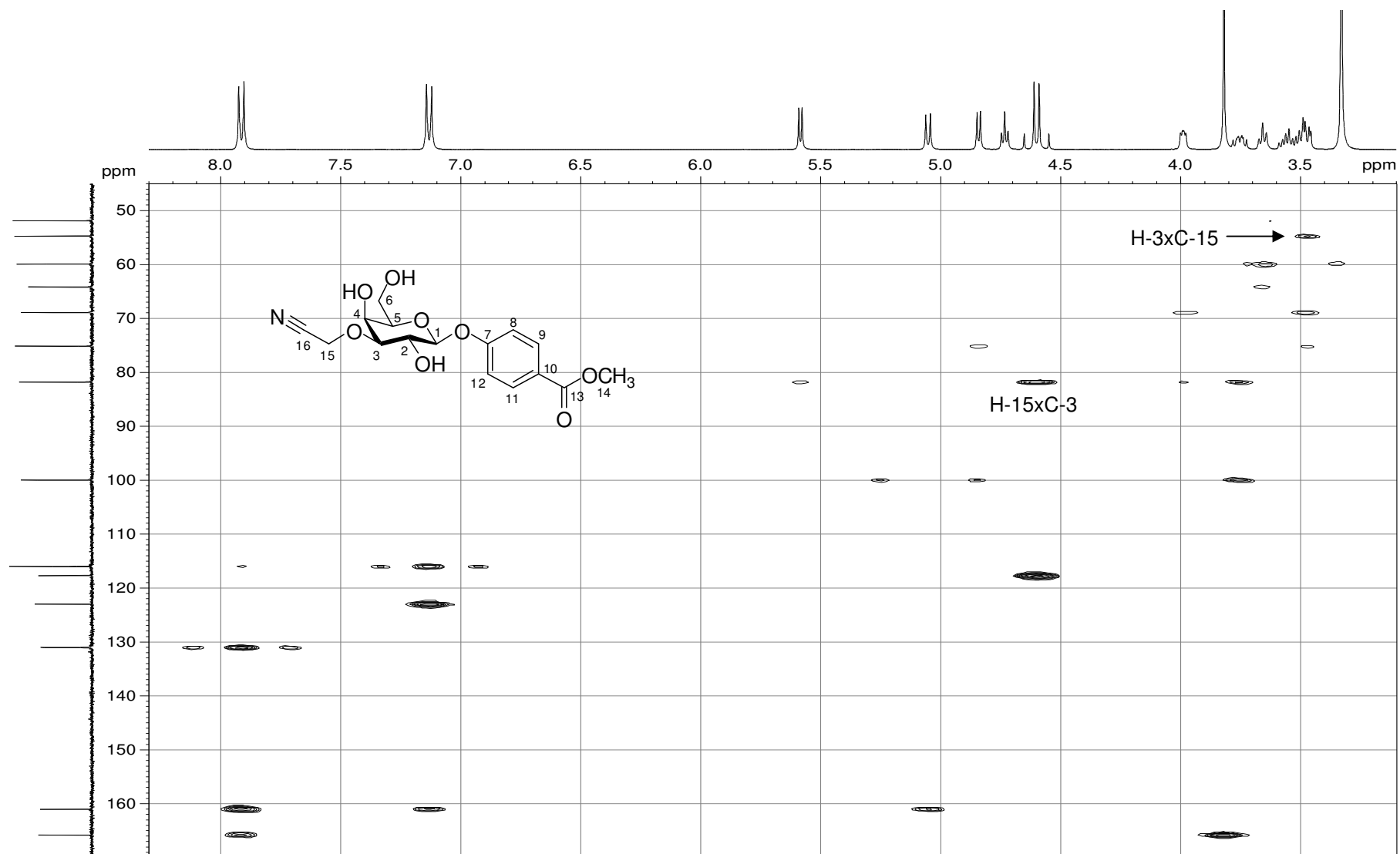
APÊNDICE Z – Espectro de RMN de ^1H de 58 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



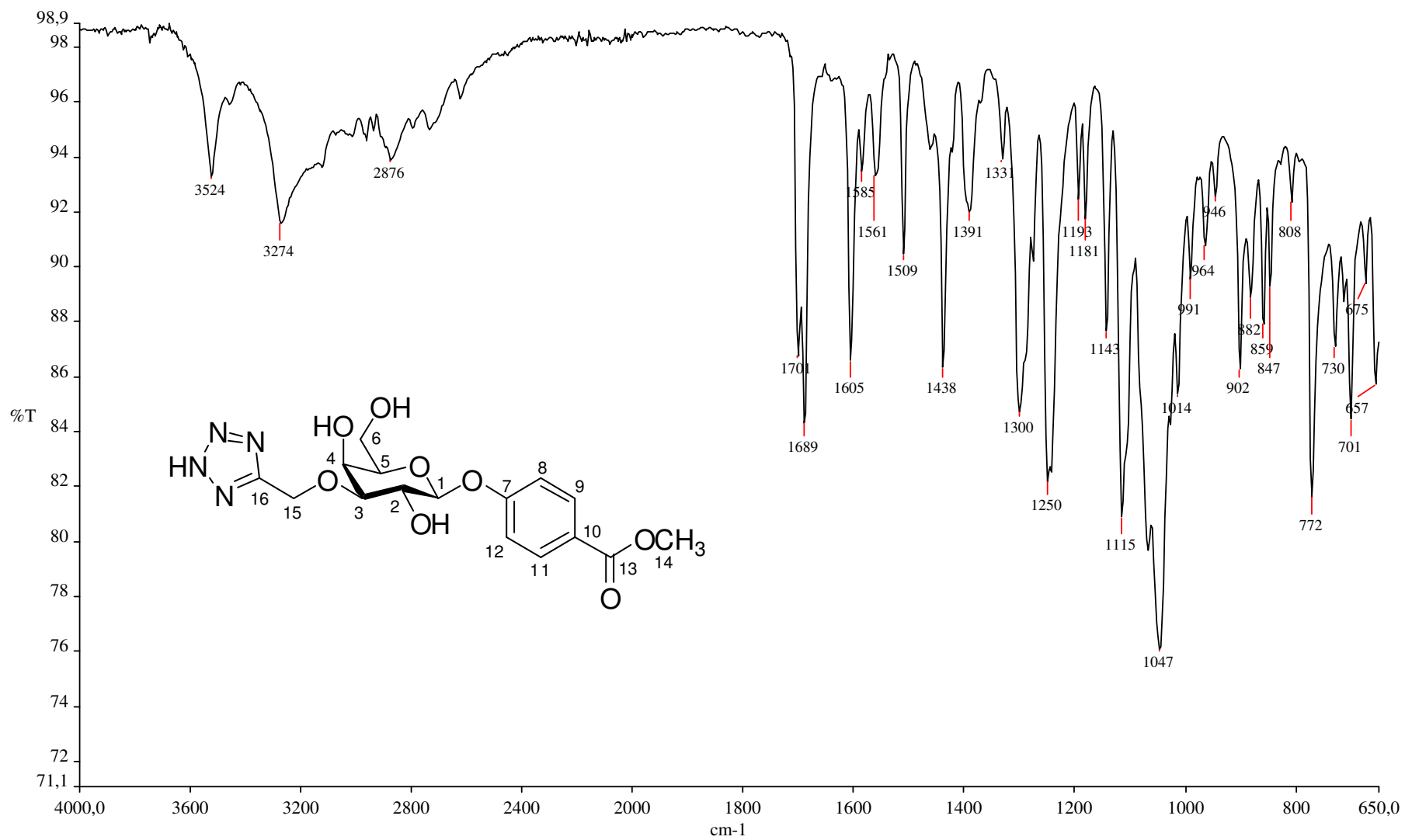
APÊNDICE AA – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 58 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE BB – Mapa de contornos COSY de 58 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

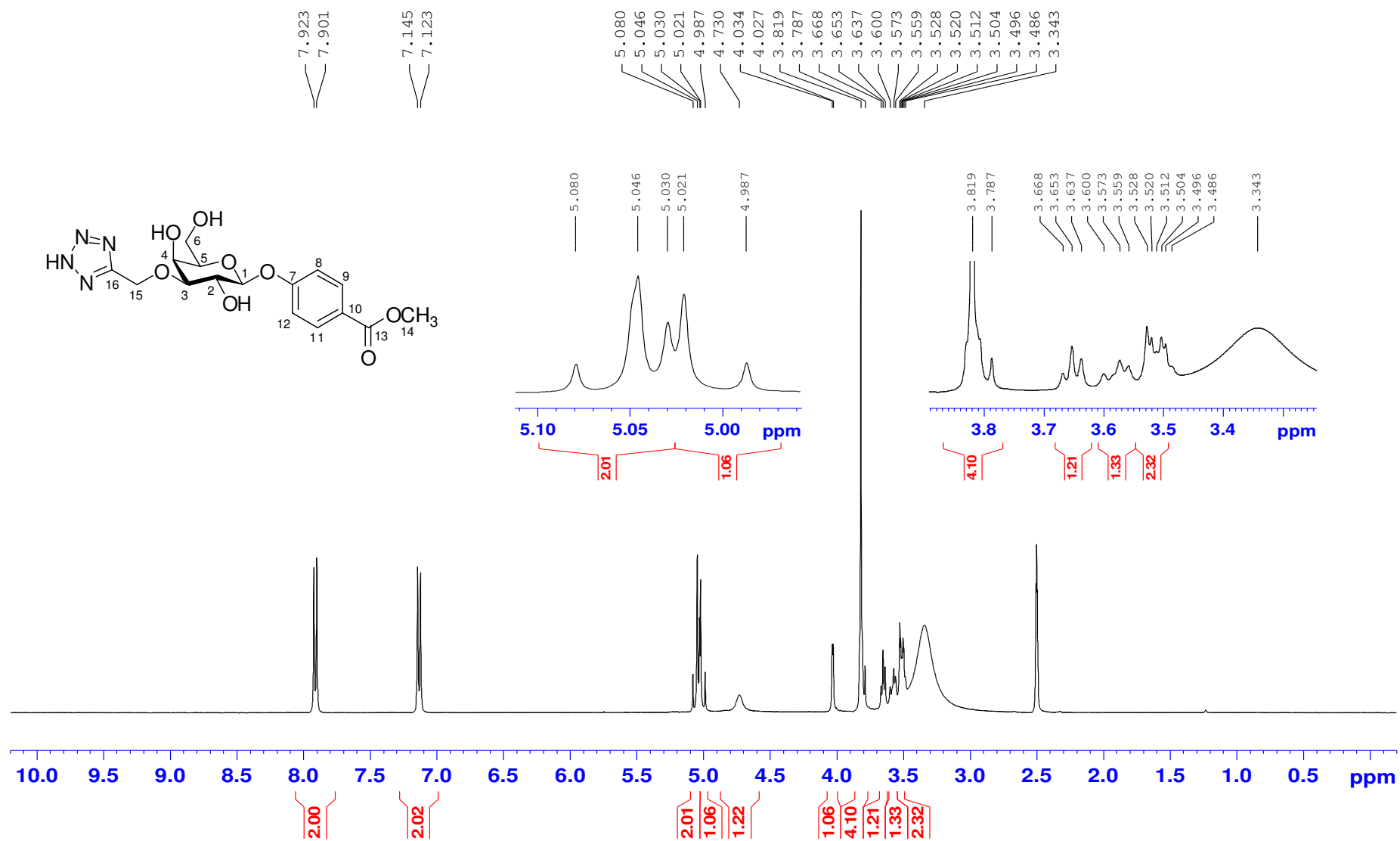
APÊNDICE CC – Mapa de contornos HMQC de 58 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

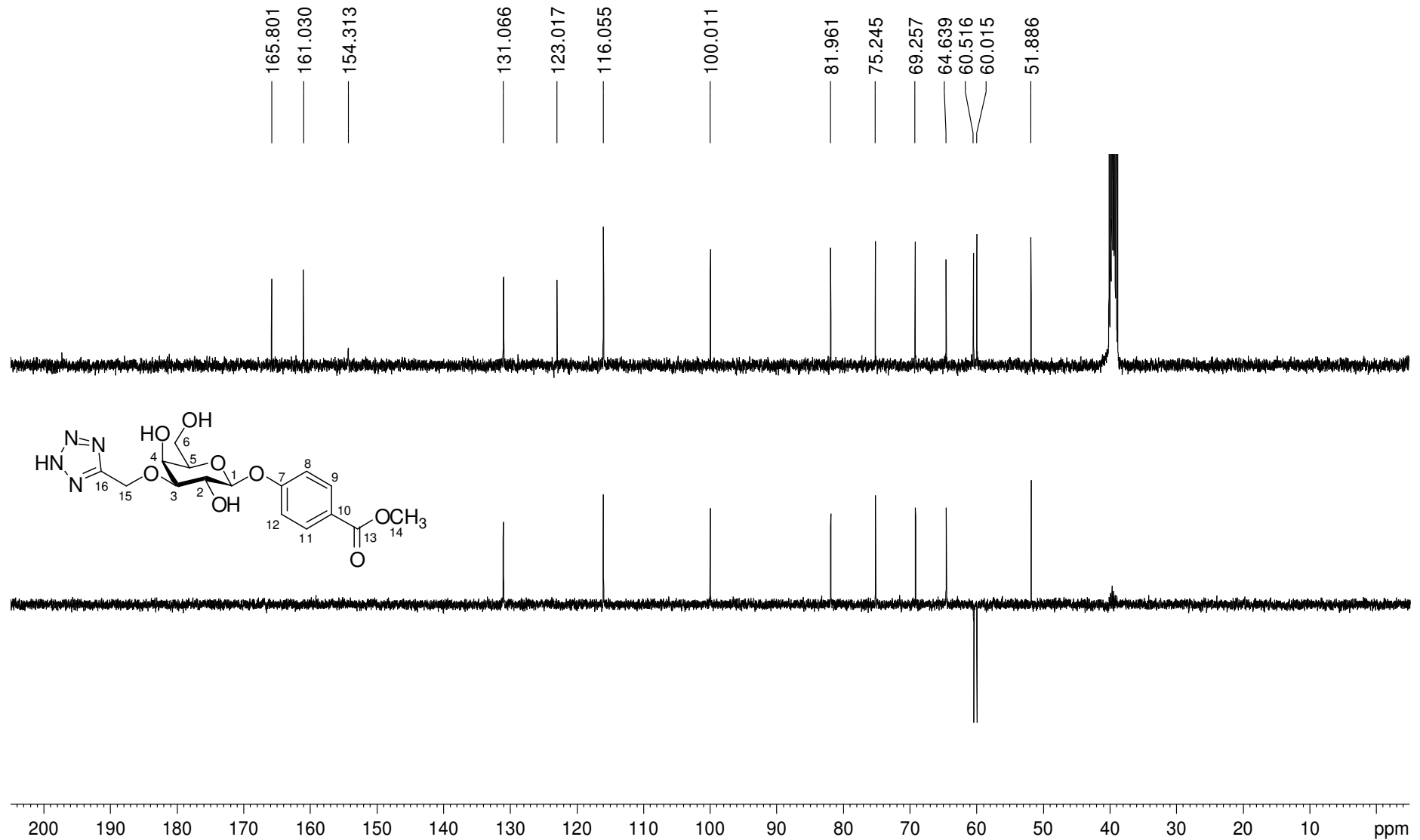
APÊNDICE DD – Mapa de contornos HMBC de 58 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

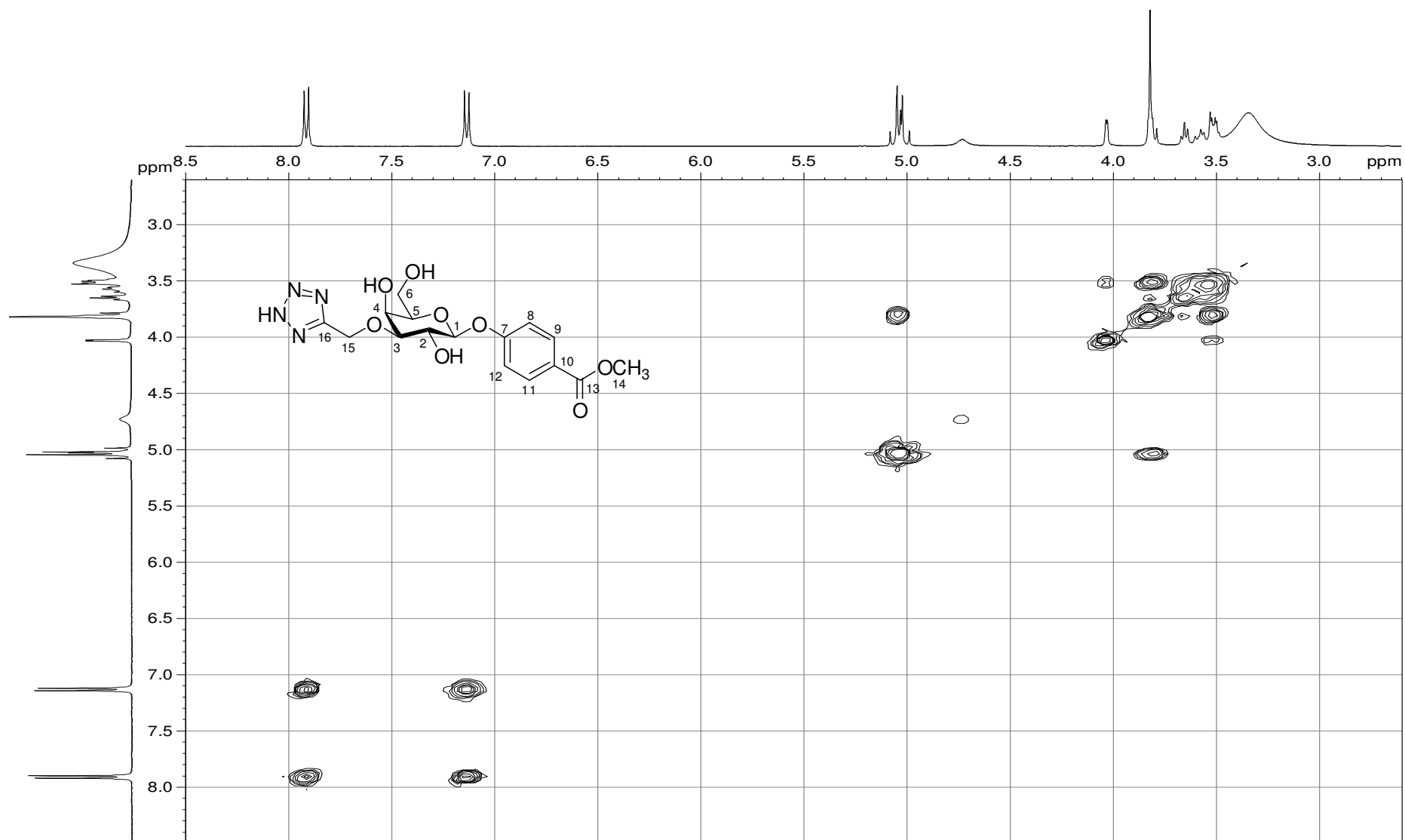
APÊNDICE EE – Espectro no infravermelho de 59

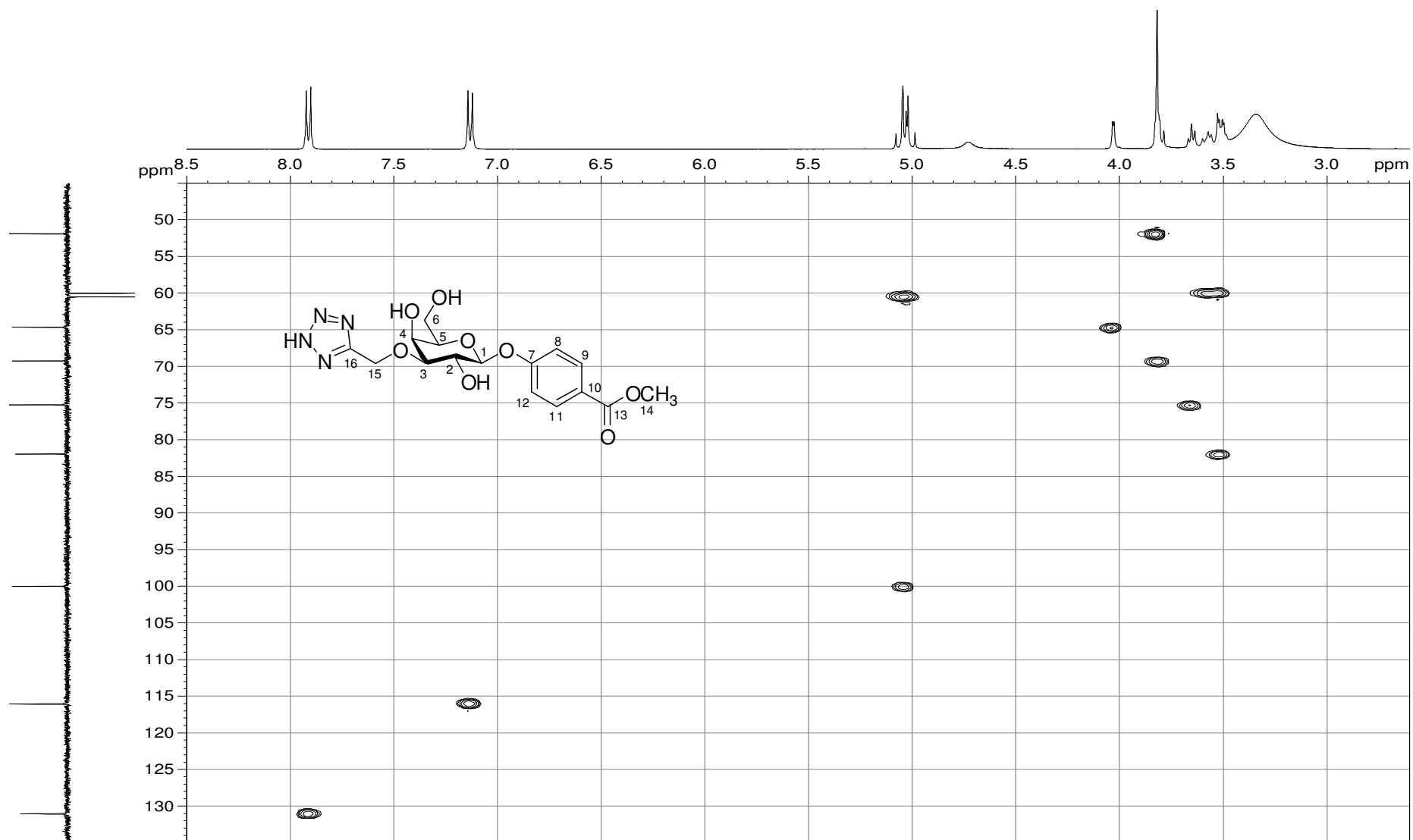


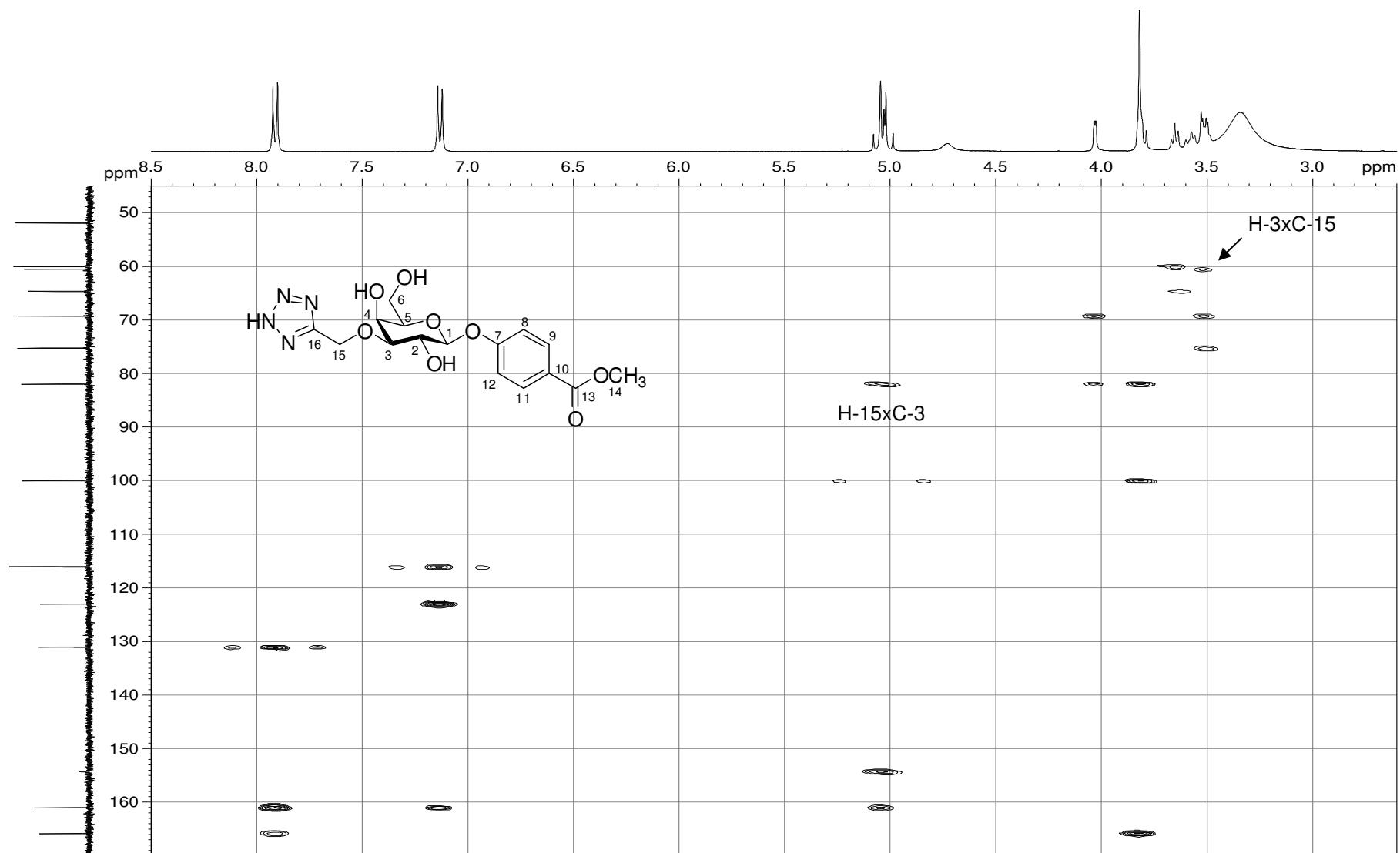
APÊNDICE FF – Espectro de RMN de ^1H de 59 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



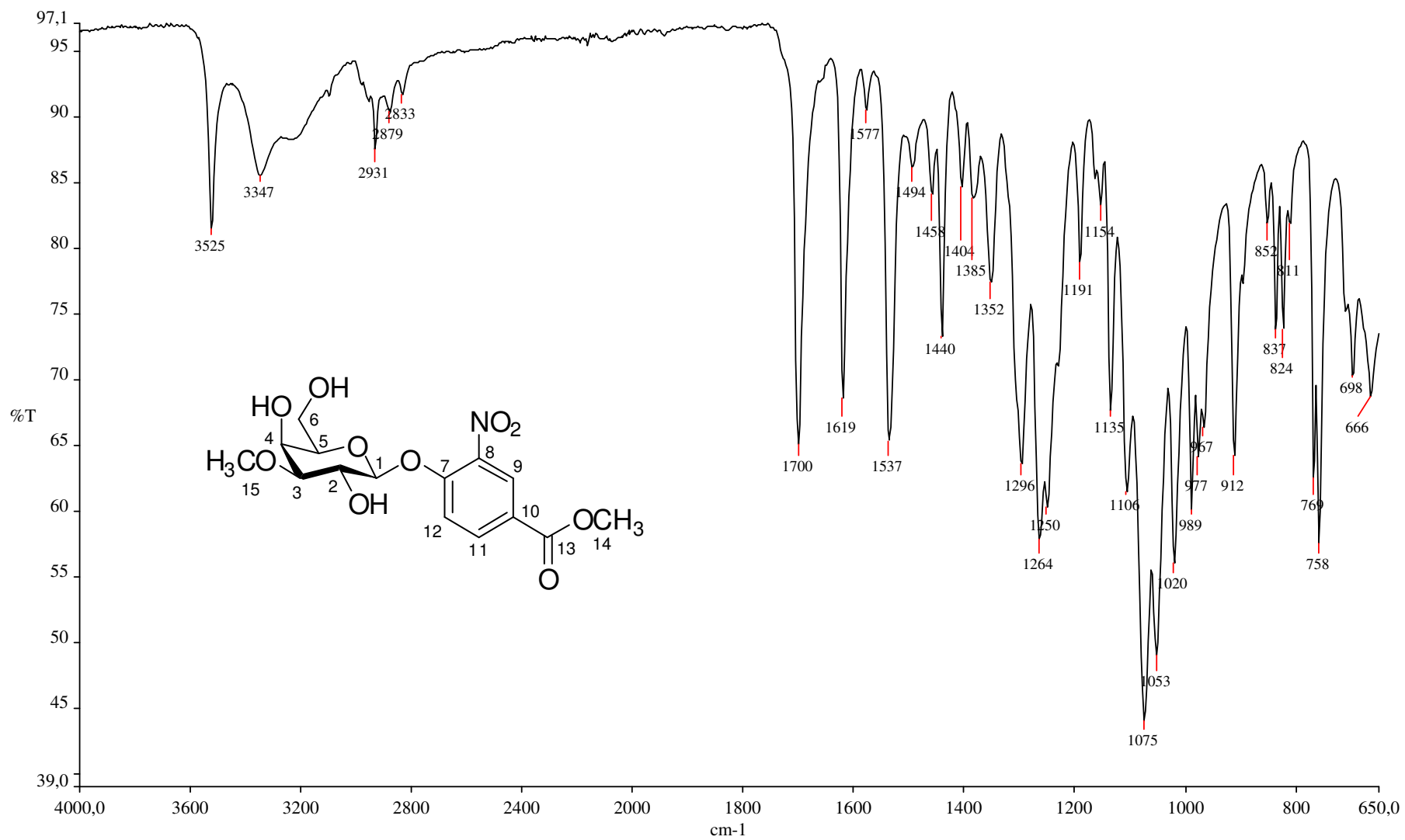
APÊNDICE GG – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 59 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE HH – Mapa de contornos COSY de 59 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

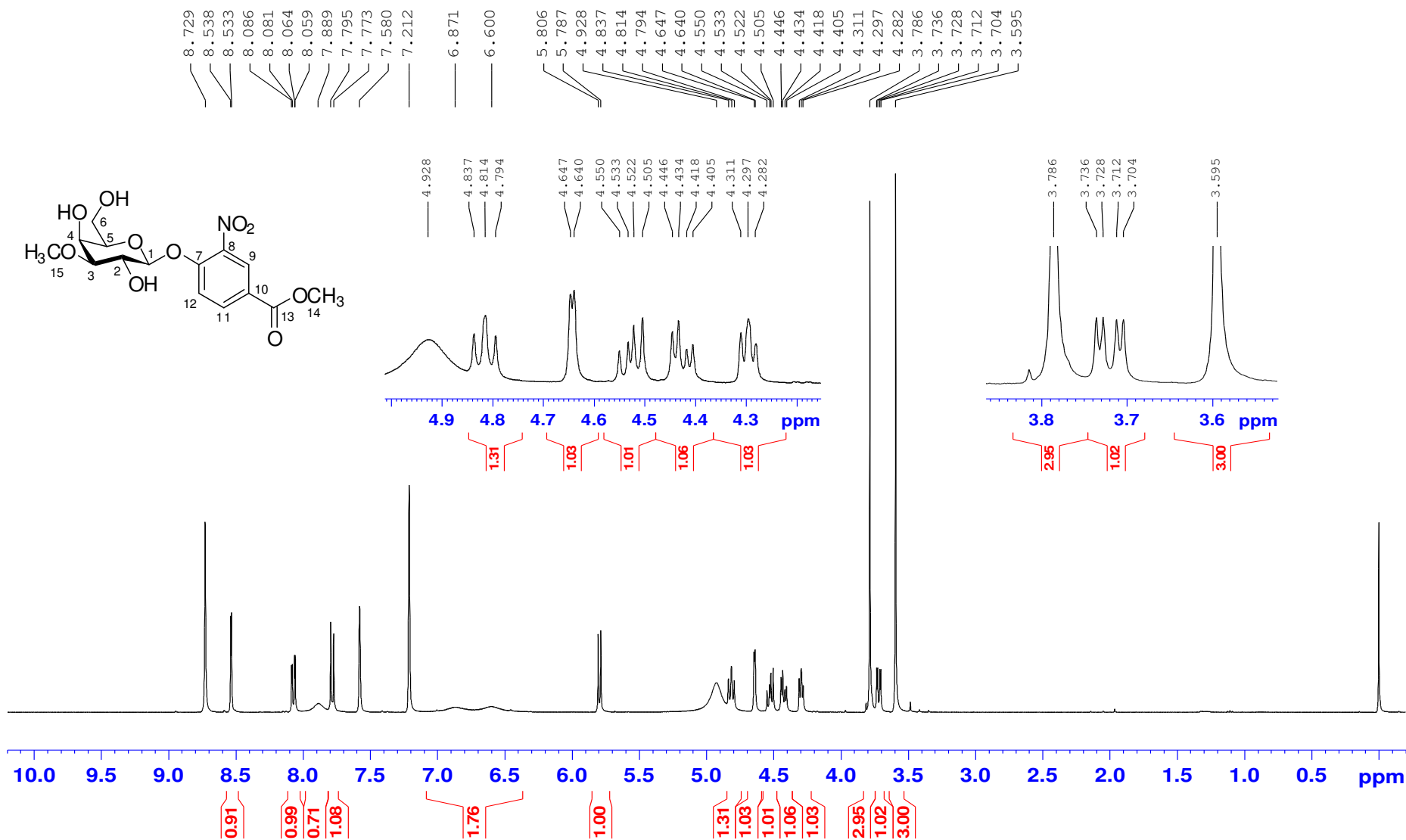
APÊNDICE II – Mapa de contornos HMQC de 59 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

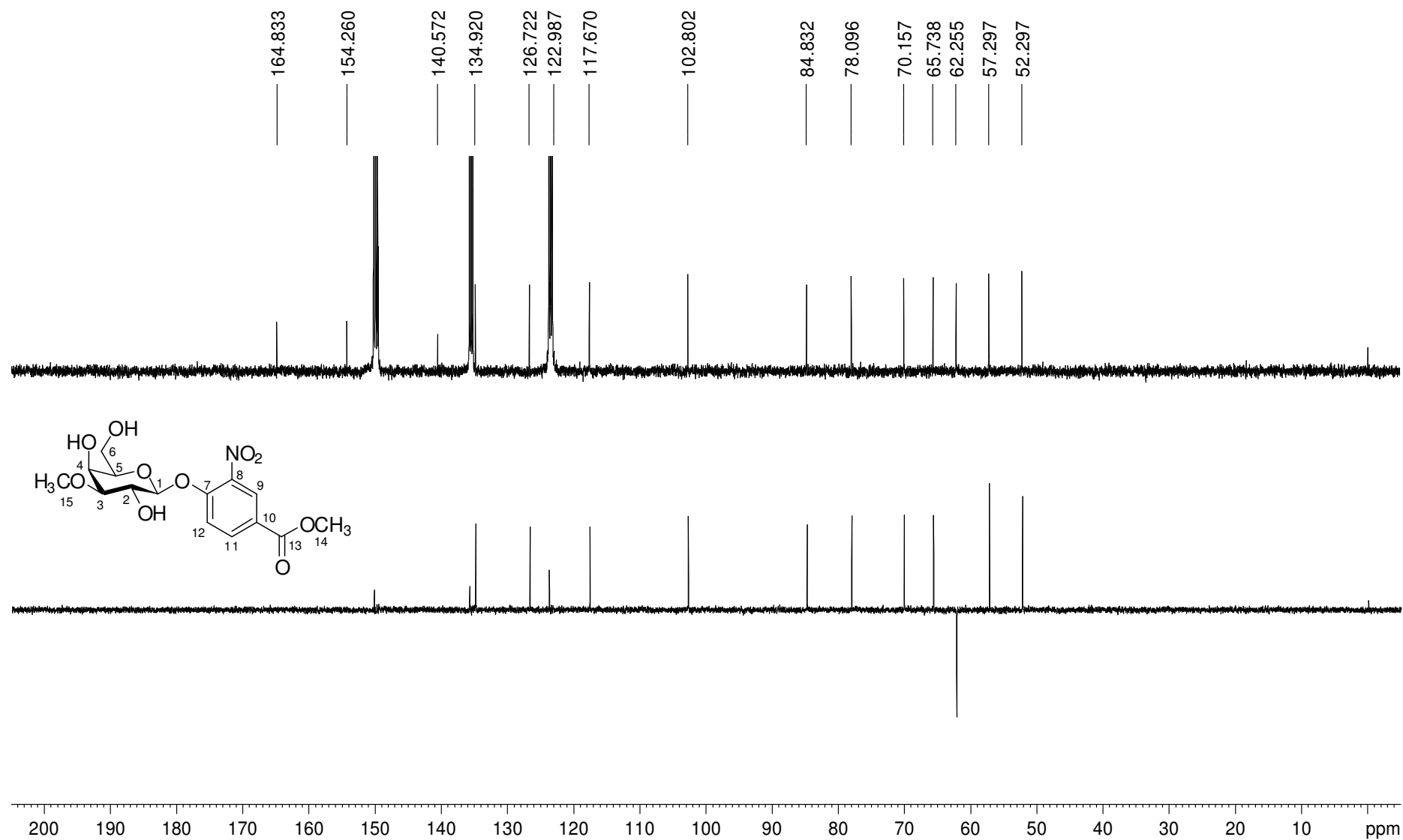
APÊNDICE JJ – Mapa de contornos HMBC de 59 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

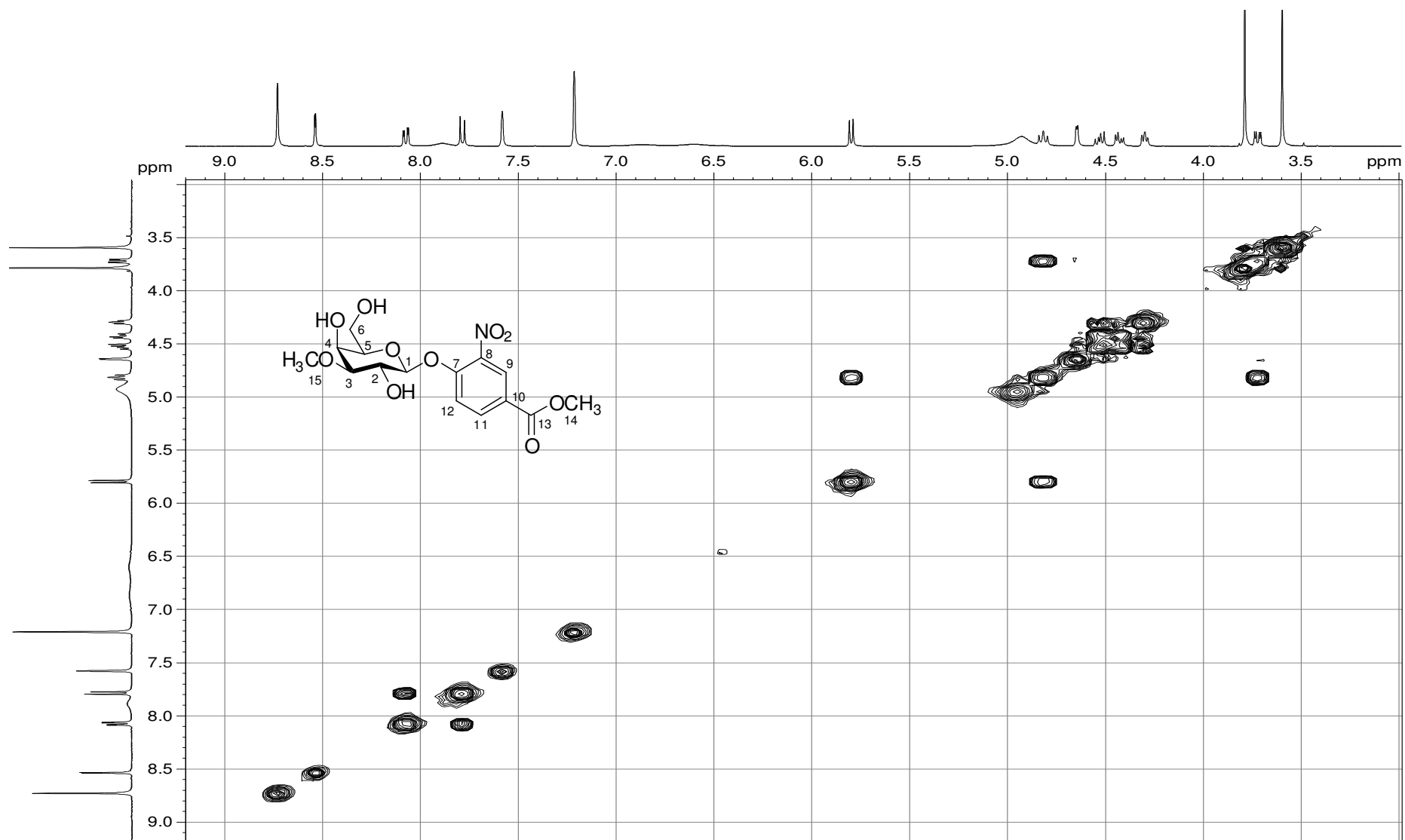
APÊNDICE KK – Espectro no infravermelho de 60

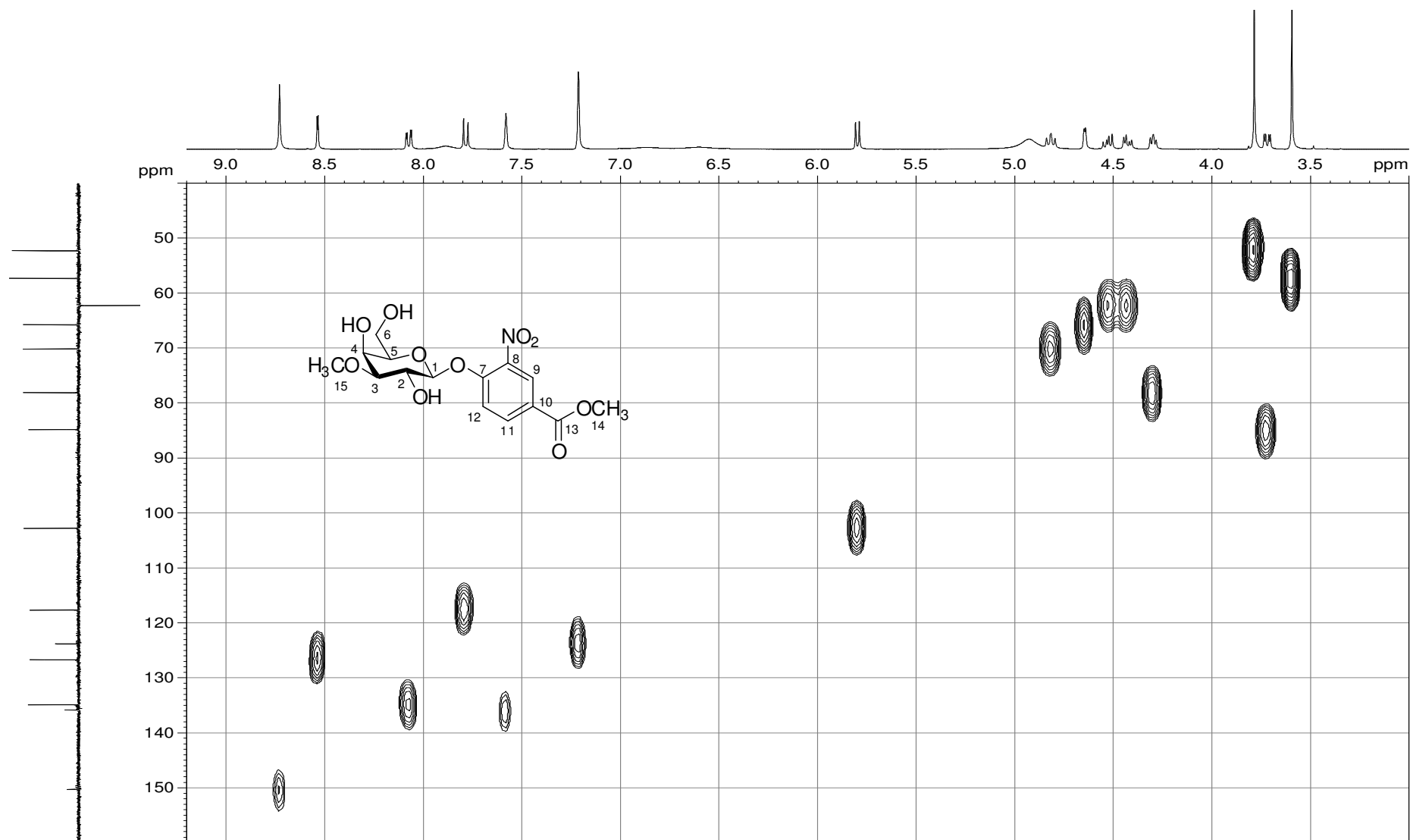


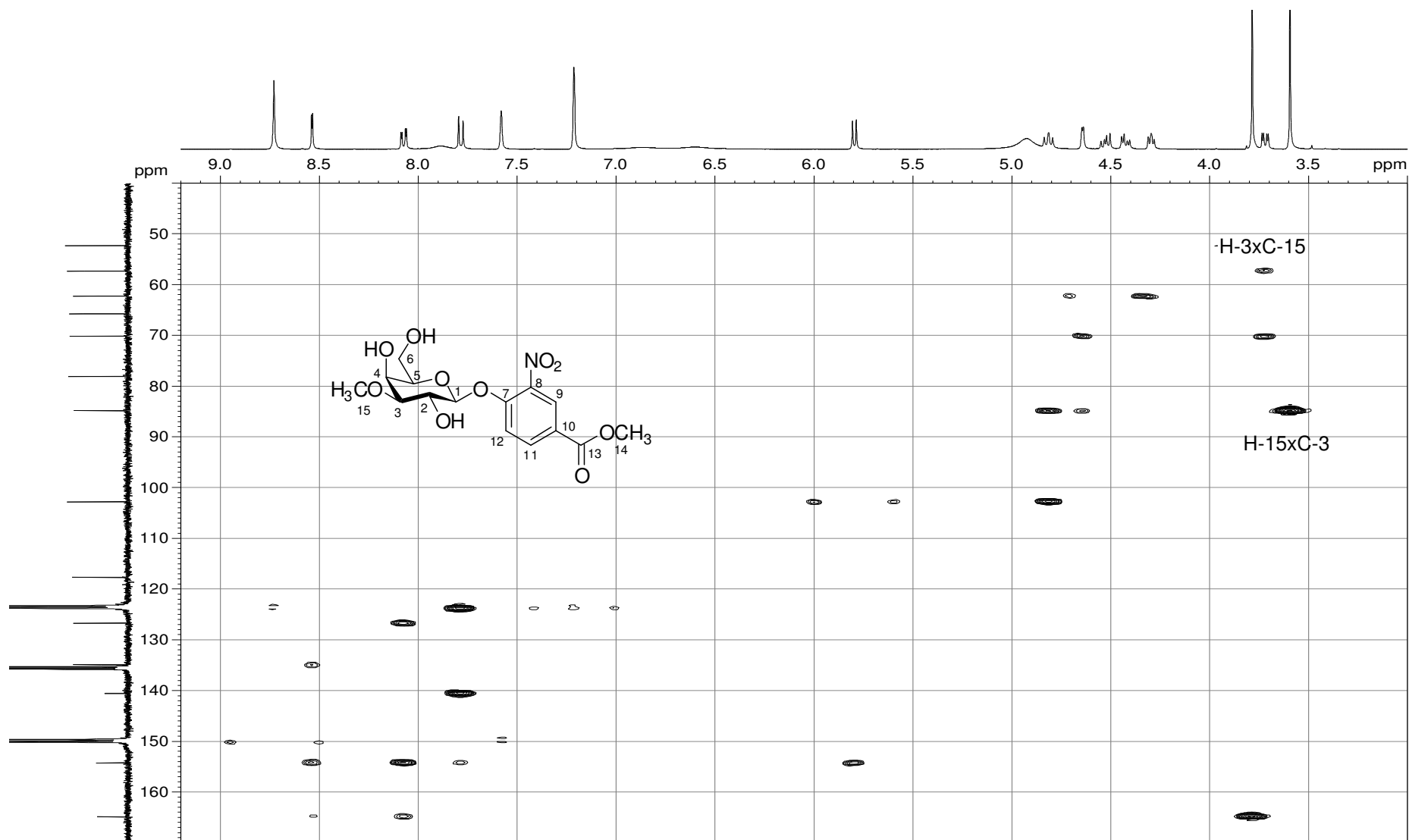
APÊNDICE LL – Espectro de RMN de ^1H de 60 (piridina- d_5 ; 400 MHz)



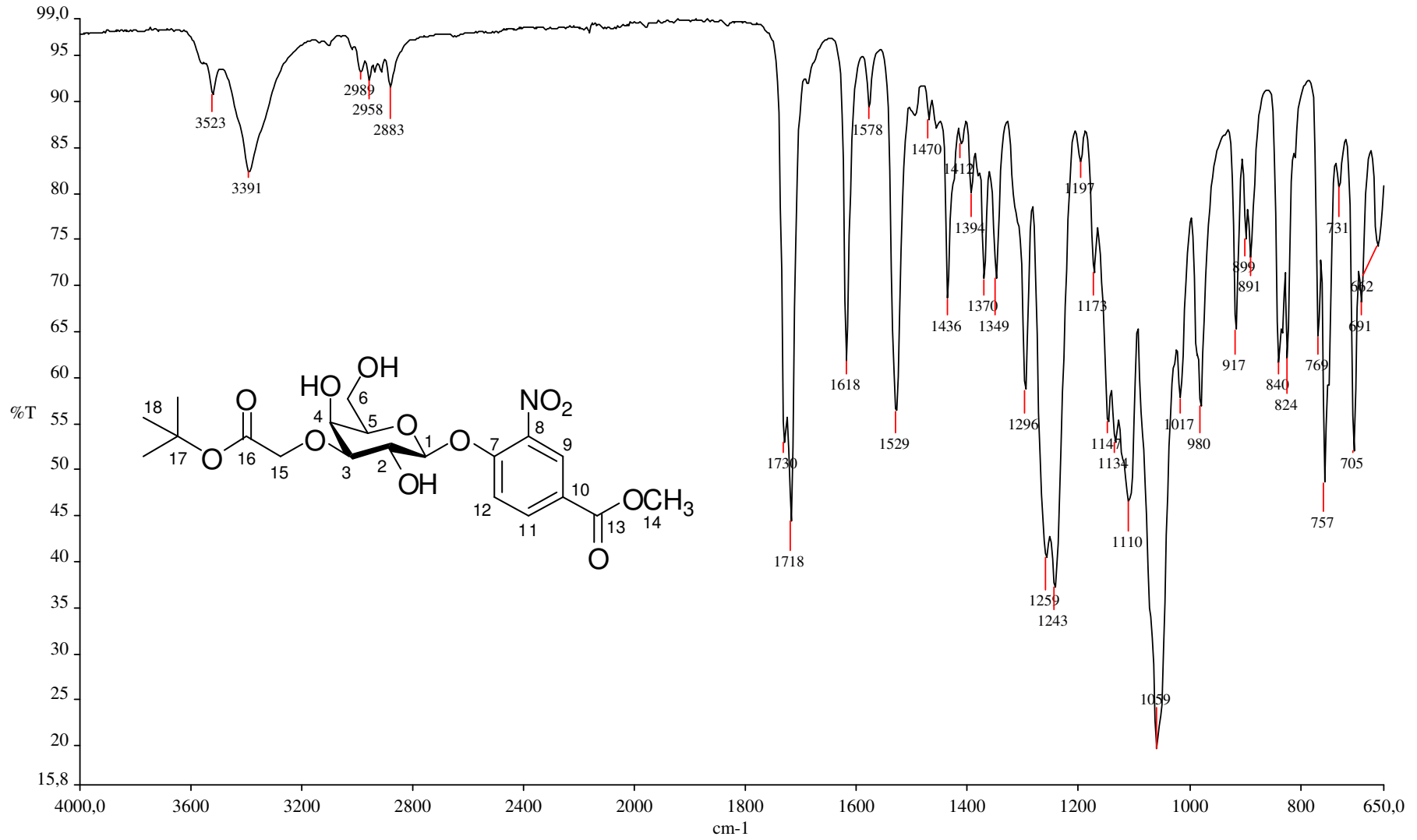
APÊNDICE MM – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 60 (piridina- d_5 ; 100 MHz)

APÊNDICE NN – Mapa de contornos COSY de 60 (piridina- d_5 ; 400 MHz)

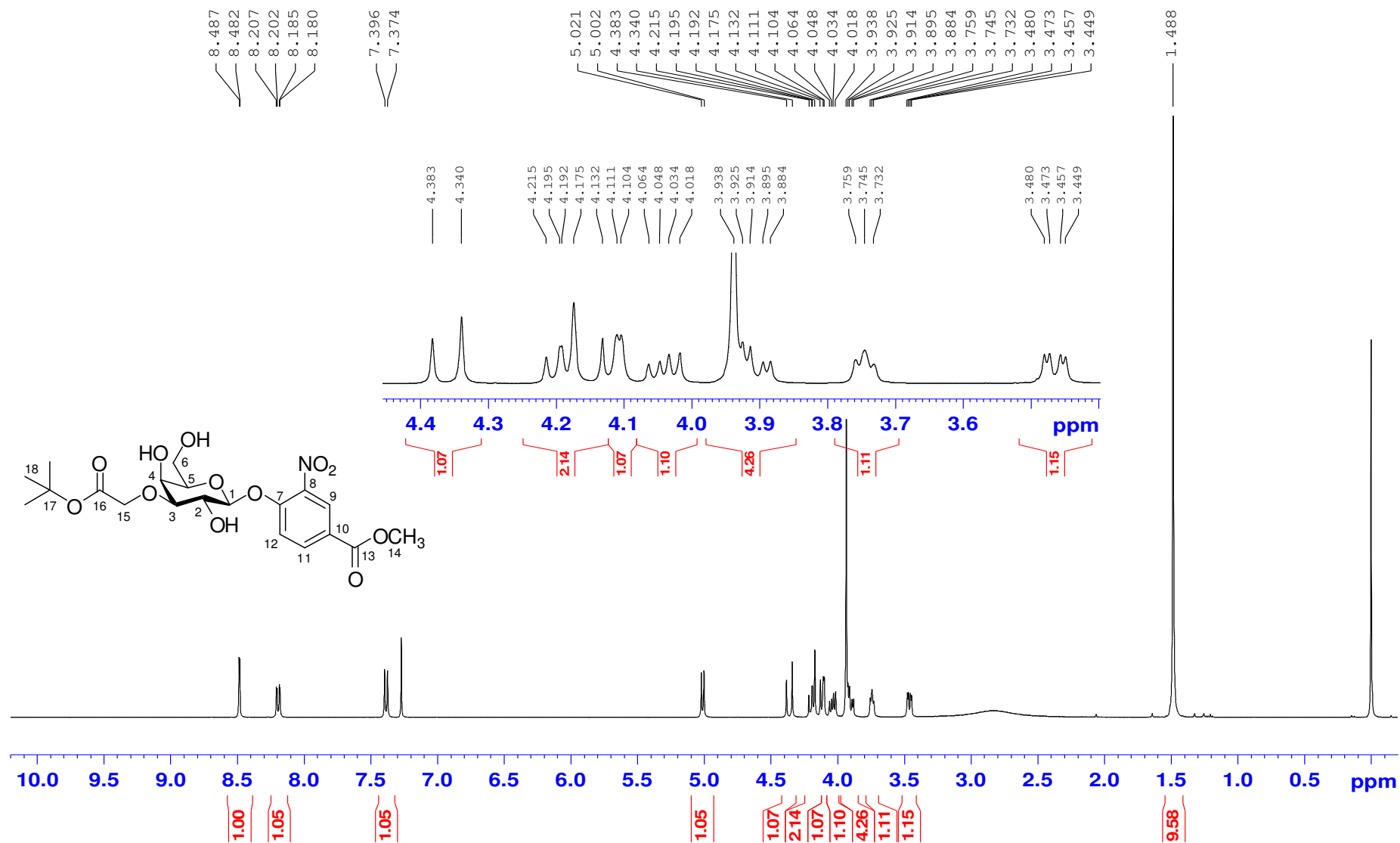
APÊNDICE OO – Mapa de contornos HMQC de 60 (piridina-*d*₅; 400 MHz)

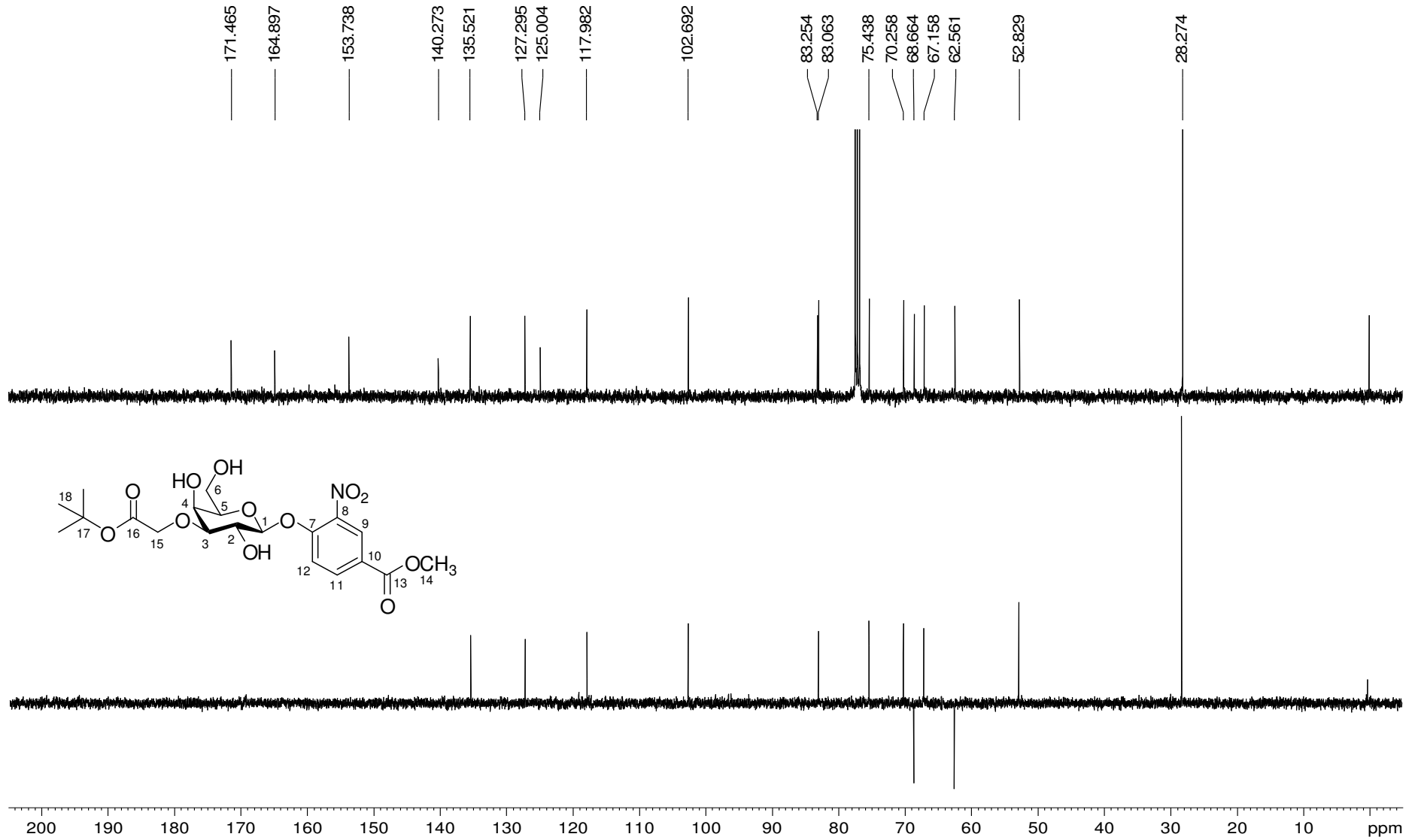
APÊNDICE PP – Mapa de contornos HMBC de 60 (piridina- d_5 ; 400 MHz)

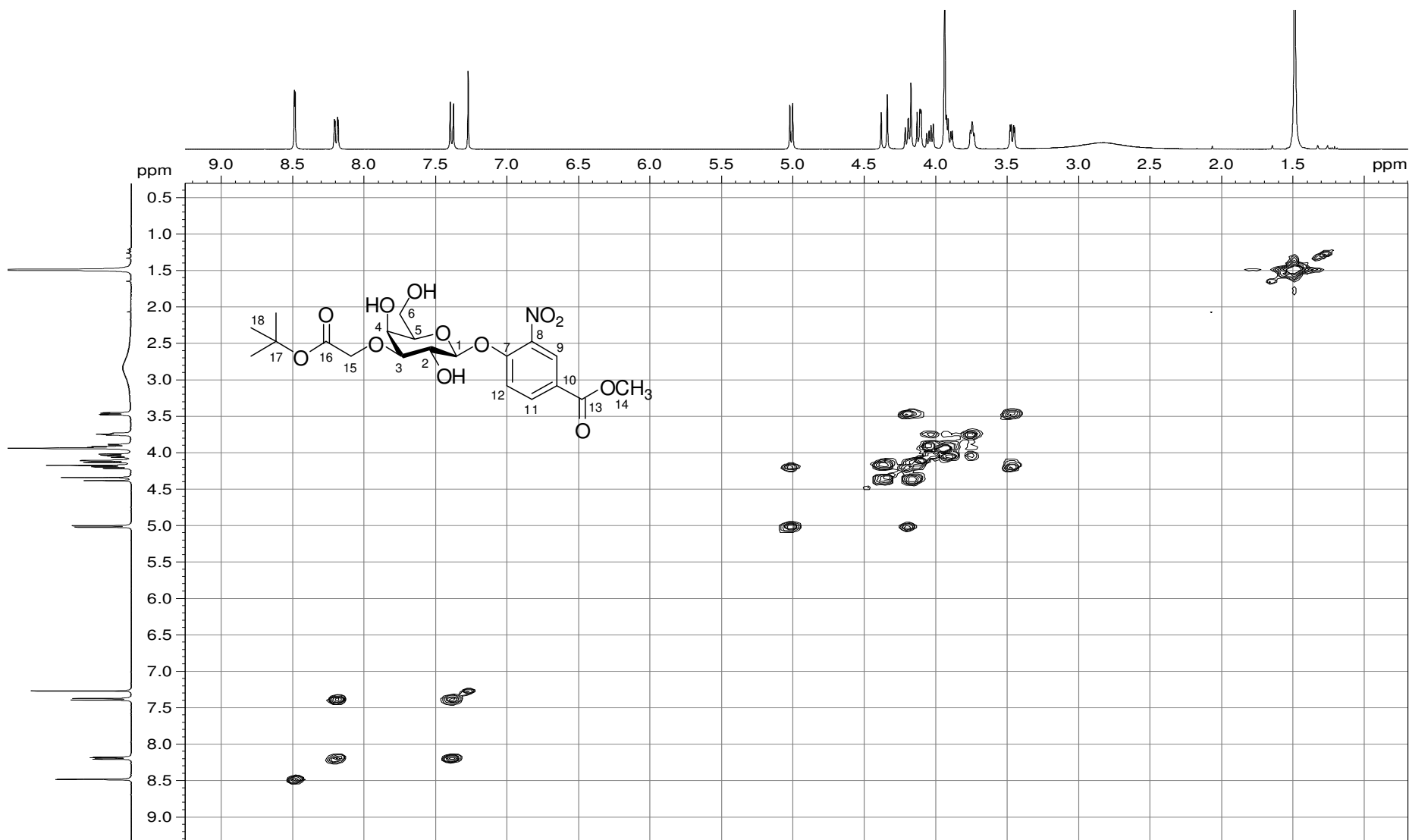
APÊNDICE QQ – Espectro no infravermelho de 61

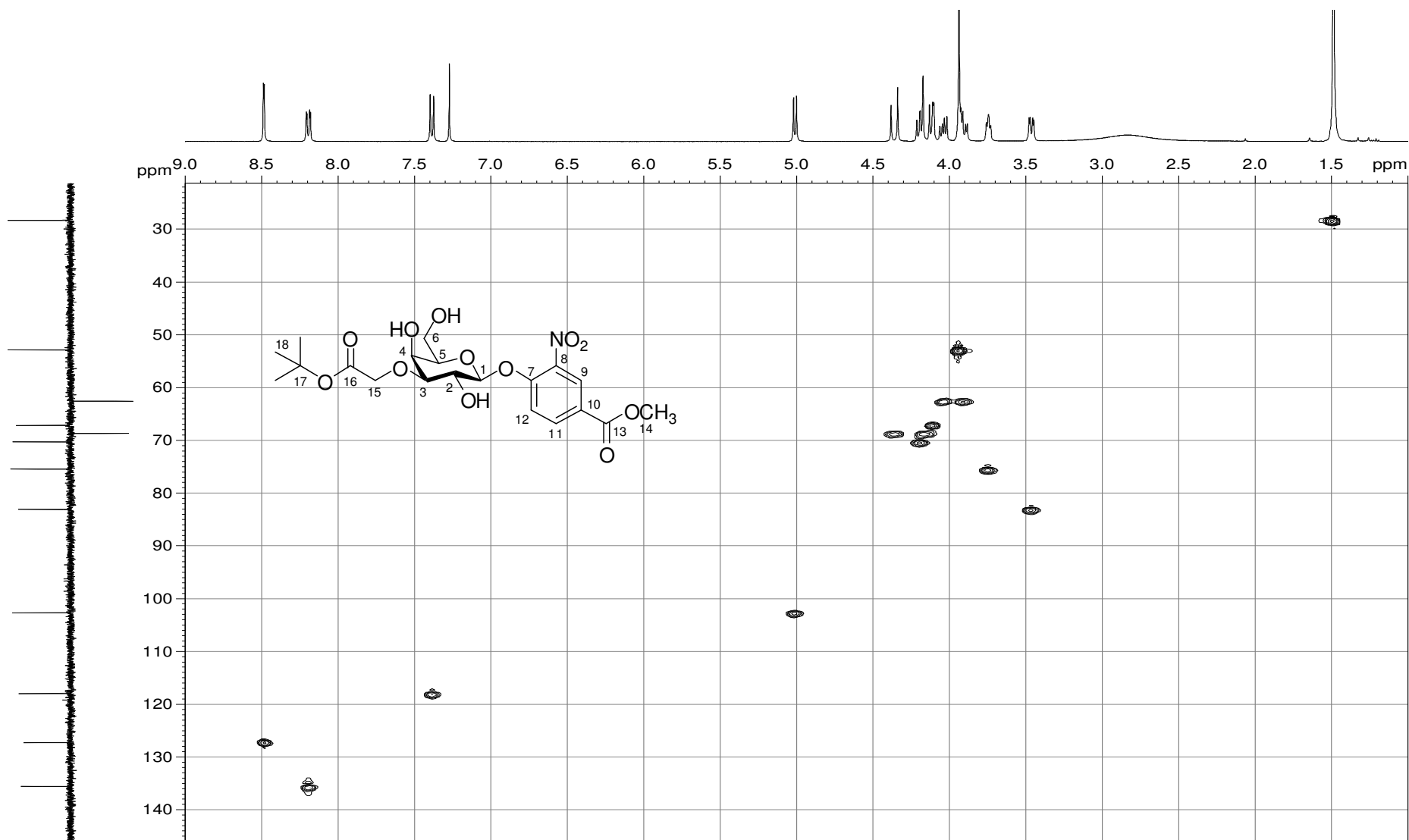


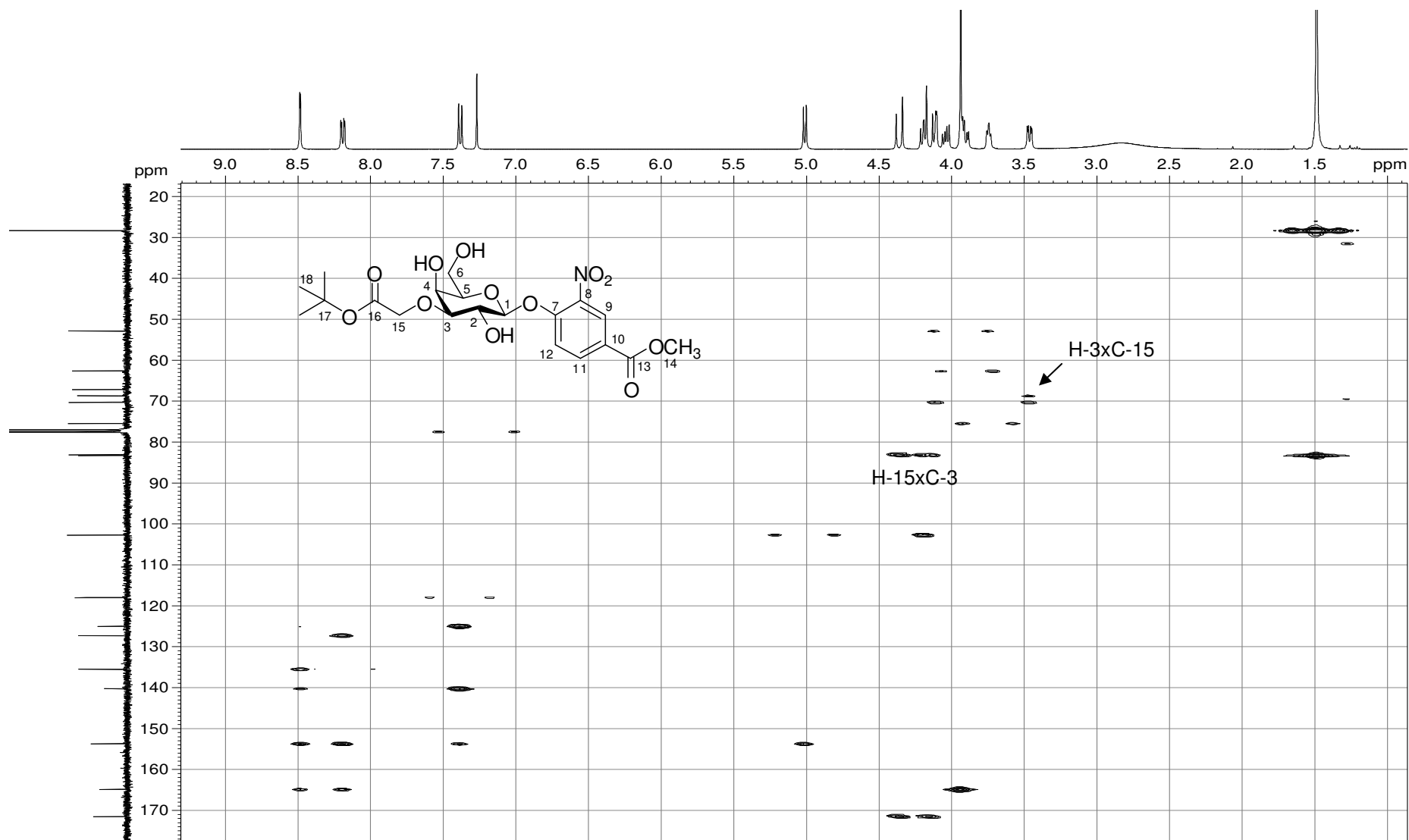
APÊNDICE RR – Espectro de RMN de ^1H de 61 (CDCl_3 ; 400 MHz)



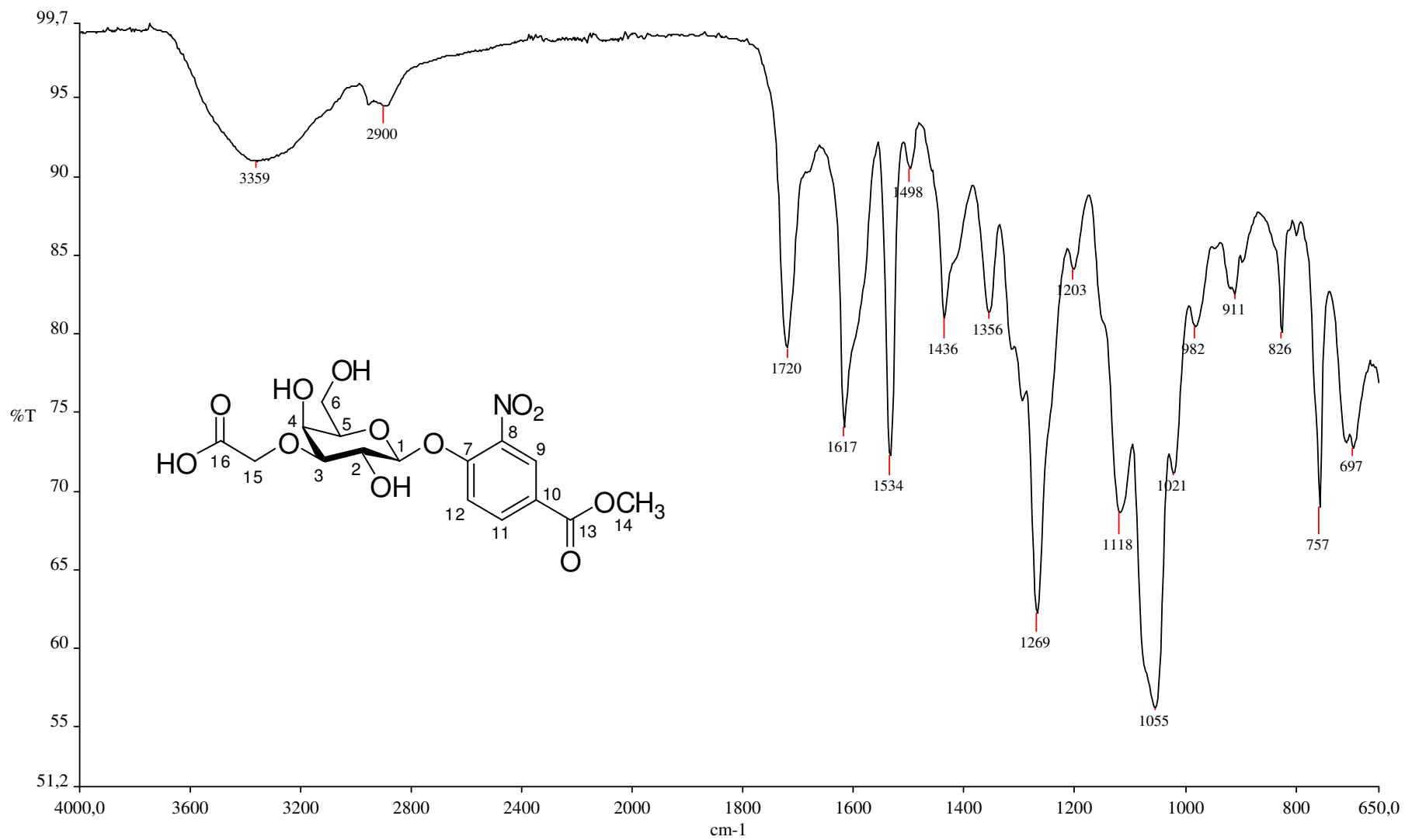
APÊNDICE SS – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 61 (CDCl_3 ; 100 MHz)

APÊNDICE TT – Mapa de contornos COSY de 61 (CDCl₃; 400 MHz)

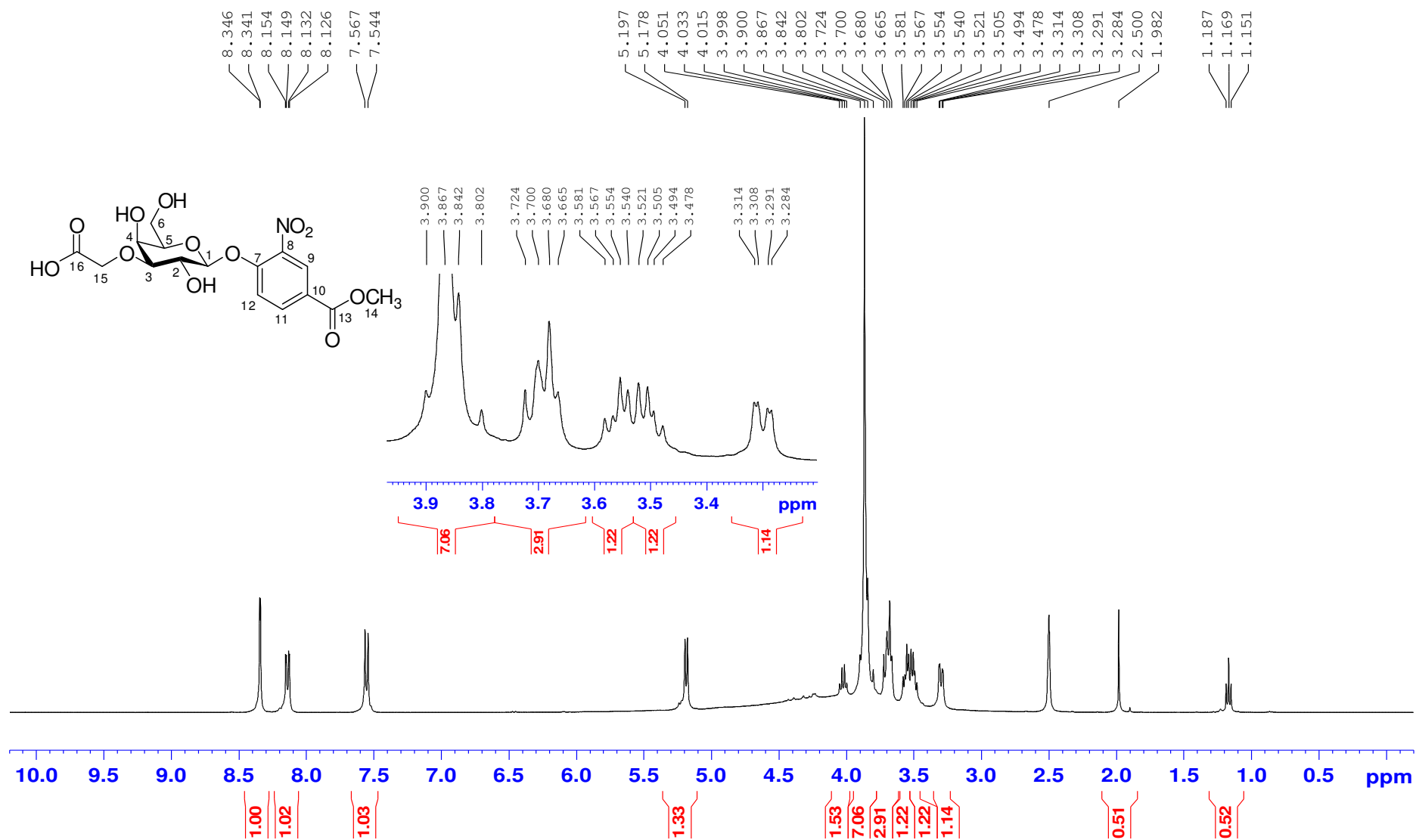
APÊNDICE UU – Mapa de contornos HMQC de 61 (CDCl₃; 400 MHz)

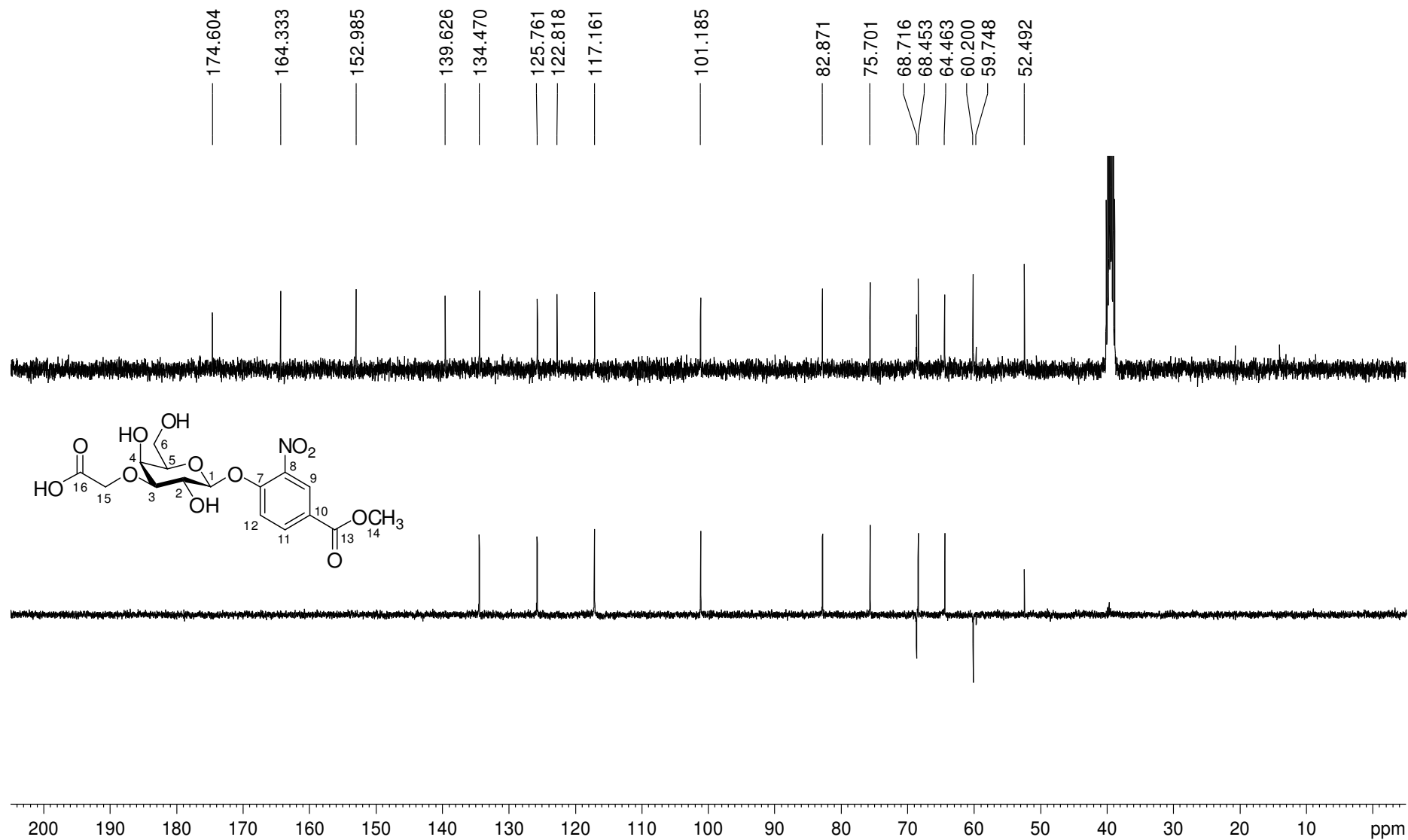
APÊNDICE VV – Mapa de contornos HMBC de 61 (CDCl₃; 400 MHz)

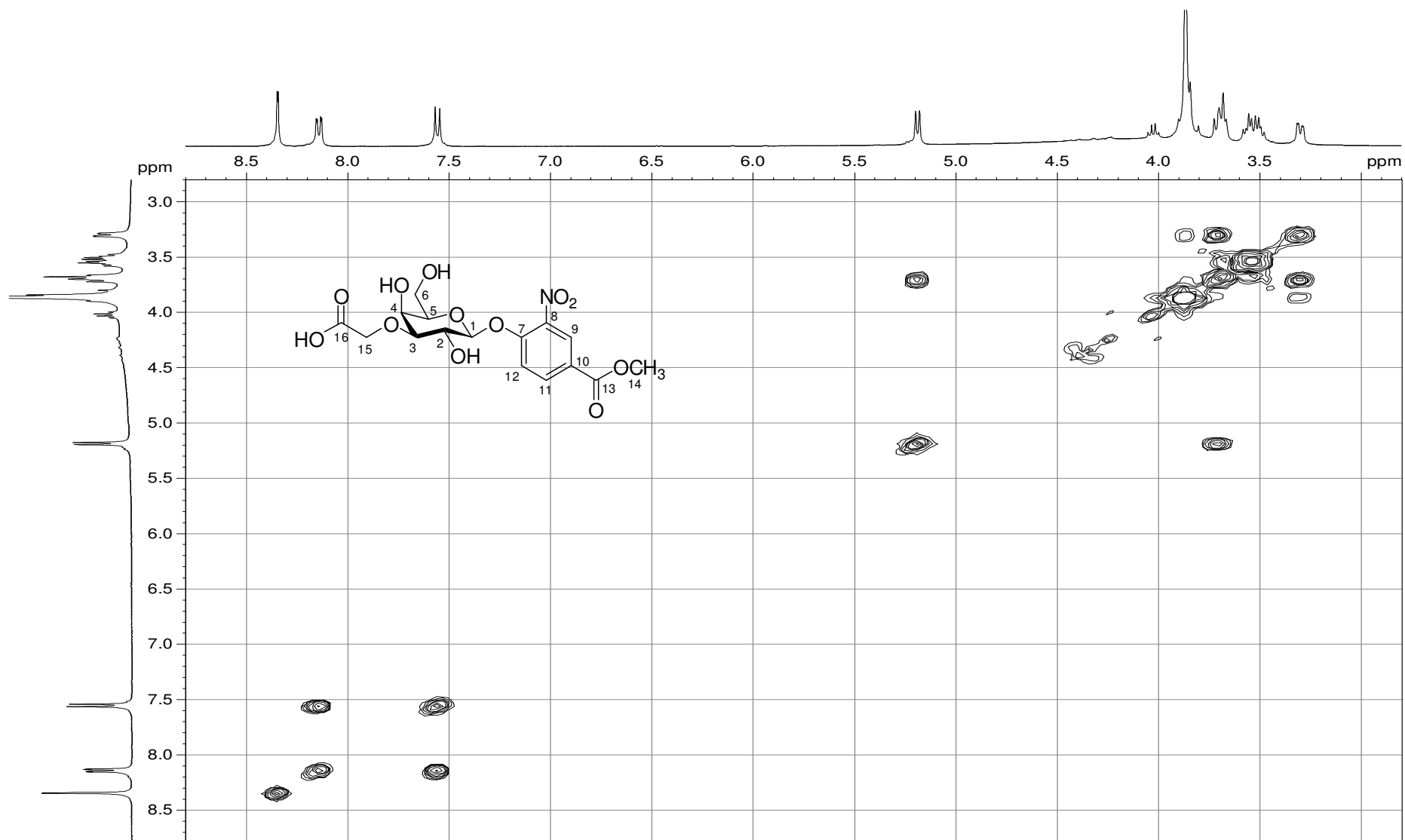
APÊNDICE XX – Espectro no infravermelho de 62

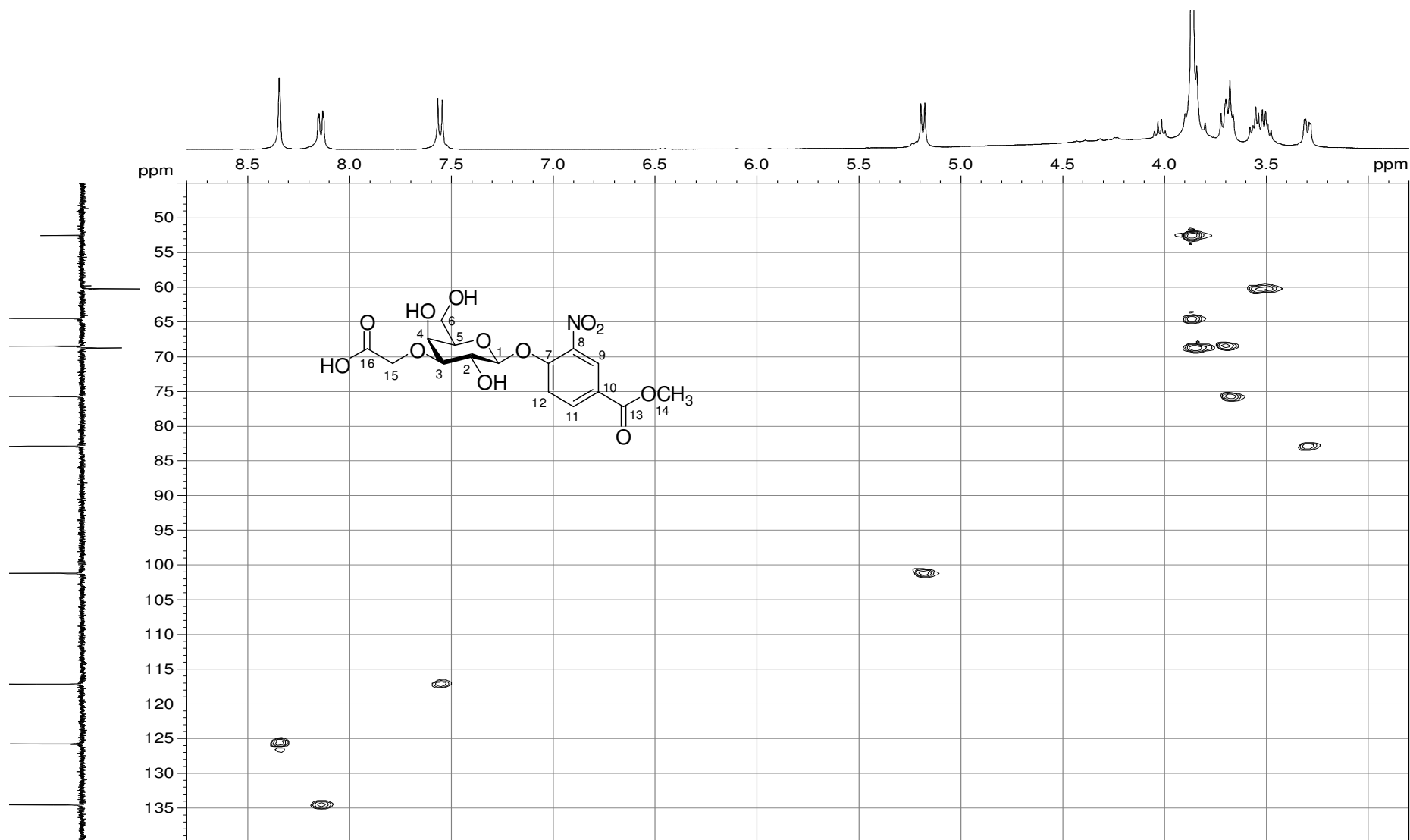


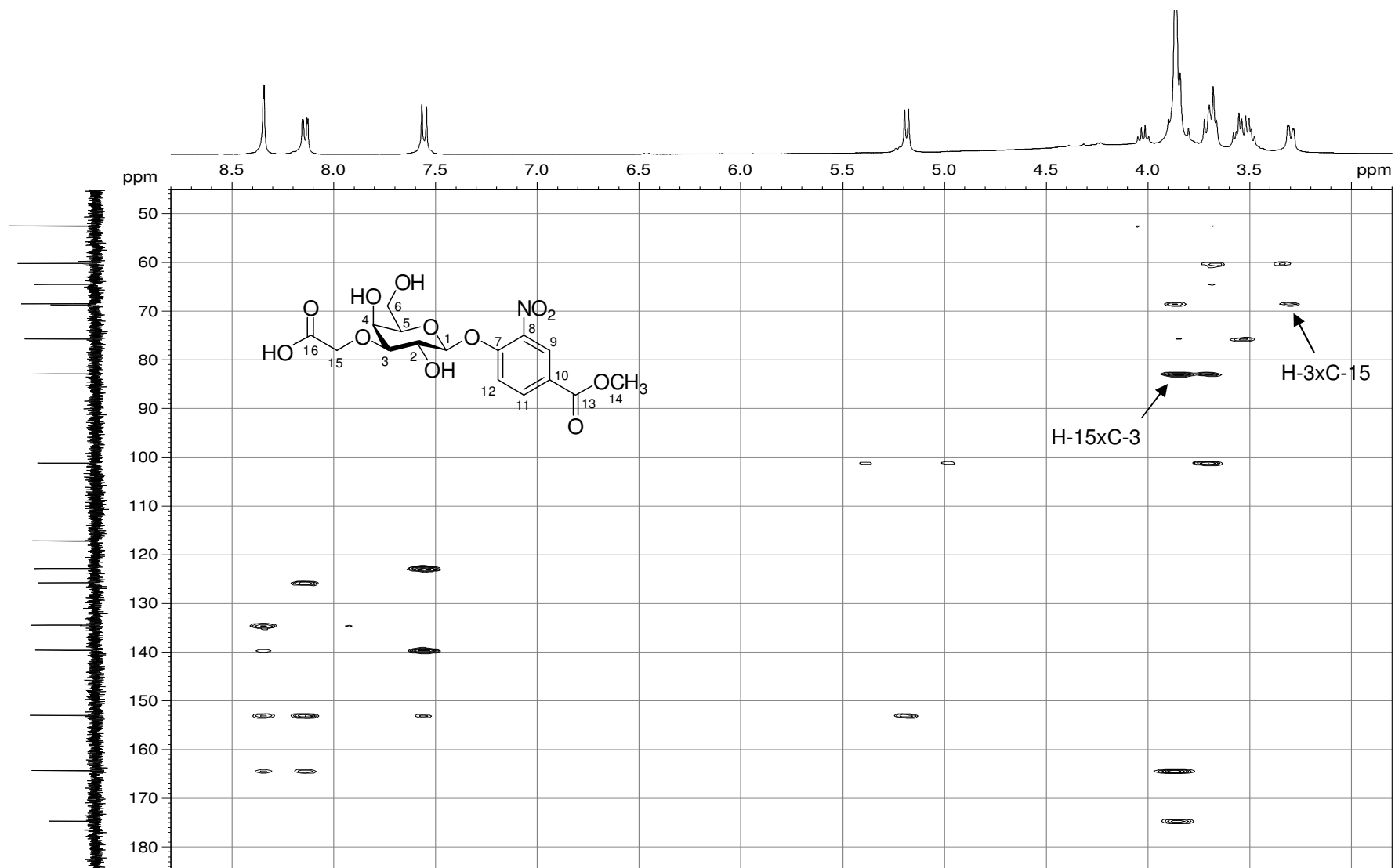
APÊNDICE YY – Espectro de RMN de ^1H de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



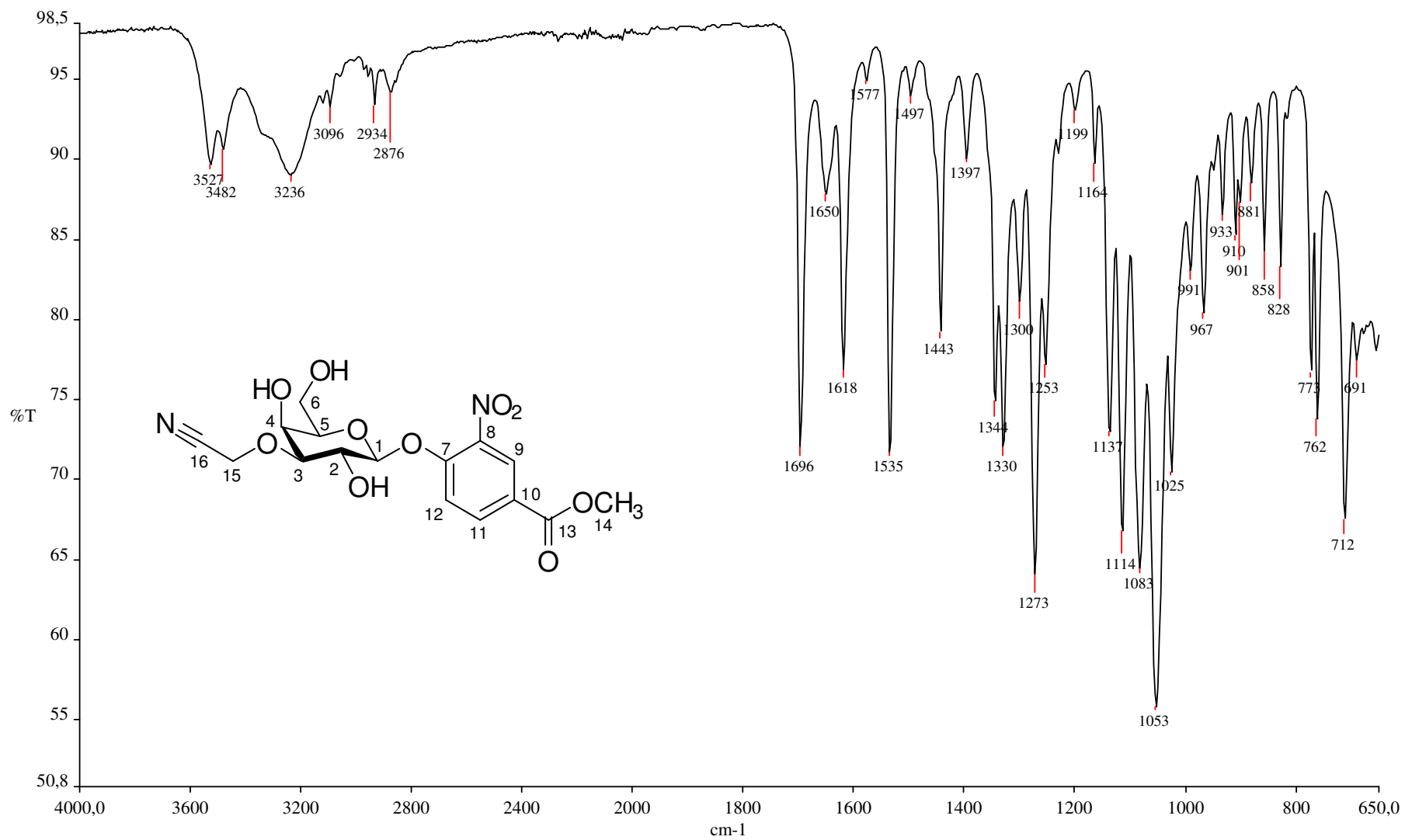
APÊNDICE WW – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 62 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE ZZ – Mapa de contornos COSY de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

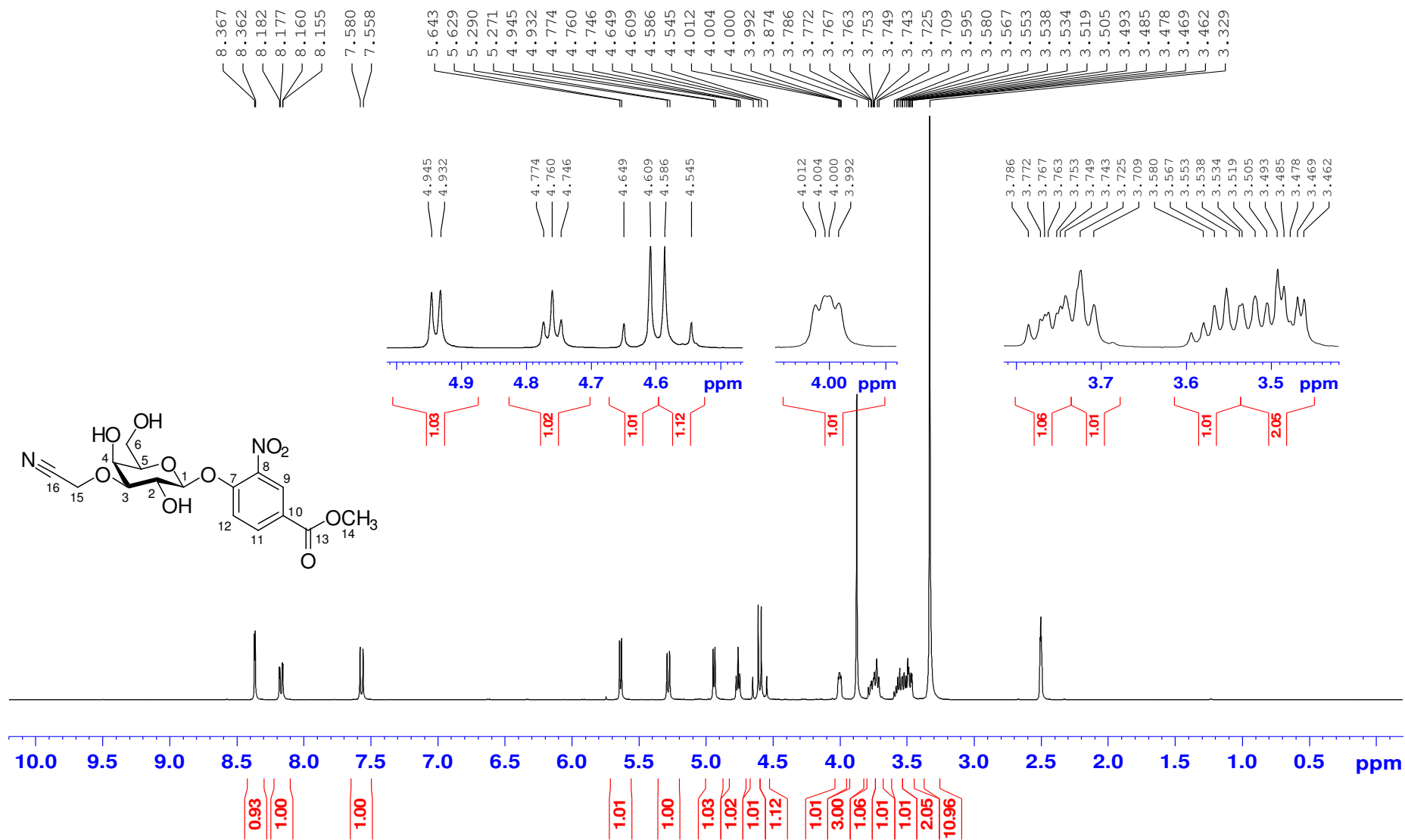
APÊNDICE AAA – Mapa de contornos HMQC de 62 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

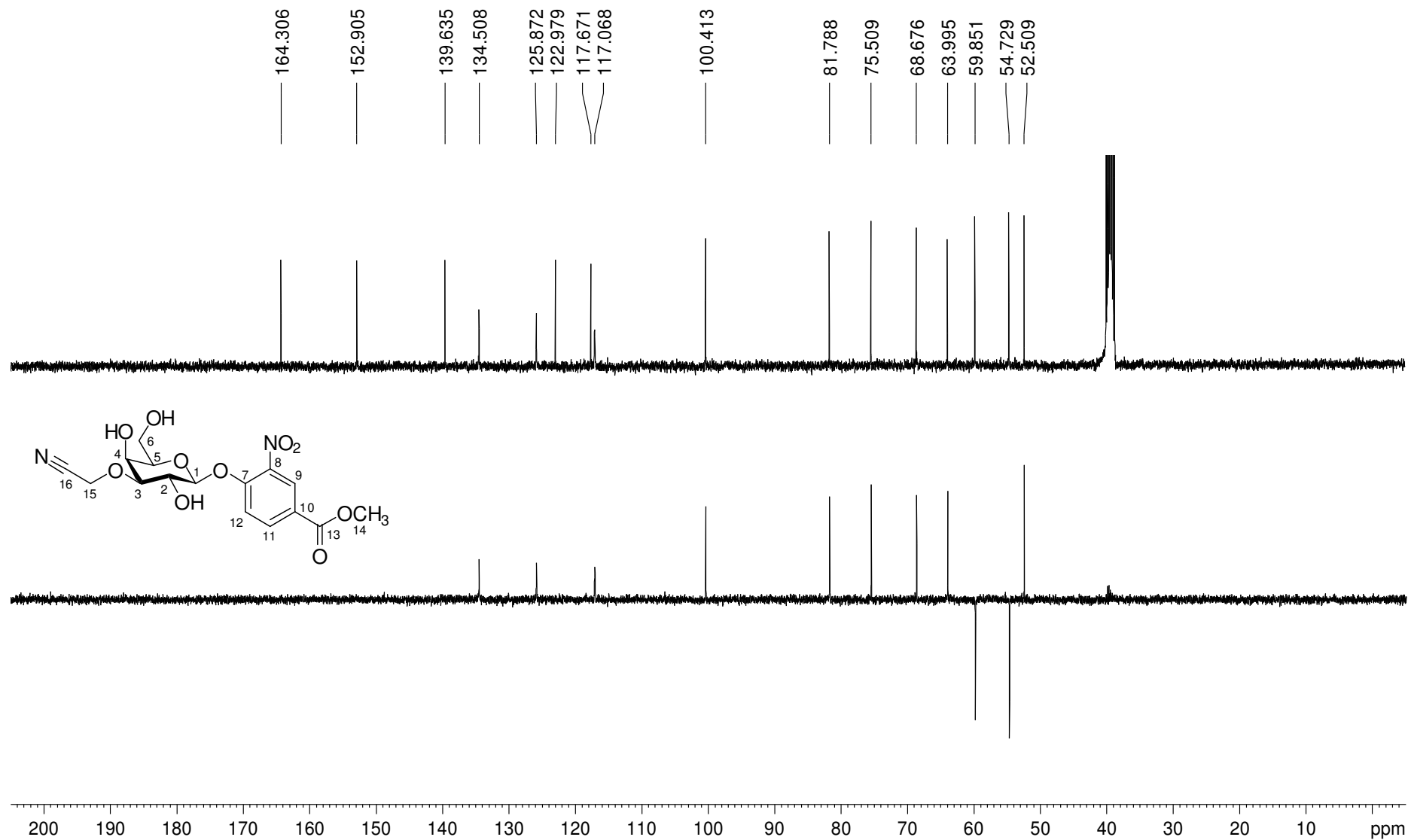
APÊNDICE BBB – Mapa de contornos HMBC de 62 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

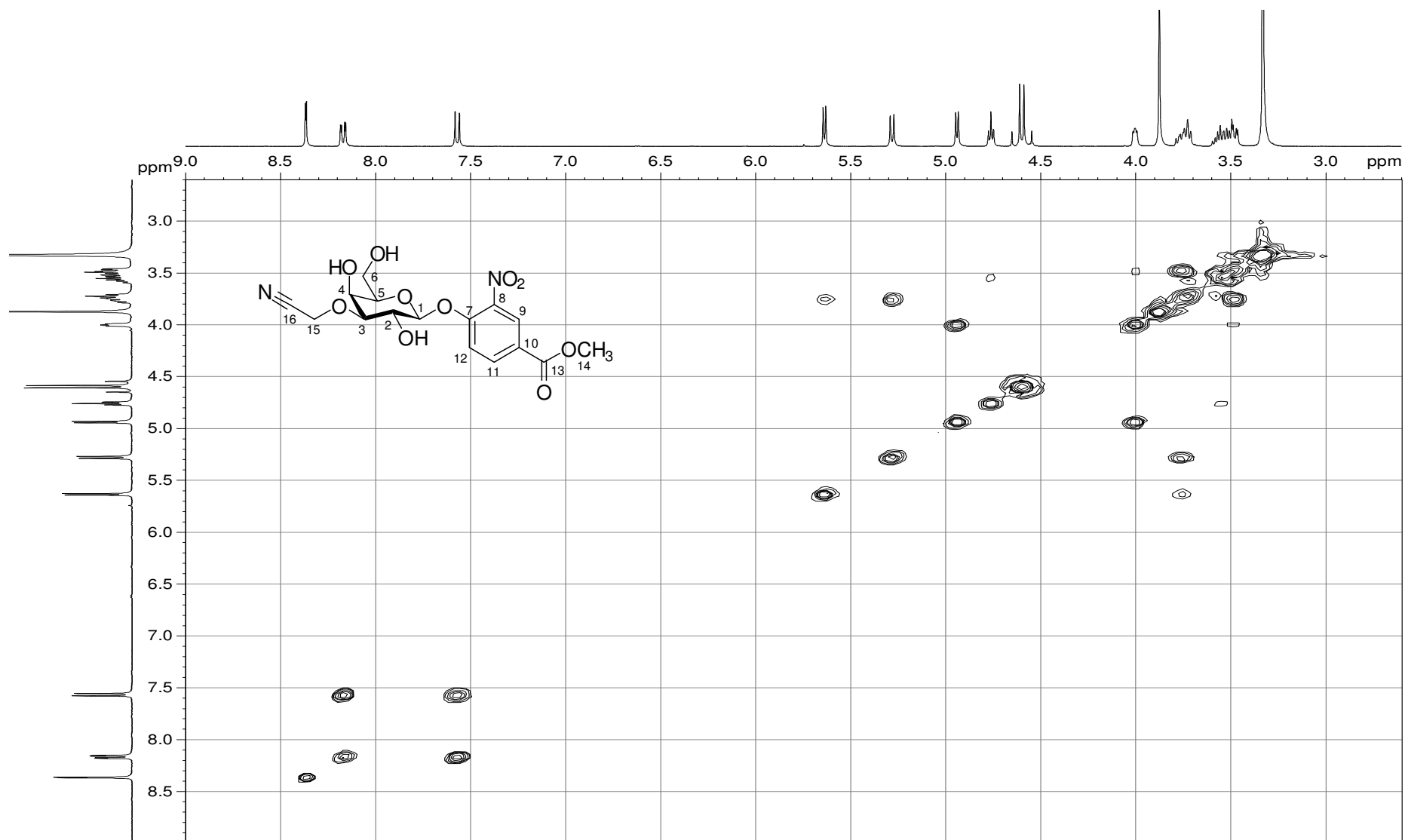
APÊNDICE CCC – Espectro no infravermelho de 63

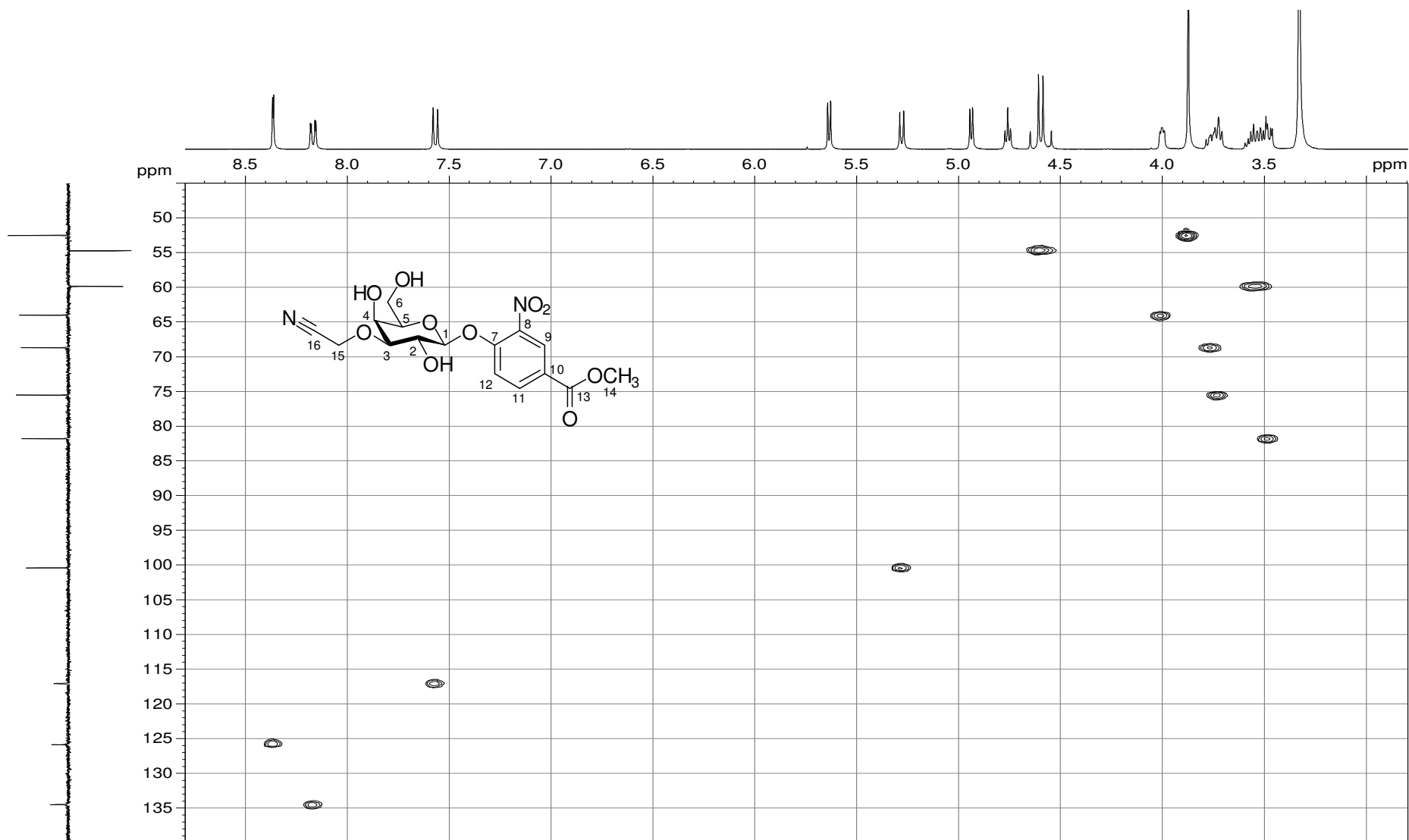


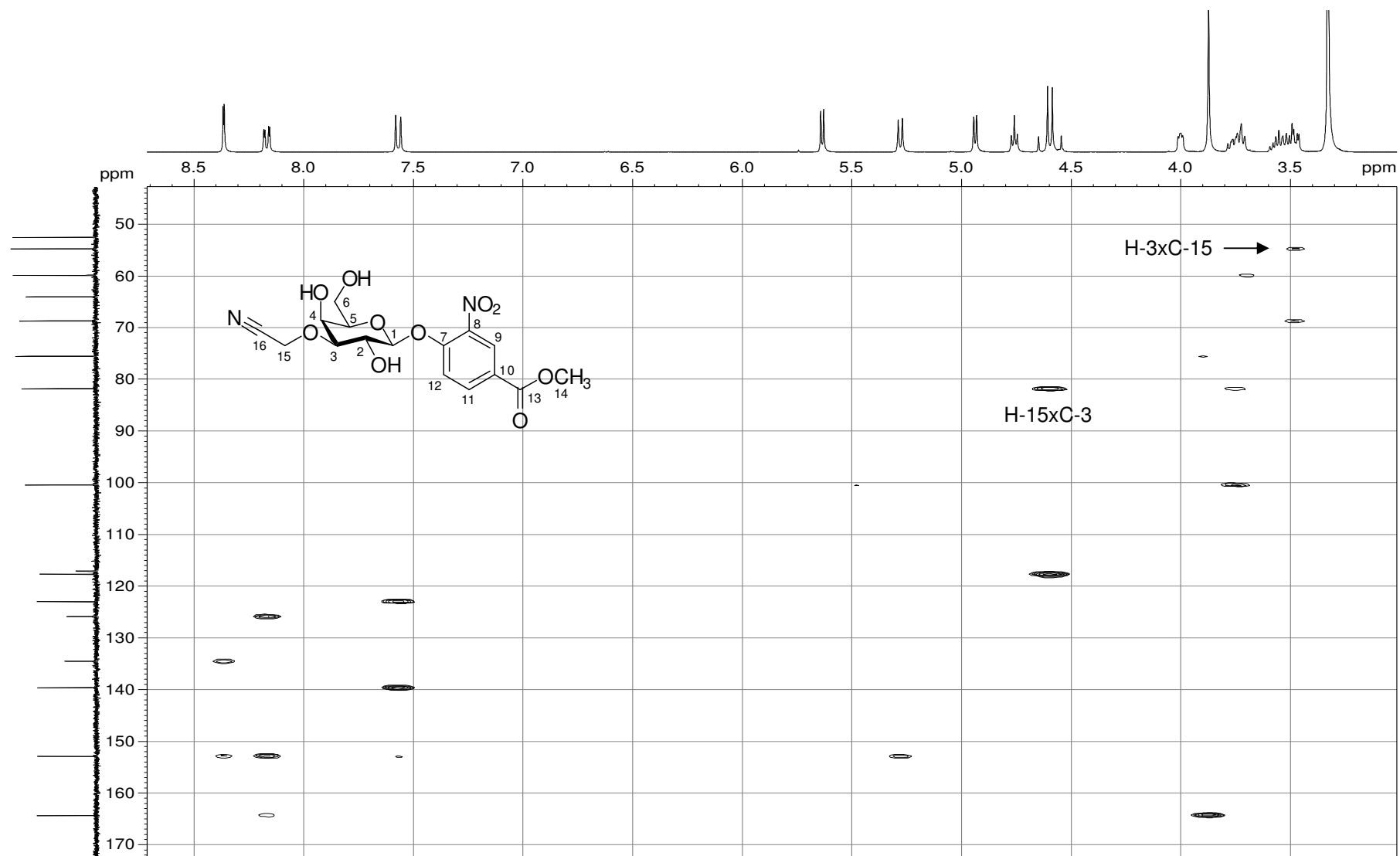
APÊNDICE DDD – Espectro de RMN de ^1H de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



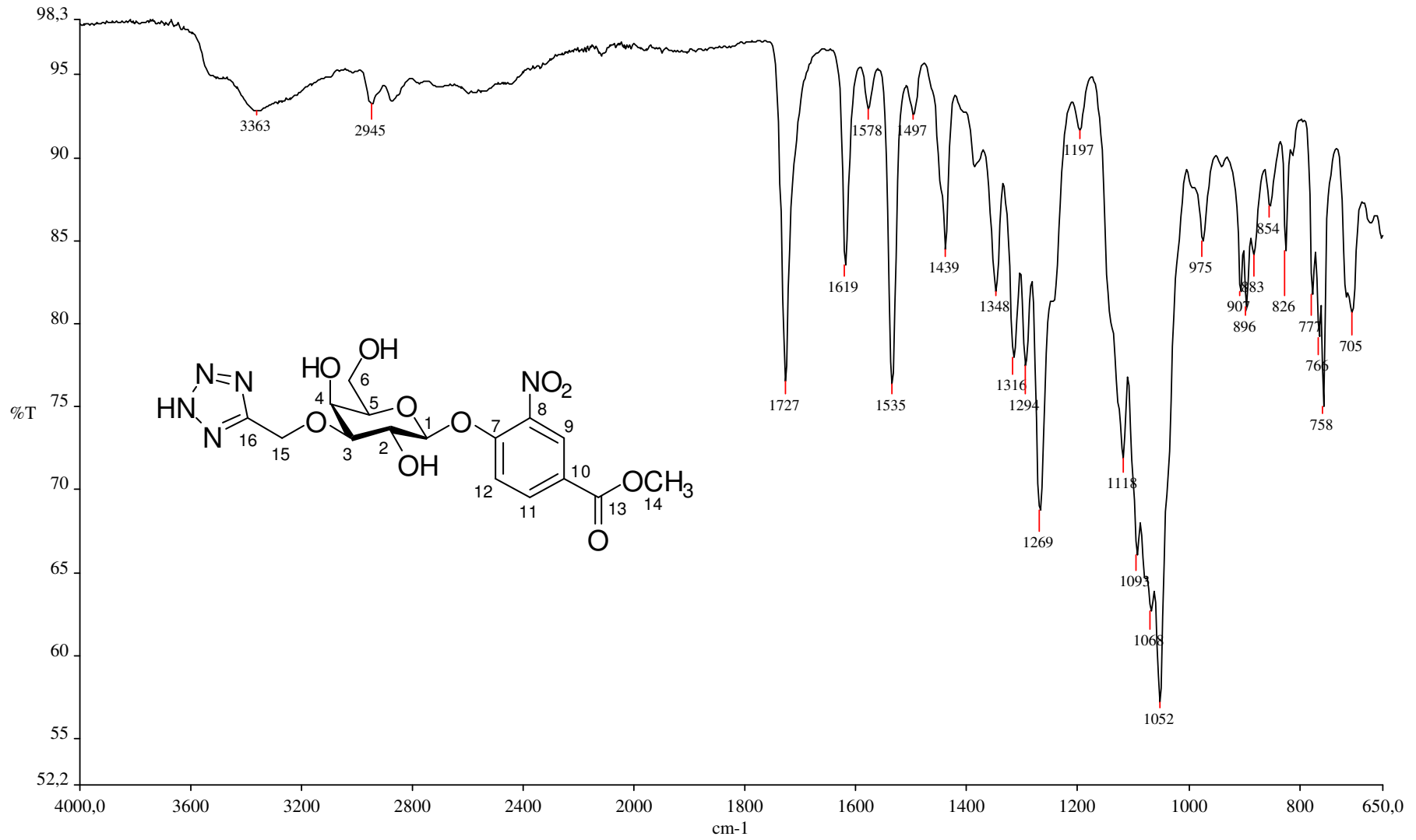
APÊNDICE EEE – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 63 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE FFF – Mapa de contornos COSY de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

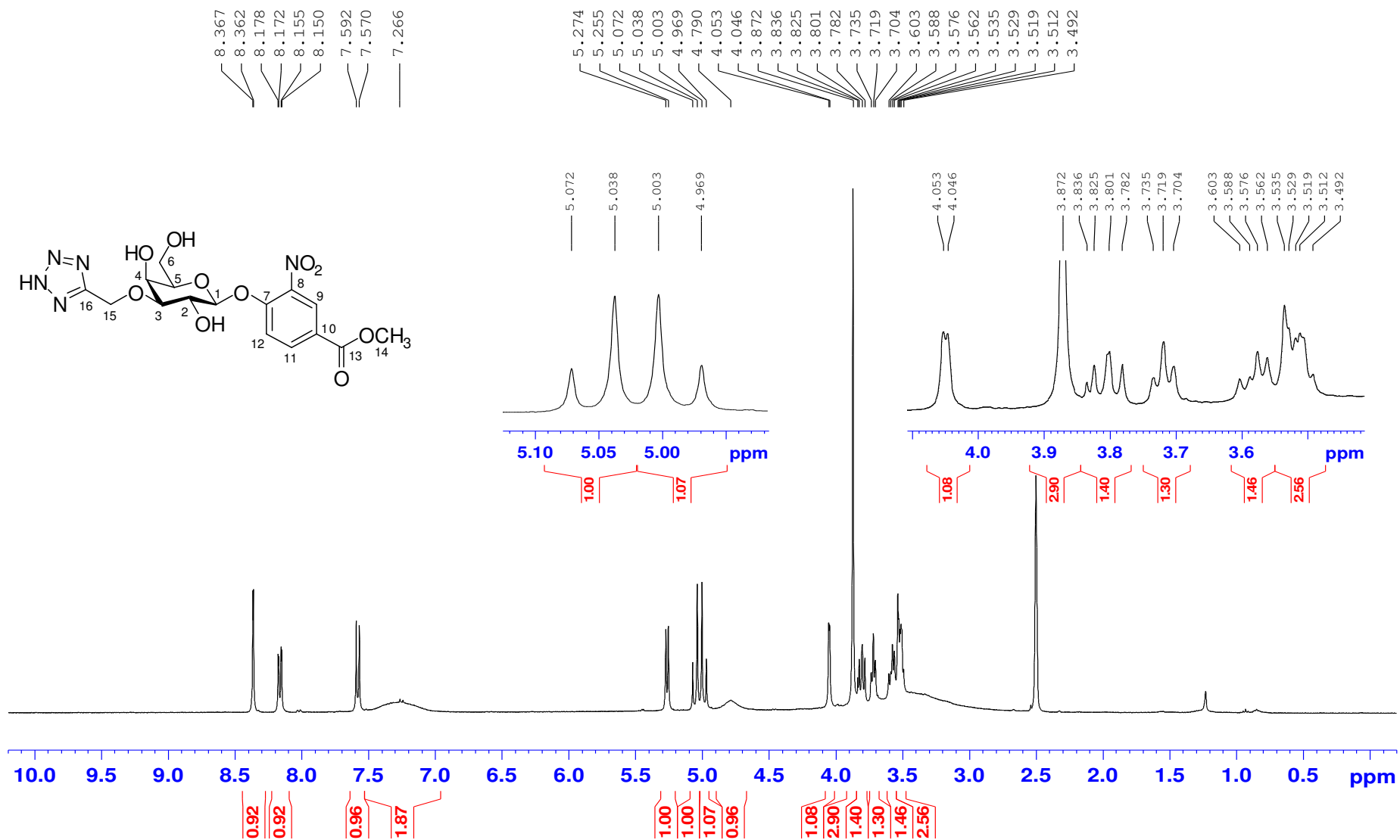
APÊNDICE GGG – Mapa de contornos HMQC de 63 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

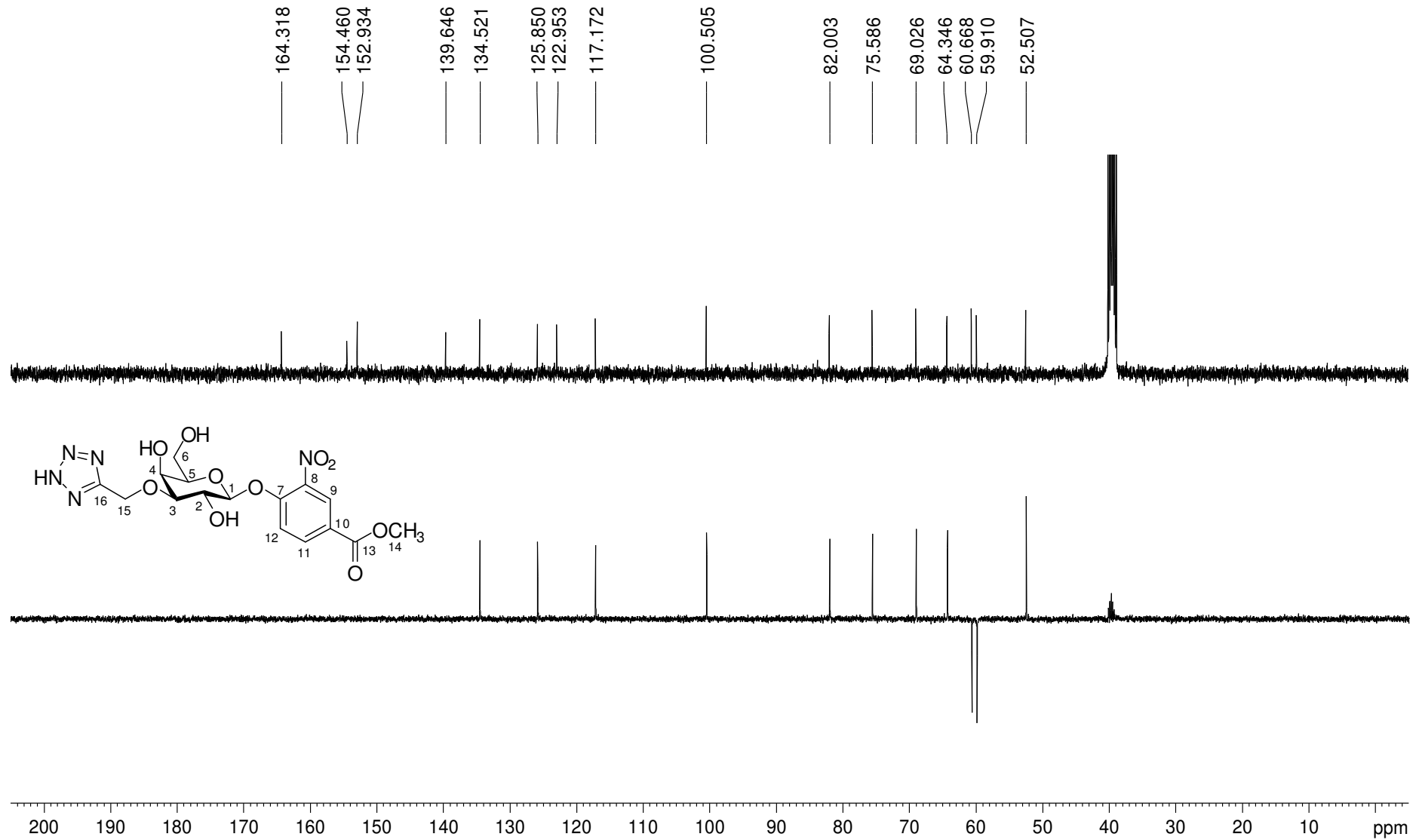
APÊNDICE HHH – Mapa de contornos HMBC de 63 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

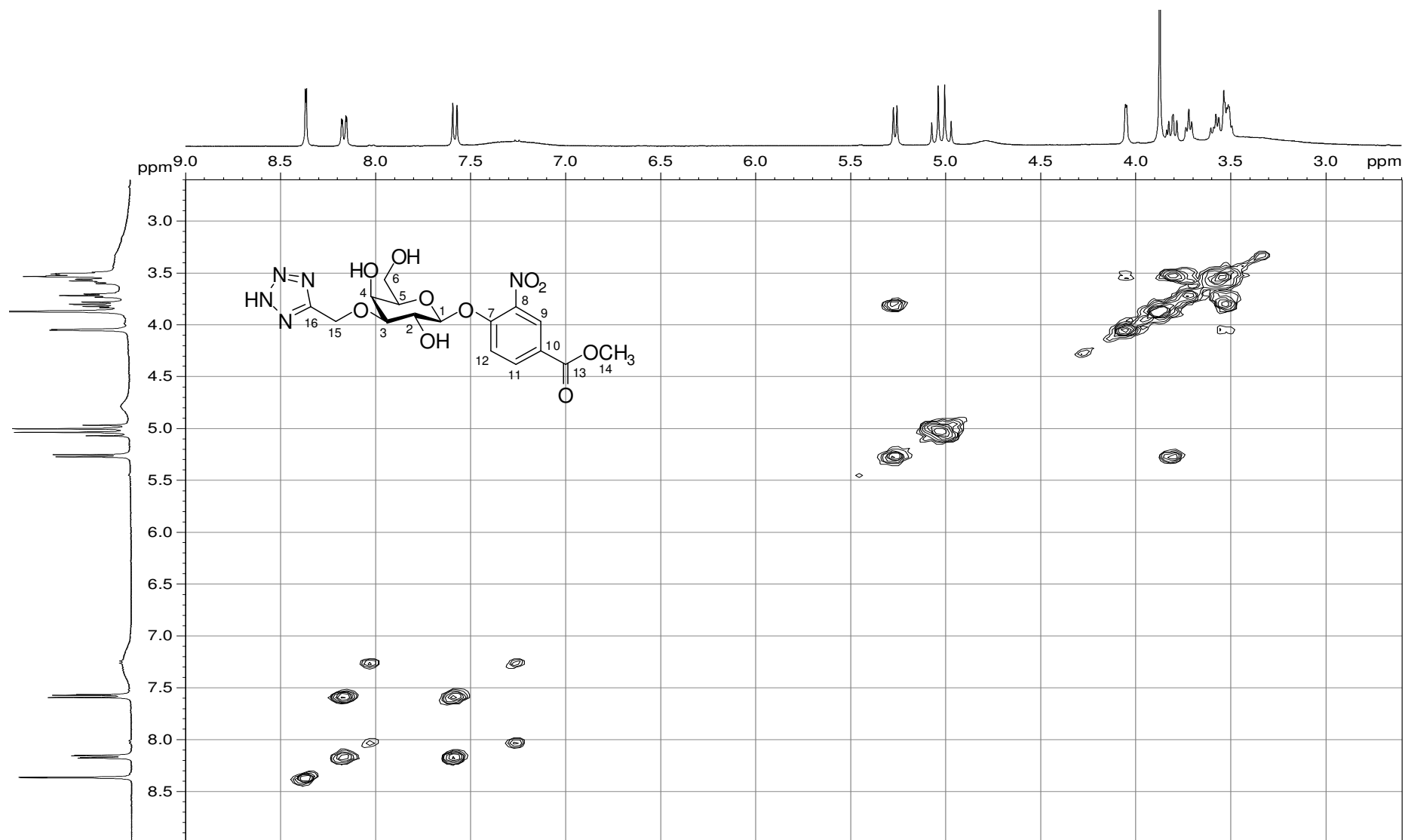
APÊNDICE III – Espectro no infravermelho de 64

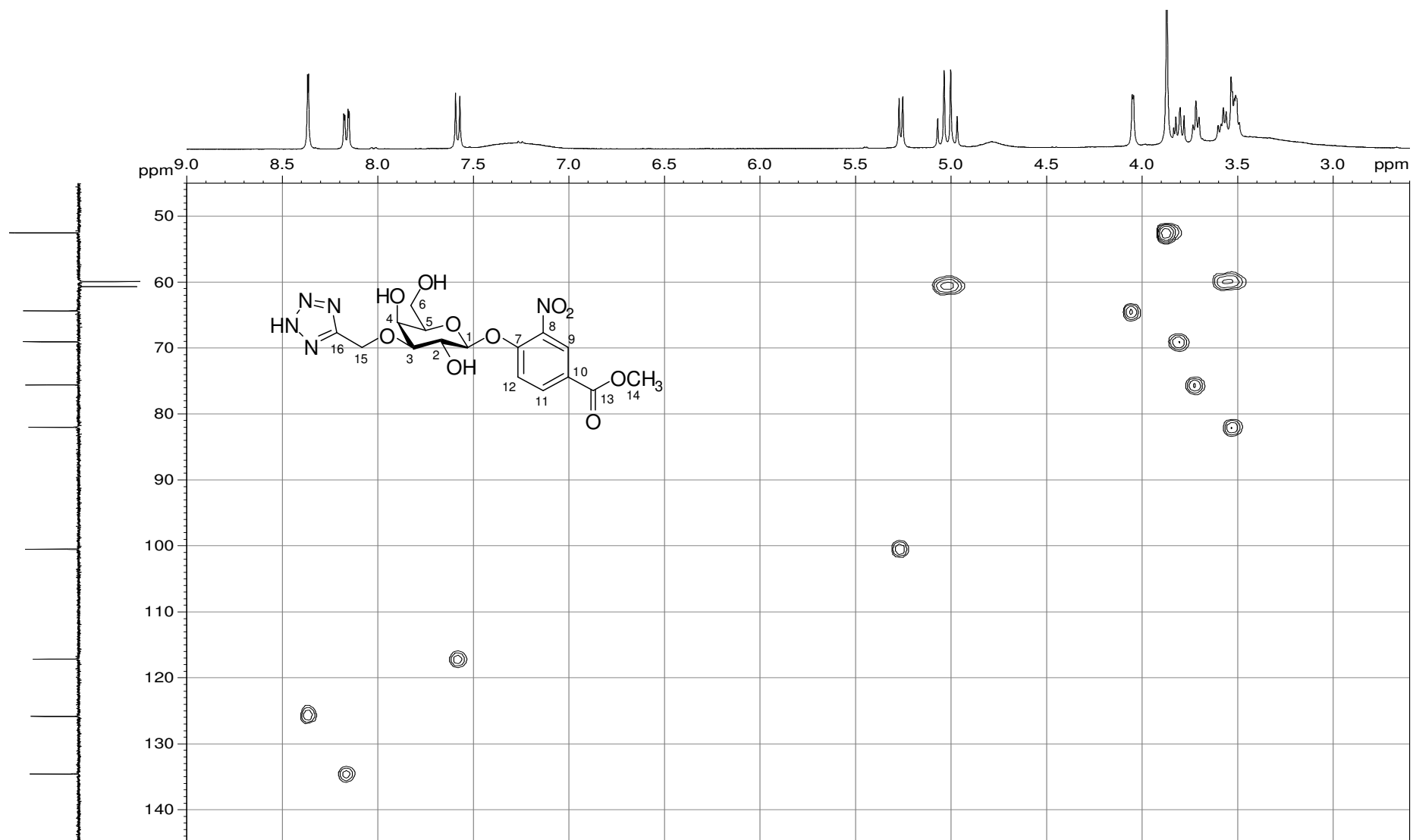


APÊNDICE JJJ – Espectro de RMN de ^1H de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



APÊNDICE KKK – Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 64 (DMSO- d_6 ; 100 MHz)

APÊNDICE LLL – Mapa de contornos COSY de 64 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)

APÊNDICE MMM – Mapa de contornos HMQC de 64 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

APÊNDICE NNN – Mapa de contornos HMBC de 64 (DMSO-*d*₆; 400 MHz)