UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas

Andreza da Silva Figueredo

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ANDREZA DA SILVA FIGUEREDO

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas

Ribeirão Preto

2018

ANDREZA DA SILVA FIGUEREDO

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profª. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 02/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

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

Figueredo, Andreza da Silva

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas. Ribeirão Preto, 2018.

171 p. : il.; 30 cm

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. Efeito multivalente. 2. *Glycoclusters*. 3. Síntese de carboidratos. 4. Glucosidases. 5. *trans*-sialidase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andreza da Silva Figueredo

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Amaro (*in memorian*) e Ana,

pelas oportunidades, amor incondicional e exemplo de integridade

Aos meus irmãos, André e Pedro,

pelo incentivo, interesse e paciência com as minhas ausências

AGRADECIMENTOS

À minha família pela torcida, suporte e carinho e a todos os amigos que contribuíram com palavras de ânimo, sugestões e/ou café, minha eterna gratidão.

À professora Dr.ª Ivone Carvalho, orientadora desse trabalho, pela confiança, paciência, incentivo, respeito e exemplo de perseverança. Muito obrigada por acreditar em mim.

Ao pós-doutorando Peterson de Andrade pela fundamental contribuição nos ensaios enzimáticos, discussões acadêmicas, ideias, bom humor e amizade decorrente desse convívio.

Ao prof. Dr Robert A. Field, pela gentil recepção no Departamento de Química Biológica do *John Innes Centre* (Norwich – UK).

Ao professor Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP) pelas amostras de enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* e aos professores Dr. Marcelo D. Baruffi (FCFRP) e Dr.ª Thalita Bachelli Riul (UFMS) pelos ensaios antiparasitários.

Aos queridos companheiros do grupo de pesquisa em Química Farmacêutica da FCFRP: Ana Hartmann, Ana Luísa, Marcelo Fiori, Maristela, Michelle Ogava, Paulo Sérgio, Susimaire e Talita pelas contribuições, bons momentos e amizade.

À querida Maristela, pelo incentivo diário, pela amizade incondicional, bancada compartilhada e por tornar mais suaves os momentos de incerteza.

À minha amiga Carine Malaquini, pelo apoio nos dias difíceis, pelos felizes 4 anos em que dividimos apartamento e vidas, e pela torcida sempre sincera.

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

Às agências de fomento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo: 2013/27038-8) pelo suporte financeiro.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

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

As funções abrangentes e complexas de carboidratos nos sistemas biológicos oferecem muitas possibilidades para explorar essas estruturas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Como consequência de sua estrutura e função, algumas glicosidases e glicosiltransferases envolvidas em patologias significativas como diabetes e doença de Chagas são alvos interessantes na busca por inibidores enzimáticos baseados em carboidratos. Assim, o conhecimento de características estruturais e mecanismo de ação de *α*- e *β*-glucosidases e *trans*-sialidases e as sólidas evidências de que glicosidases são sensíveis a efeito de multivalência sustentaram o planejamento de *glycoclusters* potencialmente inibidores dessas enzimas contendo três, quatro ou seis unidades correlatas aos seus substratos naturais (glicose e galactose/ácido siálico). Adicionalmente foram propostos *glycoclusters* baseados na estrutura do glicoaminoácido α-GalNAc-*O*-Thr. Empregando reações de cicloadição CuAAC, treze dos dezesseis *glycoclusters* tetra- e hexavalentes inicialmente propostos foram obtidos em bons rendimentos, sendo 8 derivados de glicose, 4 de galactose e o derivado tetravalente de ácido siálico **7**. Dez desses compostos são inéditos na literatura. Com a finalidade de gerar diversidade estrutural o derivado trivalente **29** foi preparado e permitiu o acoplamento de um imino-açúcar D-gluco ou L-gulo DNJ a estruturas trivalentes de glicose. A mesma estratégia levou à obtenção do *glycocluster* **85**, contendo unidades de galactose e um resíduo de ácido siálico. Ensaios de cinética em *α*-glucosidases de arroz e *Saccharomyces cerevisiae* e *β*-glucosidase de amêndoas com os *glycoclusters* derivados de glicose **1**-**4**, **9**-**12** e **63**-**66** mostraram atividade interessante apenas para os compostos mistos, evidenciando a importância do imino-açúcar para a interação com essas enzimas. No que diz respeito aos derivados multivalentes de galactose e/ou ácido siálico **5**-**7**, **13**, **14** e **85,** inibição expressiva da enzima TcTS foi alcançada pelo derivado **7** (IC_{50} 450 µM). Ensaios de atividade tripanocida, bloqueio de invasão e citotoxicidade sobre fibroblastos de mamífero não-infectados cultivados *in vitro* evidenciaram atividade de todos esses compostos contra a forma amastigota e bloqueio de invasão celular por *T. cruzi* (diminuindo a infecção em concentrações de até 25µM).

Palavras-chave: 1. Efeito multivalente 2. *Glycoclusters* 3. Síntese de carboidratos 4. Glucosidases 5. *trans*-sialidase

ABSTRACT

FIGUEREDO, A. S. Synthesis and biological evaluation of glycoclusters with potential applications in diabetes and Chagas disease. 171f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The comprehensive and elaborate functions of carbohydrates in biological systems offer countless possibilities to apply these structures in the development of therapeutic strategies. Because of their structure and function, some glycosidases and glycosyltransferases involved in pathological conditions such as diabetes and Chagas disease are interesting targets in the search for carbohydrate-based enzyme inhibitors. Thus, the knowledge of structural features and the mechanism of action of α- and β-glucosidases and *trans*-sialidases, combined with strong evidences that glycosidases are sensitive to multivalent effect, have supported the design of substrate-based glycoclusters with potential glycosidases inhibitory properties. In addition, glycoclusters based on the structure of the α-GalNAc-*O*-Thr glycoamino acid have been planned. Using CuAAC cycloaddition reactions, thirteen of the sixteen tetra- and hexavalent glycoclusters were obtained in good yields, being 8 glucose derivatives, 4 galactose, and the tetravalent sialic acid derivative **7**. Ten of these compounds are unpublished. In order to generate structural diversity, the trivalent block **29** was prepared and allowed the coupling of trivalent glucose clusters to iminosugars D-gluco or L-gulo DNJ isomers. The same strategy afforded glycocluster **85**, containing galactose units and a sialic acid residue. Kinetic assays in α and β-glucosidases with the glucose-derived glycoclusters 1-4, 9-12 and 63-66 showed interesting activity only for the heteroclusters compounds, evidencing the relevance of iminosugars for the interaction with these enzymes. Regarding galactose and/or sialic acid cluster 5-7, 13, 14 and 85, significant inhibition of the TcTS enzyme was achieved by derivative **7** (IC_{50} 450 μM). In vitro assays for trypanocidal activity and cytotoxicity showed good results for of all these compounds. They appear to block host cell invasion by *T. cruzi* (reducing infection index in concentrations up to 25μM).

Keywords: 1. Multivalent effect 2. Glycoclusters 3. Carbohydrate synthesis 4. Glucosidases 5. *trans*-sialidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos; Em azul os açúcares explorados no presente trabalho (WERZ et al., 2007). 2
Figura 2. Estruturas químicas de glicose e seus epímeros e reatividade de seus grupos hidroxila. 2
Figura 3. Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) de D-galactose. 3
Figura 4. Representação do efeito multivalente (MVE) 5
Figura 5. Modelos de ligação para explicar o efeito multivalente. Adaptado de Matassini, 2016..... 6
Figura 6. Representação geral de *glycoclusters* e glicodendrímeros. Os blocos de construção pentaeritritol e dipentaeritritol são comumente empregados na preparação de glycoclusters enquanto os as estruturas hiper-ramificadas Boltorn™ H20 e Boltorn™ H30 são empregadas na síntese de dendrímeros. 7
Figura 7. *Glycocluster* TriMan-OH e o monômero com respectivos valores de IC_{50} para a Concanavalina A. 8
Figura 8. Ciclopeptídeo ligado a 36 unidades de 1-desoxinojirimicina (DNJ) com MVE=4747. 9
Figura 9. Em (**A**) *Glycocluster* com potencial antibacteriano; (**B**) Dendron 12, contendo quatro unidades trissacarídicas com alta afinidade de ligação à receptores DC-SIGN; e (**C**) Glicodendrímero de antígeno Tn preparado a partir do dendrímero PAMAM (suporte baseado em poliamidoamina). .. 10
Figura 10. *Glycocluster* de ácido siálico e inibidor Neu5Ac2en com respectivos valores de IC_{50} 11
Figura 11. Monômero de derivado imino-açúcar e *glycocluster* trivalente com respectivos valores de IC_{50} para as enzimas α-manosidase e β-glucosidase. 11
Figura 12. Similaridade estrutural entre ligação amida e anel 1,2,3-triazol..... 14
Figura 13. Fármacos inibidores de *α*-glucosidase 1-desoxinojirimicina 17
Figura 14. Estrutura química dos fármacos nifurtimox e benznidazol..... 19
Figura 15. Representação de mucina de *T. cruzi*, com unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$. 20
Figura 16. Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico (substrato doador) 22
Figura 17. Inibidores miméticos de ácido siálico, não relacionados a carboidratos e seus respectivos Ki e IC_{50} 22
Figura 18. Derivados miméticos de substratos aceptores 23
Figura 19. Estruturas dos derivados miméticos de substratos duplos de TcTS descritos por Neres et al., 2009. 24
Figura 20. Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos e porcentagem de inibição de TcTS a 1 mM. 24
Figura 21. Sulfo-chalconas e sulfo-quinolinona inibidores de TcTS..... 25
Figura 22. *Hetero-glycoclusters* **63-66**, apresentando 3 unidades de glicose conectadas via C-1 ou C-6. R_1: L-gulo- e R_2: D-glico-imino-açúcares (DNJ). 74

Figura 23. Comparação entre os espectros de RMN de ^{1}H dos compostos tetra- **72** (superior) e trivalente **67**..... 76
Figura 24. Hidrólise do substrato *β*-p-PNG pela ação da enzima *β*-glucosidase em diferentes concentrações. Controle negativo (NE) = ausência de enzima. 84
Figura 25. Resultado do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM..... 87
Figura 26. Atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas de T. cruzi comparada a atividade do fármaco de referência benznidazol (BZD). 89
Figura 27. Porcentagem de morte celular causada pelos compostos em fibroblastos LLC-MK2 de rim de macaco rhesus e em diferentes concentrações. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 µM foi utilizado como controle de morte. CV=controle de vida (poço não tratado com inibidores). 90
Figura 28. Atividade tripanocida sobre formas amastigotas de T. cruzi comparada a atividade do fármaco de referência benznidazol (BZD). Meio=controle de vida (poço sem inibidores)..... 92
Figura 29. Bloqueio de invasão de fibroblastos por formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Meio=controle de vida (poço não tratado com inibidores prospectivos). 94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação genérica de glicosilação. R: grupo de proteção; R_1: grupo abandonador; R_2: substituinte de natureza diversa..... 4
Esquema 2. Efeito anomérico explicado pelos modelos eletrostático (**A**) e hiperconjugação (**B**)..... 4
Esquema 3. Reação de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada Cu (I) entre grupos azido (N_3) e alcino ligados ao R_1 e R_2, respectivamente, formando o grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. 12
Esquema 4. Mecanismo proposto para a reação de CuAAC. Adaptado de Bock (2006). 13
Esquema 5. Mecanismos de quebra de oligossacarídeos 16
Esquema 6. Formação de íon oxocarbênio (**B**) durante clivagem de ligação glicosídica por ação enzimática 17
Esquema 7. Reação de transferência (**A**) e hidrólise de ácido siálico (**B**) pela trans-sialidase 21
Esquema 8. Preparação dos *glycoclusters* **1** a **8** a partir do alcino **17** e dos glycoclusters **9** a **16** a partir do alcino **18.** i) $CuSO_4$, ascorbato de sódio; ii) MeONa/MeOH; R_1 a R_8, ver objetivos. 27
Esquema 9.Síntese da estrutura dendrimérica **17** baseada em pentaeritritol..... 59
Esquema 10. Tentativa de síntese do bloco **18** usando as condições reacionais de **17** 60
Esquema 11. Reação em condições de catalise de transferência de fase para obtenção do alcino **18** . 60
Esquema 12. Síntese de derivado de TRIS-propargila **29** em duas etapas..... 61
Esquema 13. Síntese do azido **20** funcionalizado em C-2. 62
Esquema 14. Mecanismo proposto para a reação de diazo-transferência catalisada por metal; R = Precursor com grupo amino (ANSELME & FISCHER, 1969). 63
Esquema 15. Síntese do derivado azido **21** funcionalizado em C-3 63
Esquema 16. Síntese do derivado azido **22** funcionalizado em C-6 64
Esquema 17. Síntese do bloco de galactose **23** funcionalizado em C-1..... 65
Esquema 18. Síntese do bloco azido **24** funcionalizado em C-6 (Método **A**)..... 66
Esquema 19. Síntese do bloco azido **24** funcionalizado em C-6 (Método **B**). 66
Esquema 20. Síntese do derivado 2-azido-ácido siálico **25**. 67
Esquema 21. Rota sintética proposta para a obtenção do derivado α-GalNAc-O-Thr **26**..... 68
Esquema 22. Síntese do *glycocluster* **55** a partir do derivado tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** e 1-azido-glicose **19**. 70
Esquema 23. Novos *glycoclusters* obtidos a partir de reações CuAAC entre o bloco **17** e glicose funcionalizada em diferentes posições (C-1, C-2, C-3 e C-6)..... 72
Esquema 24. *Glycoclusters* hexavalentes **59**-**62** peracetilados e **9**-**12** desprotegidos contendo unidades de glicose em diferentes arranjos 73
Esquema 25. Síntese dos *hetero-glycoclusters* **63** e **64**..... 75
Esquema 26. Síntese dos *hetero-glycoclusters* **65** e **66** a partir do bloco trivalente **76** 77
Esquema 27. Síntese do reagente de diazo-transferência sulfato de 1-H-imidazol-1-sulfonilazido 78

Esquema 28. Síntese dos *glycoclusters* **5** e **6** contendo 4 unidades de galactose ligadas pelas posições C-1 e C-6. 79
Esquema 29. Síntese dos *glycoclusters* **13** e **14** contendo unidades de galactose ligadas pelas posições C-1 e C-6. 79
Esquema 30. Condições testadas na preparação do *glycocluster* de ácido siálico tetravalente **7**..... 80
Esquema 31. Síntese do *hetero-glycocluster* de ácido siálico **85**..... 81
Esquema 32. Síntese de 2-propinil-ácido siálico utilizando AgOTf como catalisador..... 82
Esquema 33. Síntese de 2-propinil-ácido siálico utilizando $BF_3.Et_2O$ como catalisador..... 82
Esquema 34. Reação de clivagem dos substratos α- e β-pNPG pela ação de glucosidases 83
Esquema 35. Reação de TcTS na presença do doador MuNANA permite a detecção de metil-umbeliferona em fluorimetro. Comprimentos de onda 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão). 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito multivalente observado na inibição de enzimas (Adaptado: Kanfar et al, 2015)..... 12
Tabela 2. Resultados obtidos no estudo de condições reacionais para obtenção do *glycocluster* **55**... 70
Tabela 3. Valores de inibição observados para as enzimas α e β-glucosidases..... 85
Tabela 4. Valores de IC_{50} dos *glycoclusters* derivados de galactose e ácido siálico para ensaio tripanocida com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e CC_{50} relacionado a citotoxicidade em fibroblastos LLC-MK2..... 90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac_2O: anidrido acético

AcOEt: acetato de etila

AgOTf: triflato de prata

Boc: *terc*-butiloxicarbonila

BZD: Benznidazol

Bu_2SnO: óxido de dibutilestanho

CC_{50}: concentração que mata 50% das células

CCC: cromatografia em coluna clássica

CCD: cromatografia em coluna delgada

CCP: cromatografia em camada preparativa

CFAE: cromatografia *flash* de alta eficiência

$C_{qt.}$: carbono quaternário

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

DCM: diclorometano

DMF: *N*,*N*-Dimetilformamida

DNJ: 1-desoxinojirimicina

2,2 DMP: 2,2 dimetoxipropano

ESI-TOF: Ionização por *Electrospray*-Tempo de Voo

GAA: α-glicosidase ácida

HRMS: espectrometria de massas de alta resolução

IC_{50}: Concentração Inibitória de 50%

IV: infravermelho

KI: constante de inibição

Lys: lisina

MALDI-TOF: Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo

MO: micro-ondas

MVE: "*multivalent effect*"

NaN_3: azida de sódio

Pro: prolina

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

δ: deslocamento químico

ap.: aparente

d: dupleto

dd: duplo dupleto

ddd: duplo duplo dupleto

dt: duplo tripleto

J: constante de acoplamento

m: multipleto

s: simpleto

t: tripleto

TBAB: Brometo de tetra-*n*-butilamônio

TBAHS: Hidrogenossulfato de tetrabutilamônio 97%

TBDMS: *t*-butildimetilsilila

TBDPS: *t*-butildifenilsilila

TFA: ácido trifluoroacético

Tf_2O: anidrido tríflico

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

Thr: treonina

TMS: trimetilsilila

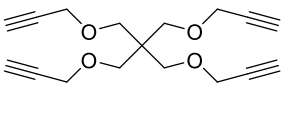
TsCl: Cloreto de tosila

p-TSOH: ácido *p*-toluenossulfônico

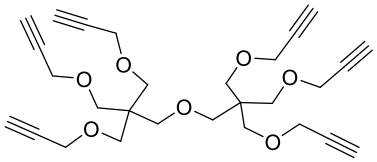
p-NPG: D-glicopiranosídeo de 4-nitrofenila

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS

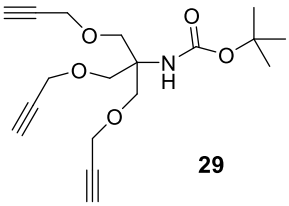
Blocos de construção



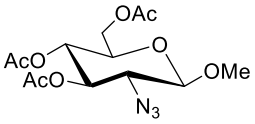
17



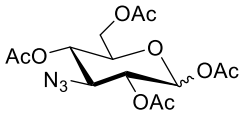
18



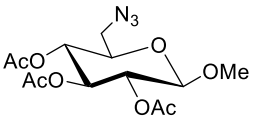
29



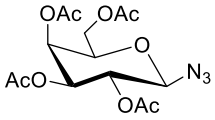
20



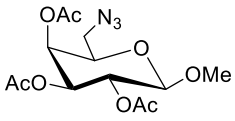
21



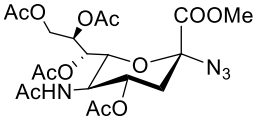
22



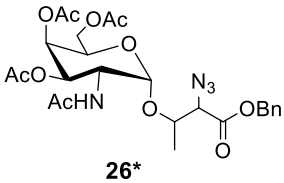
23



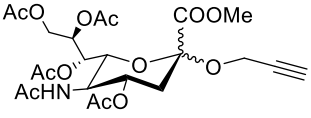
24



25



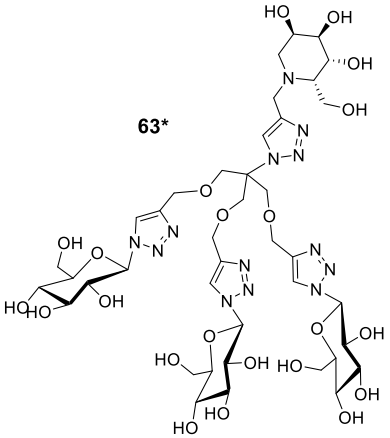
26*



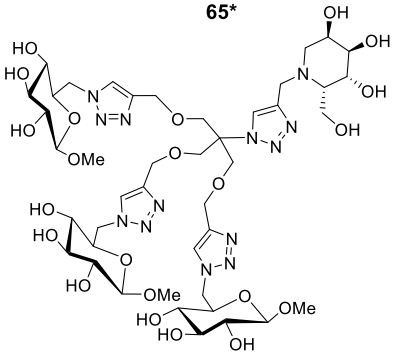
86

*composto inédito

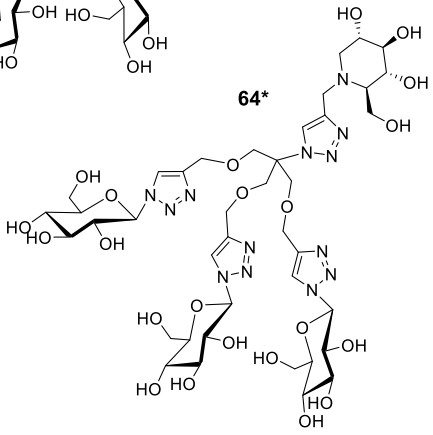
Glycoclusters derivados de glicose



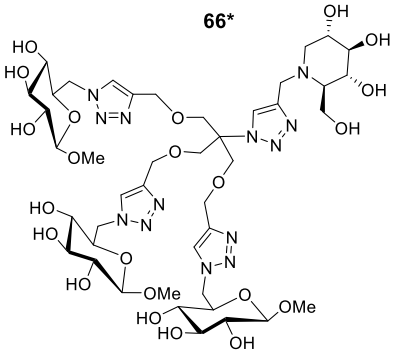
63*



65*



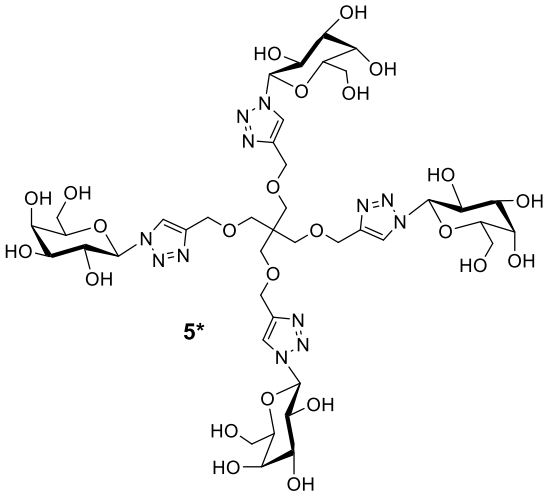
64*



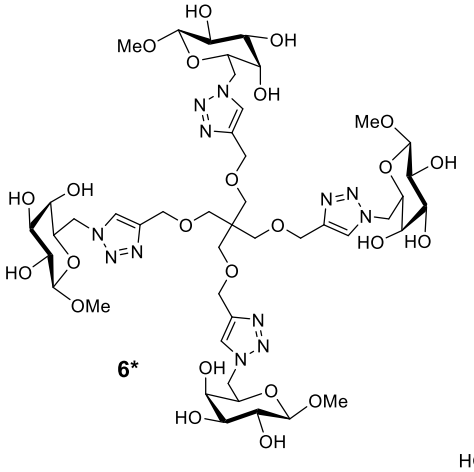
66*

*compostos inéditos

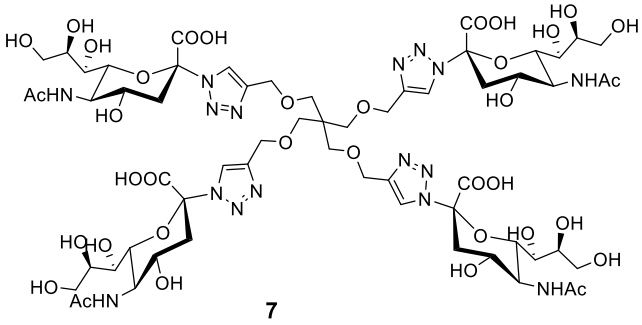
Glycoclusters derivados de galactose e/ou ácido siálico



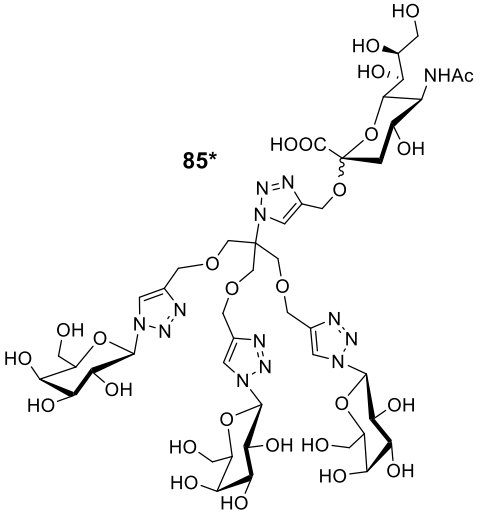
5*



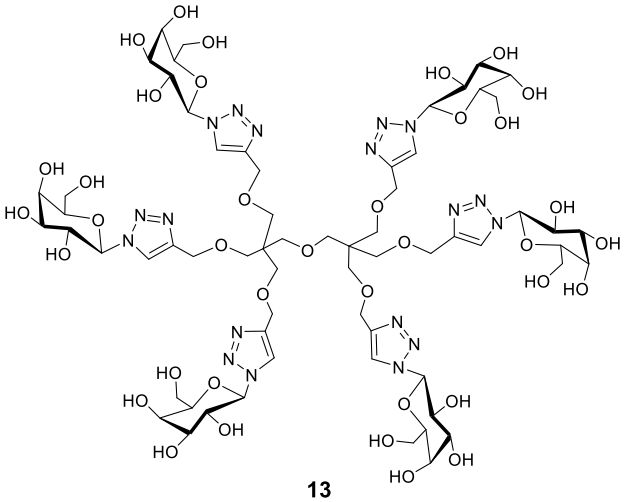
6*



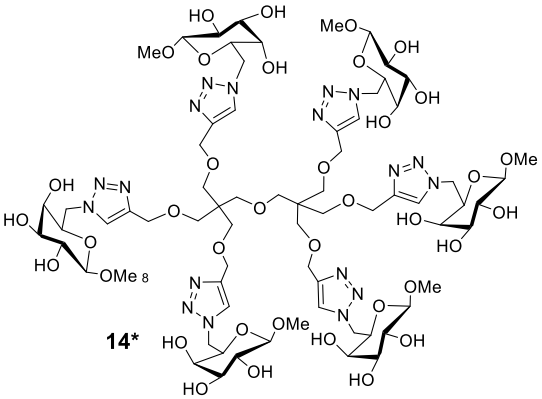
7



85*



13



14*

*compostos inéditos

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE ESQUEMAS v
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS viii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Carboidratos, glicoconjugados e aplicações terapêuticas 1
1.2 Aspectos gerais da química de carboidratos 2
1.3 Multivalência e efeito cluster 5
1.3.1 *Glycoclusters* e glicodendrímeros 7
1.4 Estratégia de '*Click Chemistry*' 12
1.5 Alvos terapêuticos 15
1.5.1 Diabetes tipo II e glucosidases 15
1.5.2 Doença de Chagas e *trans*-sialidase 18
2. OBJETIVOS 26
3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 27
4. MATERIAIS E MÉTODOS 28
4.1 Materiais 28
4.2 Métodos 29
4.2.1 Síntese de blocos de construção *O*-propargilados 29
4.2.2 Síntese de azido carboidratos 31
4.2.3 Síntese de *glycoclusters* 35
4.2.4 Ensaios biológicos 56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
5.1 Síntese de blocos de construção funcionalizados com grupos acetilenos 59
5.2 Preparação de azido-carboidratos 61
5.3 Preparação de *glycoclusters* via *Click Chemistry* 70
5.4 Ensaios biológicos 82
5.4.1 Inibição das enzimas α- e β-glucosidase 82
5.4.2 Inibição de *trans*-sialidase (TcTS) 86
6. CONCLUSÕES 95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carboidratos, glicoconjugados e aplicações terapêuticas

Os carboidratos constituem a classe de moléculas mais abundante, diversa e complexa da natureza e podem ser encontrados nos sistemas biológicos como monossacarídeos, oligossacarídeos e glicoconjugados. Para além de suas funções energéticas e estruturais, vastamente conhecidas e exploradas, moléculas de açúcares unidas covalentemente a proteínas ou lipídeos sob a forma de glicoconjugados estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos e patológicos de reconhecimento e comunicação celular (DOORES et al., 2006; WERZ et al., 2007).

Esses eventos mediados por carboidratos podem incluir adesão, diferenciação e crescimento celular, transdução de sinais, infecções por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. Tal diversidade de funções, tem levado ao emprego de estruturas sacarídicas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para fins de diagnóstico com aplicação em condições patológicas diversas como câncer, doenças autoimunes, infecções virais, bacterianas e parasitárias (SZNAIDMAN, 1999; DAVIS, 2002; DOORES et al., 2006).

Nesse contexto, é válido mencionar que fármacos derivados de carboidratos, tanto naturais quanto análogos sintéticos, já foram introduzidos com sucesso na terapêutica, casos do antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu, Roche®), do anticonvulsivante topiramato (Topamax, Janssen-Cilag®), dos antidiabéticos acarbose (Glucobay, Bayer®) e miglitol (Glyset, Pfizer®), do antitrombótico heparina (heparinas de baixo peso molecular) e dos antibióticos aminoglicosídeos (SEEBERGER & WERZ, 2007).

A diversidade de funções e estruturas dos carboidratos está correlacionada ao seu caráter polifuncional, capaz de fornecer diferentes posições para acoplamento a outros monossacarídeos, aminoácidos e cadeias lipídicas. Adicionalmente, a complexidade estrutural dos carboidratos é aumentada pela estereoquímica dos centros quirais, os quais são gerados a cada nova ligação glicosídica formada, pelo tipo de ligação glicosídica e configuração anomérica (DOORES et al., 2006; HOLEMANN & SEEBERGER, 2004).

Dessa forma, considerando apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (figura **1**), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são teoricamente viáveis, número esse que cresce significativamente com a extensão da cadeia (WERZ et al., 2007).

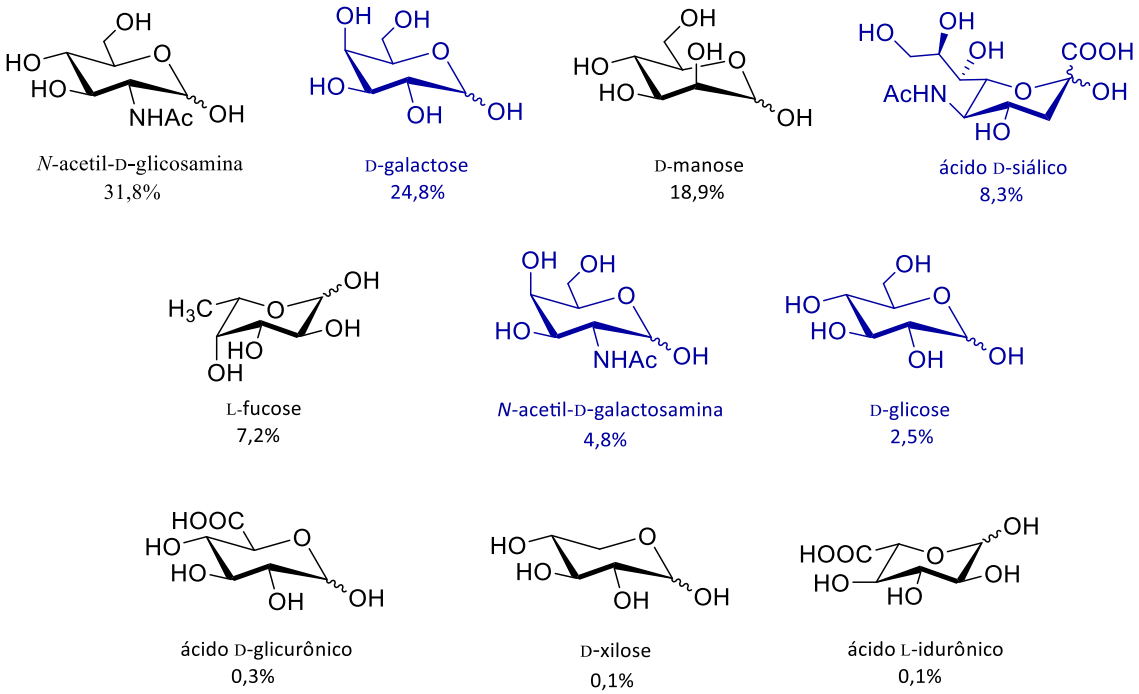


Figura 1. Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos; Em azul os açúcares explorados no presente trabalho (WERZ et al., 2007).

1.2 Aspectos gerais da química de carboidratos

A síntese de derivados sacarídicos apresenta dois pontos essenciais: i) a diferenciação das hidroxilas que possuem reatividade similar, exigindo o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas e ortogonais e ii) a obtenção de produtos com estereosseletividade desejada durante reações de glicosilação envolvendo a posição anomérica (C-1) (SEEBERGER & HAASE, 2000; LINDBERG et al., 2002).

Embora não exista uma regra geral para discriminar a reatividade das hidroxilas nas piranoses, uma vez que isso depende da configuração em que estão no anel (axial ou equatorial) e também das condições reacionais, é sabido que as hidroxilas primária e anomérica são mais reativas que as secundárias. Além disso, hidroxilas em posição equatorial são estericamente mais acessíveis em relação às axiais e por isso tendem a reagir mais rapidamente (figura **2**) (FERRIER & COLLINS, 1996).

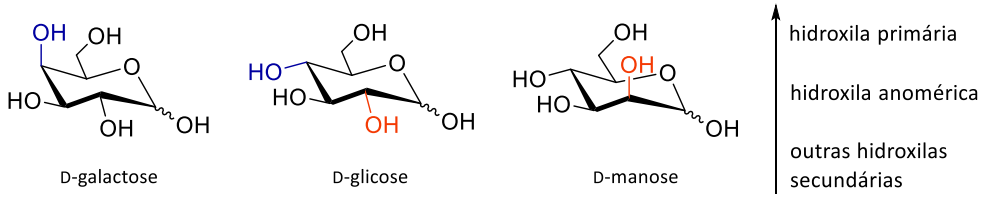


Figura 2. Estruturas químicas de glicose e seus epímeros e reatividade de seus grupos hidroxila.

Nesse contexto, a escolha de um grupo protetor e das condições reacionais para introduzi-lo ou removê-lo é fundamental para que as reações sejam químio-, régio- e estereosseletivas. Via de regra, as classes de grupos protetores mais comuns em química de carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres (benzila, tritila e alila), éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila -TBDPS) e estanilenos (óxido de dibutilestanho – Bu_2SnO) (PÉTURSSON, 1997; PEI et al., 2007).

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

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

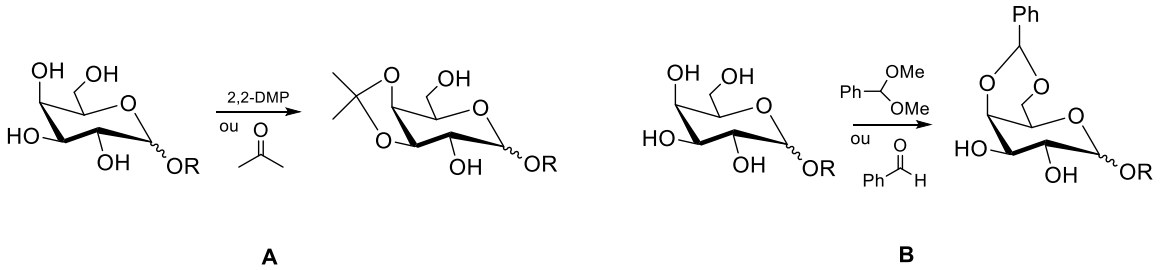
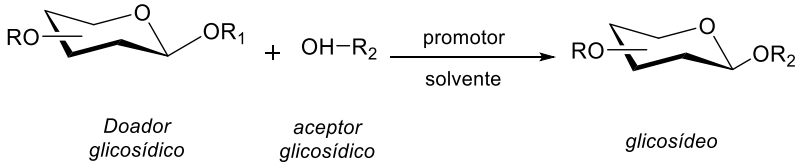


Figura 3. Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) de D-galactose.

As proteções seletivas com isopropilideno ou benzilideno são catalisadas por ácido e podem ser obtidas com o emprego de 2,2 dimetoxipropano (2,2-DMP) ou acetona (A) e benzaldeído ou 2,2-dimetoxibenzeno (B), respectivamente. A remoção desses grupos pode ser realizada por hidrólise ácida com ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH), ácido acético sob aquecimento ou com ácido trifluoroacético à 0 ºC, por exemplo (PÉTURSSON, 1997).

No que concerne às reações envolvendo a hidroxila anomérica é especialmente importante destacar os conceitos de glicosilação, doador e aceptor glicosídico, e efeito anomérico. Reações de glicosilação clássicas são aquelas em que há formação de uma ligação *O*-glicosídica entre o carbono anomérico de um sacarídeo (doador) e uma função hidroxílica qualquer (aceptor), seja um álcool simples, outra molécula de açúcar ou um grupo -OH de aminoácidos desprotegidos (esquema **1**). Vale destacar ainda que em biologia o termo glicosilação tem significado mais específico e se refere ao processo enzimático que adiciona

glicanas a lipídeos, proteínas ou outras moléculas orgânicas como forma de modificação pós-traducional.

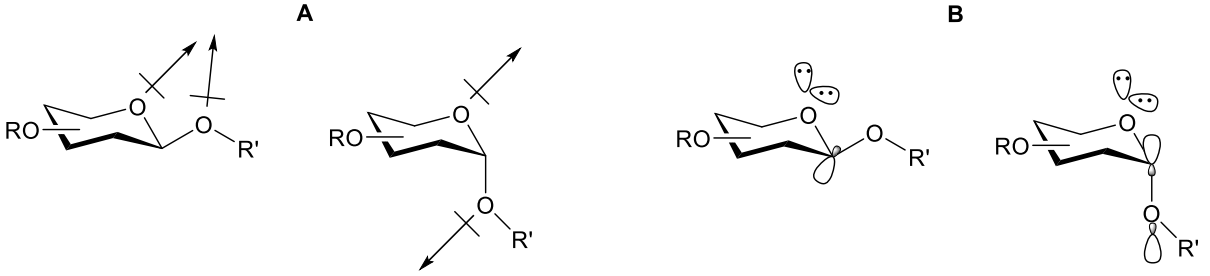


Esquema 1. Reação genérica de glicosilação. R: grupo de proteção; R_1: grupo abandonador; R_2: substituinte de natureza diversa

Os grupos abandonadores tricloroacetimidatos, cloretos, brometos, tioglicosídeos e pentenilglicosídeos ativados por sais de prata, ácidos de Lewis ou eletrófilos "*soft"* são os mais utilizados na posição anomérica de doadores em reações de glicosilação. Entre os promotores destacam-se sais de prata, particularmente Ag_2CO_3 e $AgClO_4$, triflatos, sais de mercúrio e outros metais (SEEBERGER &WERZ, 2007; BONGAT & DEMCHENKO, 2007).

A obtenção de produtos estereosseletivos é o grande desafio dessas reações, sendo influenciada por promotores, solventes e pelos substituintes ligados ao anel do doador glicosídico. Nesse contexto, o efeito anomérico pode ser entendido como um fator estereoeletrônico que descreve a tendência do substituinte em *C*-1, vizinho ao heteroátomo do anel pirano, adotar preferencialmente orientação axial em detrimento da equatorial, ainda que a última seja favorecida por menor impedimento estérico (JUARIST & CUEVAS, 1992).

Esse comportamento inesperado tem duas explicações bem aceitas: A) quando o substituinte está na posição equatorial ocorre alinhamento de dipolos envolvendo os átomos de oxigênio endocíclico e anomérico, o que causa repulsão entre os mesmos. Em contrapartida, um sistema energeticamente mais estável ocorre quando o substituinte está em posição axial, o que resulta em dipolos opostos e menor repulsão (esquema **2**) (MYDOCK & DEMCHENKO, 2010; DA SILVA, 2001).



Esquema 2. Efeito anomérico explicado pelos modelos eletrostático (**A**) e hiperconjugação (**B**).

A explicação alternativa (**B**) é a existência de efeito estereoeletrônico adicional promovida pelo fenômeno de hiperconjugação entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio endocíclico e o orbital sigma antiligante σ* da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons está em posição antiperiplanar ao orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO), o que ocorre para a orientação axial da ligação anomérica (JUARIST & CUEVAS, 1992).

A estereosseletividade da reação de glicosilação é também influenciada pelo substituinte em *C*-2 do doador glicosídico. Grupos não participantes em *C*-2, como éter benzílico ou azida, originam o correspondente α-glicosídeo, favorecido pelo efeito anomérico. Por outro lado, funções *N*- ou *O*-aciladas, como acetila ou benzoíla, nesta posição induzem à participação de grupo vizinho com formação de intermediário oxazolina (a partir do grupo NHAc) durante a ativação da posição anomérica e promovem glicosilação 1,2-*trans* seletiva, geralmente resultando em *β*-glicosídeos (BONGAT & DEMCHENKO, 2007).

1.3 Multivalência e efeito cluster

A atividade de glicoproteínas, peptideoglicanas, glicolipídeos e lipopolissacarídeos depende de interações complexas entre unidades de açúcar desses glicoconjugados e lectinas, proteínas que reconhecem especificamente carboidratos. Normalmente as interações monoméricas carboidrato-lectina são de baixa afinidade e seletividade. Todavia, interações poliméricas em processos biológicos podem apresentar aumento sinérgico de afinidade e especificidade quando ocorrem por multivalência, a qual está associada ao reconhecimento de múltiplas cópias de carboidratos por múltiplas cópias de lectinas presentes na superfície celular (BREWER et al., 2002; ELGAVISH & SHAANAN, 1997; CLONINGER, 2002).

Assim, efeito multivalente (MVE) ou efeito *cluster* pode ser definido como o aumento da resposta biológica observada para compostos que possuem mais de uma unidade bioativa ligada a uma matriz comum em comparação com a soma das contribuições dadas pelas moléculas bioativas isoladas (figura **4**).

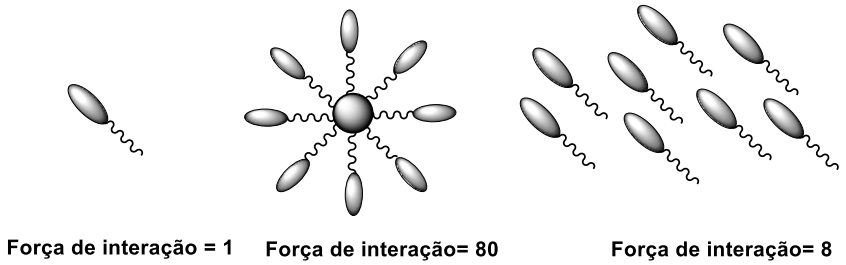


Figura 4. Representação do efeito multivalente (MVE)

Idealmente, para serem consideradas interessantes do ponto de vista terapêutico, estruturas contendo múltiplas cópias de unidades glicosídicas devem apresentar valores de MVE positivos (rp/n >1). Este valor é dado pela razão entre a potência relativa *rp* (Ki ou IC_{50} do composto multivalente/monovalente) e a valência *n* (número de unidades bioativas no sistema) (KANFAR et al., 2015; MATASSINI et al., 2016).

O modo de interação de estruturas multivalentes é dependente da natureza do alvo macromolecular e determinado por características deste, como o número de sítios de ligação, tendência à multimerização e impedimento estérico. Dessa forma, a potencialização de efeito observada em comparação a um monômero bioativo pode ser explicada por quatro fenômenos distintos: (A) Probabilidade de religação ampliada, que é gerado por uma concentração local melhorada em torno do sítio de ligação, (B) Quelação, quando vários locais de ligação idênticos estão presentes no alvo, (C) Efeito de ligação em subsítios, quando ocorrem ligações inespecíficas na superfície da macromolécula bloqueando o acesso de substratos ao sítio de ligação/catalítico e (D) Efeito de agrupamento, quando ocorre associação a múltiplas unidades macromoleculares (figura **5**) (KANFAR et al., 2015; MIRABELLA et al., 2017).

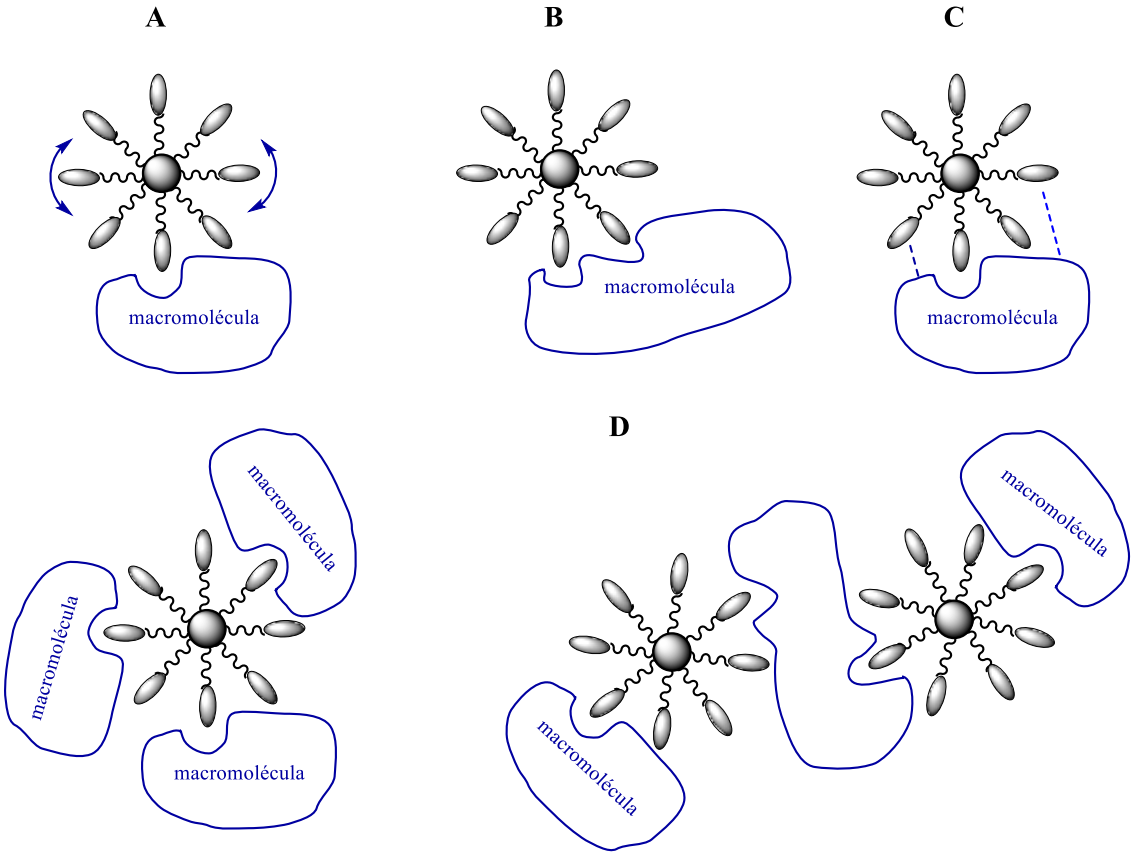


Figura 5. Modelos de ligação para explicar o efeito multivalente. Adaptado de Matassini, 2016.

1.3.1 *Glycoclusters* e glicodendrímeros

Glycoclusters e glicodendrímeros foram primeiramente descritos por Roy e colaboradores (1993), como uma nova família de biomacromoléculas multivalentes sintéticas derivadas de carboidratos e capazes de mimetizar glicoconjugados no sistema biológico. A arquitetura molecular melhor definida e a viabilidade superior do ponto de vista terapêutico são algumas das vantagens desta nova classe em relação aos glicopolímeros (ROY et al., 1993; ROY, 1996).

Embora Roy (2003) tenha sugerido que os termos *glycoclusters* e glicodendrímeros referem-se a compostos que diferem entre si quanto à multivalência, ou seja, quanto à quantidade de carboidratos presentes na estrutura, existem diversas publicações em que os termos são usados indiscriminadamente como sinônimos.

Todavia, para fins de classificação nesse trabalho, *glycoclusters* são considerados sistemas de baixa valência contendo até oito açúcares unidos diretamente a uma estrutura ramificada, tais como os blocos de construção pentaeritritol e dipentaeritritol, enquanto glicodendrímeros apresentam maior número de carboidratos (figura **6**). A construção de glicodendrímeros envolve a união de açúcares a estruturas hiper-ramificadas denominadas dendrímeros, tais como Boltorn™ H20 e Boltorn™ H30 (ROY, 2003).

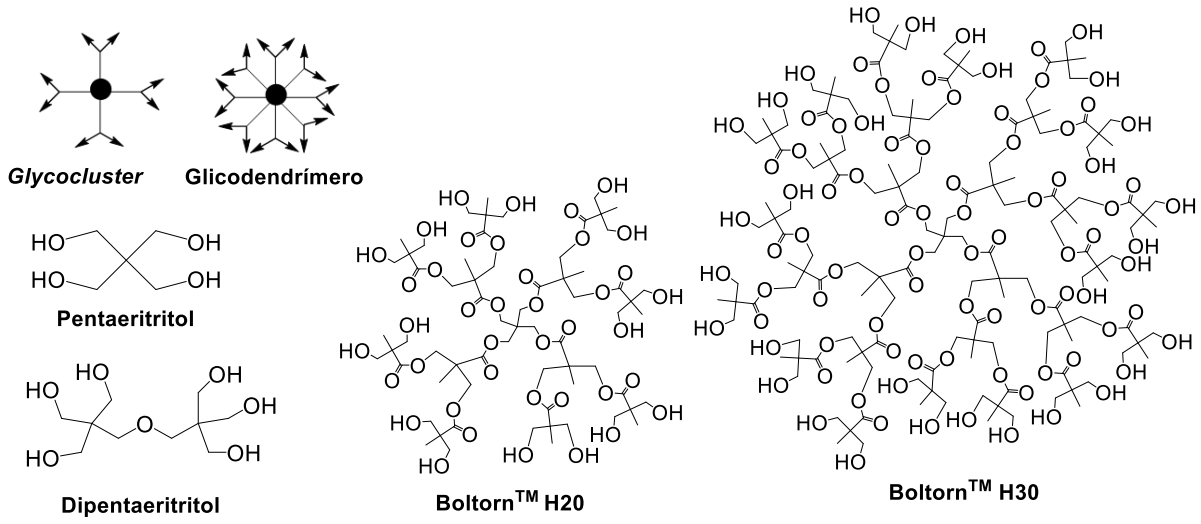


Figura 6. Representação geral de *glycoclusters* e glicodendrímeros. Os blocos de construção pentaeritritol e dipentaeritritol são comumente empregados na preparação de *glycoclusters* enquanto os as estruturas hiper-ramificadas Boltorn™ H20 e Boltorn™ H30 são empregadas na síntese de dendrímeros.

Os carboidratos presentes nestes sistemas multivalentes conferem alta especificidade e força de interação com lectinas, apresentando potencial capacidade de interferência em vários

processos que envolvam reconhecimento e adesão celular, sendo hoje uma abordagem muito útil e comum para desenvolver ferramentas de compreensão e intervenção nos processos biológicos relacionados a glicoconjugados (BAEK & ROY, 2002; ROY, 2003).

Todavia, é importante destacar que o aumento de eficiência decorrente dessas interações múltiplas ocorre de forma limitada e dependente de uma complexidade molecular ideal. Assim, um forte efeito *cluster* requer uma estrutura dendrimérica que possa apresentar o carboidrato com orientação e espaçamento adequados, considerando fatores como multivalência, natureza dos carboidratos, formato, distância entre unidades e flexibilidade do dendrímero (MATASSINI et al., 2016; ROY, 2003).

Gómez-García e colaboradores (2010) demonstraram, por exemplo, uma substancial amplificação da afinidade de ligação devido à multivalência do *glycocluster* TriMan-OH contendo três unidades funcionalizadas de açúcar, cuja afinidade de ligação à lectina Concanavalina A foi 17 vezes maior em relação ao monômero manose (figura **7**).

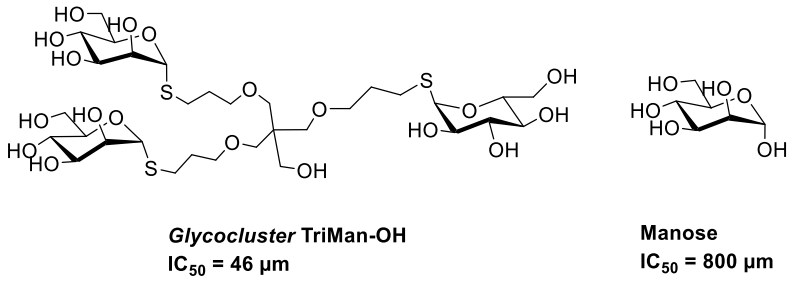


Figura 7. *Glycocluster TriMan-OH* e o monômero com respectivos valores de IC_{50} para a Concanavalina A.

Em muitos casos, aumentando-se a multivalência aumenta-se a eficiência da interação carboidrato-lectina. Entretanto, há relatos em que apenas dímeros, trímeros ou tetrâmeros apresentaram afinidade superior, quando comparados a análogos de maior valência (ROY, 2003; KANFAR et al., 2015).

Um estudo mais recente e completo envolvendo 20 peptídeos cíclicos ligados a unidades de um imino-açúcar (18 a 48 monômeros de 1-desoxinojirimicina-DNJ) reforçou essa ideia de que há limites para observação do efeito *cluster* (LEPAGE et al., 2016). O derivado CP-36 para o qual se observou o mais alto valor de MVE (rp/n= 4747) frente a enzima α-manosidase (JBα-man) apresentava 36 fragmentos bioativos e nenhum ganho de potência foi observado para os compostos maiores (figura **8**).

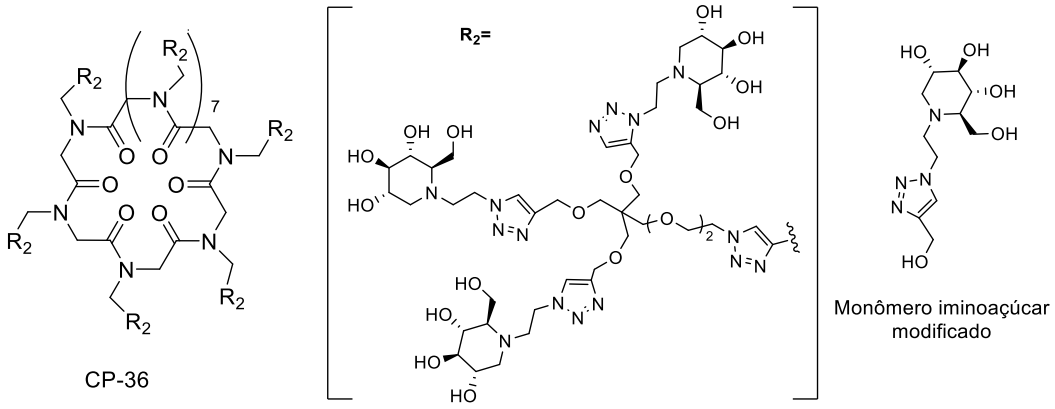


Figura 8. Ciclopeptídeo ligado a 36 unidades de 1-desoxinojirimicina (DNJ) com MVE=4747.

Uma vez que *glycoclusters* e glicodendrímeros podem interagir em sistemas biológicos por mimetizarem glicoconjugados naturais, esta classe de substâncias pode ser empregada em processos como infecções por patógenos e tumores. Como diversos trabalhos direcionam para o emprego destes glicoconjugados como anti-adesinas (substâncias capazes de bloquear a interação entre oligossacarídeos e lectinas) é possível considerar a inibição destas interações como uma estratégia viável para o desenvolvimento de substâncias com importante atividade antiparasitária, antimicrobiana e antitumoral (TOUIABIA et al., 2007; ROY, 2003; BAEK & ROY, 2002).

Entre os exemplos mais animadores da exploração do efeito multivalente para o desenvolvimento de agentes anti-infecciosos destaca-se o trabalho publicado por Touaibia e colaboradores (2007). Nele os autores descrevem a preparação de um *glycocluster* antibacteriano contendo quatro unidades de manose que apresentou afinidade de ligação à lectina *Fimbriae* tipo 1 de *E. coli* 93 vezes superior ao monômero (figura **9-A**). Uma avaliação prévia dessa lectina por cristalografia de raios-x havia demonstrado a existência de um domínio de reconhecimento de carboidrato com capacidade para acomodar apenas um resíduo de manose.

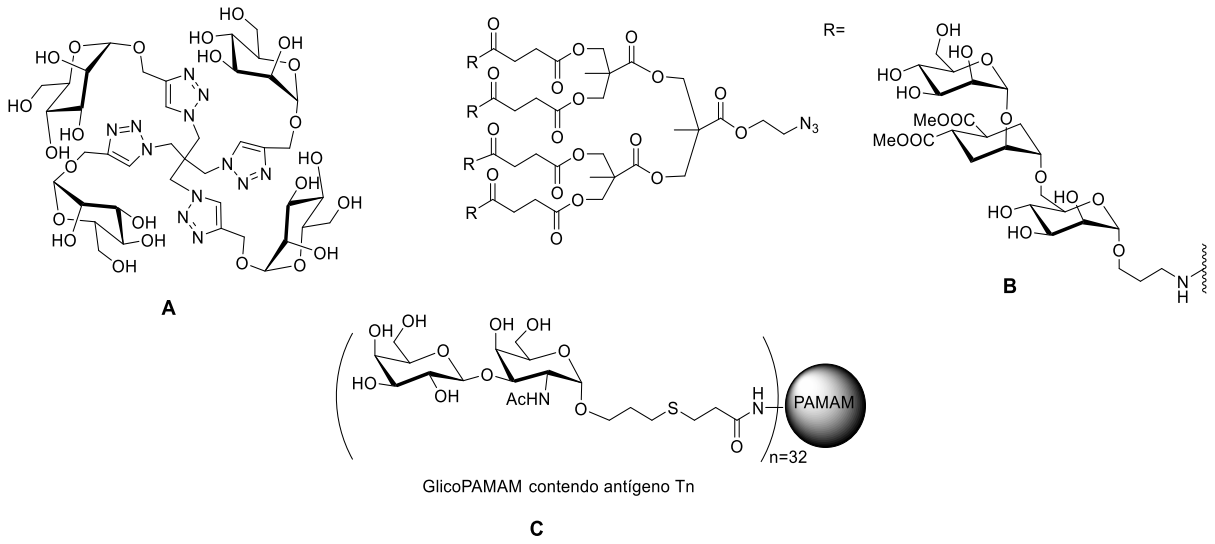


Figura 9. Em (**A**) *Glycocluster* com potencial antibacteriano; (**B**) Dendron 12, contendo quatro unidades trissacarídicas com alta afinidade de ligação à receptores DC-SIGN; e (**C**) Glicodendrímero de antígeno Tn preparado a partir do dendrímero PAMAM (suporte baseado em poliamidoamina).

Em 2010, Satín e colaboradores descreveram a preparação de um glicodendrímero (Dendron 12) capaz de bloquear fortemente lectina C (DC-SIGN), responsável pelo reconhecimento de glicoconjugados na superfície do vírus HIV. Na ocasião, o composto reduziu a infecção de Linfócitos TCD4+ pelo vírus em cerca de 90% a uma concentração de 50 µM, sendo que nas concentrações de 100µM e 250µM, a inibição foi quase completa (figura **9-B**).

Baek e Roy (2002) descreveram a preparação e avaliação biológica de glicodendrímeros contendo 32 unidades de antígeno Tn (*β*-Gal(1-3)-*α*-GalNAc), conhecidos como epítopos relacionados à processos tumorais e como importante antígeno para a diagnóstico e imunoterapia em câncer, particularmente em câncer de mama (figura **9-C**). Estes glicodendrímeros propostos tiveram afinidade de ligação ao anticorpo 3800 vezes maior que o correspondente monômero de antígeno Tn.

Embora a maior parte das pesquisas na área de glicoconjugados e dos exemplos até aqui citados explorem interações carboidrato-lectinas, promissoras abordagens baseadas em interações multivalentes carboidrato-enzima e carboidrato-DNA têm emergido. Estudos recentes destas interações, apesar de preliminares, indicam uma boa aplicabilidade em processos enzimáticos, terapias gênicas e transporte de fármacos (DIOT et al., 2009; KANFAR et al., 2015; MIRABELLA et al., 2017; AIZAWA et al., 2012; AOYAMA et al., 2003).

Weïwer e colaboradores (2009) descreveram, por exemplo, a preparação de um *glycocluster* capaz de inibir a enzima neuraminidase do vírus *influenza* e, assim, impedir a liberação de novos vírus a partir da célula infectada. Este *glycocluster*, composto por quatro

unidades de ácido siálico, apresentou IC_{50} cerca de 3 vezes menor que o conhecido inibidor de neuraminidase *Neu5Ac2en* (figura **10**).

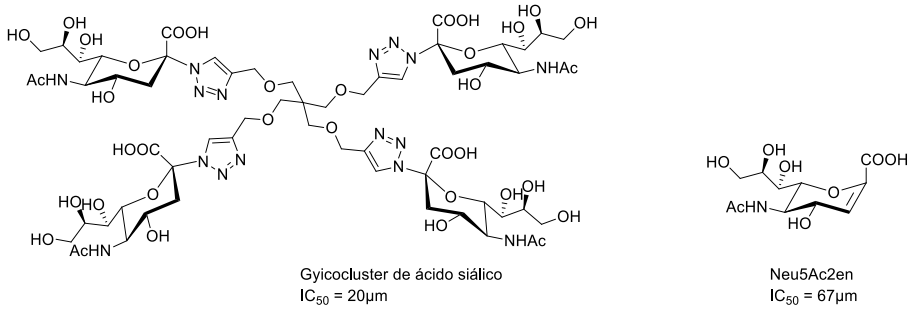
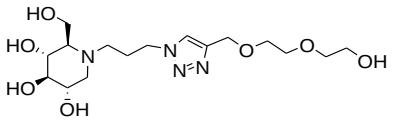


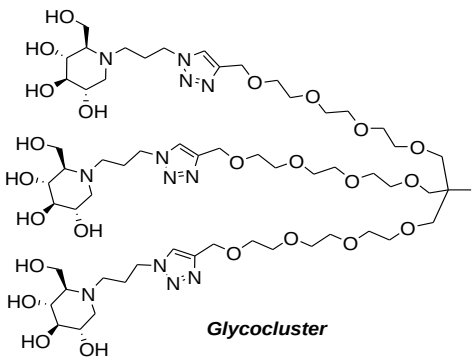
Figura 10. *Glycocluster* de ácido siálico e inibidor *Neu5Ac2en* com respectivos valores de IC_{50}

Adicionalmente, Diot e colaboradores (2009) ao estudarem os efeitos da multivalência na inibição de glicosidases, observaram que o aumento da multivalência além de proporcionar aumento da potência de inibição enzimática, também influenciou o perfil de seletividade. Enquanto o monômero do imino-açúcar modificado apresentou melhor valor de atividade para *β*-glucosidase de amêndoas, o *glycocluster* trivalente inibiu preferencialmente *α*-manosidase de feijão (JB*α*-man) (figura **11**).



Monômero Iminoaçúcar modificado

	IC_{50} (µm)	
	α-manosidase	**β-glucosidase**
Monômero	230	47
Glycocluster	35	400



Glycocluster

Figura 11. Monômero de derivado imino-açúcar e *glycocluster* trivalente com respectivos valores de IC_{50} para as enzimas α-manosidase e β-glucosidase.

As principais enzimas para as quais um efeito multivalente considerável tem sido observado estão sumarizadas na tabela a seguir. São apresentados também os diferentes blocos de construção, valência e aumento relativo de potência de inibição (tabela **1**).

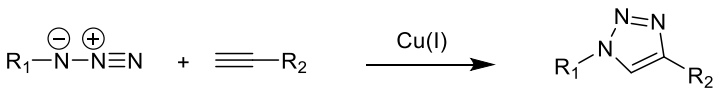
Tabela 1. Efeito multivalente observado na inibição de enzimas (Adaptado: Kanfar et al, 2015).

Enzima alvo	Plataforma	Ligante	Valencia (n)	Aumento de potência (rp)
α-manosidase de feijão	éteres de oligoetilenoglicol	DNJ	3(JBα-man)*	7,6
α-manosidase de feijão	porfirina	DNJ	4 (JBα-man)	800
α-manosidase de feijão e α-galactosidase	Fulereno C_{60}	DNJ	12 (JBα-man)	2147
β-Glucocerebrosidase	β-ciclodextrina	DNJ e DMJ**	7 (Gcase)***	200
α-manosidase de feijão	Calixereno	DNJ	8 (JBα-man)	19
neuraminidase	pentaeritritol	zanamivir	4	3,2
Neuraminidase de influenza	Ácidos poli-glutâmicos	zanamivir	~ 47	500
anidrase carbônica	Fulereno C_{60}	cumarinas	12	5
anidrase carbônica humana hCA II e IX	PAMAN	sulfonamidas	4	6
anidrase carbônica	nanoparticulas	sulfonamidas	12-15	72
Serina protease (trombina)	peptídeos	benzamidina	2	7391
5-Lipooxigenase	pentaeritritol	ácido cafeico	4	38

*JBα-man: α-manosidase de feijão **DMJ: desoximanonojirimicina ***β-Glucocerebrosidase

1.4 Estratégia de '*Click Chemistry*'

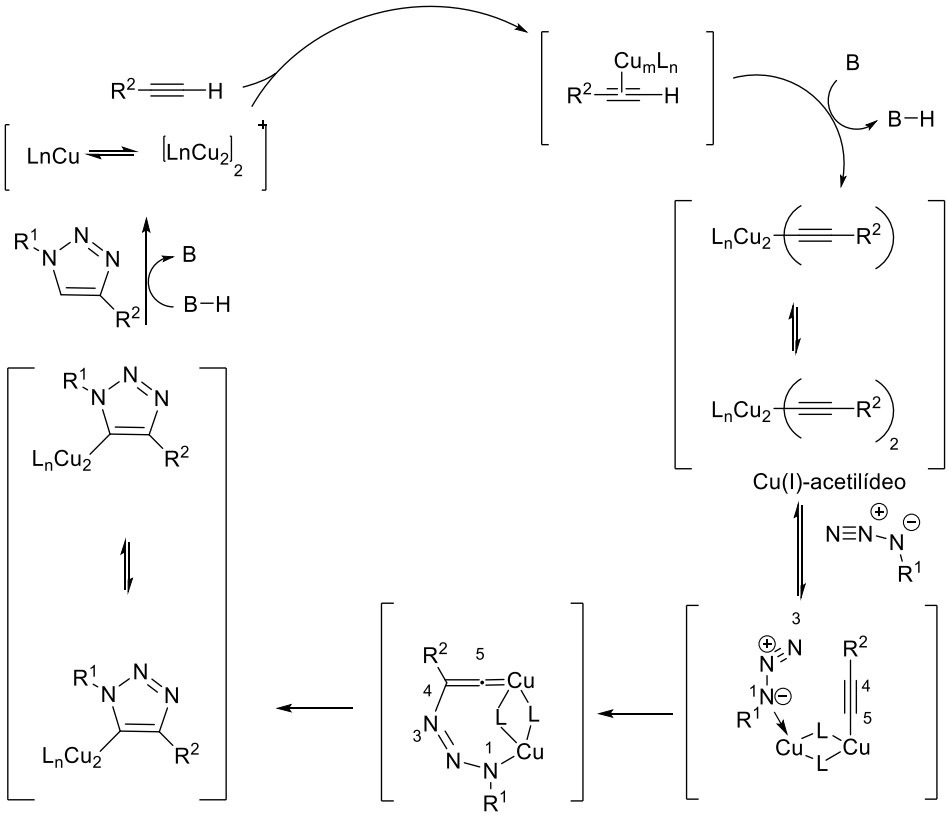
Os progressos mais recentes e significativos no desenvolvimento de ligantes que exploram o conceito de multivalência foram alcançados nas últimas duas décadas com o emprego de reações de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC). A reação, descrita de forma independente pelos grupos de Sharpless e Meldal (2002), ocorre pela ligação de dois reagentes ou blocos de construção, um azido e um alcino terminal, de maneira rápida e regiosseletiva gerando o produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído na presença de cobre (I) (esquema **3**) (TORNOE et al., 2002; ROSTOVTSEV et al., 2002; TIWARI et al., 2016; KOWALCZYK et al., 2012).



Esquema 3. Reação de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada Cu (I) entre grupos azido (N_3) e alcino ligados ao R_1 e R_2, respectivamente, formando o grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído.

O mecanismo pelo qual a reação ocorre foi primeiro proposto pelo grupo de Sharpless, em 2002, e desde então revisado com a inclusão de diferentes metalocíclicos. A proposta aqui

detalhada foi apresentada por Bock e colaboradores (2006) e sugere a participação de dois átomos de cobre (esquema **4**). No primeiro momento, há a formação de uma estrutura de Cu(I)-acetilídeo através de um complexo π entre Cu(I) e o alcino terminal; a participação do segundo átomo de cobre parece estar relacionada à ativação do grupo azido, todavia a espécie de Cu(I)-acetilídeo poderia também se complexar a outro átomo de cobre, sendo difícil a proposição de apenas uma estrutura. Na sequência, ocorre a aproximação do grupo azido formando o complexo cobre-acetilídeo-azido, com dois átomos de cobre. Isto permite que o grupo azido fique mais susceptível ao ataque nucleofílico do carbono C-4 do alcino ao nitrogênio terminal N-3 do azido, gerando um metalociclo. Este metalociclo posiciona o azido de forma que o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio N-1 se associe ao orbital π^* (antiligante) do carbono C-5-Cu(I), formando uma espécie triazolídeo de cobre mais estável. Por fim, a protonação da espécie de triazolídeo de cobre, seguida de dissociação, leva ao produto 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador (ROSTOVTSEV et al., 2002; BOCK et al., 2006; LEONETI et al., 2010).



Esquema 4. Mecanismo proposto para a reação de CuAAC. Adaptado de Bock (2006).

A fonte de sais de Cu (I) mais utilizada envolve a redução de sulfato de cobre (II) por ascorbato de sódio, embora outras condições igualmente eficientes sejam descritas, tais como complexos orgânicos, sais e derivados estabilizados de Cu (I), nanoclusters e também fio de cobre (ROSTOVTSEV et al., 2002; CHAN et al., 2004; GIL et al., 2007).

O grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído formado nas reações CuAAC apresenta propriedades físico-químicas favoráveis à descoberta de novos fármacos. A unidade triazol mantém os átomos de carbono ligados nas posições 1,4 a uma distância de 5 Å mimetizando a ligação amida (em que a distância é 3,9 Å), e diferentemente desta, não pode ser oxidada, reduzida ou clivada por hidrólise química ácida ou básica (figura **12**). No meio biológico, o anel 1,2,3-triazol é estável à degradação metabólica e atua como aceptor e/ou doador de ligações de hidrogênio, podendo ainda estabelecer ligações adicionais do tipo dipolo-dipolo e *π stacking* (LEONETI et al., 2010).

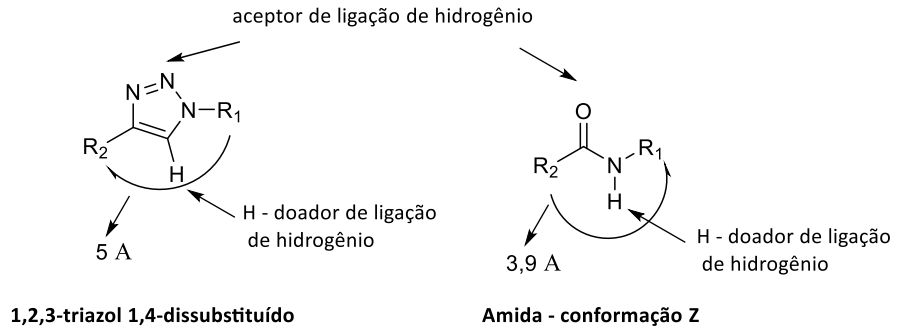


Figura 12. Similaridade estrutural entre ligação amida e anel 1,2,3-triazol.

Considerando interações intra- e intermoleculares, o grupo triazolil pode fornecer um adequado espaçamento entre dendrímero e carboidrato, permitindo melhor interação deste com seu alvo, bem como o acoplamento de muitas unidades de açúcares. Adicionalmente, esta estratégia permite modular os parâmetros de flexibilidade molecular, densidade eletrônica e hidrofilicidade. Como alternativa sintética, a utilização de irradiação por micro-ondas (MO) ou ultrassom em reações CuAAC pode ser empregada para a obtenção de maiores rendimentos e tempo reacional reduzido (MÉNDEZ-ARDOY, et al., 2009; LEONETI et al., 2010).

1.5 Alvos terapêuticos

1.5.1 Diabetes tipo II e glucosidases

Diabetes tipo II (TD2) é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla caracterizado por secreção disfuncional de insulina por células beta pancreáticas e/ou resistência à insulina no fígado e tecidos periféricos, o que resulta em hiperglicemia crônica. Esta doença, principalmente associada ao estilo de vida e fatores genéticos, afeta aproximadamente 392 milhões de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar do benefício de mudanças na dieta e inclusão de exercícios físicos regulares à rotina diária de pacientes, o que reduz o risco de diabetes em 28%, a intervenção com agentes hipoglicemiantes pode ser necessária para aqueles com hiperglicemia persistente (LANCET, 2016; OMS, 2018).

Os fármacos mais utilizados para o tratamento de TD2 podem ser classificados em seis classes principais incluindo sulfonilureas, meglitidinas, biguanidas, tiazolidinedionas, inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (SGLT2) e inibidores da enzima α-glucosidase (AGIs), ou mesmo administração de insulina exógena e seus análogos (FERREIRA et al., 2010; MILLER et al., 2014).

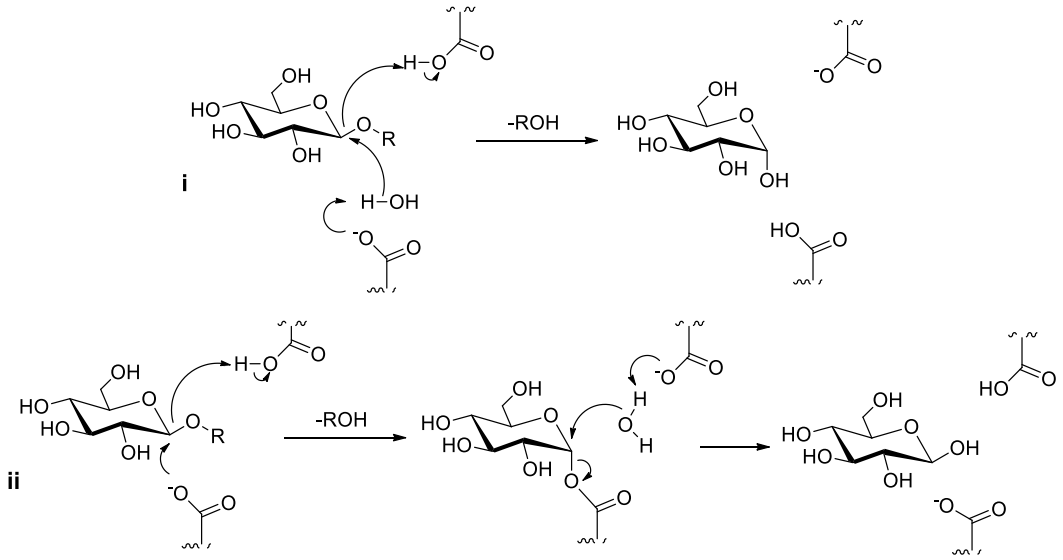
Diferentemente de outros fármacos clássicos aprovados para o tratamento de diabetes Tipo-2, os AGIs não tem efeito direto sobre a secreção ou sensibilidade a insulina. De fato, esses compostos ligam-se competitivamente a região de processamento de carboidratos das enzimas α-glucosidases, impedindo a clivagem de oligossacarídeos em monossacarídeos absorvíveis nas microvilosidases do intestino delgado. Dessa forma a inibição dessas enzimas retarda a absorção de carboidratos, permitindo que as células beta pancreáticas tenham mais tempo para liberar insulina, levando à diminuição dos níveis de glicose na circulação, especialmente no período pós-prandial (MILLER et al., 2014).

Em humanos, quatro enzimas são responsáveis pela completa degradação de amido em glicose. Primeiro, as α-amilases salivares e pancreáticas quebram as ligações α-1,4 internas do amido em cadeias de dextrina mais curtas. As dextrinas são então hidrolisadas em glicose por duas exo-hidrolases das microvilosidases intestinais: maltase-glucoamilase e sacarose-isomaltase. Essas enzimas apresentam geralmente sítios ativos únicos e profundos que se ligam ao substrato natural ou inibidores análogos. Alfa e beta-glucosidases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de dissacarídeos a partir de terminais não redutores ($1 \rightarrow 4$) liberando apenas uma molécula de glicose (HENRISSAT, 1991). Adicionalmente, a deficiência de β-glucosidase, conhecida como β-glucocerebrosidase, está envolvida na

disfunção metabólica da Doença de Gaucher, enquanto a deficiência de α-glicosidase ácida (GAA) é responsável pela doença metabólica recessiva autossômica, denominada de Doença de Pompe (MATASSINI, 2016).

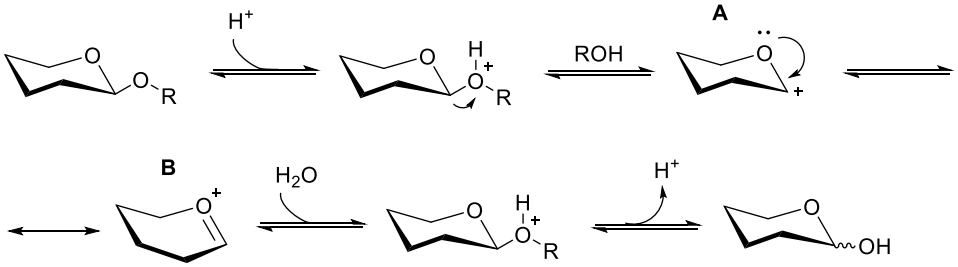
Mecanismo de hidrólise de oligossacarídeos

O mecanismo pelo qual enzimas α- e β-glucosidases clivam a ligação *O*-glicosídica de oligossacarídeos envolve a participação de dois aminoácidos contendo ácidos carboxílicos no sítio ativo, cada um atuando como ácido ou base (esquema **5**). Acredita-se que a reação possa ocorrer por dois mecanismos S_N2 principais. No primeiro e menos comum (**i**), moléculas de água ativadas por um dos carboxilatos atacam o carbono anomérico C-1 de glicose, com inversão de estereoquímica do produto formado (MELO et al., 2006; GLOSTER & DAVIES, 2010).



Esquema 5. Mecanismos de quebra de oligossacarídeos

Em (**ii**), a reação se processa via mecanismo bimolecular de substituição com formação de intermediário covalente com a enzima, e dupla inversão de configuração, o que resulta em retenção da estereoquímica original. Na proposta (**i**), um grupo carboxílico age como ácido e outro como base, diferentemente de (**ii**) em que um ácido carboxílico age como ácido e base e o outro, como nucleófilo. Evidências experimentais, entretanto, têm sugerido a geração de íon no estado de transição, via S_N1, com participação de ambos os aminoácidos e clivagem da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando espécies positivamente carregadas, como carbocátion (**A**) e íon oxocarbênio (**B**) (esquema **6**) (GLOSTER & DAVIES, 2010).



Esquema 6. Formação de íon oxocarbênio (**B**) durante clivagem de ligação glicosídica por ação enzimática

Inibidores de glicosidases

A potência e especificidade de inibidores de glucosidase está diretamente relacionada a capacidade desses compostos de mimetizar o estado de transição da glicose supracitado, sendo sua conformação e a presença de grupos protonáveis de grande relevância para interação no sítio ativo. Os inibidores de α-glucosidase atualmente disponíveis para o tratamento de diabetes Tipo-2 são os aminoaçúcares acarbose (Precose®) e voglibose (Voglib®) e o imino-açúcar miglitol (Glyset®). Miglitol é um derivado *N*-alquilado de 1-desoxinojirimicina (DNJ), uma piperidina hidroxilada natural, isolada de culturas de *Streptomyces sp.* que tornou-se protótipo de uma série de compostos com elevada propriedade de inibição de glucosidases (figura **13**). (FERREIRA et al., 2010; MILLER et al., 2014).

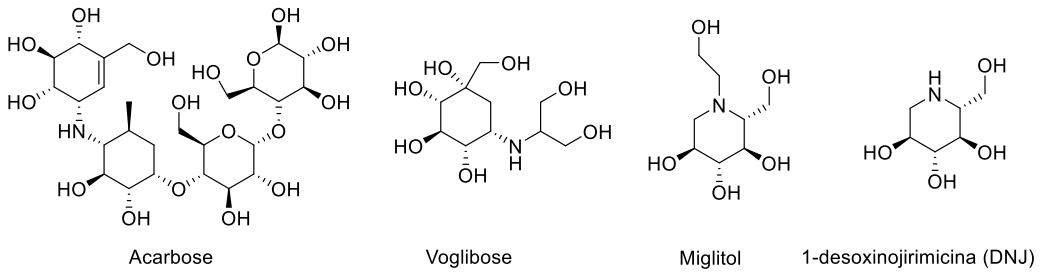


Figura 13. Fármacos inibidores de α-glucosidase 1-desoxinojirimicina

Apesar da alta atividade apresentada por esses inibidores monoméricos, uma melhor modulação da afinidade e seletividade de inibição de glicosidases tem sido alcançada por estruturas dendriméricas contendo múltiplas cópias de 1-desoxinojirimicina e isômeros.

Além do forte efeito multivalente repetidamente relatado para *α*-manosidase, caso do *glycocluster* trivalente de DNJ apresentado na figura **11** (pág. 11), outras glicosidases terapeuticamente relevantes também são sensíveis a esses imino-conjugados, tais como glucocerebrosidase-GCase humana, envolvida na doença de Gaucher, *α*-fucosidase, *α*- e *β*-galactosidases, *α*- e *β*-glucosidases e isomaltase (DIOT et al., 2009; MATASSINI et al., 2016).

Enquanto o MVE em α-manosidase foi experimentalmente relacionado a interações com múltiplas unidades macromoleculares e efeito de probabilidade de religação ampliada, o aumento de atividade sobre outras glucosidases que apresentam sítios ativos mais profundos se dá pela ligação em locais não catalíticos na superfície da enzima. Acredita-se que essas interações podem também bloquear a entrada do sítio catalítico impedindo a aproximação do substrato (STAUFFERT et al., 2016).

1.5.2 Doença de Chagas e *trans*-sialidase

A descoberta da doença de Chagas pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934) é considerada um feito sem precedente na história da medicina. Pela primeira vez um único cientista foi capaz de descrever em detalhes todos os aspectos de uma doença infecciosa: patógeno, vetor, hospedeiros, principais manifestações clínicas e epidemiologia. Passados 108 anos desde sua descoberta, a enfermidade figura agora como a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada por malária e esquistossomose, e também como uma das mais negligenciadas (IOC, 2018; RASSY JR et al., 2010).

De acordo com a OMS, a doença é endêmica em 21 países da América Latina e sul dos Estados Unidos e afeta aproximadamente 7 milhões de pessoas em todo mundo, com 30 milhões vivendo sob risco de infecção. Todavia, alguns estudos sugerem que esse número pode ser ainda subestimado devido a falhas no diagnóstico e notificações (OMS, 2017).

Tal como reportado por Carlos Chagas, o agente causador da doença é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esse parasita intracelular obrigatório possui notável habilidade de infectar células nucleadas de mamíferos, incluindo células musculares lisas e estriadas, macrófagos e fibroblastos (ANDRADE & ANDREWS, 2005).

Clinicamente a infecção é caracterizada por uma curta fase aguda com alta parasitemia e parasitismo tecidual, seguida de uma longa e progressiva fase crônica. Os sintomas da fase aguda são geralmente suaves, mas pacientes imunossuprimidos podem desenvolver uma forma mais grave como miocardite aguda e encefalomielite. Se não tratada precocemente, a doença de Chagas evolui para uma condição crônica na qual é observada destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos (coração, esôfago e cólon, entre outros) (RASSY JR et al., 2010; ZHANG & TARLETON, 1999).

O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico benznidazol (Rochagan) desenvolvido pela Roche® há mais de 50 anos. O fármaco nifurtimox (Lampit, Bayer®), também utilizado no tratamento por muito tempo, teve sua produção

descontinuada no Brasil em 2001 (figura **14**). O mecanismo de ação do nifurtimox está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio (ânions radicalares), envolvidas no dano de componentes críticos celulares do parasita, a partir da redução do grupo nitroarílico (WILLIANS; LEMKE, 2002; URBINA et al., 2003; URBINA, 2010).

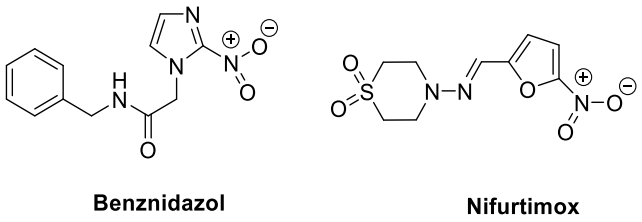


Figura 14. Estrutura química dos fármacos nifurtimox e benznidazol.

Já o mecanismo de ação do benznidazol (BZD) é mais complexo e além da liberação de intermediários radicalares e/ou metabólitos nucleofílicos que causam danos ao DNA do parasita, há evidências de que o fármaco atue na inibição enzima NADH-fumarase redutase bloqueando o crescimento de *T. cruzi*. Outra proposta sugere ainda que BZD é capaz de estimular a produção da citocina interferon gama (INF-γ), levando a aumento da fagocitose e lise celular (URBINA et al., 2003; RAJAO et al., 2014).

Ambos os fármacos são usados na fase aguda da doença, mas suas eficácias variam de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência de variação de cepas do parasita. Os dois apresentam baixa eficácia na fase crônica, efeitos colaterais severos e precisam ser usados em tratamento de longo prazo. Assim, o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes continua a ser um desafio fundamental no controle da doença de Chagas (URBINA, 2010).

***trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS)**

A superfície de *T. cruzi,* assim como de outros protozoários, é densamente recoberta por proteínas altamente glicosiladas (mucinas) que atuam na interface entre parasita e hospedeiro mediando eventos relacionadas a adesão e invasão de células ou tecidos e evasão de resposta imune (CHIOCCOLA et al., 2000; COREY et al., 2002).

Particularmente multigalactosiladas, as glicoproteínas de mucina do *Trypanosoma cruzi* apresentam unidades de lactose e galactose ligadas a uma cadeia peptídica com sequência rica nos aminoácidos treonina e prolina, por de unidades de α-*N*-acetilglicosamina

(*α*-GlcNAc) (figura **15**). Diferentemente, nos vertebrados, as unidades oligossacarídicas são ligadas à cadeia peptídica por uma unidade *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

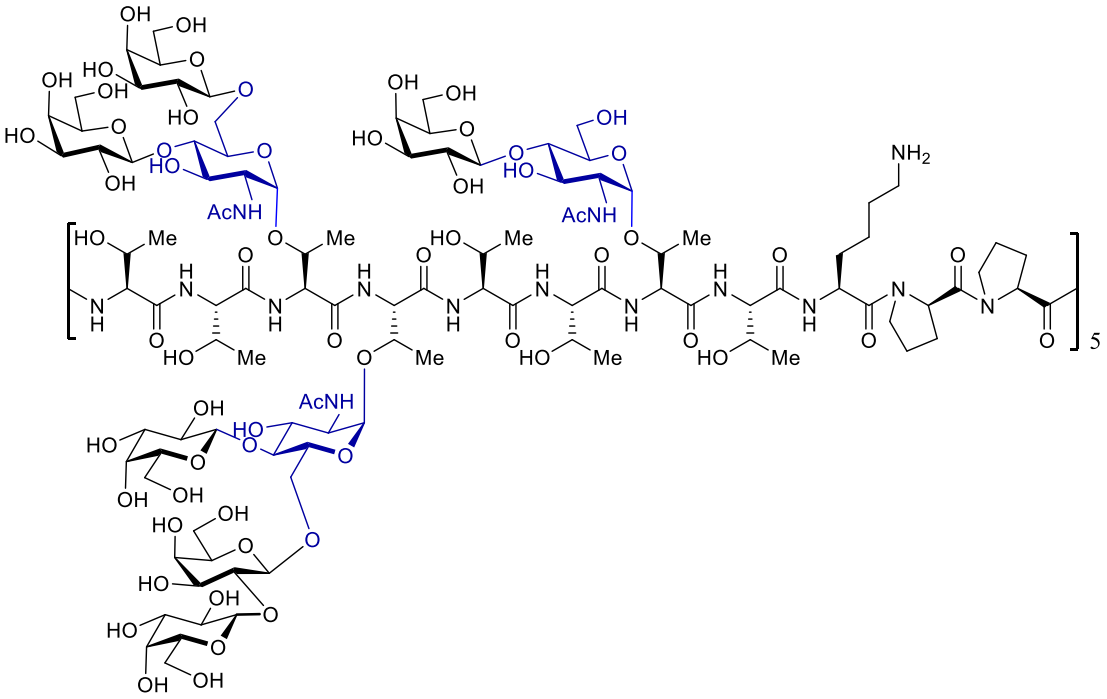
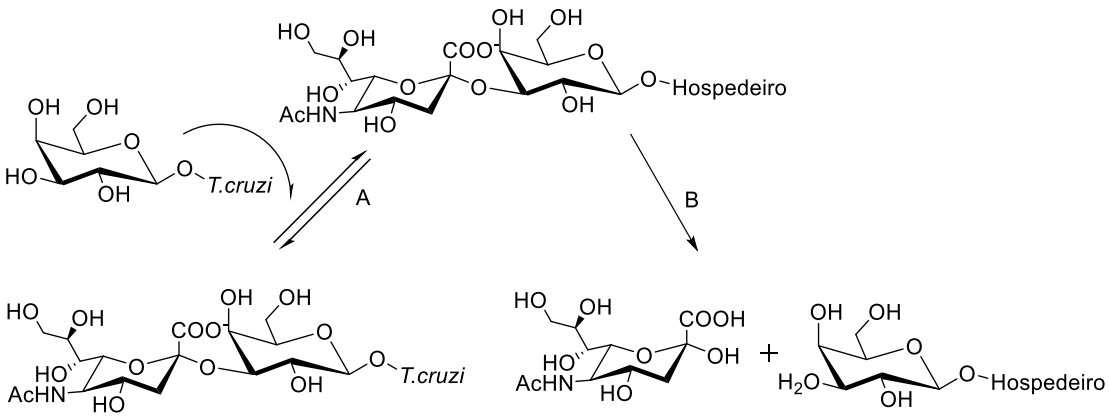


Figura 15. Representação de mucina de *T. cruzi*, com unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$.

Quando presentes em posição terminal, os resíduos de *β*-galactopiranosídeo ligados a unidade *α*-GlcNAc presentes na mucina são decorados com ácido siálico no meio extracelular pela ação da enzima regulatória *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS), específica da superfície do parasita (CHIOCCOLA et al., 2000; BUSCAGLIA et al., 2006).

Devido à incapacidade do *T. cruzi* de sintetizar ácido siálico (derivado ácido *N*-acetilneuramínico), TcTS transfere esse monossacarídeo a partir de glicoconjugados de células do hospedeiro para mucinas parasitárias com retenção da configuração *α*-2,3 da ligação glicosídica (esquema **7**). Além de contribuir para adesão de *T. cruzi* às células do hospedeiro, a sialilação das moléculas de mucina pela enzima *trans*-sialidase também protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação de anticorpos líticos anti-*α*-gal (AGUSTI et al., 2005; COREY et al., 2002).



Esquema 7. Reação de transferência (**A**) e hidrólise de ácido siálico (**B**) pela *trans*-sialidase

Apesar de ser classificada como sialiltransferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica, *in vivo* e *in vitro*, na presença de substratos adequados, como *β*-galactose terminal de glicoconjugados (BUSCHIAZZO et al., 2010).

Inibidores de trans-sialidase de *T. cruzi*

Considerando as importantes funções da sialilação para a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* no organismo hospedeiro e a presença exclusiva da enzima *trans*-sialidase no parasita, TcTS tornou-se rapidamente um alvo de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Entretanto, apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, os avanços na busca por inibidores potentes e seletivos não permitiram ainda a validação definitiva de TcTS como alvo para o tratamento da doença de Chagas.

Com novos dados sobre a estrutura da enzima em complexos, obtidos por cristalografia de raios-x a partir de 2002 e a sugestão de um mecanismo consistente para a reação de *trans*-glicosilação catalisada por TcTS, o planejamento racional de inibidores tem sido baseado majoritariamente na busca por compostos capazes de mimetizar o substrato doador (ácido siálico) ou substratos aceptores (lactose e galactose). Outra possibilidade explorada tem sido a preparação de miméticos de substratos duplos, capazes de se ligar em ambas as regiões do sítio ativo (BUSCHIAZZO et al., 2010; NERES et al, 2008; KASHIF et al., 2017).

Inibidores miméticos de substrato doador

Em virtude da similaridade estrutural entre os sítios ativos e mecanismo catalítico de TcTS e neuraminidase de influenza, parte da busca racional de inibidores envolveu a avaliação de miméticos de ácido siálico ou de seu estado de transição capazes de inibir sialidases virais.

Entre os compostos testados destacam-se o ácido 2-desoxi-2,3-didesidro-D-*N*-acetilneuramínico (DANA) e os fármacos zanamivir e oseltamivir (figura **16**) (MOREIRA et al., 2009).

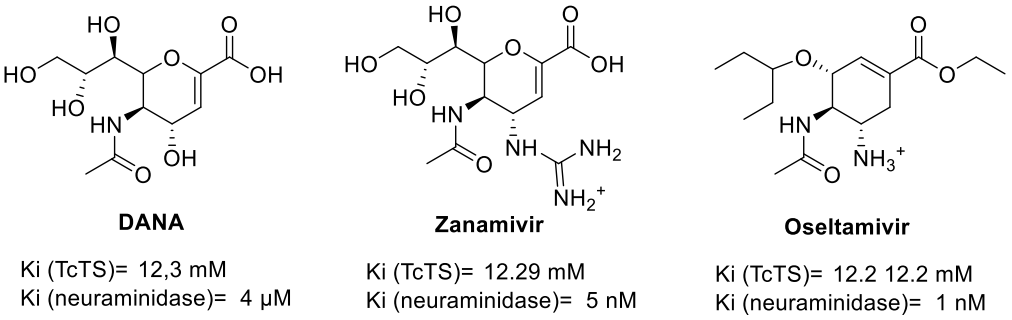


Figura 16. Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico (substrato doador)

Apesar de potentes inibidores de neuraminidase de influenza, esses compostos apresentaram fraca inibição sobre *trans*-sialidase de *T. cruzi*, mesmo com algumas interações favoráveis no sítio ativo. Curiosamente, a sialidase de *Trypanosoma rangeli* é fortemente inibida por DANA (Ki = 0,15 nM) ainda que haja 70% de identidade na sequência do domínio catalítico dessa sialidase em relação a TcTS (PARIS et al., 2005).

Na busca por inibidores potentes, estruturas não relacionadas a carboidratos também foram investigadas pelos grupos de Ferrero-Garcia e Neres, sendo descobertos os compostos piridoxal 5'-fosfato e os derivados de ácido benzóico (**A**) e piridina (**B**) (figura **17**). Assim como os inibidores anteriores, esses compostos também apresentaram atividade inibitória fraca a moderada em relação à TcTS (FERRERO-GARCIA et al., 1993; NERES et al., 2007).

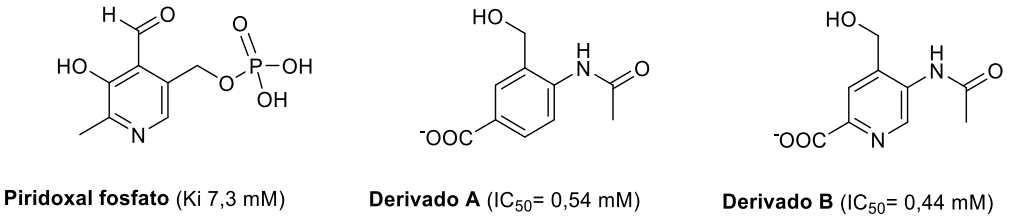


Figura 17. Inibidores miméticos de ácido siálico, não relacionados a carboidratos e seus respectivos Ki e IC_{50}

Inibidores miméticos de substratos aceptores

Entre os compostos planejados para ocupar exclusivamente o sítio aceptor de ácido siálico destaca-se o lactitol com valor de Km aparente de 0,26 mM, IC_{50} de 0,21 mM e capacidade de reduzir infecção em células de mamíferos (cerca de 25%) (figura **18**). Todavia, esse composto não inibe a atividade catalítica enzimática de TcTS, atuando apenas como um

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

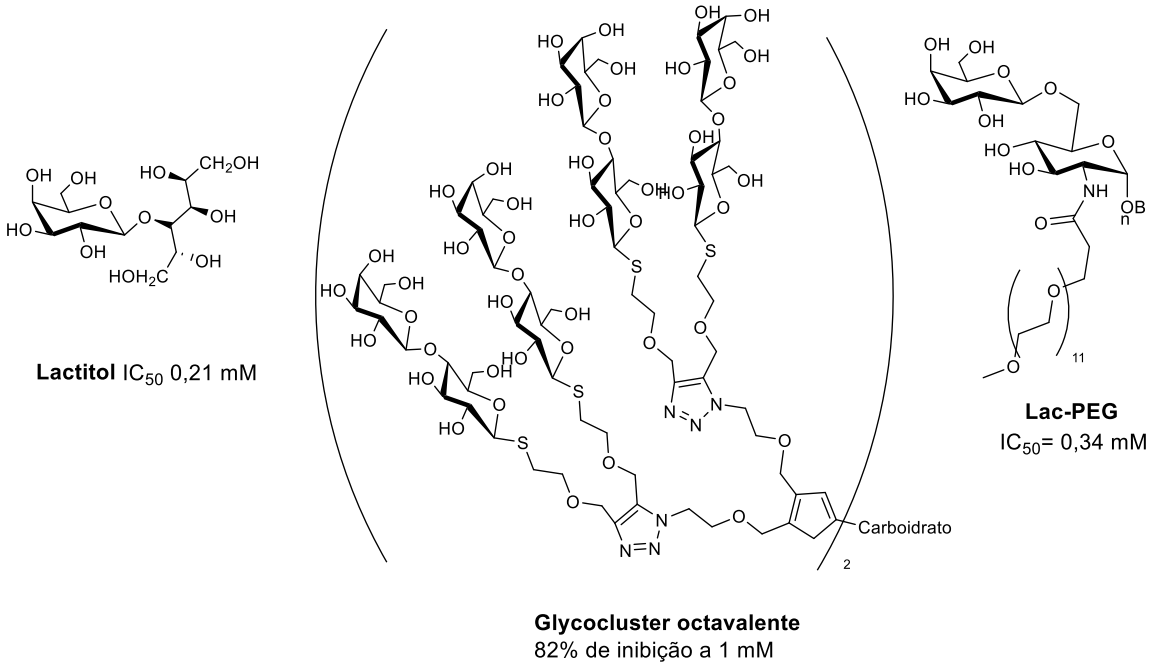


Figura 18. Derivados miméticos de substratos aceptores

Em uma abordagem mais recente, o grupo de Rosalía Agustí descreveu ainda a preparação de *glycoclusters* de lactose tri-, tetra- e octavalentes capazes de inibir a transferência de ácido siálico para o substrato natural *N*-acetillactosamina. O composto mais potente (octavalente) foi capaz de inibir a enzima em 82% a 1 mM (AGUSTÍ et al., 2016).

Buscando também compostos com melhores propriedades farmacocinéticas Giorgi e colaboradores (2010) realizaram a conjugação de derivados de lactose com polietileno glicol (PEG) o que levou a obtenção do composto Lac-PEG capaz de inibir a ação de transferência de ácido siálico por TcTS em 82% com IC_{50} de 0,34 mM (figura **18**).

Inibidores miméticos de substratos duplos

Os resultados pouco expressivos para inibidores miméticos do substrato doador ou aceptor foram em parte superados pelo desenho de estruturas capazes de ocupar os dois sítios simultaneamente, representando inibidores duplos, e tendo como primeiro exemplo importante o derivado de glangliosídeo C, com valor de IC_{50} na ordem de 100 µM (figura **19**). O mesmo grupo também realizou um *screening* de inibidores de TcTS por triagem virtual de bibliotecas de compostos comercialmente disponíveis e foi capaz de selecionar o derivado benzotiazol E como o mais ativo. (Neres et al., 2008).

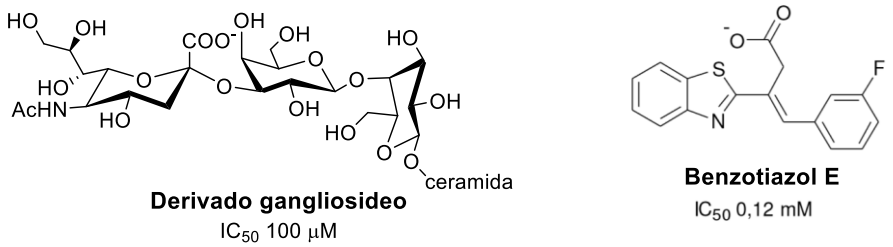


Figura 19. Estruturas dos derivados miméticos de substratos duplos de TcTS descritos por Neres et al., 2009.

Em 2012, também explorando essa ideia, Campo e colaboradores descreveram a síntese de alguns glicoconjugados sialilmiméticos ligados a galactose, glicose ou gulose por um anel 1,2,3-triazol, teoricamente capazes de mimetizar o estado de transição do substrato natural (figura **20**). Esses compostos foram testados na concentração de 1,0 mM e apresentaram atividade inibitória entre 67% a 91% (CAMPO et al., 2012).

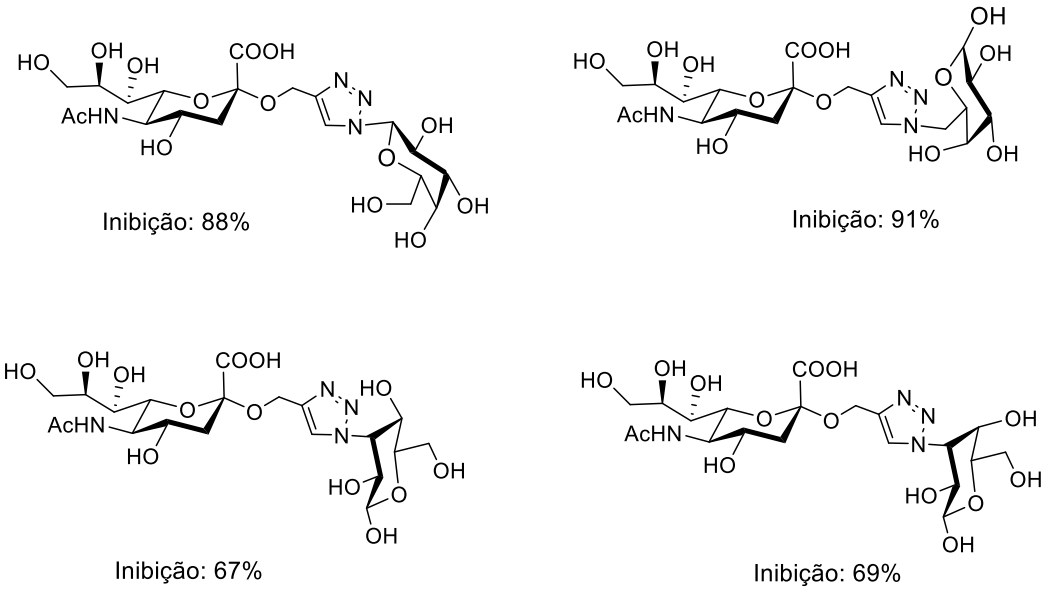


Figura 20. Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos e porcentagem de inibição de TcTS a 1 mM.

Por fim, três sulfonamidas ligadas a chalconas hidroxiladas ou derivados de quinolinona mostraram-se os mais potentes inibidores de TcTS até agora reportados, inibindo a enzima em concentrações sub-micromolares (figura **21**). Estudos de modelagem molecular posteriores demonstraram que o derivado quinolinona apresenta interações relevantes do grupo sulfonamido com aminoácidos das regiões do doador e aceptor no sítio ativo (KIM et al., 2009; LIMA et al., 2012).

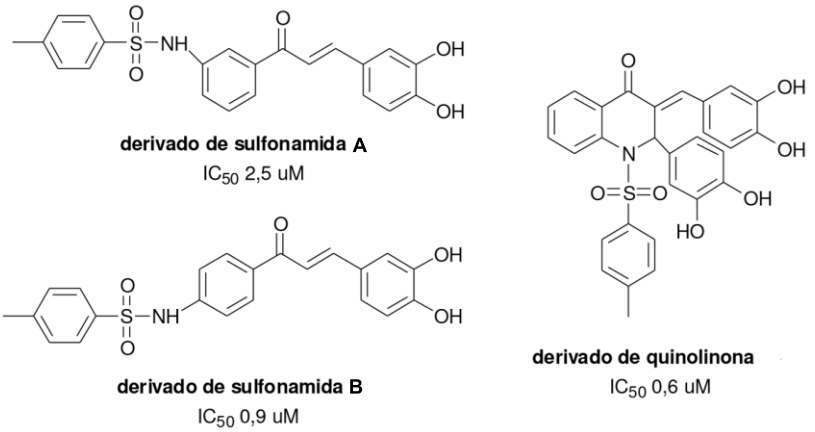


Figura 21. Sulfo-chalconas e sulfo-quinolinona inibidores de TcTS.

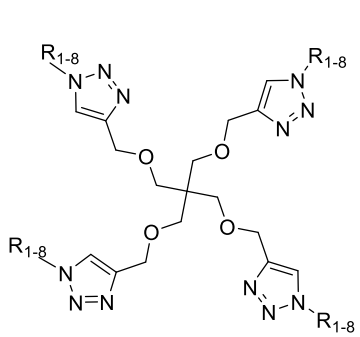
Justificativa para a síntese de *glycoclusters* tetra e hexavalentes contendo unidades de glicose, galactose e ácido siálico

As funções abrangentes e complexas de carboidratos nos sistemas biológicos oferecem inúmeras possibilidades para o uso dessas estruturas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Particularmente, em consequência de sua estrutura e função, glicosidases e glicosiltransferases envolvidas em patologias significativas são alvos constantes na busca por inibidores enzimáticos baseados em carboidratos. Nesta direção, o grupo de Química de Carboidratos da FCFRP-USP vem trabalhando no planejamento, síntese e avaliação biológica de carboidratos (pseudodissacarídeos, imino-açúcares, carbaaçúcares, derivados híbridos, glicomacrociclos, glicoaminoácidos, glicopeptídeos, etc) com potencial efeito terapêutico.

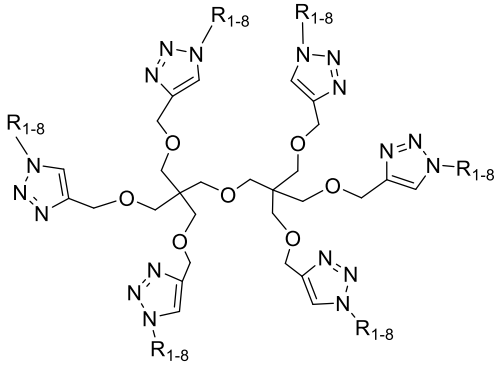
Assim, o conhecimento de características estruturais e mecanismo de ação das enzimas *α*- e *β*-glucosidases e TcTS e as sólidas evidencias da última década de que glicosidases são sensíveis a efeito de multivalência conduziram ao planejamento de *homo-glycoclusters*, potencialmente inibidores dessas enzimas contendo três, quatro ou seis unidades correlatas aos seus substratos naturais (glicose e galactose/ácido siálico) em diferentes disposições do carboidrato, além do planejamento de *hetero-glycoclusters* contendo unidade de desoxinojirimicina (DNJ), além de glicose. Adicionalmente, foram propostos *glycoclusters* potencialmente inibidores de TcTS baseados na estrutura de α-GalNAc-*O*-Thr, um glicoaminoácido presente na unidade peptídica repetitiva que forma a mucina de *T. cruzi.*

2. OBJETIVOS

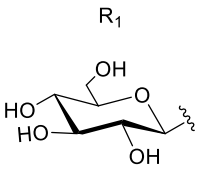
i) Síntese de *homo-glycoclusters* (**1**-**16**) com potenciais atividades antidiabética e antiparasitária. As estruturas dos compostos de interesse estão representadas a seguir, sendo os *glycoclusters* (**1**-**4**) e (**9**-**12**) compostos por unidades de glicose; (**5**-**6**) e (**13**-**14**) compostos por unidades de galactose; (**7** e **15**) contendo blocos derivados de ácido siálico e (**8** e **16**) compostos por unidades de *α*-GalNAc-*O*-Thr.



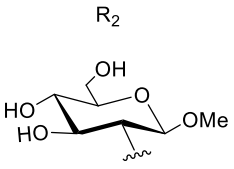
***Glycoclusters* 1-8**



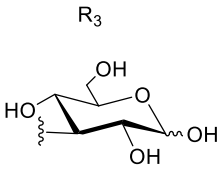
***Glycoclusters* 9-16**



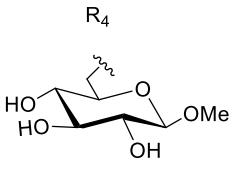
1, 9



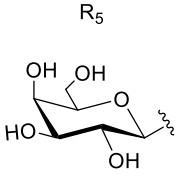
2, 10



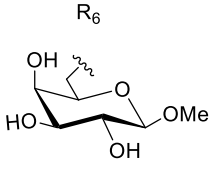
3, 11



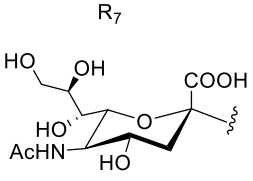
4, 12



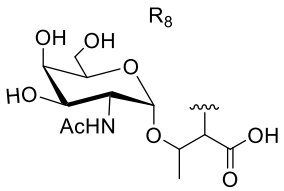
5, 13



6, 14



7, 15



8, 16

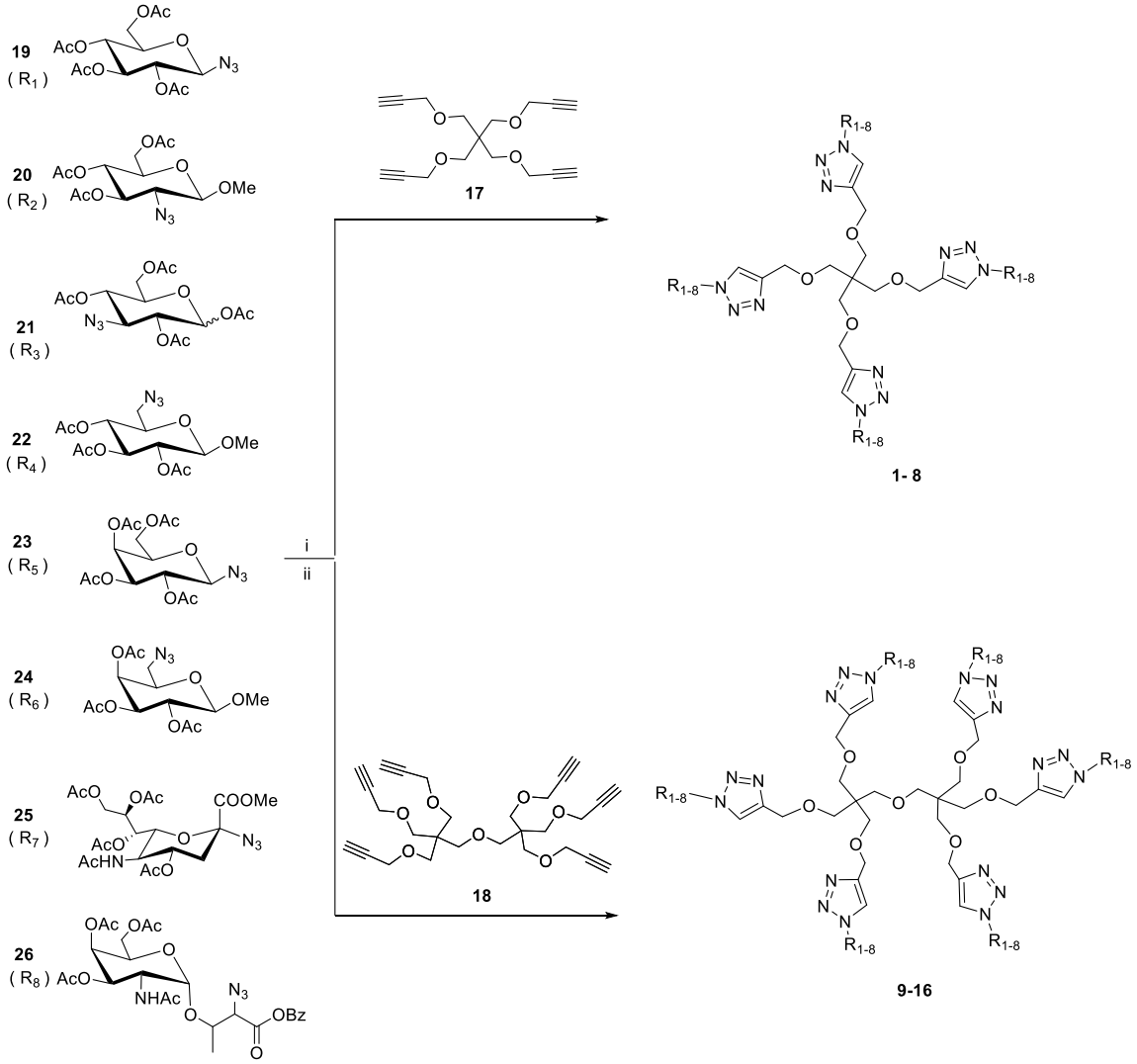
ii) Ensaio de inibição das enzimas α e β-glucosidase com os *glycoclusters* contendo unidades de glicose ligadas pelas posições C-1 (**1** e **9**), C-2 (**2** e **10**), C-3 (**3** e **11**) e C-6 (**4** e 1**2**).

iii) Ensaio de inibição de TcTS com os *glycoclusters* contendo unidades de galactose unidas por C-1 (**5** e **13**) ou C-6 (**6** e **14**), ácido siálico (**7** e **15**) ou derivado *α*-GalNAc-*O*-Thr (**8** e **16**).

iv) Ensaios de atividade tripanocida, citotóxica e bloqueio de invasão celular (**5**-**8** e **13**-**16**).

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A síntese dos *glycoclusters* **1**-**8** e **9**-**16** foi planejada a partir de reações de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) entre os alcinos **17** e **18**, respectivamente, e os azido-carboidratos **19** a **26**, com remoção completa dos grupos protetores após o acoplamento (esquema **8**).



Esquema 8. Preparação dos *glycoclusters* **1** a **8** a partir do alcino **17** e dos *glycoclusters* **9** a **16** a partir do alcino **18.** i) $CuSO_4$, ascorbato de sódio; ii) MeONa/MeOH; R_1 a R_8, ver objetivos.

Os blocos **17** e **18** foram preparados pela funcionalização dos álcoois pentaeritritol e dipentaeritritol, respectivamente, com brometo de propargila. Já a síntese dos blocos azido-carboidratos **19**-**26** foi realizada com base em protocolos clássicos encontrados na literatura, alguns dos quais estabelecidos pelo próprio grupo de pesquisa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Aparelhagem analítica

- Espectrômetros Bruker Avance DPX-300, DRX-400 e DRX-500 da Universidade de São Paulo foram empregados na obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^{1}H) e Carbono (RMN de ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão em relação ao tetrametilsilano (TMS). O número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa.
- Os espectros de massas foram obtidos em aparelho Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador híbrido quadrupolo (Q) tempo de voo (TOF).
- Espectrômetro de Infravermelho IVFT Nicollet Modelo protege 460.
- Cromatógrafo Shimadzu SCL-10AVP e o software Class-VP 5.0.

Aparelhagem laboratorial

- Agitador magnético: IKA RCT Basic e Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Cromatógrafo Biotage Horizon™
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Reator de Micro-ondas CEM® Discover
- Pipeta multicanal: Eppendorf

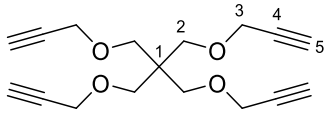
Solventes, reagentes e outros materiais

- Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram purificados conforme métodos descritos na literatura (PERRIN, 1980).
- As Cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF254 da MERCK®, as cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando sílica comum gel 60 (20-63μm) da MERCK® e as cromatografias em aparelho Biotage HorizonTM foram realizadas utilizando coluna compactada com sílica *flash* 60 (40-63 μm).

4.2 Métodos

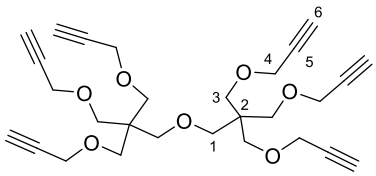
4.2.1 Síntese de blocos de construção *O*-propargilados

Tetra-*O*-propargil-pentaeritritol 17



Em um balão de 2 bocas foram adicionados pentaeritritol **27** (5 mmol, 0,68 g), KOH (76 mmol, 4,25 g) e DMF (15 mL). A mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos a 0°C. A seguir, foi adicionada, lentamente, 10 mL de solução de brometo de propargila 80% em tolueno (90 mmol, 10,680 g, d=1,335 g/mL) e a solução resultante foi mantida a 50°C por 12 horas. Após esse tempo, o solvente foi removido em evaporador rotativo sob pressão reduzida e o resíduo extraído com éter etílico, lavado com água e solução saturada de NaCl, seco em $MgSO_4$ e concentrado. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* em gradiente de éter de petróleo: acetato de etila (v/v, 1:1) obtendo-se um óleo amarelo **17** (0,547 g, 1,9 mmol, 38%).
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4,14 (8H, d, *J* 2,3 Hz, H-3), 3,54 (8 H, s, H-2), 2,41 (4 H, t, *J* 2,3 Hz, H-5). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 80,2 (C-4), 74,1 (C-5), 69,1 (C-2), 58,7 (C-3), 44,8 (C_{qt}-1). HRMS m/z calculada para $C_{17}H_{21}O_4^+$ 289,1434, encontrada 289,1436 [$M+H^+$].

Hexa-*O*-propargil-dipentaeritritol 18

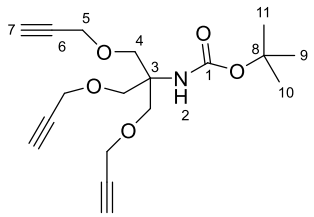


Em um balão de fundo redondo foram adicionados dipentaeritritol **28** (0,508 g, 2 mmol) e solução aquosa de NaOH (70% w/v, 9 mL). A mistura foi aquecida a 80°C e agitada por 1 hora. A seguir, foram adicionados TBAB (0,381 g, 1,18 mmol) e 1,76 mL de solução de brometo de propargila 80% em tolueno (15,8 mmol, 1,879 g, d=1,335 g/mL) e a reação continuou a 80°C por 4 horas. Após esse tempo, 1,76 mL de brometo de propargila foi novamente adicionado (15,8 mmol, 1,879 g) e a mistura foi mantida sob agitação por 12 horas. O conteúdo do balão foi resfriado e particionado entre H_2O (50 mL) e éter etílico (50 mL). A fase orgânica foi lavada com água e solução salina, seca com $MgSO_4$, filtrada e

concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* em gradiente de éter de petróleo: acetato de etila (v/v, 2:8). O produto obtido foi um óleo viscoso amarelo (0,298 g, 0,62 mmol, 31%).

RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4,11 (12H, d, *J* 2,3 Hz, H-4) 3,51 (12H, s, H-3), 3,38 (4H, s, H-1), 2,41 (6H, t, *J* 2,3 Hz, H-6). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 80,0 (C-5), 74,1 (C-6), 69,7 (C-1), 69,0 (C-3), 58,7 (C-4), 44,9 (C_{qt}-2). HRMS m/z calcd. para $C_{28}H_{34}NaO_7^+$, 505,2197 encontrada 505,2198 [M+H^+].

tris-Boc propargil 29

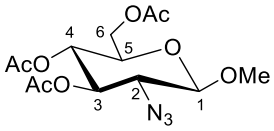


A uma suspensão de tris(hidroximetil)aminometano **30** (2,0 g, 16,5 mmol) em *t*-BuOH (20 mL), foi adicionada lentamente solução de dicarbonato de di-*terc*-butila (3,6 g, 16.4 mmol) em MeOH:*t*-BuOH (1:1, 32 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 22h, quando os solventes foram evaporados e o bruto recristalizado em acetato de etila gelado, fornecendo um sólido branco puro **31** em 64% de rendimento. À uma solução de **31** (2,32 g, 10.5 mmol) em DMF anidro, 5,7 mL de brometo de propargila (80% em tolueno, 364,3 mmol) foi lentamente adicionado e a mistura mantida sob agitação a 0 ºC por 10 minutos. Na sequência, KOH macerado (3,56 g, 63.4 mmol) foi adicionado em pequenas porções e a reação então mantida sob agitação a temperatura ambiente por 40h. À mistura marrom resultante, foi adicionado então acetato de etila sendo a agitação mantida por 10 minutos. Toda a mistura reacional foi lavada com H_2O (2 × 10 mL) e solução salina (10 mL). A fase orgânica coletada foi seca em $MgSO_4$ e concentrada em rotaevaporador. O produto bruto foi purificado por cromatografia *flash* automatizada (Isolera™ - Biotage®) em gradiente crescente de [*n*-hexano: AcOEt] para obtenção do composto **29** como um sólido amarelo (1,56 g, 4,7 mmol, 44%).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4,93 (1H, s, N*H*, H-2), 4,15 (6H, d, *J* 2,3 Hz, H-5), 3,79 (6H, s, H-4), 2,43 (3H, t, *J* 2,3 Hz, H-7), 1,43 (9H, s, 3 × C(CH_3), H-9, H-10, H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 154,7 (*C*OCH_2, C-1), 79,6 (C-6), 74,5 (C-7), 68,8 (C-4), 58,6 (C-5), 58,0 (C-8), 28,3 (C-9, C-10, C-11). HRMS m/z calculado para $C_{18}H_{25}NNaO_5^+$ 358,1625, encontrada 358,1625 [M+Na^+].

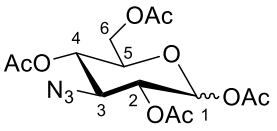
4.2.2 Síntese de azido carboidratos

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-*β*-D-glicopiranosídeo de metila 20



Uma solução de triflil azida (TfN_3) foi preparada dissolvendo azida de sódio (NaN_3) (0,170 g, 2,62 mmol) em piridina (2,9 mL), sendo anidrido tríflico (0,353 mL, 2,096 mmol) lentamente adicionando. Esse sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo por 2 horas e os sais presentes na solução foram então filtrados em celite. Essa solução de triflil azida, recém-preparada, foi lentamente adicionada à uma solução do composto **34** (0,578 g; 1,81 mmol), trietilamina (0,5 mL; 3,62 mmol) e $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ (4,6 mg; 0,0179 mmol) em piridina (2,9 mL). Após a adição da solução de triflil azida, a mistura reacional, antes em banho de gelo, foi agitada à temperatura ambiente por 16 horas e então concentrada à pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por coluna *flash* [*n*-hexano:AcOEt (1:1)] e 2-azido-glicose obtido em mistura de anômeros como um líquido viscoso claro, com 37% de rendimento (0,233 g, 0,677mmol). A subsequente recristalização da mistura em etanol permitiu obtenção do composto **20** como cristais brancos puros (34%). RMN de ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 5,04-4,97 (2H, m, H-3, H-4), 4,33-4,28 (2H, m, H-1, H-6a), 4,13 (1H, d, *J* 12,5 Hz, H-6b), 3,68 (1H, m, H-5), 3,61 (3H, s, OCH_3), 3,50-3,47 (1H, m, H-2), 2,10, 2,03 (9H, s, 3 x $COCH_3$). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,7, 170,0, 169,6 (C=O), 102,9 (C-1), 72,5 (C-3), 71,7 (C-5), 68,3 (C-4), 63,7 (C-6), 61,8 (OCH_3), 57,5 (C-2), 20,7, 20,7, 20,6 (3 x COCH_3). IV: banda característica de azido em: 2122 cm^{-1}.

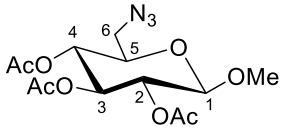
1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-*α,β*-D-glicopiranose 21



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1:2,5:6-di-*O*-isopropilideno-*α*-D-alofuranose **35** (1,509 g, 5,8 mmol) e 60 mL da mistura diclorometano/piridina (57:3). A solução foi resfriada a 0°C e anidrido tríflico (4,2 mL em 3 mL de DCM) foi lentamente gotejado. Essa mistura reacional foi mantida sob agitação por 15 minutos e extraída com solução aquosa gelada de HCl 5%, água, seca com $MgSO_4$ e concentrada sob pressão reduzida formando um óleo laranja. Esse produto foi dissolvido em DMF anidra (25 mL) e resfriada a

0°C para adição de NaN_3 (1,92 g; 29,4 mmol). A mistura foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente e então diluída com DCM, extraída com água, solução NaCl(sat) e seca com $MgSO_4$. O resíduo foi purificado em sílica gel por cromatografia *flash* [hexano/AcOEt (6:1)] gerando o intermediário 3-azido-3-desoxi-1:2,5:6-di-*O*-isopropilideno-*α*-D-glicofuranose **36** (0,747 g; 2,61 mmol, 45%) como um óleo incolor. Ácido trifluoracético (TFA) 90% (6,7mL) foi adicionado ao 3-azido-3-desoxi-1:2,5:6-di-*O*-isopropilideno-*α*-D-glicofuranose (0,747 g; 2,61mmol) a 0ºC. Após agitação por 15 minutos a reação foi concentrada sob pressão reduzida, dissolvida em piridina (10 mL), resfriada a 0ºC e tratada com anidrido acético (4 mL). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 12 horas e então concentrada sob pressão reduzida. O bruto foi purificado por cromatografia *flash* automatizada [*n*-hexano: AcOEt (3:1)] e o azido **21** em mistura de anômeros *α:β* 1:0,26 (0,292 g, 0,78 mmol, 30%).
RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 6,31 (1H, d, *J* 3,6 Hz, H-1*α*) 5,67 (0,26H, d, *J* 8,3 Hz, H-1*β*) 5,03-4,94 (1,52H, m, H-2*β*, H-4*α*, H-4*β*) 4,95 (1H, dd, *J* 3,6 e 10,7 Hz, H-2*α*) 4,23 (0.26H, m, H-6b*β*), 4,22 (1H, dd, *J* 4.6; 12.7 Hz, H-6b*α*); 4,12-4,02 (2,26H, m, H-5*α*, H-6a*α*, H-6a*β*) 3,97 (1H, t, *J* 10,4 Hz, H-3*α*) 3,79 (0,26H, ddd, *J* 2,3, 4,6 e 9,9 Hz, H-5*β*) 3,69 (0,26 H, t, *J* 10,1 Hz, H-3*β*) 2,19, 2,14, 2,10, 2,10 (12H, 4s, 4x COC*H*$_3$, isômero principal). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 170,6, 169,3, 169,0, 169,0, 168,5 (5 x C=O), 91,9 (C-1*β*), 87,3 (C-1*α*), 73,5, 70,1, 70.0, 69,9, 67,8, 67,8, 64,2, 61,5 (C-6), 60,8, 20,8, 20,6, 20,6, 20,4 (4 x CO*C*H$_3$).

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-*β*-D-glicopiranosídeo de metila 22

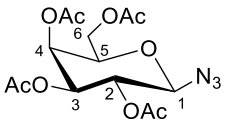


Sob atmosfera de argônio, *β*-D-glicopiranosídeo de metila **37** (0,194 g, 1,0 mmol) foi dissolvido em piridina anidra (2 mL). A solução foi resfriada a 0°C e cloreto de tosila (0,285 g, 1,5 mmol) foi lentamente adicionado, sendo a mistura mantida sob agitação à temperatura ambiente por 8h. A reação foi novamente resfriada para lenta adição de anidrido acético (1,2 mL) e agitada por mais 12 horas. Decorrido esse tempo, o meio foi co-evaporado com tolueno sob pressão reduzida e a mistura bruta purificada por cromatografia *flash* utilizando gradiente da mistura [AcOEt/Tolueno, 10–30%] para obtenção do tosilato **38** (0,32 g, 0,67 mmol, 68%). Uma suspensão do tosilato (0,09 g, 0,189 mmol) e azida de sódio (0,188 g, 2,89 mmol) em DMF foi aquecida a 100°C por 16 horas. Após esse tempo o solvente foi co-evaporado com tolueno e o resíduo diluído em água (15 mL) e extraído com DCM. A fase orgânica foi então lavada com

água, solução saturada de $NaHCO_3$, seca em $MgSO_4$ e concentrada sob pressão reduzida para obtenção de **22** como filme transparente (0,05g, 0,14 mmol, 52%).

RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5,22 (1H, t_{ap}, *J* 9,5 Hz, H-3), 4,98 (2H, m, H-2 e H-4), 4,47 (1H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 3,70 (1H, ddd, *J* 2,4, 7,5 e 10,0 Hz, H-5), 3,53 (3H, s, OC*H*$_3$), 3,43 (1H, dd, *J* 7,5 e 13,3 Hz, H-6a), 3,20 (1H, dd, *J* 2,4 e 13,3 Hz, H-6b) 2,06, 2,04, 2,01 (9H, 3s, 3 x COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,1, 169,5, 169,3 (C=O) 101,4 (C-1) 73,7 (C-5) 72,7 (C-2) 71,3 (C-4) 69,8 (C-3) 56,9 (O*C*H$_3$) 51,3 (C-6) 20,6, 20,5, 20,5 (3 x CO*C*H$_3$).

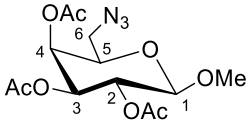
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*β*-D-galactopiranose azido 23



1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-α,*β*-D-galactopiranose **39** (0,78g, 2,56 mmol) foi dissolvida em solução de HBr/AcOH 33% (3,4 mL) e a mistura resultante agitada a temperatura ambiente por 3h. Na sequência, a mistura foi diluída em 22 mL de DCM, lavada com água gelada e soluções saturadas de $NaHCO_3$ e NaCl. A fase orgânica foi então concentrada em evaporador rotatório para redução do volume e, em seguida, foram adicionados TBAHS (186 mg, 0,55 mmol), NaN_3 (0,709 g, 10,9 mmol) e $NaHCO_{3(aq)}$ (4,3 mL). A nova mistura foi agitada vigorosamente por 18h a temperatura ambiente e, após esse período, extraída com acetato de etila (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com soluções saturadas de $NaHCO_3$, NaCl e água, seca em $MgSO_4$ e concentrada para obtenção de um sólido levemente amarelado **23** (0,860 g, 2,30 mmol, 90%).

RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5,43 (1H, dd, *J* 1,1 e 3,3 Hz, H-4), 5,17 (1H, dd, *J* 8,7 e 10,3 Hz, H-2), 5,04 (1H, dd, *J* 3,4 e 10,3 Hz, H-3), 4,60 (1H, d, *J* 8,7 Hz, H-1), 4,17 (2H, m, H-6a e H-6b), 4,02 (1H, td, *J* 1,1 e 6,6 Hz, H-5), 2,18, 2,10, 2,07, 2,00 (12H, 4s, 4x COC*H*$_3$). IV: banda característica de azido 2100 cm^{-1}.

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-*β*-D-galactopiranosídeo de metila 24



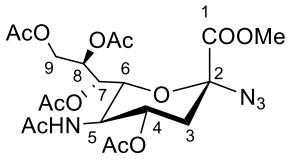
Protocolo 1: Em um balão de duas bocas foram adicionados *β*-D-galactopiranosídeo de metila **41** (0,5 g, 2,67 mmol) e piridina anidra (6 mL). A solução foi resfriada a 0°C e cloreto de tosila (TsCl) (1,410 g, 7,5 mmol) foi lentamente adicionado. A mistura reacional foi mantida

sob agitação à temperatura ambiente por 10h. Anidrido acético (6,5 mL) foi então adicionado e a agitação mantida por mais 12h. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida e co-evaporada com tolueno, a seguir diluída com DCM e lavada com soluções de HCl 1M e $NaHCO_{3(aq)}$, seca em $MgSO_4$ e novamente concentrada. O produto bruto foi purificado por CCC [AcOEt/Tolueno, 15–30%] (0,594 g, 1,25 mmol, 47%). O produto tosilado **42** (0,390 g, 0,82 mmol) foi então adicionado a uma suspensão de NaN_3 (0,815 g, 12,5 mmol) em DMF (10 mL) e a mistura aquecida a 100°C por 24h. Na sequência, o solvente foi co-evaporado com tolueno sob pressão reduzida e o resíduo diluído em DCM e água (15 mL). A fase orgânica foi então lavada com água, solução saturada de $NaHCO_3$, seca em $MgSO_4$ e concentrada sob pressão reduzida para obtenção de um sólido branco cristalino **24** (0,262 g, 0,76 mmol, 90%).

Protocolo 2: A uma suspensão de *β*-D-galactopiranosídeo de metila **41** (0,3 g, 1,54 mmol) em 2,2-dimetoxipropano (12 mL) foi adicionado *p*-TSOH (0,015 g, 0,07 mmol). Após 5 horas sob agitação a temperatura ambiente, a reação foi neutralizada com Et_3N e concentrada. A mistura foi então purificada por cromatografia *flash* [AcOEt/hexano (8:2)] para obtenção de 3,4-*O*-(1-metil-etilideno)-*β*-D-galactopiranosídeo de metila **43** (0,318 g, 1,35 mmol, 88%). O galactopiranosídeo **43** (0,318 mg, 1,35 mmol) foi então dissolvido em piridina anidra e a mistura resfriada a 0 °C. Cloreto de tosila (702 mg, 3,74 mmol) foi lentamente adicionado e a mistura mantida sob agitação a temperatura ambiente por uma noite. O solvente foi então co-evaporado com tolueno e, sem tratamento prévio do produto **44** obtido, DCM (12 mL), MeOH (3 mL) e *p*-TSOH (~ pH 3) adicionados ao mesmo balão, sendo a nova mistura mantida sob agitação por mais 12h. A solução foi então neutralizada com Et_3N e seca sob pressão reduzida. Ao resíduo formado foram adicionados 2 mL de piridina e 0,5 mL de Ac_2O (lentamente gotejado) e a mistura resultante agitada por 12h a temperatura ambiente, sendo a seguir seca sob pressão reduzida. O produto tosilado **42** foi purificado por cromatografia *flash* automatizada [*n*-hexano/AcOEt (1:1)] (0,342 g, 0,75 mmol, 56%).

RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 5,34 (1H, dd, *J* 3,4 Hz), 5,22 (1H, dd, *J* 7,9 e 10,5 Hz), 5,02 (1H, dd, *J* 3,4 e 10,5 Hz), 4,43 (1H, d, *J* 7,9 Hz), 3,85 (1H, ddd, *J* 1,0, 4,1 e 8,4 Hz), 3,56 (1H, m), 3,56 (3H, s, OC*H*$_3$), 3,12 (1H, dd, *J* 4,1 e 12,9 Hz, H-6b), 2,17, 2,07, 1,99 (9H, 3s, 3 x COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 170,2, 170,1, 169,5 (C=O), 102,1 (C-1), 73,0, (C-5), 70,8 (C-3), 68,7 (C-2), 68,0 (C-4), 57,1 (O*C*H$_3$) 50,6 (C-6), 20,8, 20,6, 20,5 (*C*OCH$_3$). IV: banda característica de azido em 2140 cm^{-1}.

5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetil-2-azido-2,3,5-tri-desoxi-D-glicero-*β*-D-galacto-2-nonulopiranosonato de metila 25



Em um balão de fundo redondo, o derivado éster metílico **47** (0,4 g, 0,75 mmol) foi dissolvido em cloreto de acetila (8 mL) e a solução resultante resfriada a –20°C. Na sequência, $HCl_{(g)}$ foi adicionado à reação por cerca de 30 min. até a saturação do meio (b. A mistura foi então levada à temperatura ambiente e submetida à agitação por cerca de 24 h. Decorrido esse tempo, a reação foi concentrada e co-evaporada com tolueno várias vezes, sendo **48** obtido como um sólido branco amorfo (0,221 g, 0,43 mmol, 59%).

Uma mistura do cloreto **48** (0,150 g, 0,3 mmol), hidrogenossulfato de tetrabutilamônio (0,102 g, 0,3 mmol) e azida de sódio (0,097 g, 1,5 mmol) em DCM/$NaHCO_{3(aq)}$ 1:1 (6 mL) foi agitada vigorosamente por 3 horas a temperatura ambiente. Diclorometano foi então adicionado e as fases separadas em funil de separação. A fase orgânica foi lavada com $NaHCO_{3(aq)}$, seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi filtrado com acetato de etila em sílica *flash* fornecendo o azido **25** (0,095 g, 0,19 mmol, 63%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 5,32 (3H, m, H-6, H-7, H-8) 5,05 (1H, td, *J* 4,7, 10,9 e 11,1 Hz, H-4), 4,35 (1H, dd, *J* 1,6 e 12,3 Hz, H-9a), 4,12 (1H, m, H-5), 4,05 (1H, m, H-9b), 3,87 (3H, s, OCH_3), 2,56 (1H, dd, *J* 4,7 e 13,0 Hz, H-3_{eq}), 2,14, 2,11, 2,04, 2,03 (4H, s, 4 x COCH_3), 1,87 (3H, s, NHCOCH_3), 1,86–1,80 (1H, m, H-3_{ax}).

4.2.3 Síntese de *glycoclusters*

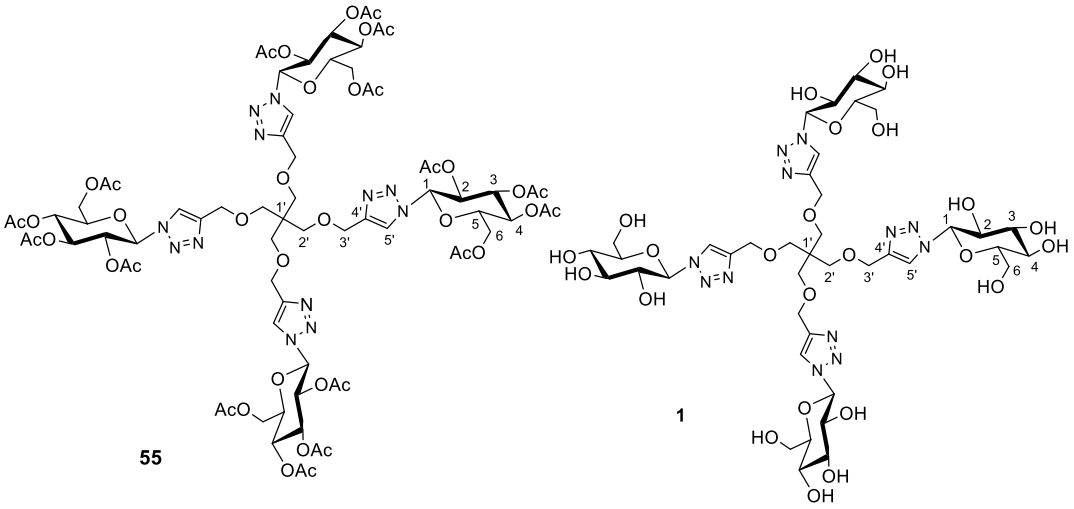
Protocolo geral (1) para síntese dos *glycoclusters* tetravalentes derivados do bloco 17

Em um tubo de micro-ondas equipado com barra magnética para agitação foram adicionados Tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** (0,007 g, 0,025 mmol), dissolvido em 0,2 mL de DMF, solução aquosa de sulfato de cobre ($CuSO_4$) 10%, ascorbato de sódio (0,010 g, 0,052 mmol) e um dos azido-carboidratos **19** a **24** (0,11 mmol). A mistura foi agitada por 30 segundos e aquecida a 80°C (100W) por 30 minutos, em 3 ciclos de 10 minutos cada, no reator de micro-ondas. A mistura bruta foi então co-evaporada com tolueno várias vezes e o resíduo sólido purificado por cromatografia *flash* utilizando gradiente crescente de uma mistura hexano/ acetato de etila [AcOEt/*n*-hexano (0-100%)].

Protocolo geral para remoção de grupos acetila

Os *glycoclusters* peracetilados foram dissolvidos em metanol (2 mL) e uma solução de metóxido de sódio (1 M em MeOH) foi adicionada à mistura até que essa atingisse pH 9. A solução foi então mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente, quando foi neutralizada com resina ácida DOWEX [H^+], filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obtenção dos *glycoclusters* completamente desprotegidos em rendimentos quase sempre quantitativos.

***Glycoclusters* 55 e 1**

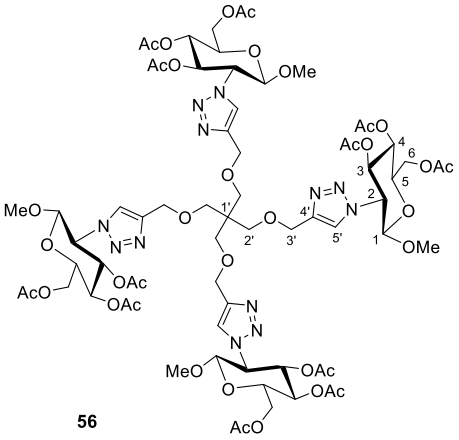


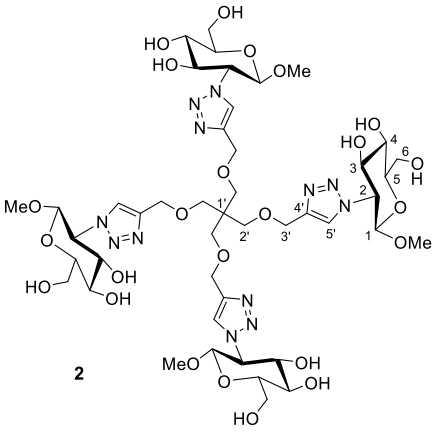
O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **55**, a partir do azido comercial **19**, como um sólido branco amorfo (36,9 mg, 0,02 mmol, 83%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8,01 (4H, s, C*H* triazol-5'), 6,05 (4H, d, *J* 9,3 Hz, H-1), 5,59 (4H, t, *J* 9,3 Hz, H-2), 5,46 (4H, t, *J* 9,2 Hz, H-3), 5,39 (4H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 4,62 (8H, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-3'), 4,33 (4H, dd, *J* 4,9 e 12,6 Hz, H-6a) 4,17 (4H, dd *J* 2,0 e 12,6 Hz, H-6b) 4,11 (4H, ddd, *J* 2,0, 4,9, e 9,8 Hz, H-5) 3,46 (8H, s, H-2'), 2,09 (12H, s, COCH_3), 2,04 (12H, s, COCH_3), 2,03 (12H, s, COCH_3), 1,80 (12H, s, COCH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,5, 170,0, 169,5, 168,8 (4 x C=O), 146,0 (C_{qt} triazol-4'), 121,4 (*C*H triazol -5'), 85,5 (C-1), 74,9 (C-5), 72,9 (C-3), 70,3 (C-2'), 69,1 (C-2), 67,8 (C-4), 64,8 (C-3'), 61,6 (C-6), 45,3 (C_{qt}-1'), 20,6, 20,6, 20,5, 20,0 (4 x CO*C*H_3). HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^+$ 1803,5739, encontrada 1803,5736 [M+Na^+].

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **1** a partir de **55**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ: 8,08 (4H, s, C*H* triazol-5'), 5,63 (4H, d, *J* 9,2 Hz, H-1), 4,41 (8H, s, H-3'), 3,89 (4H, t, *J* 9,2 Hz,

H-2), 3,63 (20H, m), 3,26 (8H, s, H-2'). HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{64}N_{12}NaO_{24}^+$ 1131,4049, encontrado 1131,4031 [M+Na^+].

***Glycoclusters* 56 e 2**

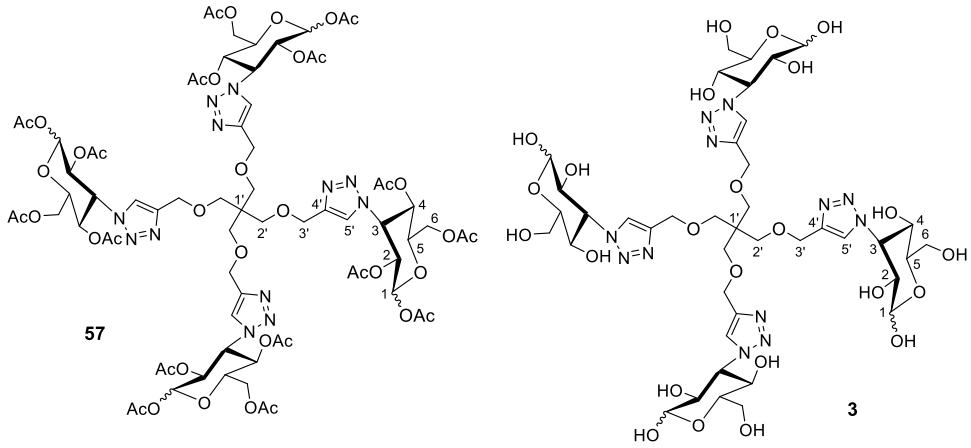




O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **56,** a partir do bloco azido **20**, como um filme transparente (27,9 mg, 0,017 mmol, 67%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,63 (4H, s, C*H* triazol-5'), 5,86 (4H, dd, *J* 9,3, 10,6 Hz, H-3), 5,22-5,13 (8H, m, H-1, H-4), 4,54 (8H, s, H-3'), 4,51 (4H, m, H-2), 4,39 (4H, dd, *J* 4,7, 12,3 Hz, H-6a), 4,20 (4H, dd, *J* 2,0, 12,3 Hz, H-6b), 4,04 (4H, ddd, *J* 2,0, 4,7, 10,0 Hz, H-5), 3,42 (12H, s, OCH_3), 3,37 (8H, s, H-2'), 2,10 (12H, s, COCH_3), 2,03 (12H, s, COCH_3), 1,82 (12H, s, COCH_3). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,8, 169,8, 169,2 (3 x C=O), 145,0 (C_{qt} triazol-4'), 123,8 (*C*H triazol-5'), 101,5 (C-1), 72,3 (C-3), 71,9 (C-4), 69,2 (C-2'), 69,0 (C-5), 64,9 (C-6), 64,0 (C-3'), 62,0 (C-2), 57,6 (O*C*H_3), 45,0 (C_{qt}-1'), 20,8, 20,7, 20,4 (3 x CO*C*H_3). HRMS m/z calcd. para $C_{69}H_{96}N_{12}NaO_{36}^+$ 1691,5942, encontrada 1691,5940 [M+Na^+].

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **2** a partir de **56**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 8,06 (4H, s, C*H* triazol-5'), 4,96 (4H, d, *J* 8,4 Hz, H-1), 4,53 (8H, s, H-3'), 4,39 (4H, dd, *J* 8,4 e 10,5 Hz, H-2), 4,20 (4H, dd, *J* 8,8 e 10,5 Hz, H-3), 3,98 (4H, dd, *J* 2,0 e 12,4 Hz, H-6a), 3,80 (4H, t, *J* 5,6 e 12,4 Hz, H-6b), 3,68 (4H, ddd, *J* 2,0, 5,6 e 9,6 Hz, H-5), 3,59 (4H, t, *J* 9,6 Hz, H-4), 3,37 (8H, s, H-2'), 3,32 (12H, s, OCH_3). MALDI-TOF m/z calcd. para $C_{45}H_{73}N_{12}NaO_{24}^+$ 1187,4675, encontrada 1187,445 [M+Na^+]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

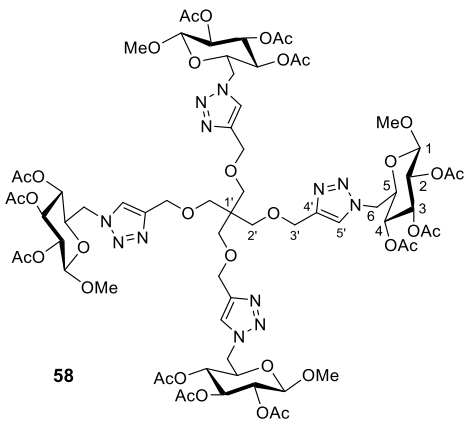
***Glycoclusters* 57 e 3**

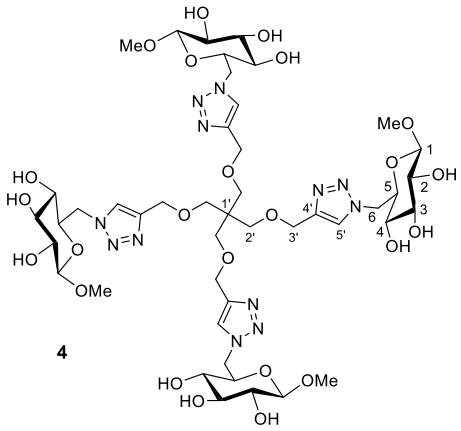


O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **57,** a partir do bloco azido **21**, como uma mistura *α*/*β* (24,9 mg, 0,014 mmol, 56%) RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ:* 7,87 (4H, s, C*H* triazol *α* – 5'), 7,82 (1,13, s, C*H* triazol *β* - 5'), 6,46 (4H, t, *J* 3,2 Hz, H-1, anômero *α*), 5,87 (1,13H, d, *J* 8,1 Hz, H-1, anômero *β*), 5,72 (4H, ddd, *J* 1,0, 3,5 e 11,3 Hz), 5,58 (6H, m), 5,61-5,44 (8H, m), 5,19 (4H, t, *J* 10,8 Hz, H-3), 4,45 (12H, m), 4,28 (12H, m), 4,15 (1,13, m), 3,37 (12H, m), 2,23, 2,14, 2,08, 2,07, 1,89, 1,87 (s, 6 x COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 170,5, 169,4, 169,3, 168,6, 168,5 (5 x C=O), 145,9 ($C_{qt.}$, triazol-4'), 145,9 (C_{qt}, triazol-4'), 121,4 (*C*H triazol-5'), 92,2 (C-1), 88,7 (C-1), 73,9, 70,5, 69,4, 69,2, 68,5, 67,4, 64,8, 64,0, 61,8, 60,2, 53,4, 45,1 ($C_{qt.}$, 1'), 20,8, 20,7, 20,6, 20,1 (4 x CO*C*H$_3$). HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^{+}$ 1803,5739, encontrada 1803,5741 [M+Na$^+$].

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **3** a partir de **57**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O) *δ*: 8,10 e 8,08 (4H, 2s, C*H* triazol), 5,35 (2,25H, d, *J* 3,4 Hz, H-1, anômero *α*), 4,88 (2H, d, H-1, anômero *β*), 4,71-4,67 (2,25H, m), 4,58-4,53 (10H, m, C*H*$_2$), 4,20 (2,25, dd, *J* 3,4 e 10,5 Hz, H-2 *α*), 4,07-3,98 (6H, m), 3,94-3,74 (12H, m), 3,70-3,65 (2,25H, m), 3,38 (8H, s). HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{64}N_{12}NaO_{24}^{+}$ 1131,4049, encontrada 1131,4047 [M+Na$^+$].

***Glycoclusters* 58 e 4**

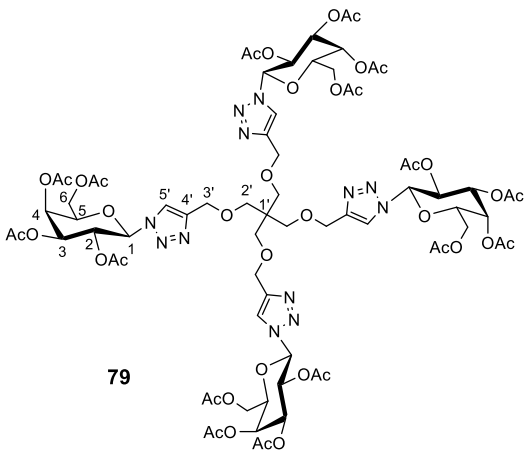


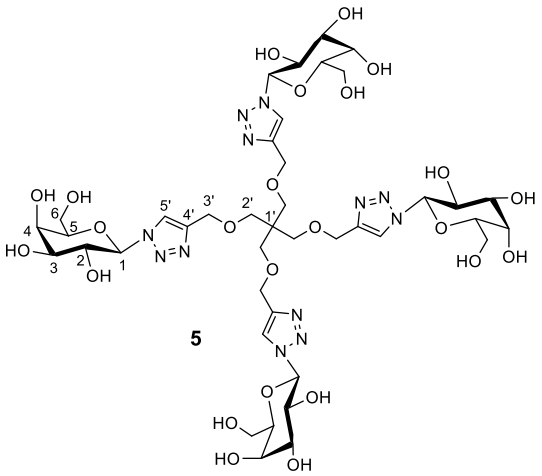


O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **58**, a partir do bloco azido **22**, como um sólido branco (21,7 mg, 0,013 mmol, 52%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,70 (4H, s, C*H*-triazol-5'), 5,24 (4H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 4,96 (4H, t, *J* 8,7 Hz, H-2), 4,91 (4H, t, *J* 9,5 Hz, H-3), 4,63 (4H, dd, *J* 1,7, 14,4 Hz, H-6a), 4,53 (8H, s, H-3'), 4,45 (4H, dd, *J* 8,5; 14,4 Hz, H-6b) 4,36 (4H, d, *J* 8,0 Hz, H-1) 3,96 (4H, t_{ap}, *J* 7,6 Hz, H-5) 3,41 (8H, s, H-2'), 3,34 (12H, s, OCH_3) 2,09 (12H, s, COCH_3), 2,04 (12H, s, COCH_3), 2,00 (12H, s, COCH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,0, 169,2, 169,3 (3 x C=O), 145,2 (C_{qt} triazol-4'), 124,2 (*C*H triazol-5'), 101,5 (C-1), 72,6, 72,3, 71,2, 70,1, 69,1 (C-2'), 64,9 (C-3'), 57,0 (O*C*H_3), 50,8 (C-6), 20,6, 20,6, 20,5 (3 x CO*C*H_3). HRMS m/z calcd. para $C_{69}H_{96}N_{12}NaO_{36}^{+}$ 1691,5942, encontrada 1691,5912 [M+Na^{+}].

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **4** a partir de **58**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ: 7,99 (4H, s, C*H* triazol-5'), 4,89 (4H, dd, *J* 2,0 e 12,6 Hz, H-6a), 4,59 (4H, dd, *J* 8,5 e 12,6 Hz, H-6b), 4,53 (8H, s, H-3'), 4,25 (4H, d, *J* 7,9 Hz, H-1), 3,76 (4H, t_{ap}, *J* 8,5 Hz, H-5), 3,51 (4H, t, *J* 9,2 Hz, H-4), 3,33 (20H, 4 x OCH_3; H-2'), 3,25 (8H, m, H-2 e H-3). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 79 e 5**

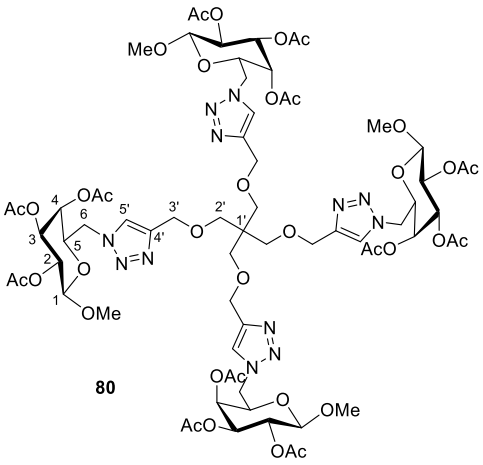


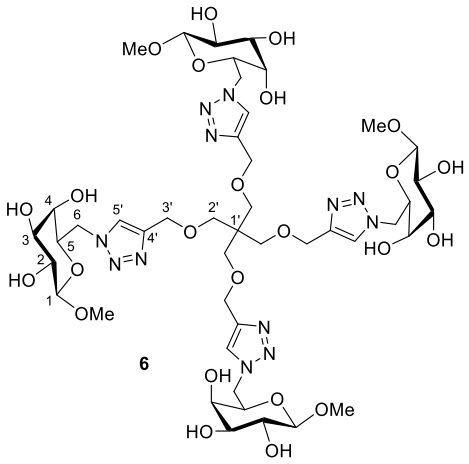


O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **79**, a partir do bloco azido **23**, como um sólido branco (0,032 g, 0,018 mmol, 75%). RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,89 (4H, s, C*H*-triazol-5'), 5,98 (4H, d *J* 9,3 Hz, H-1), 5,63 (4H, t *J* 9,7 Hz, H-2), 5,56 (4H, d, *J* 3,3 Hz, H-4), 5,32 (4H, dd, *J* 3,3 e 10,2 Hz, H-3) 4,60 (8H, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-3'), 4,33 (4H, t_{ap}, *J* 6,4 Hz, H-5), 4,18 (8H, m, H-6a e H-6b), 3,42 (8H, s, H-2'), 2,21 (12H, s, COCH_3), 2,04 (12H, s, COCH_3), 2,00 (12H, s, COCH_3), 1,76 (12H, s, COCH_3). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,3, 170,1, 170,0, 168,9 (*C*OCH_3), 145,6 ($C_{qt.}$ triazol-4'), 122,0 (*C*H triazol-5'), 85,7 (C-1), 73,7 (C-5), 70,9 (C-3), 69,1 (C-2') 67,9 (C-2), 67,0 (C-4), 64,7 (C-3'), 61,0 (C-6), 45,4 (C-1') 20,7, 20,6, 20,5, 20,1 (4 x CO*C*H_3). HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^{+}$ 1803,5739, encontrada 1803,5736 [M+Na^{+}].

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **5** a partir de **79**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 8,25 (4H, s, C*H* triazol-5'), 5,69 (4H, d, *J* 9,2 Hz, H-1), 4,64 (8H, s, H-2'), 4,20 (4H, t, *J* 9,5 Hz, H-2), 4,07 (4H, d, *J* 3,0 Hz, H-4), 3,99 (4H, t_{ap}, *J* 6,0 Hz, H-5), 3,87 (4H, dd, *J* 3,1 e 9,8 Hz, H-3), 3,76 (8H, m, H-6a e H-6b), 3,61 (8H, s, H-2'). HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{65}N_{12}O_{24}^{+}$ 1109,4229, encontrada 1109,4228 [M+H^{+}].

***Glycoclusters* 80 e 6**

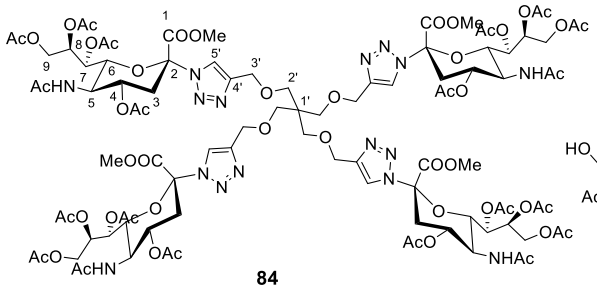




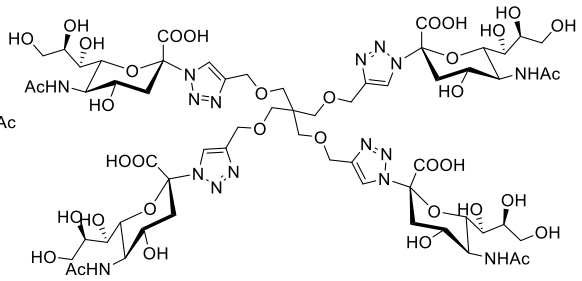
O protocolo geral (**1**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **80** como um sólido branco (0,023 g, 0,014 mmol, 58%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,85 (4H, s, C*H*-triazol-H-5'), 5,55 (4H, d, *J* 3,1 Hz, H-4), 5,23 (4H, dd, *J* 7,8 e 10,4 Hz, H-2), 5,14 (4H, dd, *J* 3,1 e 10,4 Hz, H-3), 4,64 (4H, dd, *J* 3,3 e 14,3 Hz, H-6a), 4,54 (12H, m, H-6b e H-3'), 4,39 (4H, d, *J* 7,8 Hz, H-1), 4,34 (4H, dd, *J* 3,3 e 8,8 Hz, H-5), 3,39 (8H, m, H-2'), 3,36 (12H, s, O*CH*$_3$), 2,21 (12H, s, COC*H*$_3$), 2,06 (12H, s, COC*H*$_3$), 2,00 (12H, s, COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,4, 170,1, 168,6 (C=O), 145,7 (C_{qt} triazol-4'), 123,8 (*C*H triazol-5'), 101,7 (C-1), 71,8 (C-5), 70,8 (C-3), 69,1 (C-2') 68,7 (C-2), 68,1 (C-4), 64,9 (C-3'), 56,9 (O*C*H$_3$), 50,3 (C-6), 20,8, 20,7, 20,5 (4 x CO*C*H$_3$).

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **6** a partir de **80**, como um sólido branco em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 7,98 (4H, s, C*H* triazol H-5'), 4,70-4,49H (16H, m), 4,12 (4H, d, *J* 7,9 Hz, H-1), 4,01-3,97 (8H, m), 3,64 (4H, dd, *J* 3,2 e 9,8 Hz, H-3), 3,50 (4H, dd, *J* 8,15 e 9,6 Hz, H-2), 3,32-3,26 (20H, m, O*CH*$_3$ e H-2'). HRMS m/z calcd. para $C_{45}H_{73}N_{12}O_{24}^{+}$ 1165,4855, encontrado 1165,4433 [M+H^{+}].

Glycocluster de ácido siálico 84 e 7



84



7

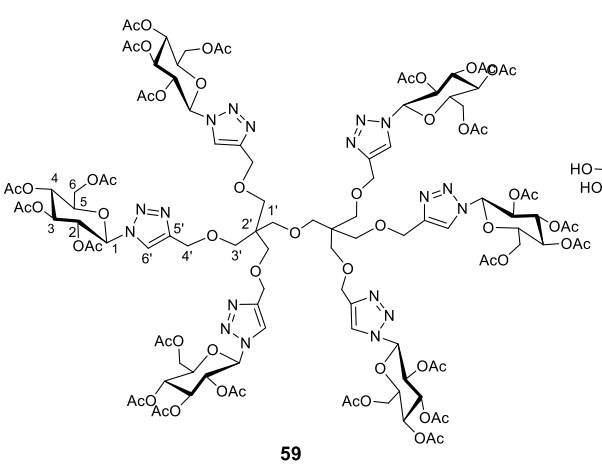
Em um balão de fundo redondo foram adicionados tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** (0,007 g, 0,025 mmol)**,** dissolvido 0,2 mL de DMF, sulfato de cobre ($CuSO_4$) 10%, ascorbato de sódio (0,010 g, 0,052 mmol) e o azido **25** (0,11 mmol). A mistura foi aquecida a 60°C e agitada por 12h. DMF foi então removido por co-evaporações sucessivas com tolueno e o resíduo sólido purificado por cromatografia *flash* utilizando gradiente crescente de uma mistura [AcOEt//hexano (0-100%)], seguido de eluição com [DCM/MeOH (95:5)]. O glycocluster 84 foi obtido com 52% de rendimento. RMN de ^{1}H (300 MHz, MeOD) δ: 8,12 (4H, s, C*H*-triazol-5'), 5,46–5,36 (8H, m, H-4 e H-6), 5,11 (4H, td, *J* 4,6; 11,6 Hz, H-8), 4,58 (8H, s, H-3'), 4,41 (4H, dd, *J* 2,0 e 10,7 Hz, H-9a), 4,25 (4H, dd, *J* 2,3 e 12,4 Hz, H-7), 4,16–4,01 (8H, m, H-5 e H-9b), 3,81 (12H, s, 4 x COOMe), 3,58 (8H, s, H-2'), 3,38 (4H, dd, *J* 4,4 e 13,0 Hz, H-3_{eq}), 2,55 (4H, t, *J* 12,6 Hz, H-3_{ax}), 2,15 (12H, s, COCH_3), 2,07 (12H, s, COCH_3), 2,04 (12H, s, COCH_3), 1,98 (12H, s, COCH_3), 1,86 (12H, s, CH_3CONH). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{97}H_{132}N_{16}NaO_{52}^+$ 2375,8069, encontrada 2376.630 [M + Na^+]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

A desproteção parcial do *glycocluster* **84** foi realizada seguindo protocolo geral de desproteções (remoção de grupos acetila). Após evaporação do metanol, a mistura resultante foi dissolvida em solução aquosa de KOH 0,2 M e agitada por 12h para clivagem do éster metílico. O produto **7** foi então obtido como um sólido branco higroscópico. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 8,16 (4H, s, C*H*-triazol-5'), 4,44 (8H, s, H-3'), 3,85-3,74 (20H, m), 3,54 (8H, m, H-5 e H-7), 3,32–3,28 (8H, m, H-8 e H-9), 3,17-3,13 (4H, m, H-3_{eq}), 2,17-2,13 (4H, m, H-3_{ax}), 2,00 (12H, s, CH_3CONH).

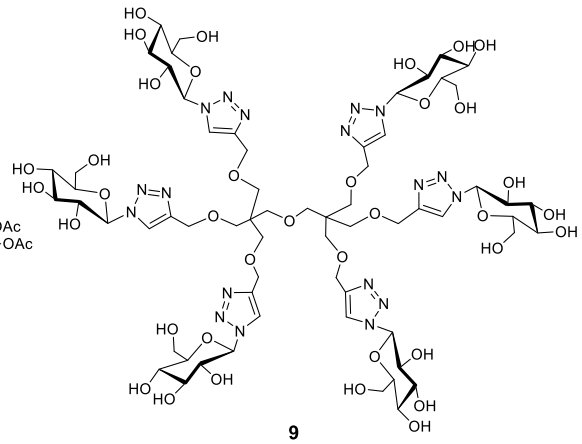
Protocolo geral (2) para síntese dos *glycoclusters* hexavalentes derivados do bloco 18

Em um tubo de micro-ondas equipado com barra magnética para agitação foram adicionados Hexa-*O*-propargil-dipentaeritritol **18** (0,012 g, 0,025 mmol), dissolvido em 0,2 mL de DMF, sulfato de cobre ($CuSO_4$) 10%, ascorbato de sódio (0,01 g, 0,052 mmol) e um dos blocos azido citados na seção **19-24** (0,165 mmol). A mistura foi agitada por 30 segundos e aquecida a 80°C (100W) em 3 ciclos de 10 minutos no reator de micro-ondas. A mistura bruta foi então co-evaporada com tolueno várias vezes e o resíduo sólido purificado por cromatografia *flash* utilizando gradiente crescente de uma mistura [AcOEt/*n*-hexano (0-100%)], seguido de eluição com [DCM/MeOH (95:5)].

***Glycoclusters* 59 e 9**



59



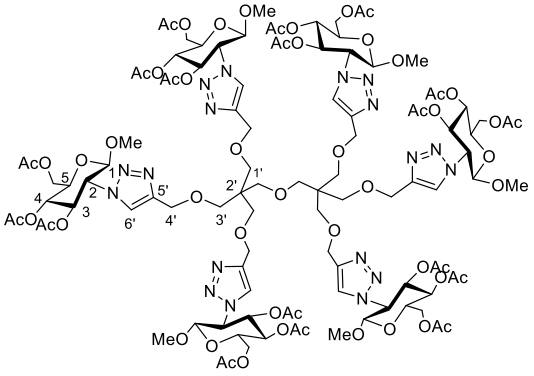
9

O protocolo geral (**2**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **59** como um sólido levemente amarelado (0,05 g, 0.019 mmol, 78%). RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8,16 (6H, s, C*H* triazol-6'), 6,10 (6H, d, *J* 9.4 Hz, H-1), 5,62 (6H, t, *J* 9,4 Hz, H-2), 5,46 (6H, t, *J* 9,3 Hz, H-3), 5,42 (6H, t, *J* 9,6 Hz, H-4), 4,59 (12H, m, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-4'), 4,31 (6H, dd, *J* 4,9 e 12,7 Hz, H-6a), 4,14 (12H, m, H-5, H-6b), 3,42 (12H, s, H-3'), 3,25 (4H, s, H-1'), 2,09 (18H, s, CO*C*H_3), 2,03 (18H, s, CO*C*H_3), 1,99 (18H, s, CO*C*H_3), 1,76 (18H, s, COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,5, 170,0, 169,5, 168,8 (4 x C=O), 145,9 ($C_{qt.}$, triazol-5'), 121,9 (*C*H triazol-6'), 85,5 (C-1), 74,9 (C-5), 73,0 (C-3), 70,4 (C-2), 69,1 (C-3'), 67,9 (C-4), 64,9 (C-6), 61,7 (C-4'), 60,3 (C-1'), 45,6 ($C_{qt.}$-2'), 20,6, 20,6, 20,5, 20,0 (4 x CO*C*H_3). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

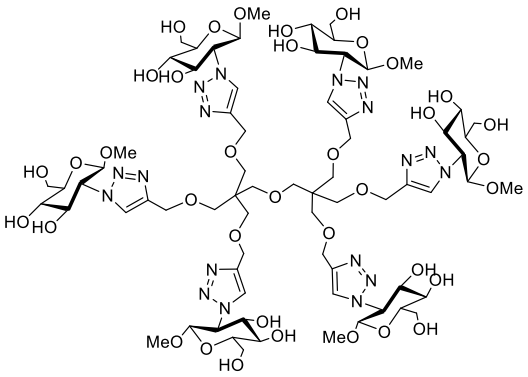
O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **9** como um sólido branco a partir de **59**, em rendimento quantitativo. RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O) δ: 8,16 (6H, s,

C*H* triazol-6'), 5,71 (6H, d, *J* 9,2 Hz, H-1), 4,48 (12H, s, H-4'), 3,96 (6H, t, *J* 9,2 Hz, H-2), 3,83 (8H, d, *J* 11,6 Hz), 3,71 (18H, m), 3,60 (6H, t, *J* 9,4 Hz), 3,29 (12H, s, H-3'), 3,16 (4H, s, H-1'). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 60 e 10**



60

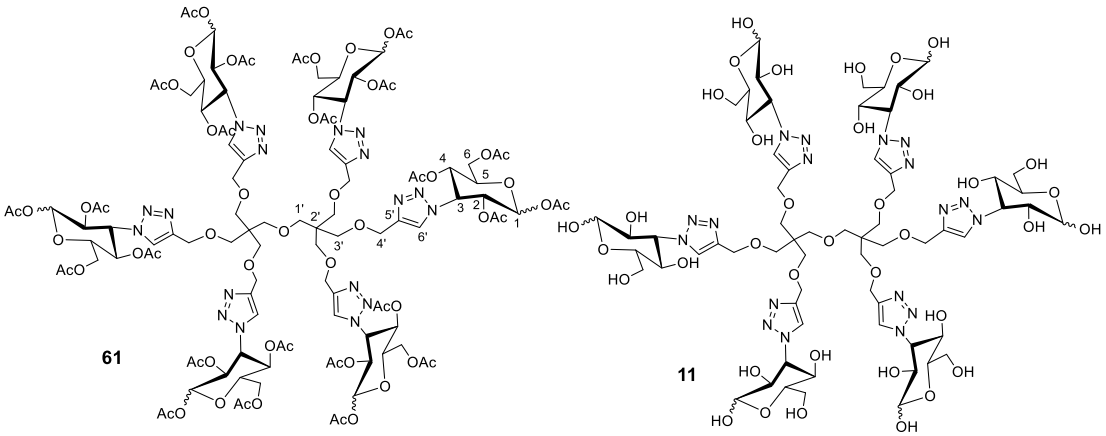


10

O protocolo geral (**2**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **60** como um sólido levemente amarelado (0,04 g, 0,015 mmol, 62%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,64 (6H, s, H-triazol-6'), 5,87 (6H, dd, *J* 9,3 e 10,4 Hz, H-3), 5,20-5,14 (12H, m, H-1, H-4), 4,55-4,52 (18H, m, H-2, H-4'), 4,38 (6H, dd, *J* 4,7 e 12,3 Hz, H-6a), 4,22 (6H, dd, *J* 1,9 e 12,3 Hz, H-6b), 4,05 (6H, ddd, *J* 1,9, 4,7 e 10.0 Hz, H-5), 3,43 (18H, s, OC*H*$_3$), 3,41-3,37 (16H, m, H-3' e H-1'), 2,10 (18H, s, COC*H*$_3$), 2,03 (18H, s, COC*H*$_3$), 1,82 (18H, s, COC*H*$_3$). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **10** a partir do composto **60**. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 8,07 (6H, s, C*H* triazol-6'), 4,96 (6H, d, *J* 8,4 Hz, H-1), 4,52 (12H, s, H-4'), 4,38 (6H, t, *J* 9,4 Hz, H-2), 4,20 (6H, t, *J* 9,7, H-3), 3,98 (4H, dd, *J* 2,0 e 12,4 Hz, H-6a), 3,80 (6H, t, *J* 5,8 e 12,4 Hz, H-6b), 3,67 (6H, m, H-5), 3,59 (6H, t, *J* 9,7 Hz, H-4), 3,39 (12H, s, H-3'), 3,32 (18H, s, OC*H*$_3$), 3,24 (4H, s, H-1'). HRMS m/z calcd. for $C_{70}H_{112}N_{18}NaO_{37}^+$ 1819,7128, found 1819,7186 [M+Na$^+$].

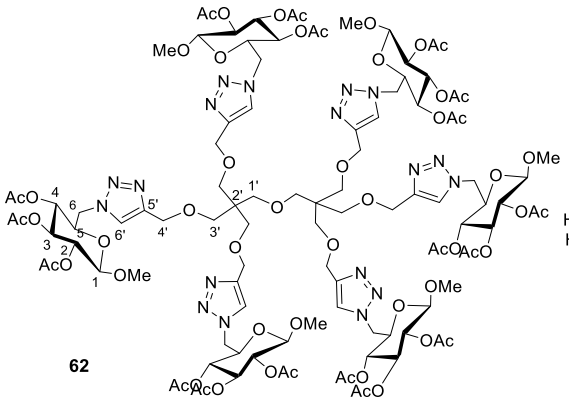
***Glycocluster* 61 e 11**

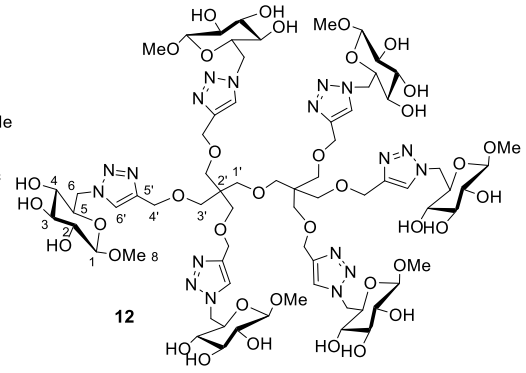


O protocolo geral (**2**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **61** em mistura de anômeros 1:0.25 (*α/β*) como um sólido levemente amarelado (0,04 g, 0.014 mmol, 55%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 7,87 (6H, s, C*H* triazol anômero-*β*-6'), 7,83 (1,65, s, C*H* triazol anômero-*α*-6'), 6,46 (6H, t, *J* 3,2 Hz, H-1 anômero *α*), 5,87 (1,65 H, d, *J* 8,1 Hz, anômero *β*), 5,73 (6H, ddd, *J* 1,0, 3,5, 11,3 Hz), 5,57 (6H, m), 5,48 (3H, m), 5,19 (6H, t, *J* 10,8 Hz, H-3*α*), 5,00 (1,65H, t, *J* 10,6 Hz, H-3*β*) 4,45 (16H, m), 4,32-4,24 (14H, m), 4,18-4,13 (8,30H, m), 4,02 (1,65H, ddd, *J* 2,1, 4,7 e 9,8 Hz), 3,37 (16H, m), 2,23, 2,14, 2,08, 2,07, 1,89, 1,87 (s, 6 x $COCH_3$). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **11** a partir do composto **61**. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) *δ*: 8,11-8,09 (6H, s, C*H* triazol-6'), 5,36 (3H, d, *J* 3,5 Hz, H-1 anômero-*α*), 4,85 (3,4H, d, H-1 anômero-*β*), 4,73-4,68 (3.4H, m, H3-*β*), 4,58-4,51 (15H, m, H3-*α* e H-4'), 4,21 (3H, dd, *J* 3,4 e 10,5 Hz, H-2*α*), 4,05-4,00 (6H, m), 3,93 (3H, dd, *J* 2,1 e 12,3 Hz, H-6a), 3,90-3,76 (12H, m), 3,69 (3H, ddd, *J* 2,1, 5,5 e 9,6 Hz, H-5*α* ou *β*), 3,39 (12H, s, H-3'), 3,33 (4H, s, H-1'). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycocluster* 62 e 12**





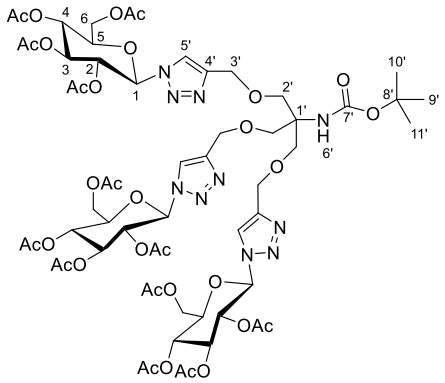
O protocolo geral (**2**) foi seguido para obtenção do *glycocluster* **62** como um sólido branco amorfo (0,037 g, 0,014 mmol, 58%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,71 (6H, s, C*H*-triazol-6'), 5,25 (6H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 4,97 (6H, t, *J* 8,8 Hz, H-2), 4,92 (6H, t, *J* 9,5 Hz, H-3), 4,65 (6H, d, *J* 14,1 Hz, H-6a), 4,54 (12H, m, H-4'), 4,45 (6H, dd, *J* 8,2 e 14,1 Hz, H-6b), 4,37 (6H, d, *J* 7,9 Hz, H-1), 3,96 (6H, t_{ap}, *J* 7,8 Hz, H-5), 3,41-3,35 (34H, m, H-3', H-1', OC*H*$_3$), 2,10, (18H, s, COC*H*$_3$), 2,05 (18H, s, COC*H*$_3$), 2,01 (18H, s, COC*H*$_3$). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

O protocolo geral de desproteção foi seguido para obtenção do *glycocluster* **12** a partir do composto **62**. RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ: 7,97 (6H, s, C*H* triazol-6'), 4,87 (6H, dd, *J* 2,8 e 13,6 Hz, H-6a), 4,55 (6H, dd, *J* 7,5 e 13,6 Hz, H-6b), 4,51 (12H, s, H-4'), 4,23 (6H, d, *J* 7,9 Hz, H-1), 3,74 (6H, m, H-5), 3,49 (6H, t, *J* 9,2 Hz, H-2), 3,36-3,19 (44H, OC*H*$_3$, H-3', H-1', H-3 e H-4), HRMS m/z calcd. para $C_{70}H_{113}N_{18}O_{37}^{+}$ 1797,7369, encontrada 1797,7337 [M+H^{+}].

Protocolo para síntese dos clusters *N*-Boc protegidos 70, 74 e 87

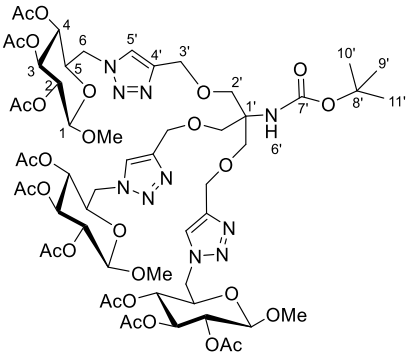
Em um tubo de micro-ondas, equipado com barra magnética para agitação, foram adicionados tris-Boc propargilado **29** (0,05 g, 0,15 mmol), dissolvido em 0,2 mL de DMF, sulfato de cobre ($CuSO_4$) 10%, ascorbato de sódio (0,01 g, 0,052 mmol) e um dos blocos azido: Glu-1-N_3 (**19**), Glu-6-N_3 (**22**) ou Gal-1-N_3 (**23**) (1,1 equivalentes para cada terminação alcino de **29**). A mistura foi agitada por 30 segundos e aquecida a 80°C (100W) em 3 ciclos de 15 minutos no reator de micro-ondas. A mistura bruta foi então co-evaporada com tolueno várias vezes e o resíduo sólido purificado por cromatografia *flash* utilizando gradiente crescente de uma mistura [AcOEt/*n*-hexano (0-100%)].

***Glycocluster* 70**



Glycocluster **70** foi obtido a partir do azido **19** como um sólido branco cristalino (179 mg, 0,12 mmol, 82%). RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,95 (3H, s, C*H* triazol-5'), 5,99 (3H, d, *J* 9,4 Hz, H-1), 5,55 (3H, t, *J* 9,4 Hz, H-2), 5,45 (3H, t, *J* 9,4 Hz, H-3), 5,35 (3H, t, *J* 9,7 Hz, H-4), 4,98 (1H, s, N*H* H-6'), 4,65 (6H, sistema AB, *J* 13,0 Hz, H-3'), 4,32 (3H, dd, *J* 4,9 e 12,6 Hz, H-6a), 4,16 (3H, m, H-6b), 4,08 (3H, m, H-5), 3,77 (6H, sistema AB, *J* 9,3 Hz, H-2'), 2,09 (9H, s, COCH_3), 2,05 (9H, s, COCH_3),, 2,04 (9H, s, COCH_3), 1,83 (9H, s, COCH_3), 1,41 (9H, 3 x CH_3-Boc). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,5, 170,0, 169,5, 168,9 (4 x C=O), 154,9 (C-7'), 145,8 (C_{qt} triazol-4'), 121,4 (*C*H triazol-5'), 85,6 (C-1), 75,1 (C-5), 72,8 (C-3), 70,3 (C-2'), 69,7 (C-2), 67,9 (C-4), 64,8 (C-3'), 61,7 (C-6), 58,5 (C-8'), 28,4 (C-9', C-10', C-11'), 20,7, 20,6, 20,5, 20,12 (4 x COCH_3). HRMS m/z calcd. para $C_{60}H_{83}N_{10}O_{32}^{+}$ 1455,5169, encontrada 1455,5167 [M+H^{+}].

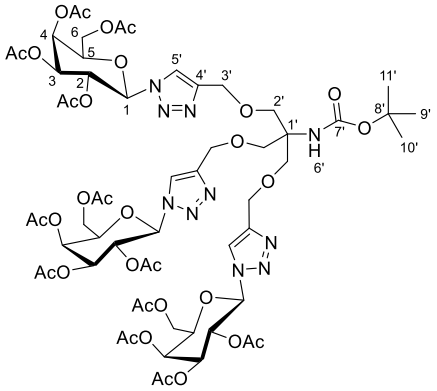
***Glycocluster* 74**



Glycocluster **74** foi obtido a partir do azido **22** como um filme transparente (0,12 g, 0,09 mM, 58%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,69 (3H, s, CH triazol-5'), 5,24 (3H, t, *J* 9,4 Hz, H-4), 4,94 (7H, m, H-2, H-3, N*H* H-6'), 4,66 (3H, dd, *J* 2,4, 14.3 Hz, H-6a), 4,59 (6H, s, H-3'), 4,42 (3H, dd, *J* 8,6 e 14,3 Hz, H-6b), 4,35 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 3,94 (3H, m, H-5), 3,70 (6H, s, H-2'), 3,36 (9H, s, COCH_3), 2,11 (9H, s, COCH_3), 2,05 (9H, s, COCH_3), 2,01 (9H, s,

COC*H*$_3$), 1,40 (3 x C*H*$_3$-Boc). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,0, 169,7, 169,4 (3 x C=O), 154,6 (C-7'), 144,8 (*C*$_{qt.}$ triazol-4'), 124,3 (*C*H triazol-5'), 101,4 (C-1), 72,4, 72,2, 71,0, 69,9 (C-2, C-3, C-4 ou C-5), 69,1 (C-2'), 64,7 (C-3'), 58,2 (C-8'), 57,1 (O*C*H$_3$), 50,8 (C-6), 28,3 (C-9', C-10', C-11'), 20,6, 20,5, 20,5 (3 x CO*C*H$_3$). HRMS m/z calcd. para $C_{57}H_{83}N_{10}O_{29}^+$ 1371,5322, encontrada 1371,5322 [M+H$^+$].

***Glycocluster* 87**



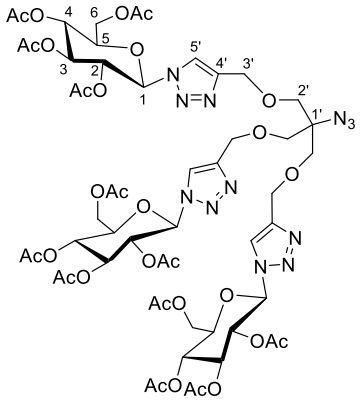
Glycocluster **87** foi obtido a partir do azido **23** como um sólido branco (0,186 g, 0,12 mmol, 84%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,87 (3H, s, triazol-5'), 5,93 (3H, d, *J* 9,2, H-1), 5,61 (3H, t, *J* 9,8 Hz, H-2), 5,55 (3H, m, H-3), 5,29 (3H, dd, *J* 3,4 e 10,2 Hz, H-4), 5,00 (1H, s, N*H* H-6'), 4,64 (6H, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-3'), 4,29 (3H, t_{ap}, *J* 6,7 Hz, H-5), 4,17 (6H, m, H-6a e H-6b), 3,74 (6H, sistema AB, *J* 9,8 Hz, H-2'), 2,22 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,04 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,00 (9H, s, COC*H*$_3$), 1,81 (9H, s, COC*H*$_3$), 1,41 (9H, 3 x C*H*$_3$-Boc). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,3, 170,0, 169,8, 168,9 (4 × *C*OCH$_3$), 154,9 (C-7'), 145,4 (C_{qt} triazol-4'), 121,6 (*C*H triazol-5'), 86,0 (C-1), 73,8 (C-5), 70,8 (C-3), 69,5 (C-2'), 67,9 (C-2), 66,9 (C-4), 64,7 (C-3'), 61,0 (C-6), 58,4 (C-8'), 28,3 (C-9', C-10', C-11'), 20,6, 20,5, 20,1 (4 x CO*C*H$_3$).

Protocolo para síntese dos azidos 67, 76 e 89

A uma solução dos compostos **70, 74** ou **88** em DCM (0,11 mmol/1mL) foi adicionado ácido trifluoroacético 90% (1mL). A mistura permaneceu sob agitação por 2 horas quando a CCC indicou consumo total do material de partida. Os solventes foram então evaporados e co-evaporados com tolueno e metanol. As misturas brutas dessas reações foram dissolvidas em metanol (4mL), resfriadas e adicionadas de quantidade catalítica de $CuSO_4$, $NaHCO_3$ (16,5 mg, 0,23 mmol) e o reagente de diazo-transferência sulfato de 1-H-imidazol-1-sulfonilazido. O pH da solução foi ajustado (8-9) com solução saturada de bicarbonato de sódio. Essa nova mistura foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas. Os solventes foram novamente evaporados e o

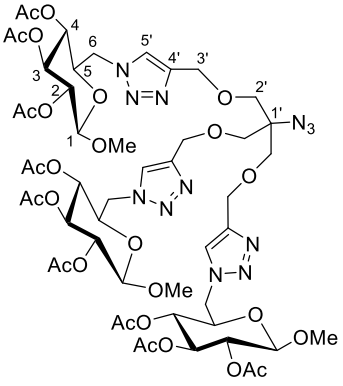
resíduo obtido particionado entre DCM, agua e posteriormente solução de HCl (3%). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e purificada, fornecendo os azidos **67**, **76** e **89** correspondentes.

***Glycocluster* 67**



O método descrito acima foi utilizado para obtenção do composto **67** como um sólido branco amorfo a partir do *glycocluster* trivalente **70** (0,122 g, 0,09 mmol, 78%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,97 (3H, s, C*H* triazol-5'), 5,99 (3H, d, *J* 9,1 Hz, H-1), 5,53 (3H, t, *J* 9,2 Hz, H-2), 5,44 (3H, t, *J* 9,2 Hz, H-3), 5,34 (3H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 4,68 (6H, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-3'), 4,31 (3H, dd, *J* 4,9, 12,6 Hz, H-6a), 4,16 (3H, dd, *J* 1,7 e 12,6 Hz, H-6b), 4,08 (3H, m, H-5), 3,63 (6H, s, H-2'), 2,08 (12H, s, COCH_3), 2,04 (24H, s, 2 x COCH_3), 1,82 (12H, s, COCH_3). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{55}H_{73}N_{12}O_{30}^+$ 1381,4550, encontrada 1395,337. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

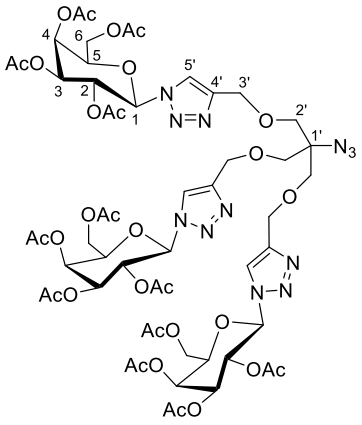
***Glycocluster* 76**



O composto **76** foi obtido pelo método descrito com 61% de rendimento a partir do *glycocluster* trivalente **74** (0,087 g, 0,067 mmol, 61%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,72 (3H, s, C*H* triazol-5'), 5,24 (3H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 4,97 (3H, m, H-2), 4,90 (3H, m, H-3), 4,67 (9H, m, H-

6a, H-3'), 4,43 (3H, dd, *J* 8,5 e 14,4 Hz, H-6b), 4,36 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 3,94 (3H, m, H-5), 3,59 (6H, s, H-2'), 3,37 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,11 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,05 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,01 (9H, s, COC*H*$_3$). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{52}H_{73}N_{12}O_{27}^+$ 1297,4703, encontrado 1297,524 [M+ H^+]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycocluster* 89**

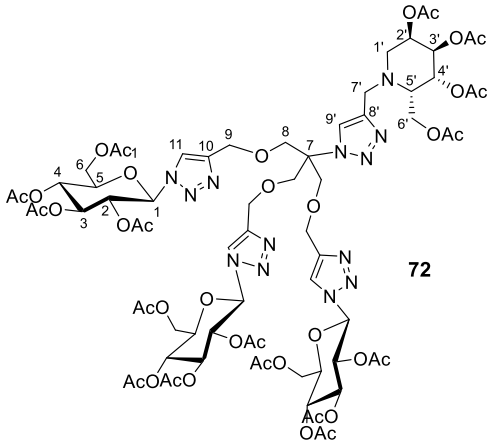


O composto **89** foi obtido pelo método anteriormente descrito com 64% de rendimento a partir do composto trivalente **88** (0,092 g, 0,08 mmol, 64%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 7,92 (3H, s, triazol-5'), 5,93 (3H, d, *J* 9,2, H-1), 5,64-5,56 (6H, m, H-2 e H-4), 5,30 (3H, dd, *J* 3,3 e 10,2 Hz, H-3), 4,69 (6H, sistema AB, *J* 12,8 Hz, H-3'), 4,30 (3H, t_{ap}, *J* 6,5 Hz, H-5), 4,20 (6H, m, H-6a e H-6b), 3,64 (6H, sistema AB, *J* 9,8 Hz, H-2'), 2,23 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,06 (9H, s, COC*H*$_3$), 2,03 (9H, s, COC*H*$_3$), 1,84 (9H, s, COC*H*$_3$).

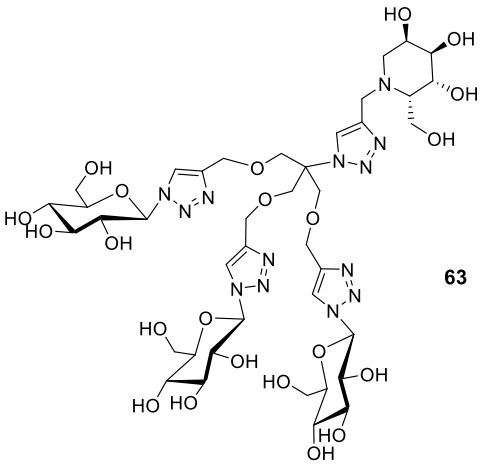
Síntese dos *hetero-glycoclusters*

A síntese dos *hetero-glycoclusters* **63**, **64**, **65**, **66** e **85** foi realizada nas mesmas condições reacionais descritas para a obtenção dos *glycoclusters* derivados do bloco **17** (protocolo geral **1** e protocolo geral de desproteção). As reações foram realizadas na escala de 0,05 mmol, usando o mesmo número de equivalentes para os blocos azido trivalentes **67**, **76** ou **89** e para os blocos funcionalizados com grupos propargila **68**, **69** e **86** .

***Glycoclusters* 72 e 63**



72

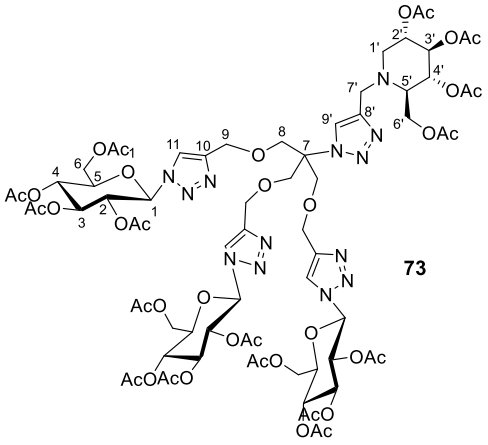


63

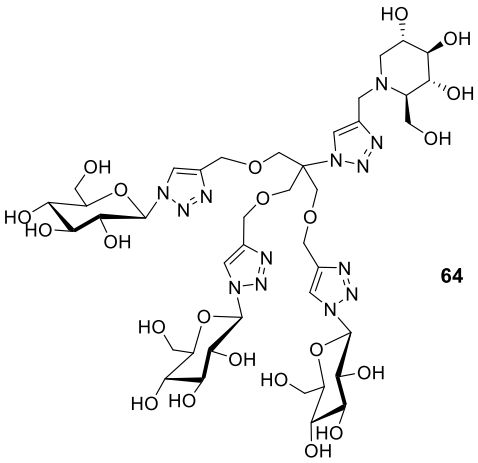
Glycocluster **72.** (35,8 mg, 0,02 mM, 41%). RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,99 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 7,78 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 5,99 (3H, d, *J* 9,1 Hz, H-1), 5,54 (3H, t, *J* 9,1 Hz, H-2), 5,44 (3H, t, *J* 9,3 Hz, H-3), 5,36 (3H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 5,26 (2H, m, H-2', H-3'), 5,19 (1H, dd, *J* 3,2 e 7,9 Hz, H-4'), 4,64 (6H, s, H-9), 4,49 (1H, dd, *J* 6,0 e 11,5 Hz, H-6a'), 4,33 (3H, dd, *J* 4,9, 11,6 Hz, H-6a), 4,26 (1H, m, H-6b'), 4,17 (3H, dd, *J* 2,0 e 12,6 Hz, H-6b), 4,13-3,98 (11H, m, H-5, H-8, H-7a', H-7b'), 3,41 (1H, m, H-5'), 2,99 (1H, dd, *J* 2,4 e 11,2 Hz, H-1a'), 2,84 (1H, dd, *J* 6,3 e 11,2 Hz, H-1b'), 2,10, 2,09, 2,05, 2,04, 2,02, 1,81 (48H, s, COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,6, 170,3, 170,1, 170,0, 169,9, 169,6, 169,0 (8 x C=O), 145,9 ($C_{qt.}$ triazol-8'), 145,1 ($C_{qt.}$ triazol-10), 122,8 (*C*H triazol-9'), 121,7 (*C*H triazol-11), 85,7 (C-1), 75,1 (C-5), 72,8 (C-3), 70,3 (C-8), 69,9 (C-2), 67,8 (C-4), 67,8, 67,4, 64,9 (C-8), 61,7 (C-6), 57,3 (C-6'), 48,5 (C-7'), 21,0, 20,9, 20,7, 20,7, 20,6, 20,1 (8 x CO*C*H$_3$). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{72}H_{95}N_{13}NaO_{38}^{+}$ 1772,5793, encontrada 1772,406 [M+Na^{+}]. Dados de alta resolução estão sendo adquiridos.

Glycocluster **63.** RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ: 8,13 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 8,01 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 5,70 (3H, d, *J* 9,1 Hz, H-1), 4,54 (6H, s, H-9), 4,03-3,79 (18H, m), 3,75-3,54 (12H, m), 3,29 (1H, s), 2,79-2,68 (2H, m, H-1a' e H-5'), 2,52 (1H, m, H-1b'). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{40}H_{63}N_{13}NaO_{22}^{+}$ 1100,4103, encontrada 1100,316 [M + Na^{+}]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 73 e 64**



73

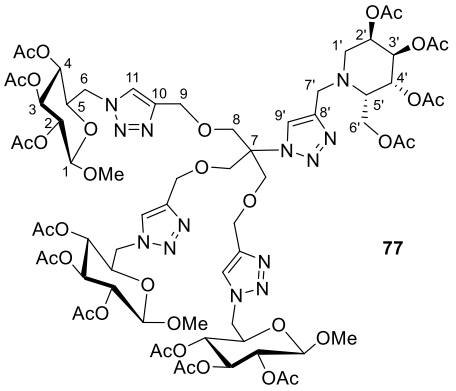


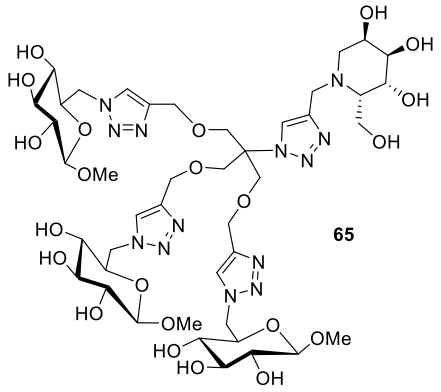
64

Glycocluster **73**. (33 mg, 0,018 mM, 38%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,97 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 7,69 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 5,99 (3H, d, *J* 9,2 Hz, H-1), 5,53 (3H, t, *J* 9,4 Hz, H-2), 5,44 (3H, t, *J* 9,4 Hz, H-3), 5,36 (3H, t, *J* 9,6 Hz, H-4), 5,12 (1H, t, *J* 9,6 Hz), 5,04-4,96 (2H, m), 4,69-4,59 (7H, m, H-6a' e H-9), 4,33 (3H, dd, *J* 4,9 e 12,6 Hz, H-6a), 4,27 (2H, m, H-6b'), 4,17 (3H, dd, *J* 2,0 e 12,6 Hz, H-6b), 4,12-4,06 (4H, m, H-5, H-7b'), 4,05-3,99 (6H, sistema AB, *J* 12,7 Hz, H-8), 3,92 (1H, m, H-5'), 3,19 (1H, dd, *J* 4,0 e 11,2 Hz, H-1a'), 2,69 (1H, m, H-1b'), 2,09, 2,08, 2,05, 2,04, 2,01, 2,00, 1,81 (48H, 12 x CO*CH*$_3$). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 171,0, 170,6, 170,4, 170,2, 170,1, 169,8, 169,6, 169,0 (8 x C=O), 145,1 ($C_{qt.}$ triazol-10), 141,2 (C_{qt} triazol-8'), 123,1 (*C*H triazol-9'), 121,7 (*C*H triazol-11), 85,8 (C-1), 75,2 (C-5), 74,2, 72,8 (C-3), 70,4, 70,0, 69,9, 69,5 (C-2), 67,9 (C-4), 67,6, 67,4, 64,8 (C-8), 61,7 (C-6), 59,3, 55,4, 46,9, 21,0, 20,9, 20,8, 20,8, 20,7, 20,7, 20,6, 20,2 (8 x CO*C*H$_3$). MALDI-TOF m/z, calcd. para $C_{72}H_{96}N_{13}O_{38}^{+}$ 1750,5974, encontrada 1750,679 [M + H^+]. Dados de alta resolução estão sendo adquiridos.

Glycocluster **64.** RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O) δ: 8,18 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 8,03 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 5,74 (3H, d, *J* 7,9 Hz, H-1), 4,58 (6H, s, H-9), 4,10 (3H, m, H-2) 3,99 (10H, m), 3,89 (3H, m), 3,78-3,69 (10H, m), 3,64-3,57 (5H, m), 3,47 (1H, s), 3,19 (1H, m), 3,04 (1H, m). Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 77 e 65**

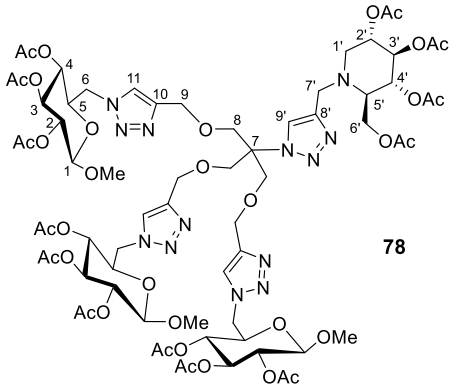


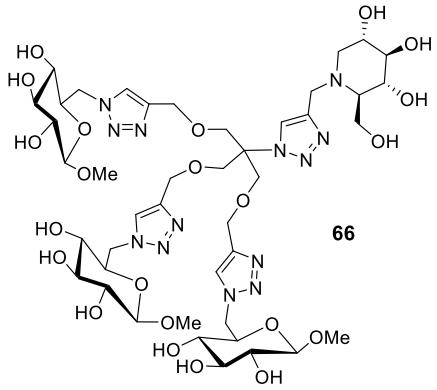


Glycocluster **77.** (39,1 mg, 0,023 mM, 47%) RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,74 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 7,68 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 5,27 (1H, dd, *J* 4,6 e 8,2 Hz, H-2'), 5,24 (3H, t, *J* 9,5 Hz, H-4), 5,17 (2H, m, H-3' e H-4'), 4,95 (3H, dd, *J* 8,0 e 9,7 Hz, H-2), 4,88 (3H, t, *J* 9,7 Hz, H-3), 4,64 (3H, dd, *J* 2,5 e 12,4 Hz, H-6a), 4,57 (6H, s, H-9), 4,44 (3H, dd, *J* 8,3 e 12,4 Hz, H-6b), 4,44 (1H, m, H-6a'), 4,36 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 4,27 (1H, dd, *J* 4,8 e 11,8 Hz, H-6b'), 4,02-3,91 (11H, m, H-8, H-5, H-7a'e H-7b'), 3,41 (1H, m, H-5'), 3,32 (9H, s, 3 x OC*H*$_3$), 2,97 (1H, dd, *J* 2,4 e 13,3 Hz, H-1a'), 2,79 (1H, dd, *J* 5,8 e 13,3 Hz, H-1b'), 2,10, 2.06, 2.04, 2.02, 2.02, 2.00 (39H, s, COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,7, 170,2, 170,1, 169,9, 169,8, 169,5 (7 x C=O), 144,3 (*C*$_{qt.}$, triazol-10), 124,6 (*C*H triazol-11), 122,7 (*C*H triazol-9'), 101,6 (C-1), 72,6, 72,3, 71,2, 70,1 (C-2, C-3, C-4 ou C-5), 69,9 (C-8), 68,4, 68,2, 67,4, 64,8 (C-9), 60,2, 57,6, 57,2 (O*C*H$_3$), 50,9 (C-6), 49,7, 48,5, 21,1, 21,0, 20,8, 20,7, 20,7, 20,6 (7 x CO*C*H$_3$). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{69}H_{96}N_{13}O_{35}^{+}$ 1666,6126, encontrada 1666,579 [M+H$^+$]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

Glycocluster **65.** RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ: 8,08 (1H, s, C*H* triazol H-9'), 7,94 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 4,85 (3H, dd, *J* 2,4 e 14,6 Hz, H-6a), 4,60-4,52 (m, 9H, H-6b e H-9), 4,21 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 4,08-3,90 (12H, m), 3,84 (1H, m), 3,71 (3H, t$_{ap}$, *J* 7,9 Hz, H-5), 3,47 (3H, t, *J* 9,2 Hz, H-4), 3,28-3,15 (15H, m, H-2, H-3 e 3 x OC*H*$_3$), 2,76 (1H, m), 2,55 (1H, m). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{43}H_{69}N_{13}NaO_{22}$ 1142,4572, encontrada 1142,364 [M + Na$^+$]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 78 e 66**

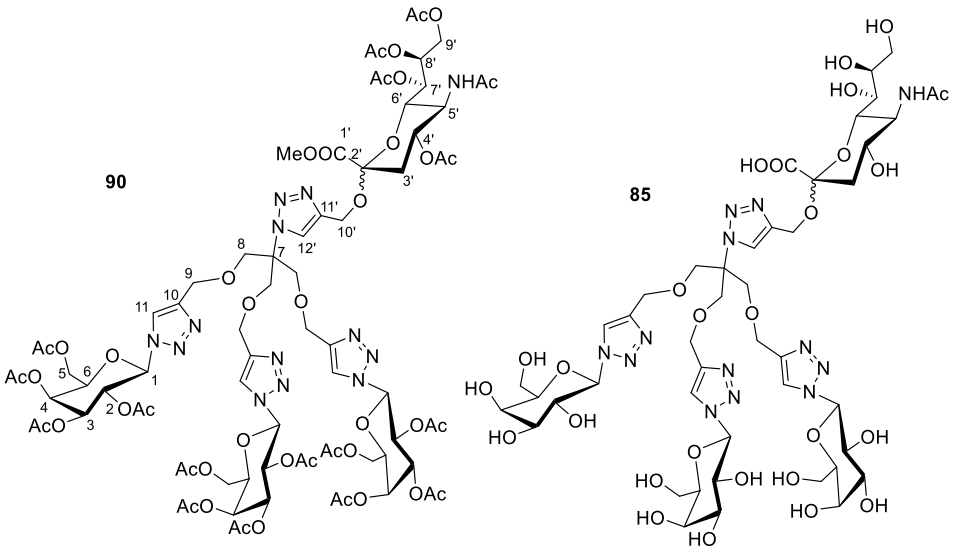




Glycocluster **78.** (15 mg, 0,009 mmol, 18%). RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,71 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 7,68 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 5,23 (3H, t, *J* 9,6 Hz, H-4), 5,12 (1H, t, *J* 8,7 Hz), 4,95 (5H, m), 4,88 (3H, m, H-3), 4,65 (3H, m, H-6a), 4,58 (6H, s, H-9), 4,53 (1H, m), 4,45 (3H, dd, *J* 8,5 e 14,4 Hz, H-6b), 4,36 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 4,22 (1H, d, *J* 11,9 Hz), 4,05 (1H, m) 3,98-3,91 (10H, m, H-5, H-8), 3,33 (9H, s, 3 x OC*H*$_3$), 3,18 (1H, m), 2,61 (1H, d, *J* 9,0 Hz), 2,34 (1H, m), 2,09, 2,04, 2,01, 2,00 (39H, s, 7 x COC*H*$_3$). RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170,9, 170,3, 170,0, 169,7, 169,3 (7 x C=O), 144,1 (C_{qt}., triazol-10), 141,0 (C_{qt}., triazol-8'), 124,5 (*C*H triazol, H-11), 122,9 (*C*H triazol, H-9'), 101,5 (C-1), 74,5, 72,5, 72,1, 71,1 (C-2, C-3, C-4 ou C-5), 69,9, 69,8 (C-8), 69,4, 67,4, 64,7 (C-9), 60,5, 59,1, 57,1 (O*C*H$_3$), 50,8 (C-6), 46,9 (C-7), 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (7 x CO*C*H$_3$). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{69}H_{95}N_{13}NaO_{35}^{+}$ 1688,5746, encontrada 1688,570 [M+Na^{+}].

Glycocluster **66.** RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O) δ: 8,01 (1H, s, C*H* triazol, H-9'), 7,96 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 4,85 (3H, d, *J* 14,6 Hz, H-6a), 4,62-4,55 (9H, m, H-6b e H-9), 4,22 (3H, d, *J* 8,0 Hz, H-1), 4,11 (1H, d, *J* 12,7 Hz, H-6a'), 4,02 (1H, d, *J* 15,6 Hz, H-7a'), 3,94-3,89 (7H, m, H-6b' e H-8), 3,73 (3H, t_{ap}, *J* 8,2 Hz, H-5), 3,57-3,52 (1H, m), 3,49 (3H, t, *J* 9,2 Hz, H-4), 3,42-3,38 (2H, m), 3,34-3,29 (1H, m), 3,27-3,19 (15H, m, H-2; H-3; 3 x OC*H*$_3$), 3,09 (1H, t, *J* 9,3 Hz), 2,07 (1H, t_{ap}, *J* 10,6 Hz), 1,97 (1H, m). MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{43}H_{70}N_{13}O_{22}^{+}$ 1120,4753, encontrada 1120,404 [M+H^{+}]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

***Glycoclusters* 90 e 85**



Glycocluster **90**. (65 mg, 0,032 mmol, 65%). RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,94 (1H, s, C*H* triazol, H-12'), 7,89 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 7,87 (2,22H, s, C*H* triazol, H-11), 7,78 (0,74H, s, C*H* triazol, H-12'), 5,96 (3H, d, *J* 9,2, H-1), 5,93 (2,22H, d, *J* 9,2, H-1), 5,64-5,56 (6H, m, H-x e H-3), 5,30 (3H, dd, *J* 3,3 e 10,2 Hz, H-4), 5,22 (1H, td, *J* 5,0, 10,9, 11,0 Hz, H-8') 4,69 (6H, m, H-9), 4,30 (3H, t_{ap}, *J* 6,5 Hz, H-5), 4,36 (0,78H, dd, *J* 2,3 e 12,4 Hz, H-7'), 4,31 (6H, t_{ap}, *J* 6,2 Hz, H-5) 4,20 (6H, m, H-6a e H-6b), 4,05-3,97 (10,6H, m), 3,83 (3H, s, OCH_3), 3,51 (2,09H, s, OCH_3), 2,67 (0,75H, dd, *J* 4,6 e 12,8 Hz, H-3'$_{ax}$), 2,51 (1H, dd, *J* 4,6 e 12,8 Hz, H-3'$_{ax}$) 2,23 (9H, s, COCH_3), 2,17 (3H, s, COCH_3), 2,06 (9H, s, COCH_3), 2,03 (9H, s, COCH_3), 1,93 (3H, s, COCH_3), 1,84 (9H, s, COCH_3). HRMS m/z calcd. para $C_{78}H_{104}N_{13}O_{43}^{+}$ 1910,6351, encontrada 1910,6128 [M + H^+].

Glycocluster **85**. RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8,14 (3H, s, C*H* triazol, H-11), 8,11 (2,3H, s, C*H* triazol, H-11), 7,99 (1H, s, C*H* triazol, H-12'), 7,98 (0,74H, s, C*H* triazol, H-12'), 5,61 (3H, d, *J* 9,2 Hz, H-1), 5,59 (2,3H, d, *J* 9,2 Hz, H-1) 4,51 (6H, 2 x s, H-9), 4,31 (1H, m), 4,13 (6H, d, *J* 9,5 Hz, H-2), 4,00 (6H, *J* 3,0 Hz, H-4), 3,94-3,89 (20H, m), 3,85-3,68 (25H, m), 3,64-3,48 (6H, m), 2,66 (1H, dd, *J* 3,8 e 10,9, H-3'$_{ax}$) 2,28 (1H, dd, *J* 3,8 e 10,9, H-3'$_{ax}$), 1,94 (6H, N*H*Ac).

4.2.4 Ensaios biológicos

Ensaio de inibição de glucosidases

Os ensaios de inibição das enzimas α- e β-glucosidase foram realizados por método colorimétrico descontínuo tal como descrito por Hakamata e colaboradores (1999) e Dale e colaboradores (1985). Todas as leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de placas Spectra Max M2, Molecular Devices usando o software Max Pro. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços contendo 25 µL de tampão, 25 µL de enzima, 25 µL de solução dos possíveis inibidores (20 mM, com concentração final de 5 mM em cada poço para os compostos **1**-**4** e **9**-**12** e 4 mM, com concentração final de 1 mM no poço, para os compostos **63**-**66**) e 25 µL de uma solução 0,8 mM do substrato α-D-glicopiranosídeo de 4-nitrofenila ou β-D-glicopiranosídeo de 4-nitrofenila. A mistura foi incubada entre 10 e 20 minutos a temperatura ambiente, sendo a reação finalizada pela adição de 100 µL de uma solução *quench* Na_2CO_3 0,3 M. Os valores de absorbância provenientes da clivagem do substrato foram medidos durante a 405 nM.

Os experimentos foram realizados em triplicata e em réplica (dois dias consecutivos) e os dados analisados no programa Excel 2016. Para cada composto testado, foi realizado um controle sem a presença de enzima sendo o valor da leitura descontado do total. O valor da porcentagem de inibição foi calculado considerando 100% de hidrólise na ausência de inibidor.

Ensaio de inibição de *trans*-sialidase

O ensaio de inibição de TcTS foi realizado empregando-se método fluorimétrico contínuo (NERES et al., 2006). Todas as medidas de fluorescência foram lidas no fluorímetro Spectra Max M2, Molecular Device usando o software Max Pro. O Ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,0 (25 µL), solução da enzima trans-sialidase recombinante (25 µL) e solução do possível inibidor **5**, **6**, **7**, **13**, **14** ou **85** (25 µL de uma solução 4 mM). Essa mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 25 °C e a reação teve início com adição do substrato ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-acetilneurâmico (25 µL de uma solução 4 mM). A fluorescência liberada pelo composto foi monitorada a 25 °C durante 10 minutos, nos comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão), e seus dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6.2 (San Diego, CA, USA).

Os experimentos foram realizados em triplicata e em réplica (dois dias consecutivos). Para cada composto testado foi gerado um gráfico que relaciona U.F e tempo de reação através

do qual foi possível calcular a velocidade de reação (ângulo de inclinação de cada uma das retas) por regressão linear. O valor da porcentagem de inibição foi calculado pelo emprego da equação: % = I 100 x [1 – (V_i / V_o)] onde V_i= velocidade da reação na presença do composto testado e V_o= velocidade da reação na ausência do possível inibidor (controle negativo).

Ensaios de atividade tripanocida e bloqueio de invasão celular (*T. cruzi*) – Compostos 5, 6, 7, 13, 14 e 85

Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram adicionadas em placas de 96 poços ($1x10^6$) e tratadas com diferentes concentrações dos compostos solubilizados em meio RPMI (1000 a 25 µM) por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2. O controle de vida (CV) foi incubado apenas com meio de cultura, e o controle de morte com benznidazol (BZD) a uma concentração de 30 µM. Após o tratamento, uma solução de resazurina 1 mg/mL foi adicionada em todos os poços, e a placa permaneceu incubada por mais 4 horas antes da leitura dos valores de dispersão óptica (DO) em 570 e 600 nm. Os poços do controle de vida (CV) foram considerados como 100% de viabilidade. *, ** e *** representam $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,005$, respectivamente (*One-way* ANOVA e pós teste de Tukey da triplicata de cada tratamento).

Avaliação da citotoxicidade em fibroblastos LLCMK2

Para a avaliação da citotoxicidade sobre células do hospedeiro (CC_{50}), fibroblastos LLCMK2 foram adicionados em placas de 96 poços ($1x10^6$), incubados por 18 horas em meio RPMI em estufa de 37ºC e 5% de CO_2 para adesão na placa de cultura. Após descarte do sobrenadante, os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações dos compostos (1000 a 62,5 µM para a maioria dos compostos) em 100 µL de meio RPMI por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2. O controle de vida (CV) foi incubado apenas com meio de cultura, e o controle de morte (CM) com peróxido de hidrogênio 30 µM. Após tratamento, foram adicionados 10 µL de uma solução 5 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) nos poços, e incubadas por mais 4 horas. Os cristais de formazan formados foram diluídos após descarte do sobrenadante com 100µL de DMSO para a leitura da DO em 570 nm. Os poços do controle de vida (CV), que foram incubados só com meio, foram considerados como 100% de viabilidade.

Avaliação da atividade tripanocida em amastigotas intracelulares

Fibroblastos (LLCMK2) foram plaqueados sobre lamínulas circulares ($3x10^5$ células por poço) em placas de 24 poços, e incubadas em meio RPMI por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2 para adesão. Os fibroblastos foram então infectados com $15x10^5$ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) por poço, numa proporção de 5:1 (parasitas:célula) e incubadas em meio RPMI por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2 para infecção. Os poços foram então lavados, e as células infectadas foram tratadas com soluções de 200 a 25 µM de cada composto testado, diluído em meio RPMI, e a placa incubada por 48 horas, a 37ºC e 5% de CO_2. Controles de infecção (CI) receberam apenas meio RPMI, e os poços para controle de morte receberam benznidazol (BZD) a 30 µM. Ao final da sequência de tratamentos, as lamínulas foram lavadas, coradas com Panótico Rápido® (Laborclin) e montadas em lâminas para contagem das células infectadas e das formas amastigotas no interior dos fibroblastos em microscópio óptico. Cada concentração foi testada em triplicata, e foram contados um total de 100 macrófagos por lamínula. *, ** e *** representam $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,005$, respectivamente (*One-way* ANOVA e pós Teste de Tukey da triplicata de cada tratamento).

Experimento de bloqueio da entrada de *Trypanosoma cruzi* em fibroblastos

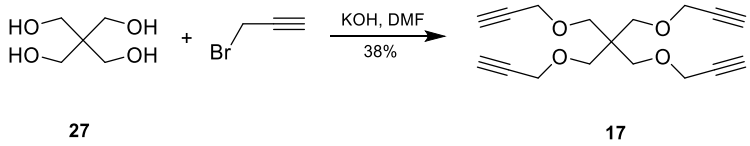
Fibroblastos (LLCMK2) foram plaqueados sobre lamínulas circulares ($3x10^5$ células por poço) em placas de 24 poços, e incubadas em meio RPMI por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2 para adesão. Os fibroblastos foram então infectados com $15x10^5$ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) por poço, numa proporção de 5:1 (parasitas:célula) na presença de soluções de 200 a 25 µM de cada composto, diluído em meio RPMI, e incubadas por 2 horas, a 37ºC e 5% de CO_2. Controles de infecção receberam apenas meio RPMI. Ao final do período de incubação, as lamínulas foram lavadas e coradas com Panótico Rápido® (Laborclin) e montadas em lâminas para contagem das células infectadas e das formas amastigotas no interior dos fibroblastos em microscópio óptico. Cada concentração foi testada em triplicata, e foram contados um total de 100 macrófagos por lamínula. *, ** e *** representam $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,005$, respectivamente (*One-way* ANOVA e pós teste de Tukey da triplicata de cada tratamento).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O item resultados e discussão deste trabalho está dividido em quatro seções principais: na primeira é descrita a síntese de blocos de construção devidamente funcionalizados com grupos acetileno para posterior emprego em reações CuAAC. A segunda parte contempla a preparação de diversos azido-carboidratos, a saber: derivados de glicose, galactose, ácido siálico e unidade *α*-GalNAc-*O*-Thr. A terceira seção está relacionada à síntese dos *glycoclusters* propostos via '*click chemistry*'. Por fim, a quarta seção descreve os ensaios de inibição das enzimas *α* e *β*-glucosidase, TcTS e ensaios de atividade tripanocida, citotóxico e bloqueio de invasão celular.

5.1 Síntese de blocos de construção funcionalizados com grupos acetilenos

Conforme proposto, a primeira etapa do trabalho envolveu a preparação dos blocos tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** e hexa-*O*-propargil-pentaeritritol **18** a partir dos álcoois comerciais pentaeritritol **27** e dipentaeritritol **28**, respectivamente. Assim, seguindo o protocolo descrito por Weïwer e colaboradores (2009), o composto **27** foi tratado com brometo de propargila em DMF e a reação aquecida a 50°C por 12 h, sendo o produto **17** obtido com 38% de rendimento, próximo aos 42% alcançados na referência citada (esquema **9**).



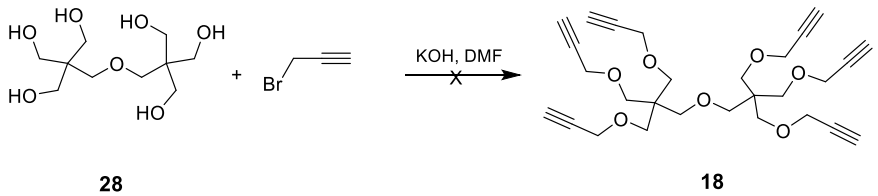
27 **17**

Esquema 9.Síntese da estrutura dendrimérica **17** baseada em pentaeritritol

A confirmação da estrutura foi realizada por espectrometria de massas de alta resolução e RMN de ^{1}H e ^{13}C. Tanto o tripleto (t) em δ 2,41 quanto o dupleto (d) em δ 4,13 com J 2,3 Hz, observados no espectro de RMN de ^{1}H, são característicos desses grupos acetilênicos terminais. Além disso, as integrais relativas de 4 para ≡C*H* e 8 para os grupos CH_2 foram atentamente observadas e importantes para determinar que a alquilação ocorreu nas quatro hidroxilas do precursor **27**.

As mesmas condições reacionais utilizadas na síntese do bloco **17** não permitiram, entretanto, a obtenção de hexa-*O*-propargil-pentaeritritol **18** a partir de dipentaeritritol **28**

(esquema **10**). Na tentativa de solucionar o problema, tanto o tempo reacional quanto o número de equivalentes de brometo de propargila foram aumentados em diferentes experimentos sem sucesso.

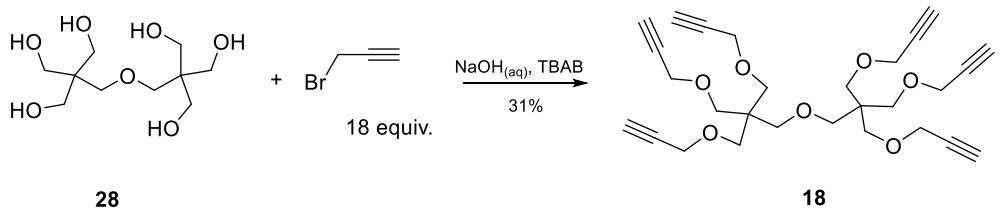


28 **18**

Esquema 10. Tentativa de síntese do bloco **18** usando as condições reacionais de **17**

Três manchas principais com diferentes valores de fator de retenção (R_f)=0,5, 0,41 e 0,30 [AcOEt/éter de petróleo (2:8)], foram observadas na placa cromatográfica sugerindo formação de subprodutos com posições não alquiladas. A dificuldade no preparo do composto **18** foi citada por Touaibia e colaboradores (2007) que obteve o produto com apenas 6% de rendimento.

Diante desse obstáculo, optou-se por realizar o protocolo descrito por Rajaram e colaboradores (2014) que propõe a reação com o mesmo reagente, porém em condições de catálise de transferência de fase com emprego de brometo de tetra-*n*-butilamônio (TBAB) (esquema **11**). Esse modelo de reação se sustenta na diferença de solubilidade entre o poliálcool utilizado como material de partida, o intermediário alcóxido gerado no início da reação e o produto que é gradualmente formado e transferido para a fase orgânica (NOUGUIER & MCHICH, 1985).



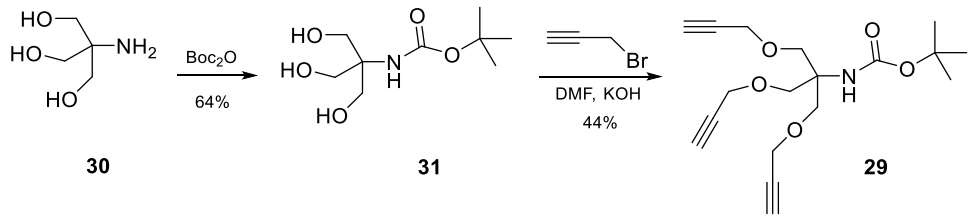
28 **18**

Esquema 11. Reação em condições de catalise de transferência de fase para obtenção do alcino **18**

Dessa forma, hexa-*O*-propargil-pentaeritritol **18** foi obtido com 31% de rendimento (rendimento de 33% foi obtido por Rajaram e colaboradores, 2014). A confirmação da estrutura foi realizada por espectrometria de massas e RMN de ^{1}H e ^{13}C. O espectro de RMN de ^{1}H apresentou sinais em δ 2,41 (6H, t) e 4,11 (12H, d), com J 2,3 Hz, evidenciando a presença do grupo acetileno na proporção correta. A diferença fundamental entre os espectros

dos compostos **17** e **18** é a presença de um simpleto em δ 3,38 com integral relativa de 4 referente aos metilenos centrais de hexa-*O*-propargil-pentaeritritol **18**.

Com a pesquisa bibliográfica ao longo do trabalho foi vislumbrada ainda a possibilidade de preparar o bloco de construção trivalente **29** com estrutura correlata à estrutura de tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** para a inclusão de carboidratos distintos na proporção 3:1. Para tanto, a síntese do bloco **29** foi realizada em duas etapas a partir do reagente comercial tris(hidroximetil)aminometano **30**, popularmente conhecido como TRIS e amplamente utilizado em bioquímica como componente de soluções tampão (esquema **12**).



Esquema 12. Síntese de derivado de TRIS-propargila **29** em duas etapas

O grupo amino de TRIS foi inicialmente protegido com *terc*-butiloxicarbonila (Boc) utilizando dicarbonato de di-*terc*-butila para obtenção do derivado *N*-Boc protegido **31** com 64% de rendimento (CHABRE et al., 2008). As hidroxilas de **31** foram então propargiladas em condição semelhante à empregada na síntese de tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** (DMF/KOH), sendo o produto **29** obtido com 44% de rendimento. Além dos sinais relativos aos grupos propargila, o espectro de RMN de ^{1}H de **29** apresentou um simpleto intenso em δ 1,41 com integral relativa de 9 referente aos hidrogênios do grupo *terc*-butila.

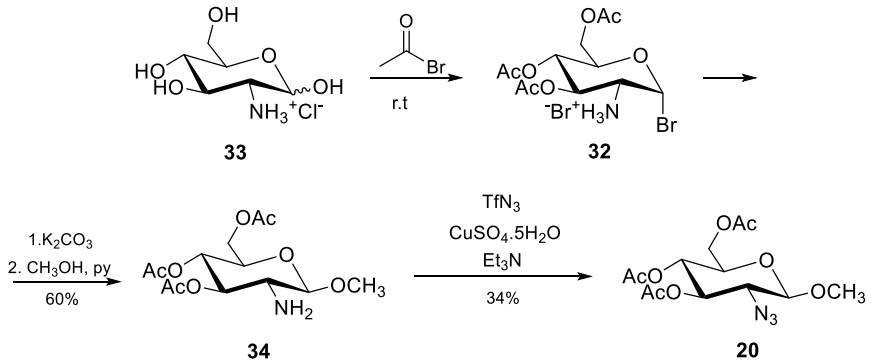
5.2 Preparação de azido-carboidratos

Síntese de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila 20

O protocolo de síntese do derivado azido **20**, empregado em reações de cicloadição com os blocos de construção **17** e **18**, foi estabelecido durante o desenvolvimento do projeto de iniciação científica de Michelle Ogava Igual (Processo Fapesp: 14/25960-0).

A primeira etapa envolveu a formação do doador de bromo *O*-acetilado **32** pelo tratamento de cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose **33** com brometo de acetila. A manutenção do sal de amônio de **32** impediu que o grupo fosse acetilado, sendo posteriormente neutralizado para a reação de diazo-transferência, evitando assim etapas desnecessárias de

proteção e desproteção. O intermediário instável **32** foi empregado diretamente na reação de glicosilação com metanol (solvente e aceptor glicosídico), sem purificação prévia (esquema **13**).

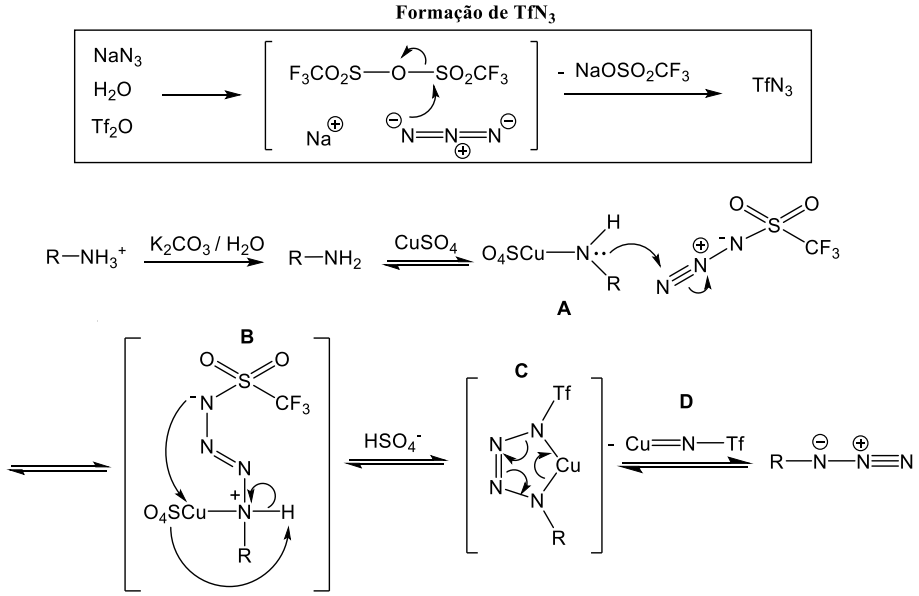


Esquema 13. Síntese do azido **20** funcionalizado em C-2.

Um mecanismo aceitável para esta reação envolve o ataque nucleofílico do grupo -OH do metanol ao carbono anomérico, deslocando o bromo, majoritariamente via S_N1. O sal formado foi dissolvido em clorofórmio e lavado com solução saturada de carbonato de sódio para obtenção do produto **34** como base livre com 60% de rendimento como mistura de anômeros β:α (10:1).

A última etapa consistiu na conversão do grupo amino em C-2 de **34** para azido via diazo-transferência em piridina, utilizando triflil azida (TfN_3) recém preparado. Após purificação por coluna *flash* o azido-glicose foi obtido com 37% de rendimento, sendo mantida a proporção de isômeros β:α (10:1). A estrutura foi confirmada por RMN de ^1H e IV, com observação de banda característica de grupo azido em 2122 cm^{-1} (GÜNTHER et al., 2008). A subsequente recristalização da mistura em etanol permitiu a obtenção do anômero β **20** como cristais brancos puros com 34% de rendimento.

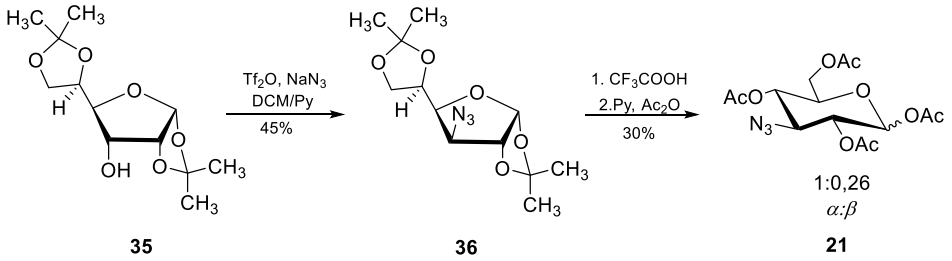
Embora o mecanismo exato da reação de diazo-transferência seja ainda desconhecido, a proposta de Nyffeler e colaboradores (2002) é bastante aceita (esquema **14**). Este sugere que um grupo amino livre, formado normalmente pelo tratamento de sais de amônio com carbonato de potássio (K_2CO_3), forma um complexo com o catalisador sulfato de cobre II (A). Nesta etapa ocorre o ataque do nitrogênio do precursor a um dos nitrogênios de triflil azida (previamente preparado por reação entre anidrido tríflico e NaN_3) formando um novo complexo (B). A subsequente desprotonação leva à formação do tetrazeno estabilizado por cobre (C). O rompimento deste sistema gera o imino complexo de cobre-triflilila (D) e o produto contendo a função azido, via cicloadição dipolar (ANSELME & FISCHER, 1969).



Esquema 14. Mecanismo proposto para a reação de diazo-transferência catalisada por metal; R = Precursor com grupo amino (ANSELME & FISCHER, 1969).

Síntese de 1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-*α,β*-D-glicopiranose 21

A síntese do bloco **21** (3-azido-glucopiranose) foi realizada em quatro etapas a partir do açúcar comercial 1:2,5:6-di-isopropilideno-*α*-D-alofuranose **35**. As condições reacionais empregadas para obtenção do derivado de glicose foram adaptadas do método descrito por Hindsgaul e Lowary (1994) para obtenção de 3-azido-galactopiranose. Assim, o tratamento de **35** com o reagente Tf_2O em DCM e piridina, seguido de reação de substituição com azida de sódio em DMF forneceu o produto 1:2,5:6-di-isopropilideno-3-azido-*α*-D-glicofuranose **36** com 45% de rendimento (esquema **15**), com inversão de configuração em C-3.



Esquema 15. Síntese do derivado azido **21** funcionalizado em C-3

Subsequentemente, o intermediário **36** foi tratado com solução de TFA 80% e a seguir peracetilado na presença de piridina e anidrido acético (Ac_2O), com obtenção do produto **21** como mistura de isômeros *α/β* (1:0,26) e rendimento de 30%. Nas condições testadas, não foi

possível a separação cromatográfica entre os anômeros. Por esta razão, foi usado nas reações de acoplamento na forma de mistura anomérica.

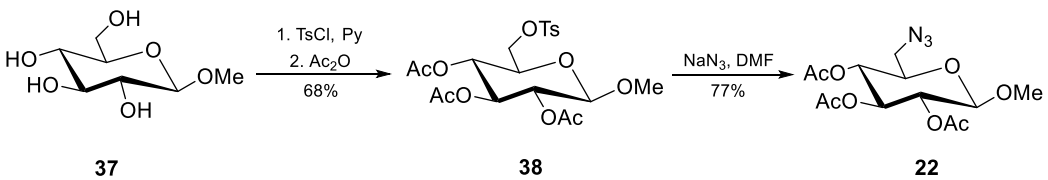
Embora não discutidos nas referências consultadas, diferentes problemas de síntese foram enfrentados nessa etapa, o que pode explicar o baixo rendimento. Além da formação de subprodutos, provavelmente provenientes do processo de abertura da furanose, não houve consumo total do material de partida **36** [CCD, Hexano/AcOEt (3:1)], mesmo após aumento do tempo reacional (DANAC, 2008; CAMPO, 2012).

A análise de RMN de ^{1}H do bloco **21** apresentou dupletos característicos de H-1 em δ 6,30 (J 3,6 Hz) para o isômero α e δ 5,66 (J 8,3 Hz) para o isômero β, respectivamente, e tripletos relativos a H-3 em δ 3,96 (J 10,4 Hz, α) e δ 3,68 (J 10,4 Hz, β). O espectro apresentou também 2 grupos de quatro simpletos cada, com diferentes valores de integrais relativas entre δ 2,19 e 2,09 referentes aos grupos acetila (COCH_3). A presença de -N_3 foi confirmada por análise de infravermelho com banda em 2100 cm^{-1}, característica de grupo azido. Os dados são condizentes com os descritos na literatura para esse composto (CAMPO et al., 2012).

Síntese de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila 22

A síntese do derivado de glicose funcionalizado em C-6 (**22**) foi realizada em duas etapas a partir de β-D-glicopiranosídeo de metila **37** (esquema **16**). As condições reacionais foram adaptadas do protocolo descrito por Carvalho e colaboradores (2010) para obtenção de 6-azido galactose. A primeira etapa foi iniciada pela lenta adição de cloreto de tosila (TsCl/py) a uma solução do precursor **37**, sendo a reação acompanhada por CCD até consumo total do material de partida. A tosilação simultânea da hidroxila em C-3 formando um intermediário di-tosilado (C-3 e C-6), frequentemente observada para o derivado galactopiranosídeo, foi evitada pela simples redução de temperatura da reação e do número de equivalentes de TsCl, uma vez que a posição C-3 do glicopiranosídeo é mais impedida e, portanto, menos reativa.

As hidroxilas livres (C-2, C-3 e C-4) foram a seguir *O*-acetiladas pela adição de Ac_2O ao meio reacional e o intermediário **38** obtido com 68% de rendimento após purificação.



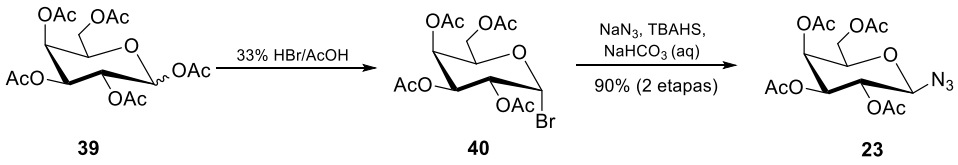
37 **38** **22**

Esquema 16. Síntese do derivado azido **22** funcionalizado em C-6

A etapa final envolveu a troca do grupo tosila por uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) com azida de sódio, favorecida pela presença de solvente aprótico e aquecimento (100 °C). O azido-carboidrato **22** foi obtido com 77% de rendimento e a estrutura confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C, além de análise bidimensional (HMQC) para correta atribuição de todos os sinais, já que estes dados não foram encontrados na literatura.

Síntese de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*β*-D-galactopiranose azido 23

A síntese do derivado azido-galactose **23** foi também realizada para emprego em reações de cicloadição com os blocos alcino **17** e **18**. O composto foi obtido com facilidade em duas etapas, com 90% de rendimento, a partir de D-galactose peracetilada **39**, disponível no laboratório (esquema **17**) (CAMPO et al., 2010; TROPPER et al., 1992).



Esquema 17. Síntese do bloco de galactose **23** funcionalizado em C-1.

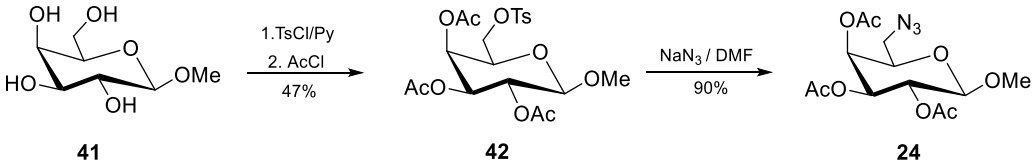
O método selecionado envolveu a formação de brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*α*-D-galactopiranosila **40** pela reação entre o açúcar protegido **39** e solução de HBr 33% por 3 horas. Na sequência, o intermediário brometo **40** foi diretamente empregado em reação de substituição nucleofílica utilizando NaN_3, o qual forneceu o composto **23** com alto grau de pureza.

A orientação *α* do bromo, confirmada na literatura, é tendência para substituintes eletronegativos em C-1 e explicada pelo efeito anomérico (LEMIEUX & HAYAMI, 1965). No entanto, a configuração *β* observada no produto **23** foi devido à participação do grupo vizinho em C-2, grupo *O*-acetil, capaz de realizar ataque intramolecular no carbono anomérico e formar intermediário ortoéster o qual, subsequentemente, sofre abertura pelo ataque nucleofílico do grupo azido pela face oposta *β*. A formação do composto **23** foi confirmada por RMN de ^{1}H e espectrometria de massas. Adicionalmente, o espectro na região do infravermelho apresentou uma banda em 2107 cm^{-1}, característica de grupo azido.

Síntese de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-*β*-D-galactopiranosídeo de metila 24

A síntese de 6-azido-*β*-D-galactopiranosídeo de metila **24** foi realizada utilizando dois protocolos sintéticos. No primeiro (**A**), foram empregadas as condições de reação descritas por

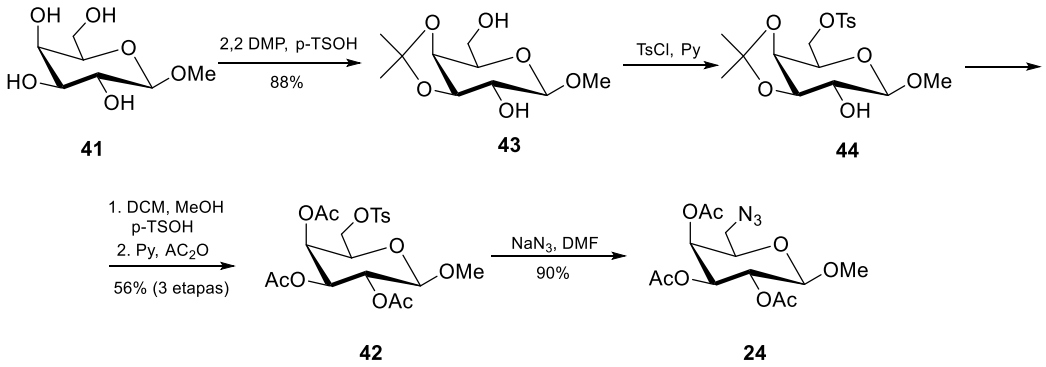
Carvalho e colaboradores (2010) e o composto preparado em três etapas a partir do açúcar comercial *β*-D-galactopiranosídeo de metila **41**. Assim, o precursor desprotegido foi tosilado e sequencialmente acetilado (*one-pot*), sendo a posterior troca do grupo tosila por azido realizada em DMF de acordo com mecanismo de substituição nucleofílica do tipo S_N2 (esquema **18**).



Esquema 18. Síntese do bloco azido **24** funcionalizado em C-6 (Método **A**).

Apesar da obtenção do produto Gal-6-N_3 **24**, o método envolve uma separação cromatográfica difícil dos intermediários mono e di-tosilado (posições 3 e 6) formados durante a primeira etapa. Duas purificações em sequência, utilizando cromatografia *flash* automatizada e gradiente crescente de uma mistura [AcOEt/tolueno (1:1)] foram necessárias para que o composto **24** fosse adequadamente purificado (47%).

Na tentativa de evitar a formação do intermediário di-tosilado, o azido **24** foi também preparado pela rota **B**, que envolve a proteção inicial das hidroxilas em C-3 e C-4 do β-galactopiranosídeo **41** com isopropilideno, impedindo a reação em C-3 (esquema **19**). Embora duas etapas tenham sido acrescentadas na preparação dos intermediários **43** e **44**, não houve prejuízo ao rendimento global da reação sendo o intermediário **42** obtido com 49% de rendimento após 3 etapas. A substituição do grupo tosila por azido foi realizada nas condições supracitadas (método A) com rendimento de 90% (BARILI et al., 1986; CARVALHO et al., 2010).

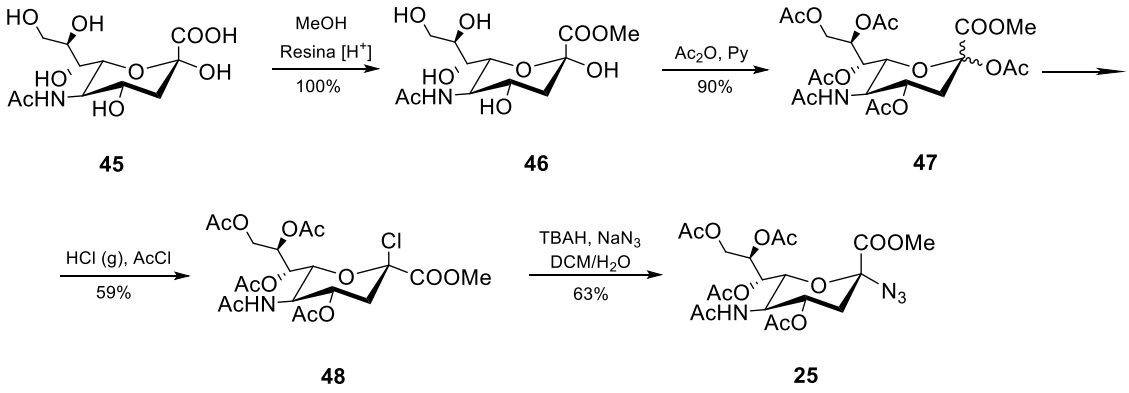


Esquema 19. Síntese do bloco azido **24** funcionalizado em C-6 (Método **B**).

A estrutura do azido **24** foi confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C. Os sinais relativos aos H-6a e H-6b são os mais blindados e foram observados como duplo dupletos em δ 3,11 (J 4,0 e 12,9 Hz) e δ 3,57 (J 8,4 e 12,9 Hz) no espectro de RMN de ^{1}H.

Síntese de α-azido ácido siálico 25

A síntese de 2-azido-ácido siálico **25** foi realizada em quatro etapas a partir de ácido siálico **45** (esquema **20**). A primeira etapa envolveu a formação do éster metílico **46** em rendimento quantitativo na presença de metanol e resina ácida Dowex® 50WX8-200. O composto **46** foi a seguir peracetilado, com emprego de anidrido acético e piridina, sendo convertido no intermediário protegido **47** com 90% de rendimento (CAMPO et al., 2012).



Esquema 20. Síntese do derivado 2-azido-ácido siálico **25**.

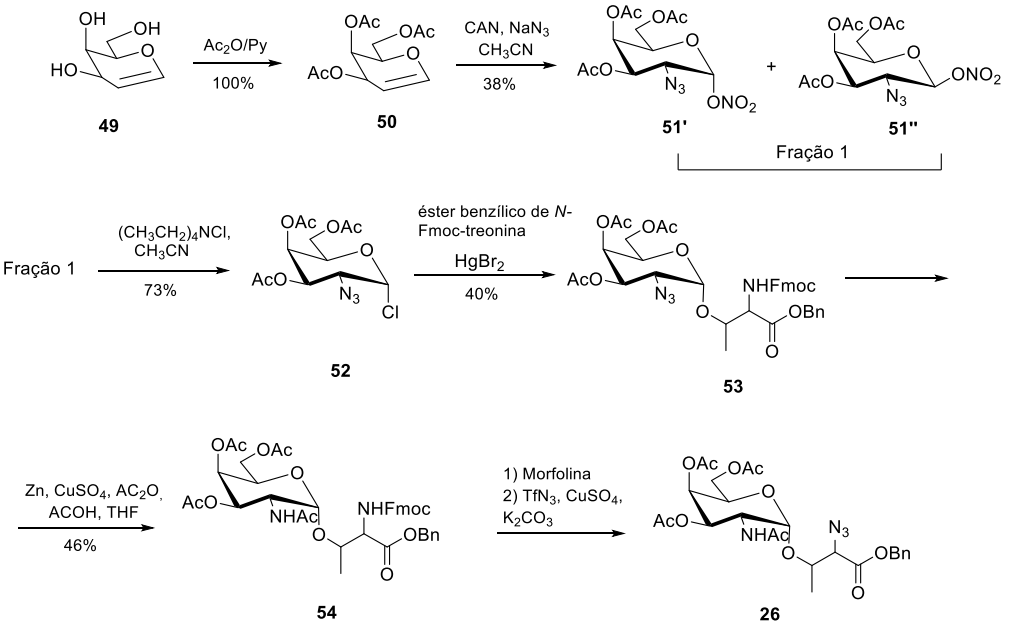
A reação de clorinação do composto **47** foi realizada empregando cloreto de acetila saturado com $HCl_{(g)}$ como reagente e solvente. Inicialmente resfriada a -20°C (30 min. iniciais), a reação foi conduzida a temperatura ambiente por mais 24 h e forneceu o β-cloreto de ácido siálico **48** com 59% de rendimento. A estrutura do composto **48** foi confirmada pelo espectro de RMN de ^{1}H, o qual apresentou sinais característicos do produto, tais como três duplo-dupletos em δ 5,38, 4,06 e δ 2,78 relativos a H-7 (J 2,0 Hz, J 6,8 Hz), H-9 (J 5,8 Hz, J 12,5 Hz) e H-3_{eq} (J 4,6 Hz, J 13,9 Hz), um simpleto do grupo éster em δ 3,87 e cinco simpletos entre δ 2,12-2,05 e δ 1,91, referentes aos grupos acetila ($COCH_3$) e acetamido ($NHCOCH_3$), respectivamente.

A etapa final foi realizada de acordo com o método incialmente descrito por Tropper e colaboradores (1991), em que o cloreto **48** é substituído por azido em reação de transferência de fase utilizando hidrogenossulfato de tetrabutilamônio (TBAH), com inversão completa da configuração anomérica. O rendimento de 63% obtido nesta etapa foi considerado satisfatório,

embora valores de até 92% estejam descritos. A estrutura do α-azido-ácido foi confirmada por RMN de ^{1}H e os sinais apresentados para H-3_{eq} em δ 2,56 (1H, *J* 4,6 e 13,1 Hz), H-4 em δ 5,05 e demais hidrogênios correspondem aos descritos na literatura para o isômero α. Embora não exista próton anomérico, a configuração é inferida com base no deslocamento de H-3_{eq}, cerca de 0,5 ppm mais blindado do que o isômero β (TROPPER et al., 1991; WEÏWER et al., 2009).

Síntese de éster benzílico de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-α-D-galactopiranosil-azido-treonina 26

Embora já parcialmente realizada pelo grupo, a síntese do bloco de aminoácido glicosilado **26** não foi trivial, envolvendo grande número de etapas e algumas dificuldades sintéticas (esquema **21**). A sequência reacional foi iniciada a partir de D-galactal comercial **49** que, após peracetilado em condição clássica (Ac_2O/py), produto **50**, foi submetido a reação de azidonitração em passo único na presença de azida de sódio e nitrato cérico amoniacal (CAN). O azido nitrato **51**, obtido em mistura de anômeros α/β 1:0,6 com 38% de rendimento, foi tratado com cloreto de tetraetilamônio em acetonitrila para substituição do grupo nitrato por cloro, sendo convertido no intermediário **52** com 73% de rendimento (LEMIEUX & RATCLIFFE, 1979).



Esquema 21. Rota sintética proposta para a obtenção do derivado α-GalNAc-*O*-Thr **26**.

Tanto a mistura de anômeros **51**, quanto o cloreto **52,** isolado exclusivamente na forma α, foram analisados por RMN de ^{1}H e apresentaram sinais condizentes com a literatura (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013). Para o cloreto **52** destacam-se os sinais observados em δ 6,12 (d, *J* 3,9 Hz) característico de H-1 e o sinal de H-2 sobreposto na região de δ 4,00, mais blindado que nos precursores devido à influência do grupo azido.

Sequencialmente o doador glicosídico **52** foi empregado na reação de glicosilação de éster benzílico de *N*-Fmoc treonina para obtenção do glicoaminoácido **53**, utilizando $HgBr_2$ como promotor. Embora a formação do produto tenha sido evidenciada por CCC [Tolueno: AcOEt 8:2], houve bastante dificuldade para uma adequada purificação. Além da contaminação constante com o doador glicosídico **52**, confirmada pelos sinais em δ 6,12 e na região de δ 4,00, um aumento de massa inesperado sugeriu a presença de sais de mercúrio. Esses problemas foram contornados após algumas tentativas com a extração da mistura reacional bruta de **53,** utilizando solução aquosa de iodeto de potássio (10 %).

A formação da ligação glicosídica foi evidenciada pela presença de sinais característicos do açúcar (H-1α em δ 4,92, *J* 3,4 Hz e H-2 em δ 3,50, *J* 3,4 e 11,1 Hz) e do aminoácido (aromáticos de Fmoc δ 7,8-7,1 e grupo metila de Thr em δ 1,32). Nesta reação foi evidente a formação estereosseletiva do isômero α devido ao efeito anomérico e a impossibilidade de participação do grupo vizinho em C-2, agora contendo grupo azido e não acetamido. De fato, a rota sintética apresentada no esquema **21** foi planejada para obtenção do anômero α de **26**, para melhor mimetizar as unidades de antígeno Tn (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013).

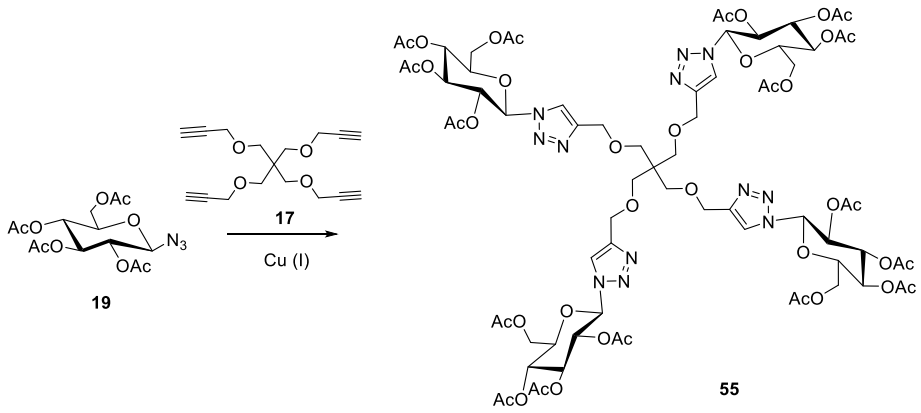
A conversão do grupo azido do composto **53** a acetamido foi realizada por acetilação redutiva na presença de anidrido acético, zinco metálico e sulfato de cobre, o que permitiu a obtenção do bloco **54** com 46 % de rendimento (KARTHA & FIELD, 1997). Finalmente, a remoção do grupo Fmoc com morfolina, seguido por reação de diazo-transferência aparentemente conduziu ao derivado azido de α-GalNAc-*O*-Thr **26**. O bloco **26**, com grupo azido na cadeia lateral do aminoácido é inédito e sua estrutura foi confirmada apenas por análise de massas e IV (página 117).

A correta elucidação de sua estrutura e aplicação na preparação de *glycoclusters* derivados de pentaeritritol e dipentaeritritol está em andamento, sendo necessário a preparação de maior quantidade para realização dos acoplamentos por reação de CuAAC.

5.3 Preparação de *glycoclusters* via *Click Chemistry*

Glycoclusters contendo unidades de glicose em diferentes arranjos estruturais

Reações de cicloadição azido alcino 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) são amplamente utilizadas em química de carboidratos, com existência de vasta literatura sobre métodos de síntese e purificação dos derivados sacarídicos 1,4-dissubstituídos resultantes dessa condensação. Cientes dessas informações e da necessidade de estabelecer um protocolo de síntese simples, eficiente e aplicável ao maior número de compostos propostos, diferentes condições reacionais foram estudadas para preparação do *glycocluster* tetravalente **55** a partir de 1-azido-glicose peracetilada comercial **19** e do derivado tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** (esquema **22**).



Esquema 22. Síntese do *glycocluster* **55** a partir do derivado tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** e 1-azido-glicose **19**.

As variações envolveram diferentes sistemas de solvente, temperatura, tempo e métodos de aquecimento (convencional ou micro-ondas) e os resultados foram sumarizados na tabela **2**. Em todos os experimentos foram utilizados 1,1 equivalentes de azido, sulfato de cobre ($CuSO_4$) 10% e 0,3 equiv. de ascorbato de sódio, para cada grupo alcino presente no derivado tetra-*O*-propargil-pentaeritritol **17** (LEONETI et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; TIWARI et al., 2016).

Tabela 2. Resultados obtidos no estudo de condições reacionais para obtenção do *glycocluster* **55**

	Aquecimento	Temperatura	Potência	Solvente	Tempo	Resultado
1	Convencional	70°C	-------	DMF	24h	20%
2	MO	70°C	100 W	DMF	10 min (3x)	40%
3	MO	80°C	100 W	DMF	10 min (3x)	83%
4	-------	Ambiente	-------	THF/H_2O	24h	MP*
5	MO	70°C	100 W	THF/H_2O	10 min (3x)	MP*

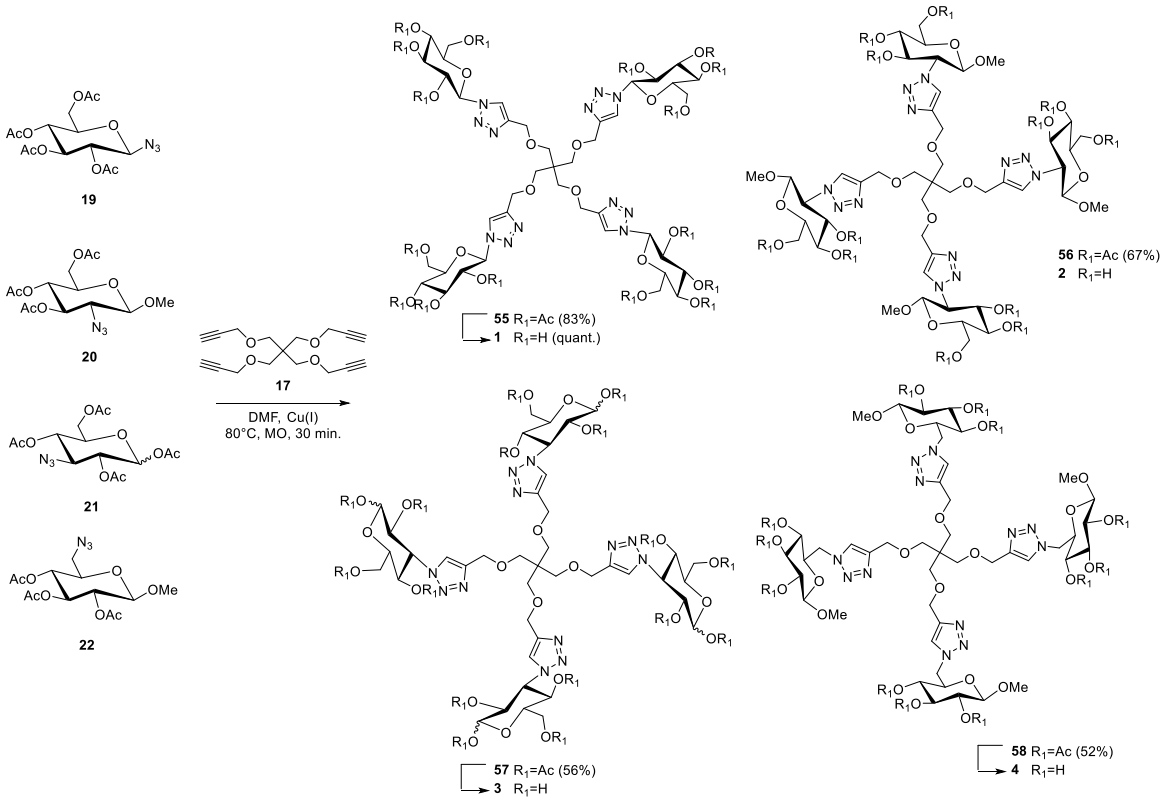
* MP = material de partida

Em todos os casos o progresso das reações foi periodicamente acompanhado por CCD, sendo as condições 2, 3 e 5 verificadas a cada ciclo de aquecimento. A irradiação foi mantida até a formação de apenas duas manchas com R_f=0,15 e 0,83 [AcOEt/hexano (8:2)] referentes ao produto **55** e ao excesso de azido **19**, respectivamente, ou até que não fossem mais observadas mudanças na placa.

Nos experimentos 1, 2 e 3, a mistura foi seca e repetidamente co-evaporada com tolueno para remoção completa de DMF. A mistura foi purificada por cromatografia *flash* automatizada, sem remoção dos catalisadores inorgânicos. Comparativamente, o melhor rendimento (83%) foi obtido com aquecimento por MO a 80 °C, utilizando *N*-dimetilformamida como solvente.

A reação completa (quatro posições) foi evidenciada no espectro de RMN de ^{1}H pela observação de apenas um simpleto em δ 8,01, região típica do hidrogênio do anel 1,2,3-triazol, além da ausência de sinais entre δ 2,3-2,5 que poderiam ser atribuídos à presença de um grupo acetileno. Houve ainda uma mudança significativa no deslocamento químico do hidrogênio anomérico da glicose, que passou de δ 4,67 (1H, d, *J* 8,9 Hz) no azido precursor **19** para δ 6,05 (4H, d, *J* 9,3 Hz) no produto **55**. A mudança de H-1 e demais hidrogênios do açúcar para região de menor blindagem é condizente com a presença do anel triazol (efeito anisotrópico). A menor influência nos valores de deslocamento químico foi observada para os H-6 (a e b) que passaram de δ 4,28 e 4,20 (**19**) para δ 4,33 e 4,17 (**55**). Quanto aos grupos CH_2 da estrutura central do esqueleto de pentaeritritol, esses foram observados em δ 3,46 (8H, s) e 4,62 (8H, m). Os sinais correspondentes aos carbonos do anel triazol foram observados em δ 146,0 e 121,4 no espectro de RMN de ^{13}C.

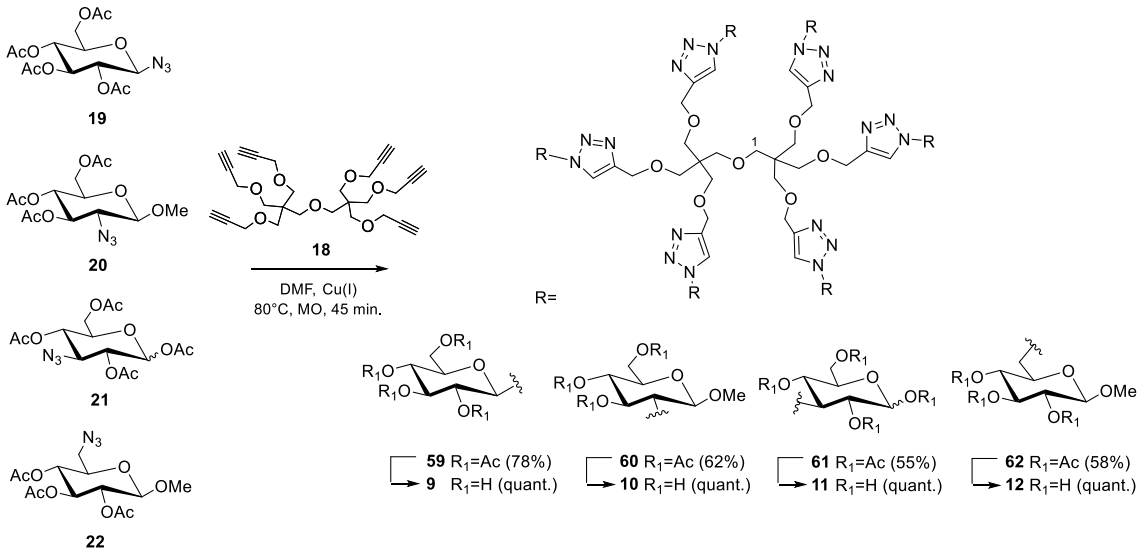
A melhor condição reacional estabelecida para preparação do composto **55** (experimento 3 – tabela **2**) foi então extrapolada para síntese dos demais *glycoclusters* tetravalentes **56**, **57** e **58**, sendo estes obtidos com 67, 56 e 52% de rendimento, respectivamente. A etapa final de remoção dos grupos acetila foi realizada em meio básico, pela adição de metóxido de sódio (MeONa 1M) à uma solução concentrada dos derivados *O*-acetilados em metanol. As desproteções dos compostos **55-58** forneceram os *glycoclusters* de interesse **1-4** em rendimentos próximos a 100% (esquema **23**).



Esquema 23. Novos *glycoclusters* obtidos a partir de reações CuAAC entre o bloco **17** e glicose funcionalizada em diferentes posições (C-1, C-2, C-3 e C-6)

As estruturas de todos os compostos protegidos **55-58** foram confirmadas por RMN de ^{1}H e ^{13}C e espectrometria de massas. Tal como destacado para o *glycocluster* **55,** apenas um sinal referente ao hidrogênio do anel 1,2,3-triazol foi observado na região de δ 8,00, comprovando a reação completa e o caráter simétrico das estruturas. A ausência de outros sinais na região de próton aromático reforça ainda a formação regiosseletiva do isômero 1,4-dissubstituído. Em geral, houve também desblindagem dos hidrogênios do açúcar precursor, sendo o hidrogênio próximo ao anel 1,2,3-triazol o mais afetado.

Com relação à obtenção de *clusters* hexavalentes foi utilizado a princípio o mesmo protocolo estabelecido para a síntese do composto **55** e demais derivados tetravalentes. Todavia, como esperado, o tempo de conversão e funcionalização de todas as seis posições dos grupos acetilenos de hexa-*O*-propargil-pentaeritritol **18** foi superior (3 ciclos de 15 min, MO) quando comparado às reações com o bloco **17** (3 ciclos de 10 min, MO). Dessa forma, os compostos **59-62**, contendo seis unidades de glicose ligadas pelas posições C-1, C-2, C-3 ou C-6 foram obtidos com rendimentos satisfatórios entre 55 e 78% (esquema **24**).



Esquema 24. *Glycoclusters* hexavalentes **59**-**62** peracetilados e **9**-**12** desprotegidos contendo unidades de glicose em diferentes arranjos

Após consumo total do alcino **18**, *N*,*N*-dimetilformamida foi removida por co-evaporações sucessivas com tolueno e os produtos purificados por CCC [AcOEt/Hexano 50-100%]. A estrutura dos compostos protegidos foi confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C e espectrometria de massas. Tal como observado para os *glycoclusters* tetravalentes, houve deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios do açúcar próximos ao anel 1,2,3-triazol, para a região mais desblindada do espectro. Da mesma forma, os sinais referentes ao hidrogênio do anel triazol foram identificados em torno de δ 8,00. A distinção entre os compostos tetra e hexavalentes pôde ser feita essencialmente por um simpleto observado entre δ 3,10-3,30 com integral relativa de 4, referente à CH_2-1 central (ver esquema **23**). As desproteções foram realizadas conforme protocolo clássico anteriormente descrito (MeONa/MeOH 1M) em excelentes rendimentos e as estruturas dos compostos de interesse **9**-**12** confirmadas apenas por RMN de ^{1}H e análises de massas.

A síntese dos *glycoclusters* **7** (ácido siálico), **9** e **13** (glicose e galactose respectivamente ligadas a dipentaeritritol por C-1) está descrita na literatura para aplicações diferentes das aqui propostas. Todos os demais *homo-glycoclusters* sintetizados neste trabalho são inéditos (WEÏWER et al., 2010; RAJARAM et al., 2014)

Ampliando a proposta inicial para inibidores multivalentes de glucosidases, a qual previa apenas a série de *homo-clusters* descrita acima, houve interesse em preparar também outros novos *hetero-glycoclusters* (figura **22**), análogos aos compostos **1** e **4,** mas apresentando 3 unidades de glicose (via C-1 ou C-6) e uma unidade imino-açúcar derivada de

1-desoxinojirimicina ou seu isômero L-gulitol (configuração invertida em C-2 e C-5), recentemente descrito pelo grupo (ZAMONER et al., 2016; KATO et al., 2005).

A forte interação de imino-açúcares com uma ampla gama de glicosidases, e o sucesso da incorporação de unidades de DNJ em sistemas multivalentes diversos sobre a atividade de enzimas como α-manosidase, α-fucosidase e glucocerebrosidase (KANFAR et al., 2015; MATASSINI et al., 2016) torna a inclusão dessa unidade em sistemas pequenos e pouco flexíveis como TRIS ou pentaeritritol bastante intrigante e ainda pouco explorado.

A comparação dos valores de inibição das enzimas *α*- e *β*-glucosidases para estes compostos com os valores obtidos para os *homo-glycoclusters* correlatos **1** e **4** pode fornecer informação inédita importante, sobre o impacto de unidades de DNJ nesses pequenos sistemas multivalentes.

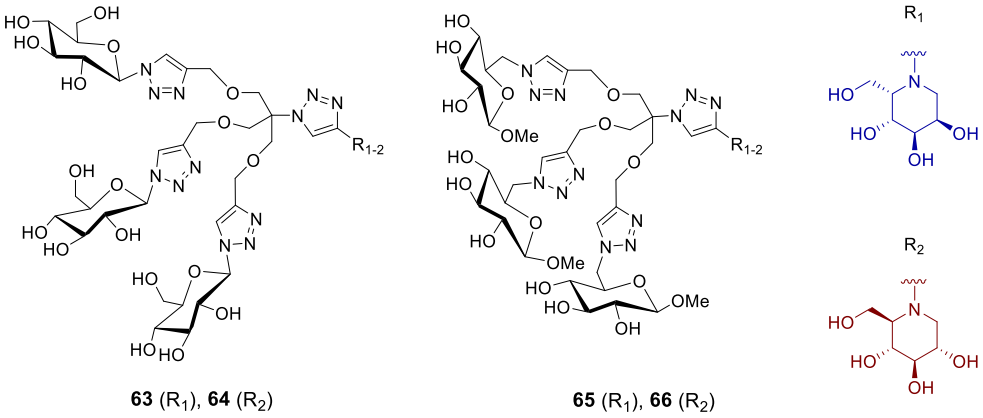
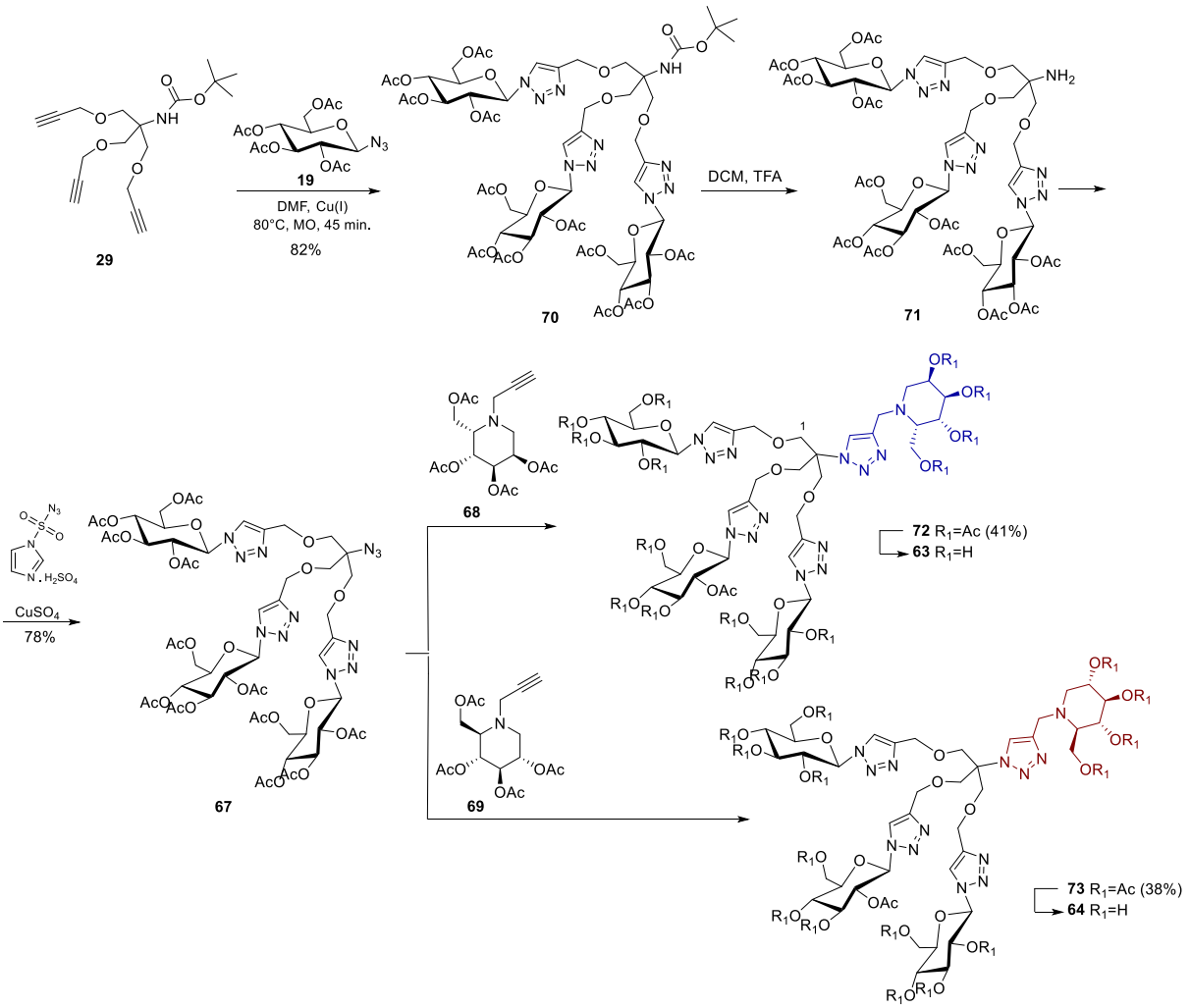


Figura 22. *Hetero-glycoclusters* **63**-**66**, apresentando 3 unidades de glicose conectadas via C-1 ou C-6. R_1: L-gulo- e R_2: D-glico-imino-açúcares (DNJ).

A síntese dos *glycoclusters* **63** e **64** foi realizada pela condensação entre o *cluster* trivalente glico-funcionalizado **67** e derivados *N*-propargilados de L-gulo 1-desoxinojirimicina **68** ou D-gluco 1-desoxinojirimicina **69**, respectivamente, anteriormente preparados no laboratório (esquema **25**). A reação de cicloadição foi conduzida em condição similar àquela utilizada para síntese do composto **55** e foi seguida de desproteção básica com MeONa/MeOH.

A preparação do composto **67,** por sua vez, foi realizada em três etapas. Na primeira etapa, o intermediário *N*-Boc protegido **70** foi obtido com 82% de rendimento a partir da reação CuAAC entre os blocos TRIS-propargil **29** e 1-azido-glicose **19**, sendo a estrutura do composto seguramente confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C. A remoção quantitativa do grupo *N*-Boc de **70** e conversão subsequente do amino **71** a azido *via* diazo-transferência, utilizando o reagente mais seguro sulfato de 1-H-imidazol-1-sulfonilazido, forneceu o composto **67** em

78% de rendimento (esquema **25**). O desaparecimento de um simpleto intenso em δ 1,41 no espectro de RMN de ^{1}H e do sinal em δ 154 (RMN de ^{13}C) confirmaram a remoção do grupo *N*-Boc. Adicionalmente, o espectro na região do infravermelho apresentou a banda em 2107 cm $^{-1}$, característica de grupo azido de **67**.



Esquema 25. Síntese dos *hetero-glycoclusters* **63** e **64**

Os espectros de RMN dos compostos **72 e 73** apresentaram sinais condizentes com a presença de dois tipos de açúcares e anéis 1,2,3-triazólicos em proporção 3:1 (figura **23**). Um exemplo claro são os dois simpletos em δ 7,99 (3H, s) e 7,78 (1H, s) no espectro de RMN de ^{1}H do composto **72**. Para esse mesmo composto, foi observado um deslocamento considerável dos hidrogênios metilênicos centrais para região de desblindagem, passando de δ 3,63 no precursor **67** para 3,98 no composto **72**. Adicionalmente, os prótons em C-1 e C-6 do imino L-gulitol DNJ foram observados em δ 2,99-2,84 e 4,49 (integral relativa de 1), respectivamente.

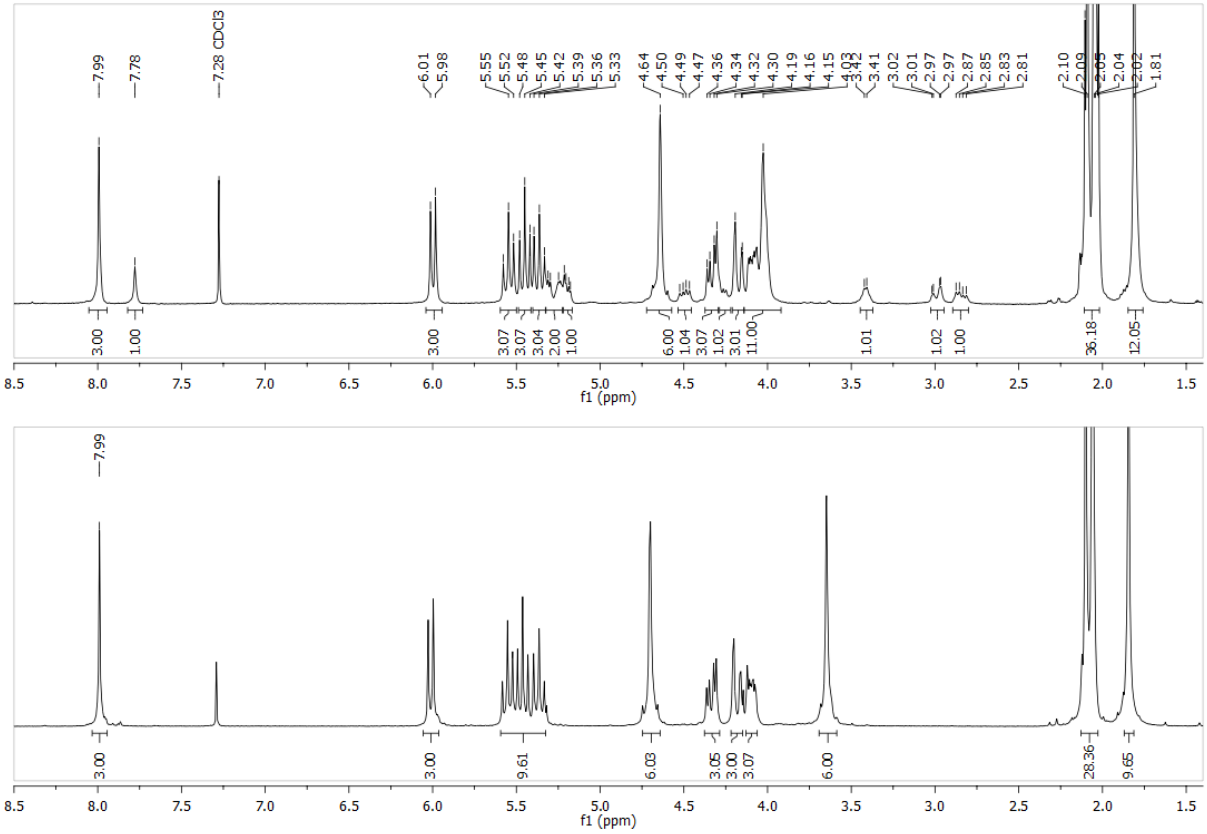
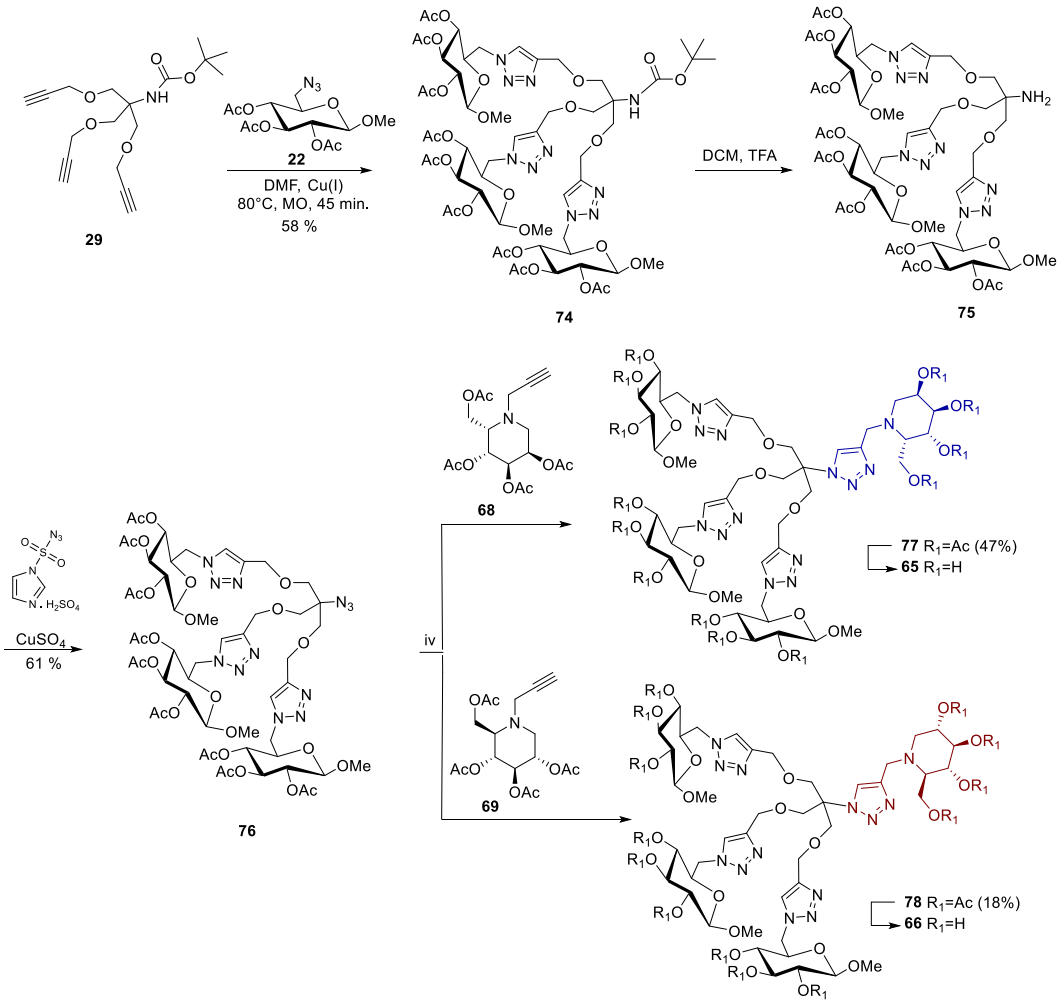


Figura 23. Comparação entre os espectros de RMN de ^{1}H dos compostos tetra- **72** (superior) e trivalente **67**.

Os correspondentes *hetero-clusters* **65** e **66**, com unidades de glicose ligadas pela posição C-6 de D-glicose, foram obtidos seguindo a mesma sequência de reações discutida para **63** e **64**, todavia envolvendo a preparação do intermediário *N*-Boc protegido **74** preparado pela condensação entre o bloco TRIS-azido **29** e 6-azido-glicose **22** (esquema **26**) e posterior desproteção do grupo carbamato para formação do derivado com função amino livre **75** e conversão ao correspondente azido **76** por reação de diazo-transferência de forma similar à descrita no esquema **25**.

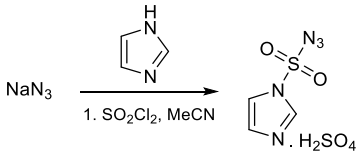
O acoplamento via CuAAC entre o azido **76** e os derivados *N*-propargilados L-gulo **68** ou D-gluco DNJ **69** forneceu os *glycoclusters* protegidos **77** e **78**, que foram finalmente foram convertidos nos produtos de interesse **65** e **66** após tratamento com metóxido de sódio em metanol (esquema **26**).



Esquema 26. Síntese dos *hetero-glycoclusters* **65** e **66** a partir do bloco trivalente **76**

Com relação às reações de diazo-transferência realizadas acima, vale destacar que o processo de conversão de aminas primárias em grupos azido em rendimentos razoáveis é, frequentemente, realizado por reações de diazo-transferência utilizando o reagente triflil azida. Todavia, o emprego de TfN_3 apresenta limitações consideráveis, tais como: necessidade de utilização imediata após preparo, decorrente de sua natureza explosiva e rápida degradação, e rendimentos inconsistentes durante sua preparação *in situ* (NYFFELER et al., 2002; GODDARD-BORGER & STICK, 2007).

Considerando assim a necessidade de obtenção azidos **67** e **76** em bons rendimentos e, as restrições de uso de TfN_3, foi preparado o derivado sulfato de 1-H-imidazol-1-sulfonilazido (esquema **27**). Este sal, obtido na forma de um sólido cristalino estável, é descrito na literatura como um eficiente reagente de diazo-transferência para uma variedade de estruturas sacarídicas e não-sacarídicas (FISCHER et al., 2012; GODDARD-BORGER & STICK, 2007).



Esquema 27. Síntese do reagente de diazo-transferência sulfato de 1-H-imidazol-1-sulfonilazido

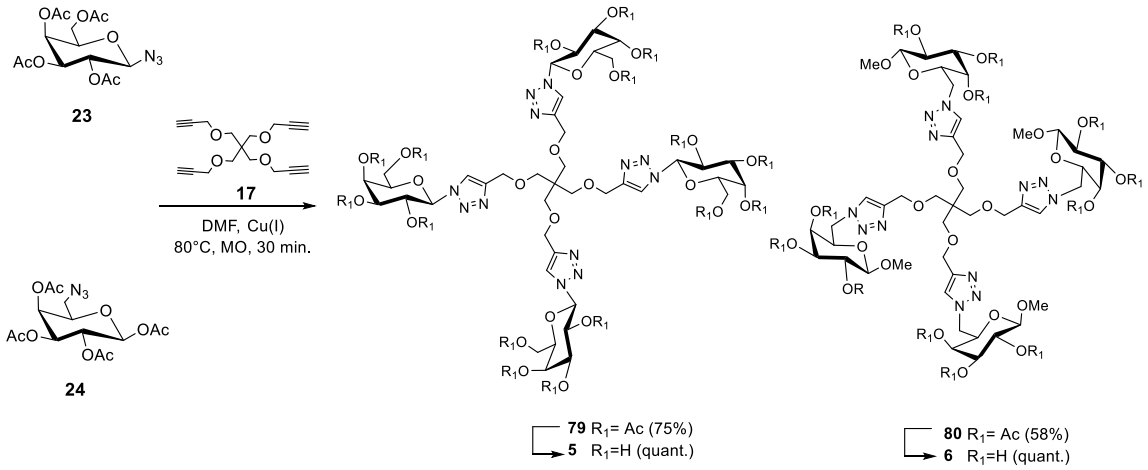
A síntese do composto 1-sulfonilazido foi realizada conforme protocolo descrito por Fischer e colaboradores (2012) a partir de imidazol comercial. A precipitação do sal ocorreu após adição de H_2SO_4 concentrado e o produto seco foi obtido com 20% de rendimento. A estrutura do sal foi confirmada por RMN de ^1H e os sinais são condizentes com a literatura consultada (FISCHER et al., 2012; GODDARD-BORGER & STICK, 2007).

Apesar do baixo rendimento, comparado aos 63% citados na referência utilizada, as condições reacionais não foram otimizadas porque o reagente foi preparado em média escala (5,3 g), em apenas uma tentativa, a partir de materiais de baixo custo.

Glycoclusters contendo unidades de galactose e ácido siálico em diferentes disposições

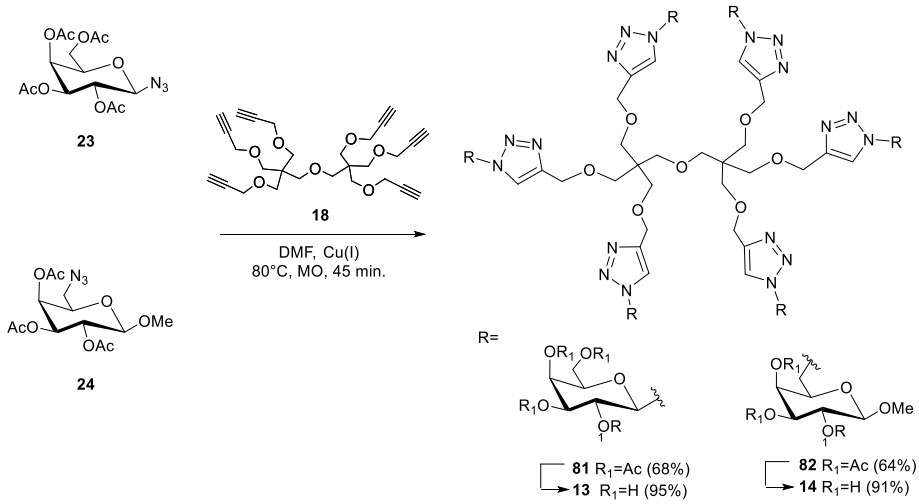
A síntese dos *glycoclusters* tetravalentes derivados de galactose **5** e **6** (esquema **28**) foi realizada sob as mesmas condições reacionais empregadas na obtenção dos derivados de glicose **1**-**4**. As reações de CuAAC contendo D-galactose ligadas pelas posições C-1 e C-6 foram priorizadas pela maior facilidade sintética dos azido-açúcares correspondentes **23** e **24**. Como citado anteriormente, 3-azido-galactose poderia ser preparado pela mesma estratégia utilizada para obtenção do bloco **21**, partindo agora de 1:2,5:6-di-*O*-isopropilideno-α-D-gulofuranose. Já a síntese de 2-azido-galactopiranosídeo em condições semelhantes à utilizada para a síntese do bloco **20** (Glu-2-N_3) requer o uso de cloridrato de D-(+)-galactosamina, consideravelmente mais caro que D-(+)-glicosamina usado como precursor para o bloco **20**.

Assim, os compostos protegidos **79** e **80** foram preparados a partir dos azidos de galactose **23** e **24** e o derivado acetilênico de pentaeritritol **17** com 75 e 58% de rendimento, respectivamente. Os *glycoclusters* **79** e **80** foram completamente caracterizados (RMN de ^1H e ^{13}C e HRMS) antes da remoção dos grupos protetores.



Esquema 28. Síntese dos *glycoclusters* **5** e **6** contendo 4 unidades de galactose ligadas pelas posições C-1 e C-6.

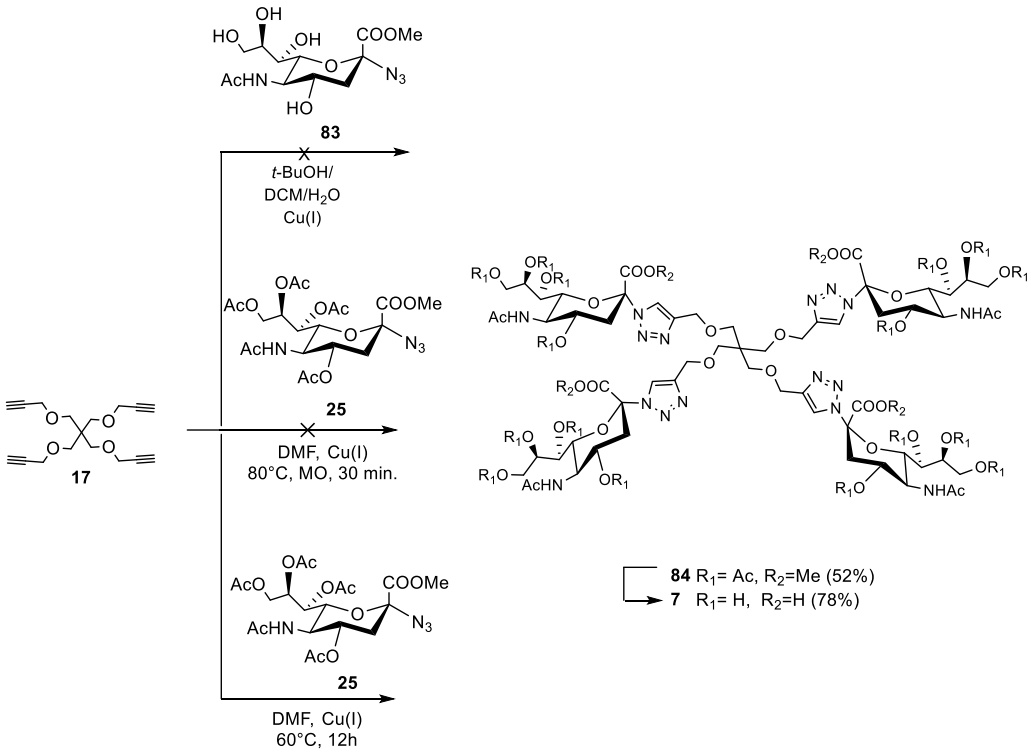
Também como realizado para os derivados hexavalentes da seção anterior (**9**-**12**), a síntese dos compostos **13** e **14** foi conduzida em maior tempo, em 3 ciclos de 15 minutos de aquecimento a 80°C. Dessa forma, os derivados protegidos **81** e **82**, preparados a partir dos azidos de galactose **23** e **24** foram obtidos em 68 e 64% de rendimento, respectivamente. Os *glycoclusters* **81** e **82** foram *O*-desacetilados em meio básico para obtenção dos compostos de interesse **13** e **14** com 95 e 91% de rendimento (esquema **29**).



Esquema 29. Síntese dos *glycoclusters* **13** e **14** contendo unidades de galactose ligadas pelas posições C-1 e C-6.

A síntese do *glycocluster* de ácido siálico **7** já havia sido descrita por Weïwer e colaboradores (2009), que avaliou suas propriedades de inibição de neuraminidase de influenza. Dessa forma, a primeira tentativa de obtenção desse composto foi conduzida nas condições exploradas por esses autores, utilizando ácido siálico funcionalizado com grupo azido, mas contendo hidroxilas livres, derivado **83**. Surpreendentemente, não houve

conversão completa dos materiais de partida no produto desejado (esquema **30**). A presença de sinais adicionais na região de δ 8,00, típica de hidrogênio de anel 1,2,3-triazol, sugere a presença de uma mistura de produtos onde um ou mais grupos acetileno de **17** não foram convertidos ao correspondente derivado glicosil-triazólico.



Esquema 30. Condições testadas na preparação do *glycocluster* de ácido siálico tetravalente **7**

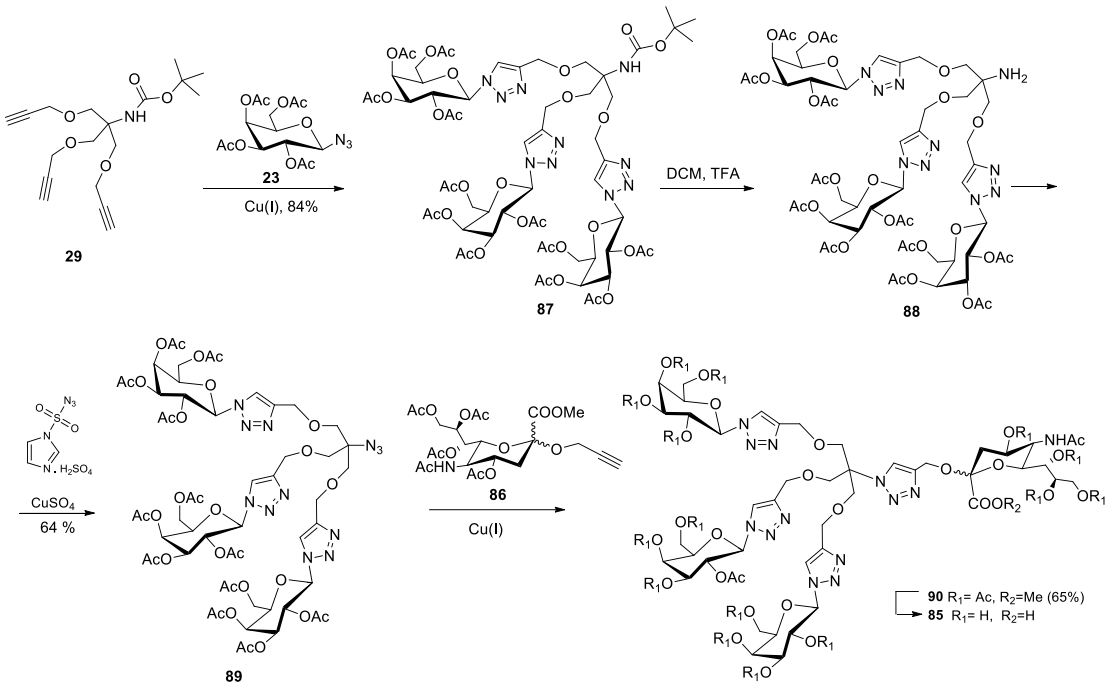
Uma segunda tentativa, utilizando agora o derivado peracetilado de azido ácido siálico **25** e as condições reacionais até então empregadas para os *homo-glycoclusters* de glicose e galactose, também não permitiu a obtenção do composto de interesse protegido **84** com recuperação de 65% do azido **25**.

Finalmente, o *glycocluster* protegido **84** foi preparado em 52% de rendimento por aquecimento convencional a 60°C durante 12 horas. O composto **84** foi rapidamente *O*-desacetilado utilizando MeONa/MeOH e sequencialmente desesterificado pelo tratamento com KOH (0,2 M) por 10 horas, fornecendo o *glycocluster* **7** em 78% de rendimento após duas etapas.

Síntese do *hetero-glycocluster* de ácido siálico e galactose 85

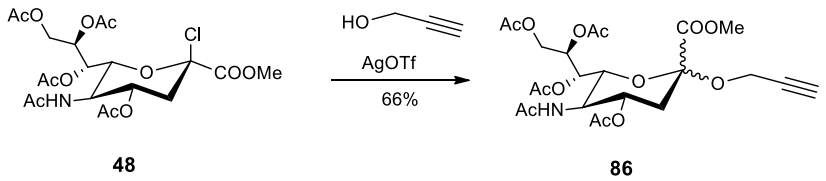
A mesma estratégia utilizada para obtenção dos compostos **63-66**, contendo unidades bioativas distintas de glicose e DNJ, foi utilizada para a síntese de um *hetero-glycocluster*

contendo três unidades de galactose ligadas pela posição C-1 e um bloco de ácido siálico (esquema **31**).



Esquema 31. Síntese do *hetero-glycocluster* de ácido siálico **85**

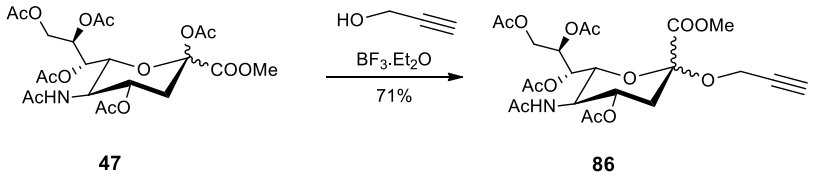
Conforme detalhado no esquema **31**, a preparação do *glycocluster* misto **85**, via o *glycocluster* protegido **90**, exigiu a preparação prévia do bloco ácido siálico funcionalizado com grupo acetileno **86**, a qual foi realizada a partir do cloreto de ácido siálico **48** (esquema **32**), intermediário anteriormente obtido durante a preparação do azido **25** (ver esquema 20). A reação de glicosilação do cloreto **48** com álcool propargílico, foi realizada na presença de triflato de prata (AgOTf) como catalisador e DCM anidro como solvente. A mistura foi inicialmente resfriada a -20°C para adição de AgOTf e em seguida permaneceu sob agitação por 2h à temperatura ambiente. O produto **86** foi obtido como mistura de isômeros (1:0,80 com 66% de rendimento após purificação por cromatografia *flash* [AcOEt/Hex (7:3)]. Apesar das diversas tentativas, não foi possível realizar a separação cromatográfica dos anômeros de **86** e, por esta razão, foram usados como mistura na reação de acoplamento com o *cluster* azido TRIS-Gal **89**, semelhante ao já descrito na preparação dos *glycoclusters* **63**-**66**, mas neste caso contendo três unidades de galactose (ao invés de glicose) para obtenção do produto desejado protegido **90**. A desproteção ocorreu de forma semelhante à anteriormente descrita e forneceu o *glycocluster* **85**.



48 **86**

Esquema 32. Síntese de 2-propinil-ácido siálico utilizando AgOTf como catalisador

Alternativamente, a síntese de **86** a partir do ácido siálico peracetilado **47** foi também investigada, tendo em vista a possibilidade de redução do número de etapas sintéticas e maior estereosseletividade (CAMPO et al., 2012). A reação de glicosilação do derivado de ácido siálico **47** com álcool propargílico foi realizada utilizando $BF_3.Et_2O$ como promotor sendo obtido o produto **86** com 56% de rendimento (esquema **33**).



47 **86**

Esquema 33. Síntese de 2-propinil-ácido siálico utilizando $BF_3.Et_2O$ como catalisador

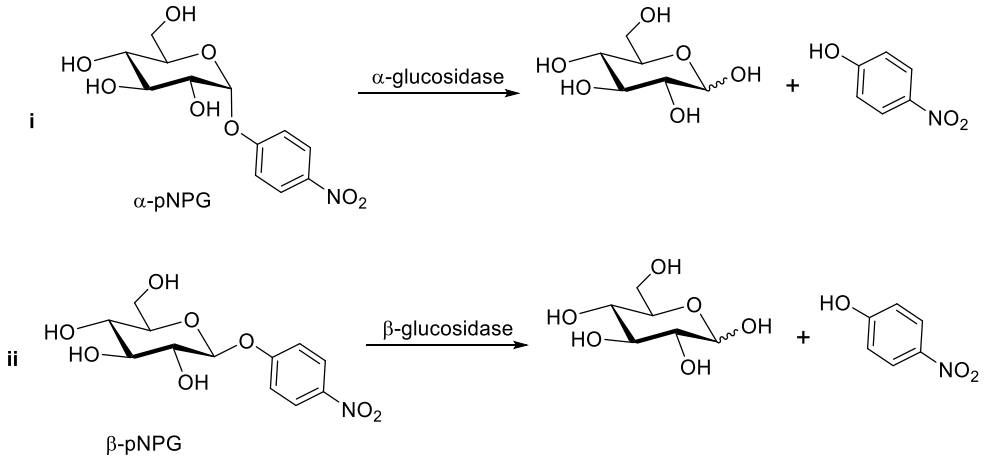
Assim como observado para reação com AgOTf, a reação não foi estereosseletiva e o produto **86** obtido como mistura de isômeros α/β (1:0,7). O espectro de RMN de ^1H apresentou dois sinais característicos de grupos C*H*-propargil em δ 2,55 e 2,45 (t, *J* 2,4 Hz), bem como diversos sinais na região de δ 2,00, típica de grupos acetila.

5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 Inibição das enzimas *α*- e *β*-glucosidase

Os ensaios de inibição das enzimas *α*-glucosidase (de *Saccharomyces cerevisiae* e arroz) e *β*-glucosidase (de amêndoas) foram realizados pelo método colorimétrico descontínuo descrito por Dale e colaboradores (1985) que quantifica a liberação de *p*-nitrofenol a partir da clivagem da ligação *O*-glicosídica do substrato *α*- ou *β*-D-glicopiranosídeo de 4-nitrofenila (*p*-NPG) catalisada por essas enzimas. Em pH básico *p*-nitrofenol é completamente desprotonado e convertido ao íon *p*-nitrofenolato que pode ser facilmente detectado em espectrofotômetro a 405 nm. Como a atividade enzimática frente a

esse substrato é seletiva, os isômeros α (i) e β (ii) específicos foram utilizados em cada caso (esquema **34**).



Esquema 34. Reação de clivagem dos substratos α- e β-pNPG pela ação de glucosidases

As três enzimas usadas são comercialmente disponíveis e rotineiramente usadas para determinar os padrões de potência e seletividade de inibidores de glucosidases. Além de principal escolha para ensaios de inibição *in vitro,* modelos homólogos de α-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* são frequentemente empregados em ensaios *in silico* para o planejamento de novos protótipos inibidores, já que a estrutura cristalográfica da enzima lisossomal humana de maior interesse permanece não resolvida (PARK et al., 2008).

A primeira etapa para padronização do ensaio foi estabelecer as melhores diluições para cada enzima estabelecendo o gráfico que relaciona dispersão óptica (D.O) e tempo (minutos). Os parâmetros cinéticos experimentais descritos na literatura foram considerados para escolha da concentração de substrato, pH ideal e temperatura:

EC 3.2.1.20: α-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* [Km para α-pNPG= 2,4 mM; pH= 6,8]
Tampão: Acetato de sódio (NaOAc) - 20mM, PIPES - 10mM, EDTA - 0,1mM - pH 6,8 - 37°C.

EC 3.2.1.20: α-glucosidase de arroz [Km para α-pNPG = 2,62 mM; pH= 4,0]
Tampão: NaOAc 50 mM - pH 4,0 - 37°C

EC 3.2.1.21: β-glucosidase de amêndoas [Km para β-pNPG= 2,5 mM; pH= 6,2]
Tampão: NaOAc - 20 mM; PIPES - 10 mM; EDTA - 0,1 mM - pH 6,2 - 37°C

Os ensaios para determinação de atividade hidrolítica foram realizados em placas de 96 poços contendo 50 µL de tampão, 25 µL de soluções das enzimas (α- ou β-glucosidase) em

diferentes concentrações e 25 µL do substrato *p*-NPG específico [conc. final 0,2 mM]. A liberação de *p*-nitrofenol a partir do glicosídeo correspondente foi acompanhada pela leitura de D.O (405 nm) a cada dez minutos, durante 50 a 60 minutos. Todas as reações foram realizadas em duplicata e seus dados foram analisados no programa Excel 2016. Como exemplificado na figura **24** para *β*-glucosidase, a escolha da diluição ideal levou em consideração a apresentação de um perfil hiperbólico ideal (0,075 U/mL). O tempo de leitura para o ensaio com os inibidores foi estipulado considerando sempre um valor de dispersão óptica de 0,4 (aproximadamente 10 minutos nesse caso).

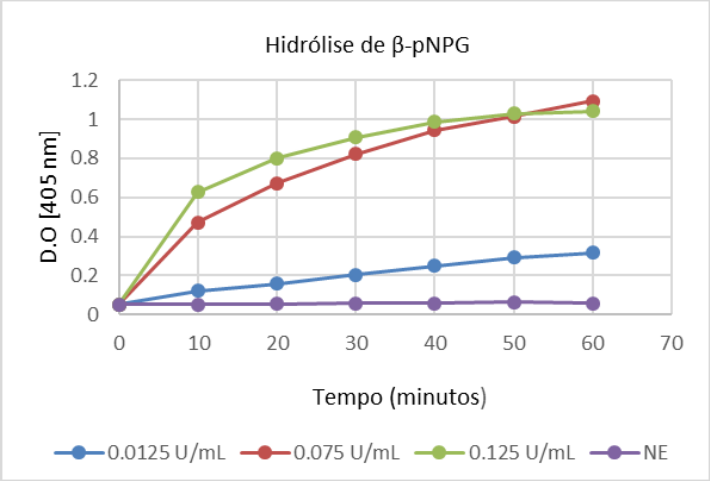


Figura 24. Hidrólise do substrato *β*-p-PNG pela ação da enzima *β*-glucosidase em diferentes concentrações. Controle negativo (NE) = ausência de enzima.

Os ensaios para determinação da atividade inibitória com os *homo-glycoclusters* derivados de glicose **1-4** e **9-12** e *hetero-clusters* (glicose + DNJ) **63-66** foram realizados nas concentrações de 5000 µM e 1000 µM, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e réplica (dois dias consecutivos). 1-Desoxinojirimicina (DNJ) foi utilizada como controle positivo e, como esperado, apresentou 100% de inibição nessas concentrações (ASANO et al., 1994; KATO et al., 2005).

Os compostos que apresentaram mais de 50% de inibição nas respectivas concentrações testadas foram submetidos a diluição seriada para o cálculo dos valores de $IC_{50)}$. Os resultados estão apresentados na tabela **3**.

Faixa de concentração testada para determinação dos valores de IC_{50}:

- *homo-glycoclusters*: 5000, 2500, 1250, 625 e 312,5µM
- *hetero-glycoclusters:* 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µM

Tabela 3. Valores de inibição observados para as enzimas α e β-glucosidases

Compostos	α-Glucosidase de *S. cerevisiae* (IC_{50} - µM)	α-Glucosidase de arroz (IC_{50} - µM)	β-Glucosidase de amêndoas doces (IC_{50} - µM)
Homo-glycoclusters			
Tetravalentes			
1	NI[a]	NI[a] (12.6%)	NI[a]
2	NI[a]	NI[a]	NI[a]
3	~5000 (49.7%)	3100 ± 50	1002 ± 50
4	NI[a]	NI	970 ± 20
Hexavalentes			
9	NI[a]	NI[a] (5%)	NI
10	NI[a]	NI[a] (21%)	NI
11	NI[a]	NI[a] (39%)	1040 ± 100
12	NI[a] (30%)	NI[a] (21%)	1300 ± 60
Hetero-glycoclusters			
63	210 ± 30	206 ± 40	NI[b]
64	860 ± 120	1010 ± 90	NI[b]
65	225 ± 50	210 ± 20	713 + 60
66	370 ± 40	------	------
DNJ (4)	110 ± 40	0.090 ± 20	370 ± 40

NI[a] Inibição menor que 50% a 5000 µM; NI[b] Inibição menor que 50% a 1000 µM.

Os compostos **1**-**4**, bem como os seus correspondentes análogos hexavalentes **9**-**12** apresentaram menos de 50% de inibição em relação às enzimas α-glucosidase de *S. cerevisiae* e de arroz, mesmo a uma concentração muito elevada. A única exceção foi *glycocluster* tetravalente **3** (glicose ligada por C-3) que demonstrou atividade muito fraca (IC_{50} de 5000 e 3100 µM, respectivamente).

Por outro lado, os ensaios realizados com β-glucosidase, na mesma concentração (5,0 mM) apresentaram resultados ligeiramente melhores. Tanto os *glycoclusters* **3** e **4** (glicose ligada por C-3 ou C-6, respectivamente), quanto seus pares hexavalentes **11** e **12** exibiram fracas atividades anti-β-glucosidase com valores de IC_{50} em torno de 1000 µM (tabela **3**).

Com relação aos *hetero-glycoclusters* **63**-**66** (três unidades de glicose ligadas por C-1 ou C-6 e um bloco L-gulo ou D-gluco DNJ), os compostos **63**, **64** e **66** demonstraram atividade inibitória moderada em relação a α-glucosidase de *Saccharomyces* (210, 225 e 370μM, respectivamente). De forma inesperada o composto **64**, que contém três glicoses ligadas pela posição C-1 e o bloco D-gluco DNJ apresentou atividade quatro vezes menor do que análogo **63**, com as mesmas unidades de glicose, mas contendo o L-gulo imino-açúcar. Apenas o composto **65** (blocos de glicose ligados por C-6) apresentou fraca atividade inibitória de β-glucosidase.

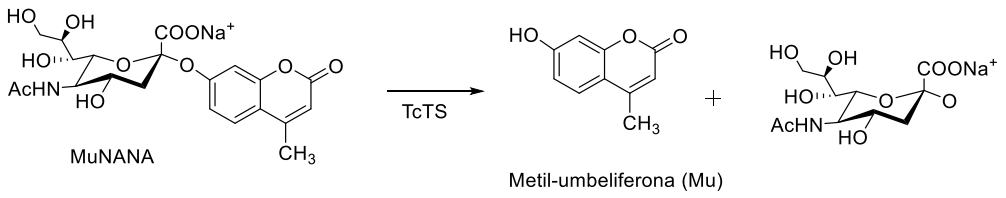
Em geral os dados indicaram a importância das unidades de DNJ para a atividade de inibição de α-glucosidase, principalmente quando se comparam os compostos **63**-**66** com seus

correspondentes *glycoclusters* tetravalentes **1** e **4**. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na inibição das enzimas devido ao arranjo posicional da glicose em C-1 ou C-6, a natureza dos imino-açúcares demonstrou certa influência. Os compostos **63** e **65** (isômero L-gulo imino-açúcar) foram os compostos mais ativos do estudo atual, com valores de IC_{50} de 210 e 225 μM para α-glucosidase de *Saccharomyces*. Apesar das atividades inferiores ao composto de referência DNJ (110 μM), estes valores são interessantes porque *glycoclusters* trivalentes de imino-açúcar (figura **11),** descrito na seção de Introdução, não apresentou qualquer atividade contra α-glucosidase, mas sim apenas para α-manosidase de feijão.

Todavia, quando comparamos nossos valores com os dados da literatura para estruturas com arranjos multivalentes inibindo glucosidases (Ki e IC_{50} sub-micromolares), fica clara a necessidade de introdução de grupos espaçadores maiores entre as unidades glicosídicas, especialmente para alvos com sítios ativos menos acessíveis como as glucosidases avaliadas. Assim, uma possível explicação para esta atividade moderada pode ser devida ao efeito volumoso exercido pelas unidades de glicose expostas próximas ao resíduo de imino-açúcar que deve impedir o seu correto posicionamento no sítio ativo da enzima.

5.4.2 Inibição de *trans*-sialidase (TcTS)

O ensaio de inibição de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* foi realizado por método fluorimétrico contínuo que mede diretamente a liberação do grupo fluorescente metil umbeliferona (Mu) a partir da clivagem da ligação glicosídica do substrato ácido 2-(4-metilumbeliferil)-D-*N*-acetilneurâmico (MuNANA) pela ação de TcTS (esquema **35**) (COREY, 2002).



Esquema 35. Reação de TcTS na presença do doador MuNANA permite a detecção de metil-umbeliferona em fluorimetro. Comprimentos de onda 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão).

Parâmetros cinéticos de TcTS como Km (constante de Michaelis-Menten) e Vmax (velocidade máxima) foram anteriormente padronizados no laboratório utilizando esse mesmo método. Dessa forma, a diluição enzimática ideal dos lotes da enzima *trans*-sialidase

recombinante fornecidos pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP) foi facilmente obtida, dessa vez pela comparação da velocidade de reação com os dados anteriores. A velocidade de reação foi calculada por regressão linear com base no gráfico que relaciona unidades de fluorescência (U.F.) e tempo (minutos).

Assim, o ensaio com os inibidores foi realizado em placas de 96 poços contendo 25 µL de tampão fosfato (pH 7,0), 25 µL de enzima diluída, 25 µL de uma solução 4 mM dos *glycoclusters* derivados de galactose (**5, 6**, **13** e **14**), ácido siálico (**7**) ou o *hetero-glycocluster* (**85**) e 25 µL de uma solução 0,4 mM do substrato MuNANA. Sabendo que o volume final em cada poço foi de 100 µL, a concentração final dos compostos testados e substrato foi de 1 e 0,1 mM, respectivamente. Como controles positivos foram empregados os compostos piridoxal fosfato e 2-desoxi-2,3-deidro-*N*-acetil ácido neuramínico (DANA).

A fluorescência liberada em decorrência da clivagem da ligação glicosídica do substrato MuNANA foi monitorada a 25 °C durante 10 minutos (leitura em intervalos de 1 minuto) em comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão). Todas as reações foram realizadas em triplicata e seus dados foram analisados no programa *GraphPad* Prisma 6.0.

A partir do gráfico que relaciona U.F. e tempo foram calculadas as velocidades de reação na presença e ausência dos inibidores, dados que, através de análise de regressão linear, forneceram os valores de inibição. As porcentagens de inibição de TcTS a 1,0 mM são apresentadas a seguir (figura **25**).

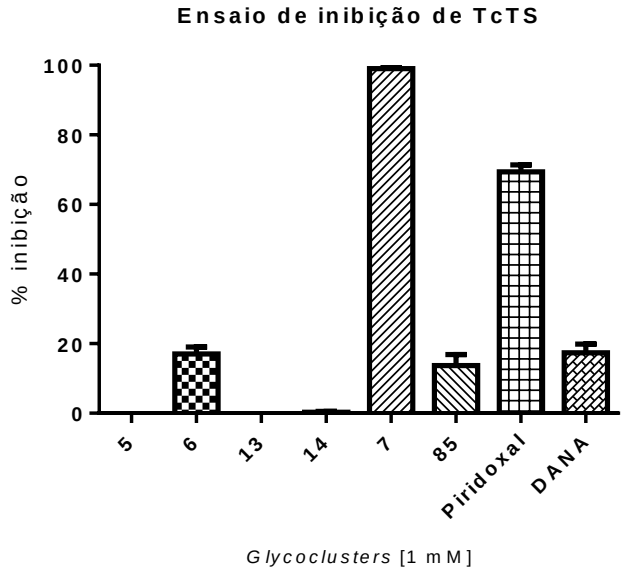


Figura 25. Resultado do ensaio de inibição de TcTS na concentração de 1,0 mM

Com base na figura **25**, é possível observar que o *glycocluster* **7** (quatro unidades de ácido siálico) apresentou 100% de inibição na concentração de 1 mM, resultado inicial bastante promissor diante da escassez de inibidores sub-micromolares de TcTS. Devido a este resultado preliminar, composto **7** foi submetido a uma serie de diluições seriadas (1000 – 62,5 µM), sendo o valor de IC_{50} (0,45 mM) calculado pela relação entre porcentagem de inibição da atividade enzimática versus a concentração do composto. Apesar deste resultado promissor, o valor de inibição para a neuraminidase viral deste mesmo *glycocluster* foi bem superior (IC_{50} 20 µM) (WEÏWER et al., 2009).

Com relação aos outros *glycoclusters*, houve fraca inibição da enzima *trans*-sialidase na presença do derivado hexavalente **6** (unidades de galactose ligadas por C-1) na concentração de 1 mM (18%). A porcentagem de inibição foi semelhante à obtida para DANA (17%) e inferior à do piridoxal fosfato (70%). Os demais derivados de galactose (**5**, **13** e **14**) foram inativos na concentração de 1 mM. Adicionalmente, o *hetero-glycocluster* **85** (três unidades de galactose e uma de ácido siálico) apresentou apenas 14% de inibição (inferior quando comparado a DANA e piridoxal fosfato).

De forma geral, os resultados indicaram que unidades de ácido siálico **7** (mimético do substrato doador), expostas na estrutura tetravalente de pentaeritritol, apresentam interações favoráveis com TcTS, enquanto a exposição de unidades de galactose nesses sistemas não tem impacto significativo sobre a atividade catalítica da enzima.

A fraca atividade apresentada pelo composto **85**, idealizado como um possível mimético de substratos duplos para interação concomitante nos sítios aceptor (galactose) e doador (ácido siálico) de TcTS sugere que uma apresentação/espaçamento ideal entre as unidades de galactose e ácido siálico não foi alcançada.

4.4.3 Ensaios de atividade tripanocida, citotóxica e bloqueio de invasão celular

Além do ensaio de inibição de *trans*-sialidase, os *glycoclusters* derivados de galactose e/ou ácido siálico **5**, **6**, **13**, **14**, **7** e **85** foram submetidos a ensaios de atividade tripanocida *in vitro*, envolvendo as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* cepa Y. Nestes estudos foram investigados a capacidade dos produtos sintetizados de (i) eliminar as forma tripomastigota e amastigota do parasita, (ii) causar citotoxicidade à fibroblastos não-infectados e (iii) impedir a invasão celular pelo parasita. Os ensaios foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi.

Avaliação da atividade tripanocida (tripomastigotas) e citotoxicidade em fibroblastos

A ação tripanocida dos *glycoclusters* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi avaliada em concentrações de 1000 a 62,5 µM. O impacto sobre a viabilidade celular foi comparado àquele causado pela ação de benznidazol a 30 μM (BZD - controle de morte).

Assim, analisando a figura **26** é possível observar que, de maneira geral, os compostos testados não apresentaram atividade significativa sobre essa forma do parasita. Apenas os *glycoclusters* **13, 14** e **85** reduziram a viabilidade celular (tripomastigotas) nas maiores concentrações testadas (1000 e 500 μM).

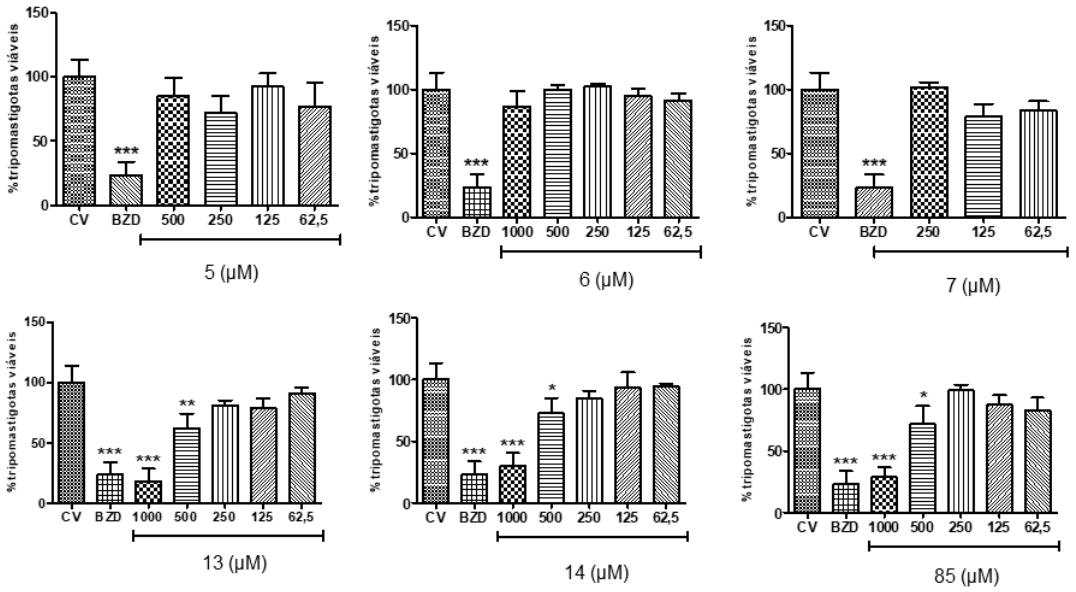


Figura 26. Atividade tripanocida sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* comparada a atividade do fármaco de referência benznidazol (BZD).

O tratamento de fibroblastos LLC-MK2 não infectados (rim de macaco *rhesus*) com soluções desses compostos nas mesmas concentrações, não indicou citotoxicidade maior que 50% em concentrações ≥ 500 μM para nenhum dos *glycoclusters* avaliados (figura **27**).

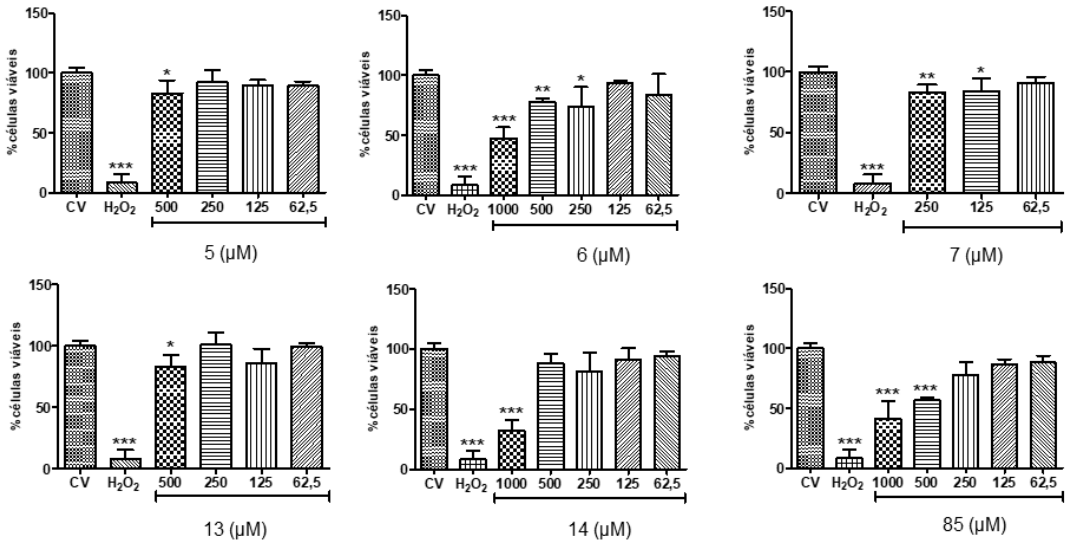


Figura 27. Porcentagem de morte celular causada pelos compostos em fibroblastos LLC-MK2 de rim de macaco rhesus e em diferentes concentrações. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 µM foi utilizado como controle de morte. CV=controle de vida (poço não tratado com inibidores).

Os valores de IC_{50} (concentração dos compostos que provocou 50% de morte do parasita) e CC_{50} (diminuição de 50% da viabilidade de fibroblastos LLC-MK2) são apresentados na tabela **4.**

Tabela 4. Valores de IC_{50} dos *glycoclusters* derivados de galactose e ácido siálico para ensaio tripanocida com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e CC_{50} relacionado a citotoxicidade em fibroblastos LLC-MK2.

COMPOSTOS	IC_{50} (µM)	CC_{50} (µM)
5	ND (>1000)	ND (>500)
6	ND (>1000)	ND (>1000)
13	709,3±118,9	ND (>500)
14	533,9±121,1	811,4±170,7
7	ND (>250)	ND (>250)
85	716,1±138,4	704,3±173,9

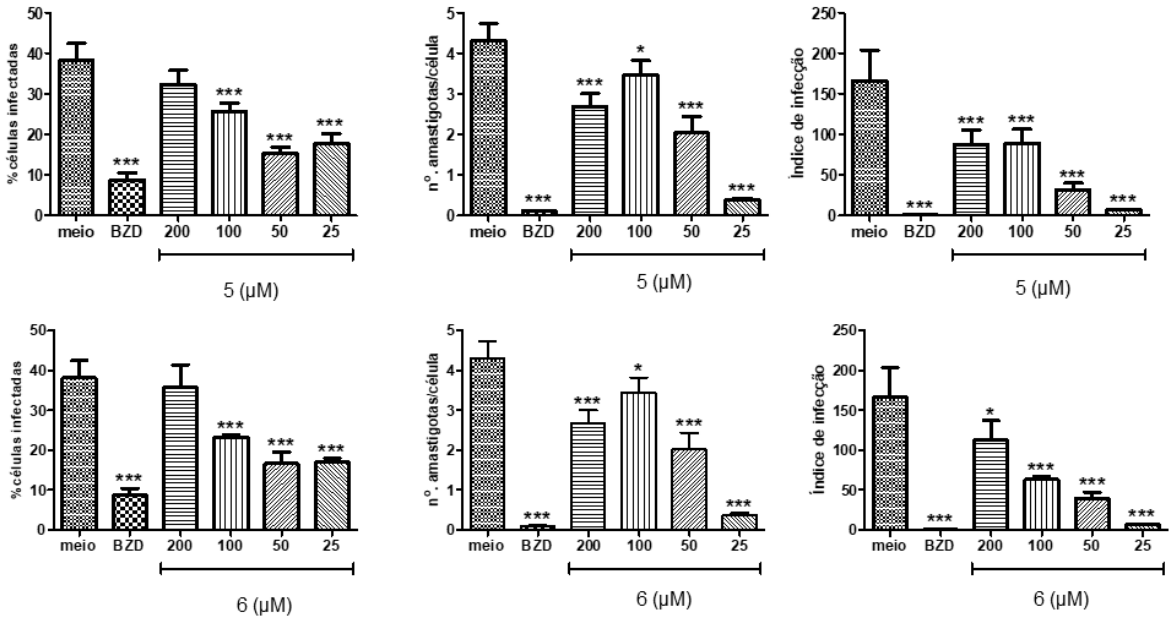
*ND=não determinado

Avaliação da atividade tripanocida em amastigotas intracelulares

A atividade tripanocida dos *glycoclusters* sobre formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foi avaliada pelo tratamento de fibroblastos infectados com *Trypanosoma cruzi* usando soluções dos compostos em meio RPMI em 4 concentrações (200μM - 25μM), por 48h. Benznidazol foi utilizado como controle de morte em concentração de 30 μM.

Os resultados para cada um dos compostos são apresentados na figura **28**. O primeiro gráfico (esquerda) indica a porcentagem de células infectadas; o gráfico do meio indica o número médio de formas amastigotas no interior de cada célula; e o terceiro (direita) representa o índice de infecção, que é dado pela multiplicação da porcentagem de células infectadas pelo número médio de amastigotas por célula.

Via de regra, todos os compostos foram ativos contra a forma amastigota de *T. cruzi* (cepa Y), diminuindo o índice de infecção em todas as concentrações testadas. De forma inesperada, os compostos **5**, **6** e 7 apresentaram aumento de atividade com a diminuição da concentração. Como uma das limitações do experimento é a impossibilidade de quantificar a porcentagem de penetração do composto na célula, não foi possível, até o momento, relacionar esse comportamento a concentração dos inibidores no interior da célula.



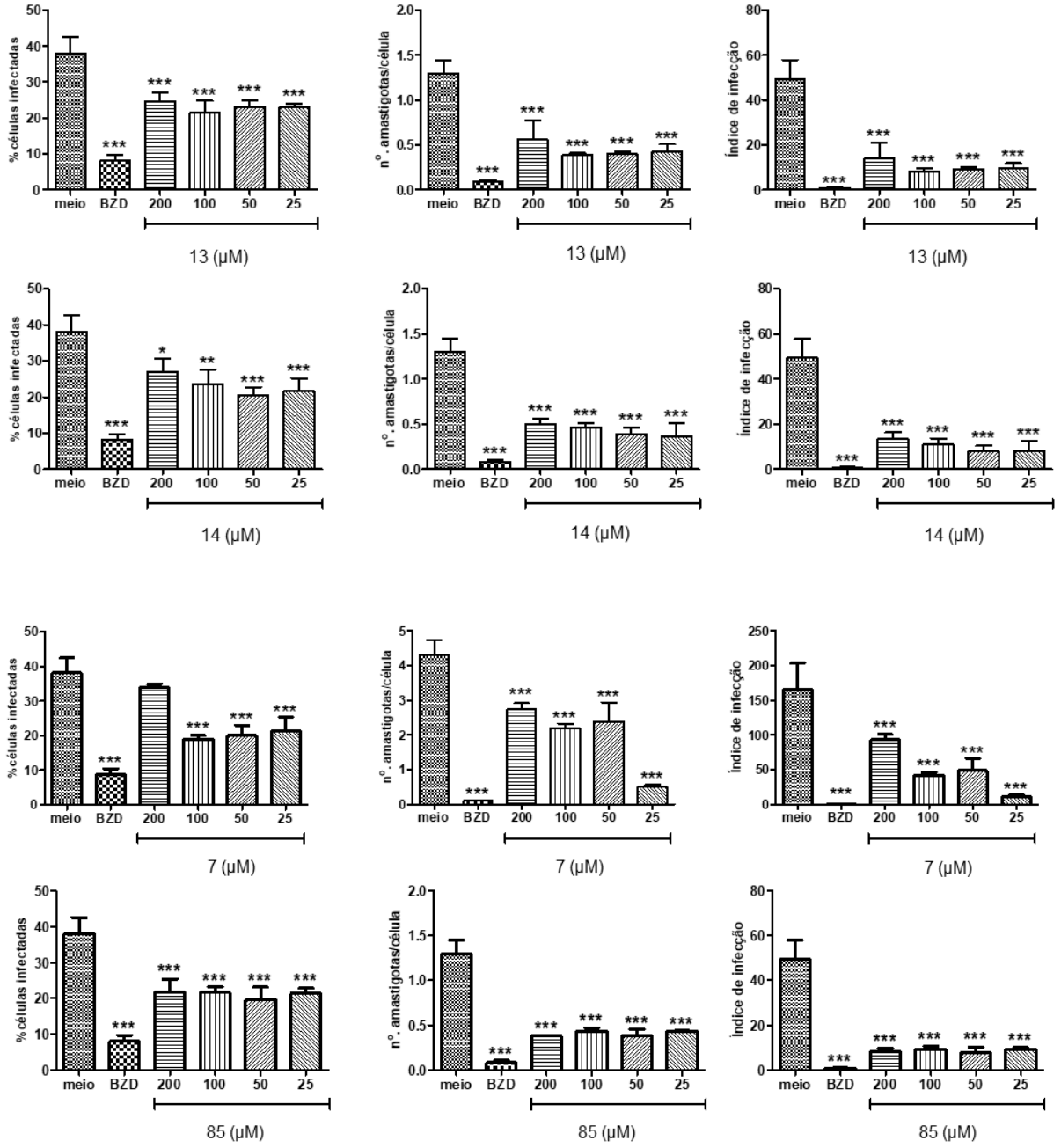
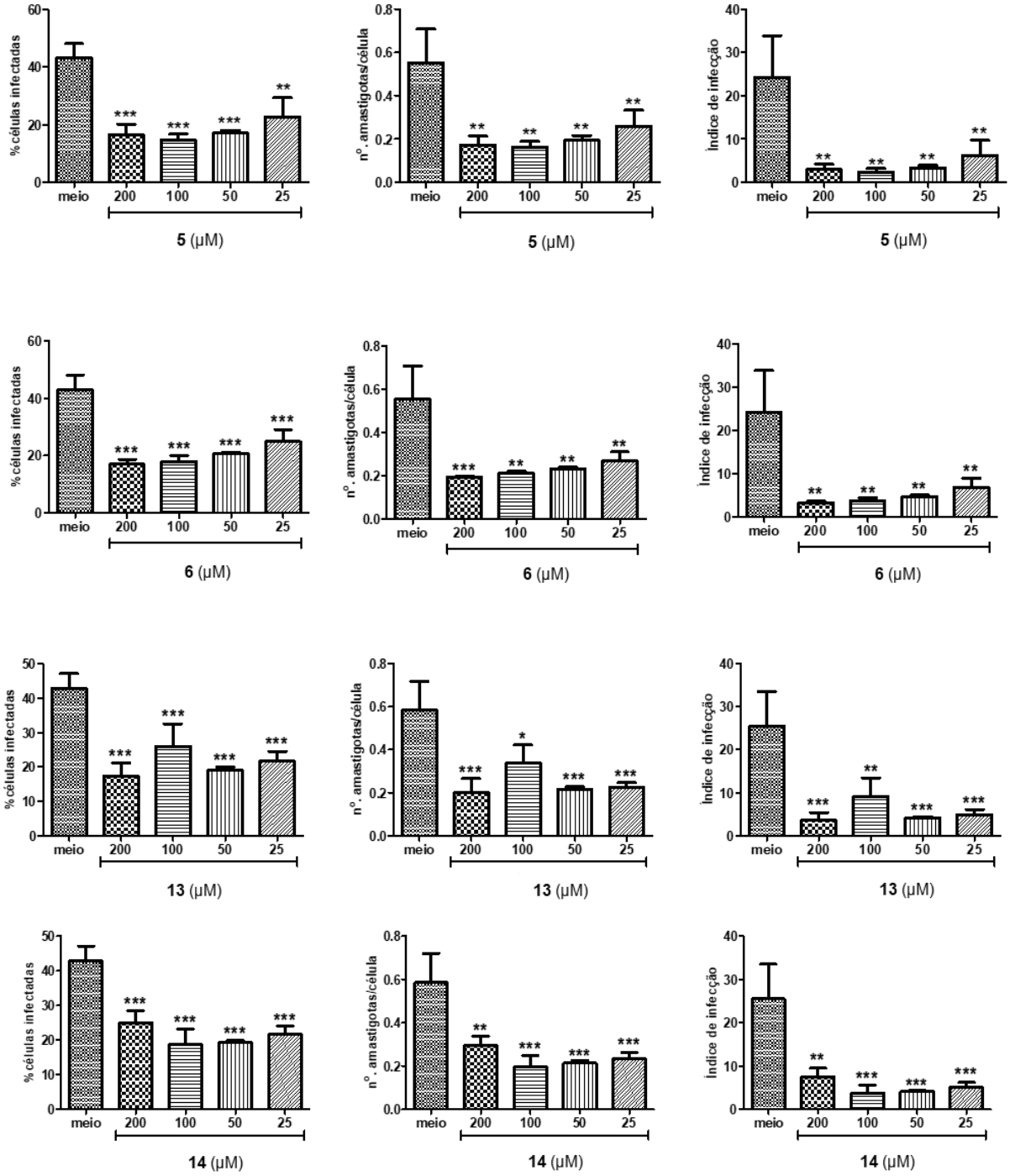


Figura 28. Atividade tripanocida sobre formas amastigotas de *T. cruzi* comparada a atividade do fármaco de referência benznidazol (BZD). Meio=controle de vida (poço sem inibidores).

Experimento de bloqueio da entrada (2h) de *T. cruzi* em fibroblastos não infectados

Fibroblastos LLC-MK2 cultivados em lâmina foram tratados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) na presença dos compostos **5**, **6**, **13**, **14, 7** e **85**, diluídos em meio RPMI em quatro concentrações (200-25 μM). Ao final de um período de incubação de 2 horas foi realizada a contagem das células infectadas e das formas amastigotas no interior dos fibroblastos, sendo calculado o índice de infecção para cada uma das concentrações (figura **29**).

Analisando os gráficos, conclui-se que os seis compostos bloquearam a invasão celular pelo parasita, mesmo na menor concentração testada (25μM). O mecanismo pelo qual os compostos foram ativos será investigado uma vez que, aparentemente, não houve relação direta entre o bloqueio de invasão celular e inibição da enzima TcTS.



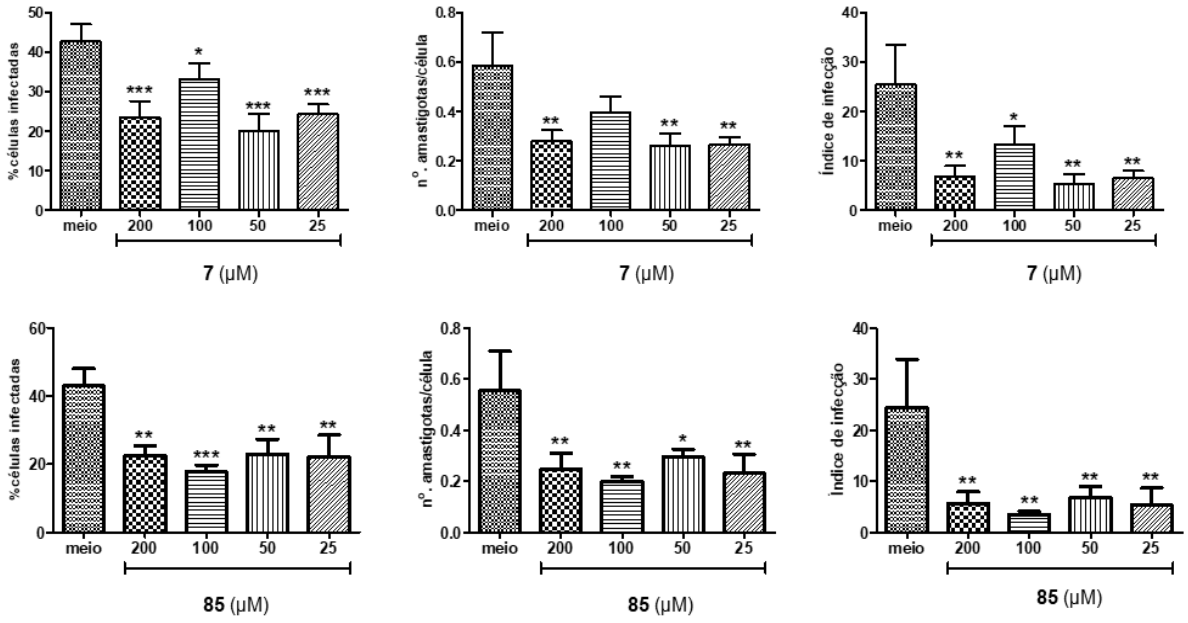


Figura 29. Bloqueio de invasão de fibroblastos por formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Meio=controle de vida (poço não tratado com inibidores prospectivos).

6. CONCLUSÕES

Treze dos dezesseis *glycoclusters* tetra- e hexavalentes, inicialmente propostos, foram obtidos, sendo 8 derivados de glicose, 4 derivados de galactose e um derivado tetravalente de ácido siálico. Entre esses compostos, 10 são inéditos na literatura.

Tanto os blocos de construção multivalentes **17** e **18**, como os azido carboidratos modificados nas posições C-1, C-2, C-3 e C-6, empregados nos acoplamentos, são conhecidos e foram preparados por procedimentos convencionais descritos na literatura. Algumas dificuldades encontradas na reprodução desses métodos foram superadas pela repetição das reações em escalas diferentes e/ou pequenas alterações do protocolo utilizado.

Os acoplamentos azido-alcino por meio de reação CuAAC foram efetivos e os *glycoclusters* **1**-**7** e **9**-**14** obtidos em bons rendimentos. Esses resultados reafirmam uma vez mais a aplicabilidade de reações do tipo *Click Chemistry* na preparação de glicoconjugados de interesse não apenas terapêutico, mas também como ferramentas para entendimento de mecanismos de estrutura e função enzimática.

A pesquisa bibliográfica ao longo do trabalho levou ainda à expansão dos objetivos originais. Com a finalidade de gerar maior diversidade estrutural, o bloco de construção trivalente **29** foi utilizado para incorporação inicial de três unidades de D-glicose, ligadas pelas posições C-1 ou C-6, e posteriormente funcionalizado para acoplamento de unidades imino-açúcar derivadas de D-gluco-1-desoxinojirimicina ou seu correspondente isômero L-gulitol. A mesma estratégia levou a obtenção do *glycocluster* **85**, contendo unidades de D-galactose e um resíduo de ácido siálico.

Ensaios enzimáticos em α e β-glucosidases envolvendo os *glycoclusters* derivados de glicose **1**-**4**, **9**-**12** (*homo-clusters*) e **63**-**66** (*hetero-clusters*) mostraram atividade interessante apenas para os compostos mistos, evidenciando a importância do imino-açúcar para a interação com essas enzimas. Nestes estudos, a atividade reduzida pela metade observada em dois *heteroclusters*, em relação ao composto referência 1-desoxinojirimicina, foi atribuída a uma possível interferência dos resíduos de glicose expostos que podem ter dificultado a interação correta do imino-açúcar no sítio ativo da enzima. Novos *heteroclusters* deverão ser sintetizados para confirmar esta proposição.

No que diz respeito aos derivados multivalentes de galactose e/ou ácido siálico **5**-**7**, **13**, **14** e **85,** inibição expressiva da enzima TcTS foi alcançada pelo derivado **7** (IC_{50} 450 μM), uma vez que os valores de inibição frequentemente descritos para esta enzima são na faixa de 500

μM. Ensaios de atividade tripanocida, bloqueio de invasão e citotoxicidade sobre fibroblastos não-infectados cultivados *in vitro* evidenciaram a atividade de todos esses derivados contra a forma amastigota de *T. cruzi* e bloqueio de invasão celular pelo parasita (diminuindo a infecção em concentrações de até 25μM).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUSTI, R.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; DE LEDERKREMER, R. M. Selective syalilation of 2,3-di-*O*-(*β*-galactopiranosyl)-D-galactose catalyzed by *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Tetrahedron: Asymmetry**. 2005 (16): 541-551.

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

AIZAWA, H.; OTOMO, K.; HONSHO, N.; SHIMAZAKI, T.; VILLENEUVE, M.; MATSUOKA, K.; HATANO, K.; TERUNUMA, D. A carbosilane dendrimer and a silacyclopentadiene analog carrying peripheral lactoses as drug-delivery systems. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. 2012 (22): 3564–3566.

ALPER, P. B.; HUNG, S. C.; WONG, C. H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides from Amines, **Tetrahedron Letters**. 1996 (37): 6029-6032.

ANDRADE, L. O; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews, Microbiology**. 2005 (3): 819-823.

AOYAMA, Y.; KANAMORI, T.; NAKAI, T.; SASAKI, T.; HORIUCHI, S.; SANDO, S.; NIIDOME, T. Artificial Viruses and Their Application to Gene Delivery. Size-Controlled Gene Coating with Glycocluster Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**. 2003 (125): 3455-3457.

ASANO, N.; KENGO, O.; Kaneko, E.; Matsui, K. Enzymic synthesis of cz- and P-D-glucosides of 1-deoxynojirimycin and their glycosidase inhibitory activities. **Carbohydrate Research.** 1994 (258): 255-266.

BAEK, M.G.; ROY, R. Synthesis and protein binding properties of T-antigen containing glycoPAMAM dendrimers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2002 (10): 11-17.

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

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. **European Journal of Organic Chemistry**. 2006 51-68.

BREWER, C. F.; MICELI, M. C.; BAUM, L. Cluster, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharides-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**. 2002 (12): 616-623.

BONGAT, A. F. G.; DEMCHENKO, A. V. R. Recent trends in the synthesis of *O*-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars. **Carbohydrate. Research**. 2007 (342): 374-406.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews, Microbiology.** 2006 (4): 229-236.

BUSSCHER, G. F.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN DEL, F. L.; 2-Deoxystreptamine: Central Scaffold on Aminoglycoside Antibiotics. **Chemical Reviews**. 2005 (105): 775-791.

BUSCHIAZZO A.; AMAYA M. F.; CREMONA M. L.; FRASCH A. C.; ALZARI P. M. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Molecular Cell**. 2010 (10): 757-768.

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

CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A. FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface *trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 2010 (18): 2412–2427.

CHABRE, Y. M.; CONTINO-PEPIN, C.; PLACIDE, V.; SHIAO, T. Z.; ROY, R. Expeditive synthesis of glycodendrimer scaffolds based on versatile TRIS and mannoside derivatives. **Journal of Organic Chemistry.** 2008 (73): 5602–5605.

CHAN, T.R.; HILGRAF, R.; SHARPLESS, K.B.; FOKIN, V.V. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. **Organic Letters.** 2004 6 (17): 2853–2855.

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

CLONINGER, M. J. Biological applications of dendrimers. **Current Opinion in Chemical Biology**. 2002 (6): 2-7.

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

DA SILVA, C. O. Efeito Anomérico em Carboidratos: Fatos e Hipóteses. **Revista Virtual de Química**. 2001 4 (3): 235-246.

DA SILVA, J. G.; HYPPOLITO, M. A.; OLIVEIRA, J. A. A.; CORRADO, A. P.; ITO, I. Y.; CARVALHO, I. Aminoglycoside antibiotic derivatives: Preparation and evaluation of toxicity on cochlea and vestibular tissues and antimicrobial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2007 (15): 3624–3634.

DALE, M. P.; ENSLEY, H. E.; KERN, K.; BYERS, L. D. Reversible Inhibitors of β-Glucosidase. **Biochemistry**. 1985 p. 3530-3539.

DAS, R.; MUKHOPADHYAY, B. Use of 'click chemistry' for the synthesis of carbohydrate-porphyrin dendrimers and their multivalent approach toward lectin sensing. **Tetrahedron Letters**. 2016 (57): 1775–1781.

DAVIS, B. G. Synthesis of glycoproteins. **Chemical Reviews**. 2002 (102): 579.

DIOT, J.; M. GARCÍA-MORENO, I.; GOUIN, S. G.; MELLET, C. O.; HAUPT, K.; KOVENSKY, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2009 (7): 357–363, 2009.

DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. **Chemistry - A European Journal**. 2006 (12): 656.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**. 1997 (22): 462-467.

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

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

FRANC, G.; KAKKAR, A. Dendrimer design using CuI-catalyzed alkyne–azide ‘‘click-chemistry’’. **Chemical Communication**. 2008 5267–5276.

FERREIRA, S. B.; SODERO, A. C. R.; CARDOSO, M. F. C.; LIMA, E. S.; KAISER, C. R.; SILVA JR, F. P.; FERREIRA, V. F. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Studies of 1H-1,2,3-Triazole Derivatives of Carbohydrates as α-Glucosidases Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2010 (53): 2364-2375.

FISCHER, N.; GODDARD-BORGER, E. D.; GREINER, R.; KLAPÖTKE, T. M.; SKELTON, B. W.; STIERSTORFER, J. Sensitivities of Some Imidazole-1-sulfonyl Azide Salts. **Journal of Organic Chemistry**. 2012 (77): 1760-1764.

FORD, J. H.; BERGY, M. E.; BROOKS, A. A.; GARRETT, E. R.; ALBERTI, J.; DYER, J. R.; CARTER, H. E. Further Characterization of Neomicin B and Neomicin C. **Journal of American Chemical Society.** 1955 (77): 5311-5314.

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

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

GLOSTER, T. M.; DAVIES, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 305-320.

GODDARD-BORGER, E. D.; STICK, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. **Organic Letters**. 2007 (9): 3797-3800.

GÓMEZ-GARCÍA, M.; BENITO, J. M.; GUTIÉRREZ-GALLEGO, R.; MAESTRE, A.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; BLANCO, J. L. J. Comparative studies on lectin–carbohydrate interactions in low and high density homo- and heteroglycoclusters. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 1849–1860.

GÜNTHER, K.; SCHIPS, C.; ZIEGLER, T. Preparation of Some Glycosyl Amino Acid Building Blocks via Click Reaction and Construction of a Glycotetrapeptide Library Using Spot Synthesis. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. 2008 (27): 446-463.

HAKAMATA, W.; TOSHIYUKI, N.; OKU, T. Synthesis of p-Nitrophenyl 3- and 6-deoxy-a-Dglucopyranosides and Their Specificity to Rice a-Glucosidase. **Journal of Applied Glycoscience**. 1999 (46): 459-463.

HENRISSAT, B. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. **Biochemistry Journal**. 1991 (280): 309–316.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. **Current Opinion in Biotechnology**. 2004 (15): 615.

JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies on the anomeric effect. **Tetrahedron.** 1992 48 (24): 5019-5087.

Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>, Acesso em 10 jan. 2018. IOC, 2018.

KANFAR, N.; BARTOLAMI, E.; ZELLI, R.; MARRA, A.; WINUM, J-Y.; ULRICH, S.; DUMY, P. Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 2015 (13): 9894–9906.

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

KASHIF, M.; MORENO-HERRERA, A.; LARA-RAMIREZ, E. E.; RAMIREZ-MORENO, E.; BOCANEGRA-GARCIA, V.; ASHFAQ, M.; RIVERA, G. Recent developments in *trans*-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of drug Targeting**. 2017 (25): 485–498.

KATO, A.; KATO, N.; KANO, E.; ADACHI, I.; IKEDA, K.; YU, L.; OKAMOTO, T.; BANBA, I.; OUCHI, I.; TAKAHATA, H.; ASANO, N. Biological Properties of D- and L-1-Deoxyazasugars. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2005 (48): 2036-2044.

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

KOWALCZYK, W.; MASCARAQUE, A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, M.; ROJO, J.; ANDREU, D. Convergent Synthesis of Glycodendropeptides by Click Chemistry Approaches. **European Journal Organic Chemistry**. 2012 4565–4573.

<www.thelancet.com > **Lancet**. 2016 (388): 1545-1602.

LEMIEUAX, R. U.; HAYAMI, J. I. Mechanism of anomerization of tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl chlorides. **Canadian Journal of Chemistry**. 1965 (43): 2162-.

LEMIEUAX, R. U.; RATCLIFFE, R. M. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. **Canadian Journal of Chemistry**. 1979 (57): 1244-1251.

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

LEPAGE, M. L.; SCHNEIDER, J. P.; BODLENNER, A.; MELI, A.; DE RICCARDIS, F.; SCHMITT, M.; TARNUS, C.; NGUYEN-HUYNH, N-T.; FRANCOIS, Y-N.; LEIZE-WAGNER, E.; BIRCK, C. COUSIDO-SIAH, A. PODJARNY, A. IZZO, I. COMPAIN, P. Iminosugar-Cyclopeptoid conjugates raise multivalent effect in glycosidase Inhibition at unprecedented high levels. **Chemistry - A European Journal.** 2016 (22): 5151-5155.

LIMA, A. H.; LAMEIRA, J.; ALVES, C. N. Protein ligand interaction of *T. cruzi* trans-sialidase inhibitors: a docking and QM/MM MD study. **Structural Chemistry**. 2012 (23): 147-152.

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

LOWARY, T. D.; HINDSGAUL, O. Recognition of synthetic O-methyl, epimeric, and amino analogues of the acceptor CX-L-Fucp-(1+2)-p-D-Galp-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases. **Carbohydrate Research**.1994 (251): 33-67.

MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CAMPO, V. L.; BIONDO, M.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, J S.; CARVALHO, I. α-Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active *on Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 2013 (21): 1978-1987.

MATASSINI, C.; PARMEGGIANI, C.; CARDONA, F.; GOTI, A. Are enzymes sensitive to the multivalent effect? Emerging evidence with glycosidases. **Tetrahedron Letters**. 2016 (57): 5407–5451.

MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**. 2006 (62): 10277-10302.

MÉNDEZ-ARDOY, A.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; MELLET, C. O.; SEVILLANO, N.; GIRÓN, M. D.; SALTO, R.; SANTOYO-GONZÁLEZ, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Preorganized macromolecular gene delivery systems: amphiphilic b-cyclodextrin "click clusters". **Organic Biomolecular Chemistry**. 2009 (7): 2681–2684.

MILLER, B. R.; NGUYEN, H.; HU, C. J-H.; LIN, C. NGUYEN, Q. T. New and Emerging Drugs and Targets for Type 2 Diabetes: Reviewing the Evidence. **American Health & Drug Benefits.** 2014 (7): 452-463.

MIRABELLA, S.; D'ADAMIO, G.; MATASSINI, C.; GOTI, A.; DELGADO, S.; GIMENO, A.; ROBINA, I.; MORENO-VARGAS, A.J.; SESTAK, S.; JIMENES-BARBERO, J.; CARDONA, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to α-mannosidases. **Chemistry - A European Journal**. 2017 (23): 14585–14596.

MYDOCK, L.K.; DEMCHENKO, A.V. Mechanism of chemical O-glycosilation: from early studies to recent discoveries. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 497-510.

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

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

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

NYFFELER, P. T.; LIANG, C. H.; KOELLER, K. M.; WONG, C. H. The chemistry of amine-azide interconversion: Catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. **Journal of American Chemical Society**. 2002 (124): 10773–10778.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/> . Acesso em: 20 jan. 2018. **OMS**, 2018.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/> Acesso em: 22 dez. 2017. **OMS**, 2017.

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

PARK, H.; HWANG, K. Y.; OH, K. H.; KIM, Y. H.; LEE, J. Y.; Kim, K. Discovery of Novel alpha-glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 2008 (16): 284-292.

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

PÉTURSSON, S. Protecting groups in carbohydrate chemistry. **Journal of Chemical Education**, 1997 11 (74): 1297-1303.

RAJÃO, M. A.; Furtado, C.; Alves, C. L.; Passos-Silva, D. G.; Moura, M. B.; Schamber Reis, B. L.; Kunrath-Lima, M.; Zuma, A. A.; Vieira-da-Rocha, J. P.; Garcia, J. B. F.; et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 2014 (55): 309–321.

RAJARAM, H.; PALANIVELU, M. K.; ARUMUGAM, T. V.; RAO, V. M.; SHAW, P. N.; MCGEARY.; ROSS, B. P. "Click" Assembly of Glycoclusters and Discovery of a Trehalose Analogue that Retards Aβ40 Aggregation and Inhibits Aβ40-Induced Neurotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** 2014 (24) 4523–4528**.**

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet**. 2010, (375):1388–1402.

ROSTOVTSEV, V.V.; GREEN, L.G.; FOKIN, V.V. SHARPLESS, K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewantde Chemie In edt.** 2002 (41): 2596-2599.

ROY, R.; ZANINI, D.; MEUNIER, S. J; ROMANOWSKA, A. Journal of the Chemical. Society., **Chemical Communications**. 1993 1869-1872.

ROY, R. Blue-prints, synthesis and applications of glycopolymers. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. 1996 (8): 79-99, 1996.

ROY, R. A Decade of Glycodendrimer Chemistry. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. 2003 (15): 291-310.

SATTIN, S.; DAGHETTI, A.; THÉPAUT, M.; BERZI, A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, M.; TABARANI, G.; ROJO, J.; FIESCHI, F.; CLERICI, M.; BERNARDI, A. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear tri-mannoside mimic in a tetravalent presentation. **ACS Chemical Biology**. 2010 (5): 301–312.

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

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

STAUFFERT, F.; BODLENNER, A.; TRINH, T. M. N.; GARCIA-MORENO, M. I.; MELLET, C. O.; NIERENGARTEN, J-F.; COMPAIN, P. Understanding multivalent effects in glycosidase inhibition using C-glycoside click clusters as molecular probes. **New Journal of Chemistry**. 2016 (40) 7421-7430.

SZNAIDMAN, M. Bioorganic Chemistry: Carbohydrates (Ed.: S. M. Hecht), **Oxford University Press**, New York, 1999, p. 1-56.

TIWARI, V.; MISHRA, B. B.; MISHRA, B. K.; MISHRA, N.; SINGH, A. S.; CHEN, X. Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry. **Chemical Reviews**. 2016 (116): 3086−3240.

TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptideo-triazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **Journal of Organic Chemistry**. 2002 (67): 3057-3064.

TOUAIBIA, M.; SHIAO, T. C.; PAPADOPOULOS, A.; VAUCHER, J.; WANG, Q.; BENHAMIOUD, K.; ROY, R. Tri- and hexavalent mannoside clusters as potential inhibitors of type 1 fimbriated bacteria using pentaerythritol and triazole linkages. **Chemmical Communications**. 2007 380–382.

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

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

URBINA, J. A. J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: current limitations and new approaches. **Acta Tropica**. 2010 (115): 55–68.

WERZ, D. B.; RANZINGER, R.; HERGET, S.; ADIBEKIAN, A.; VON DER LIETH, C. W.; SEEBERGER, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis. **ACS Chemical Biology**. 2007 (2): 685.

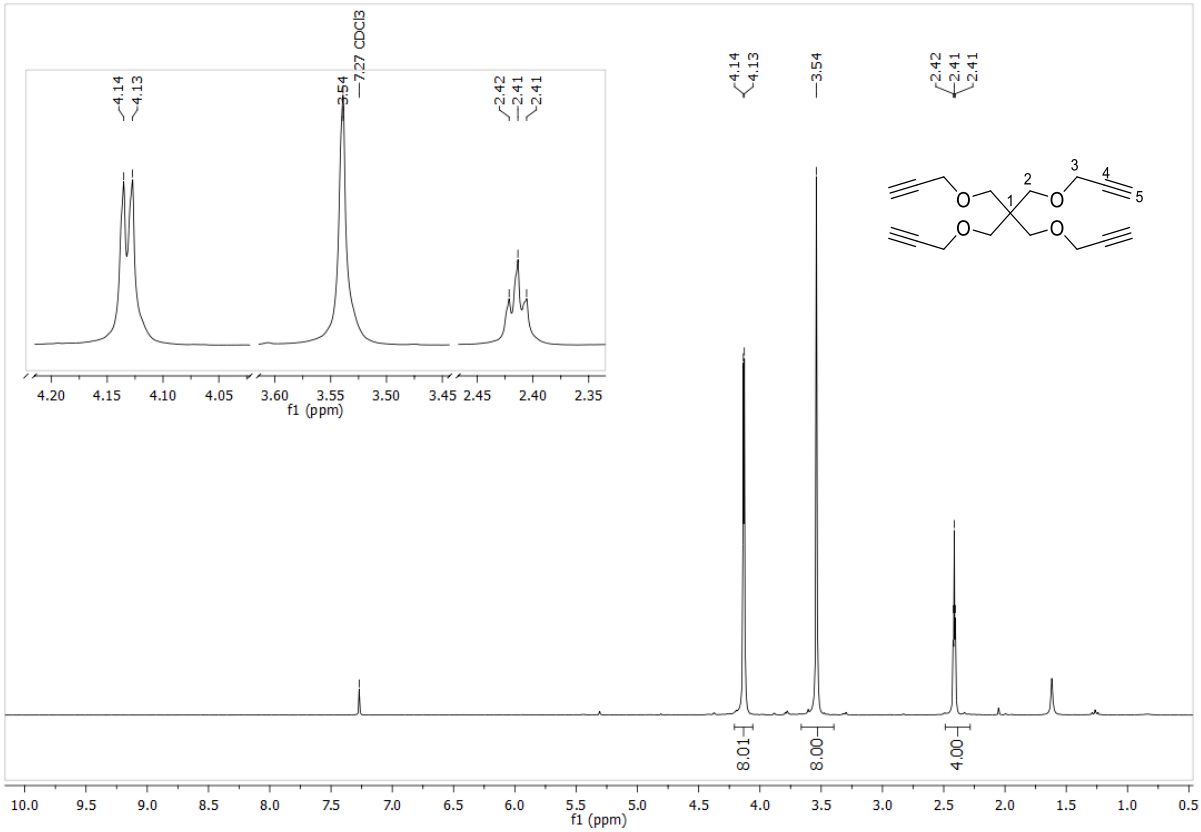
WEÏWER, M.; CHEN, C.; KEMP, M. M.; LINHARDT, R. J. Synthesis and Biological Evaluation of Non-Hydrolyzable 1,2,3-Triazole-Linked Sialic Acid Derivatives as Neuraminidase Inhibitors. **European Journal Organic Chemistry.** 2009 (16): 2611–2620.

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

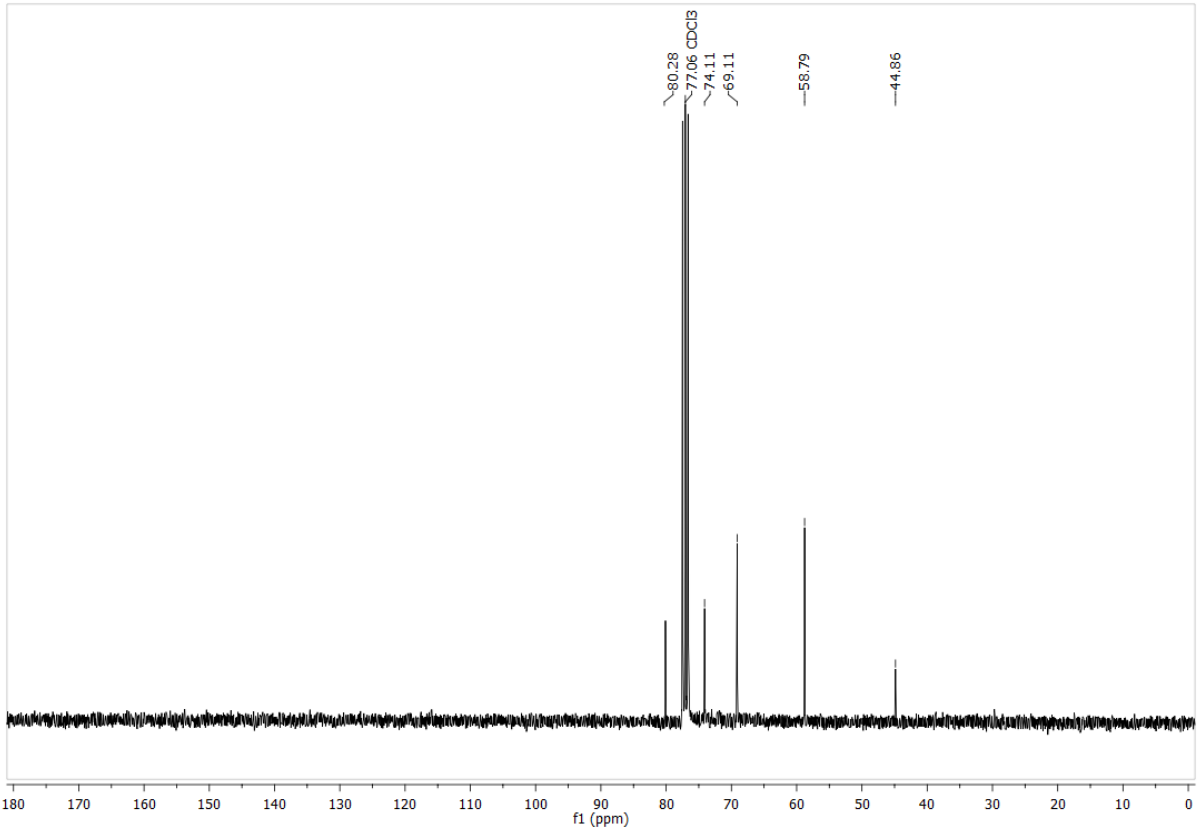
ZAMONER, L. O. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; MANTOANI, S. P.; RUGEN, M.D.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. CuAAC click chemistry with N-propargyl 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-gulitol and N-propargyl 1,6-dideoxy-1,6-imino-D-mannitol provides access to triazole-linked piperidine and azepane pseudo-disaccharide iminosugars displaying glycosidase inhibitory properties. **Carbohydrate Research.** 2016 (429): 29–37.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **Journal of Infectious Disease**. 1999 (180): 480–486.

Tetra-*O*-propargil-pentaeritritol 17



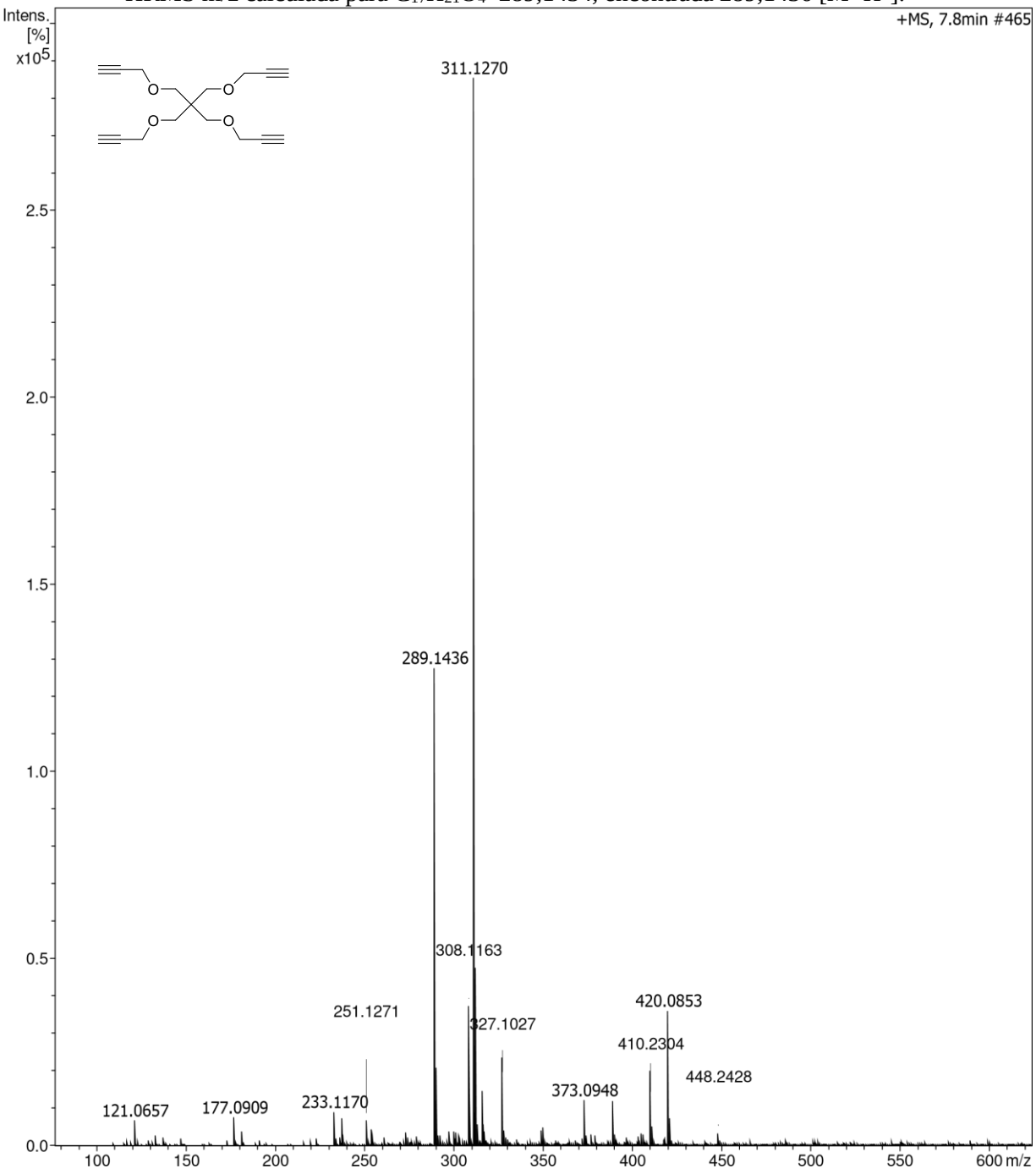
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



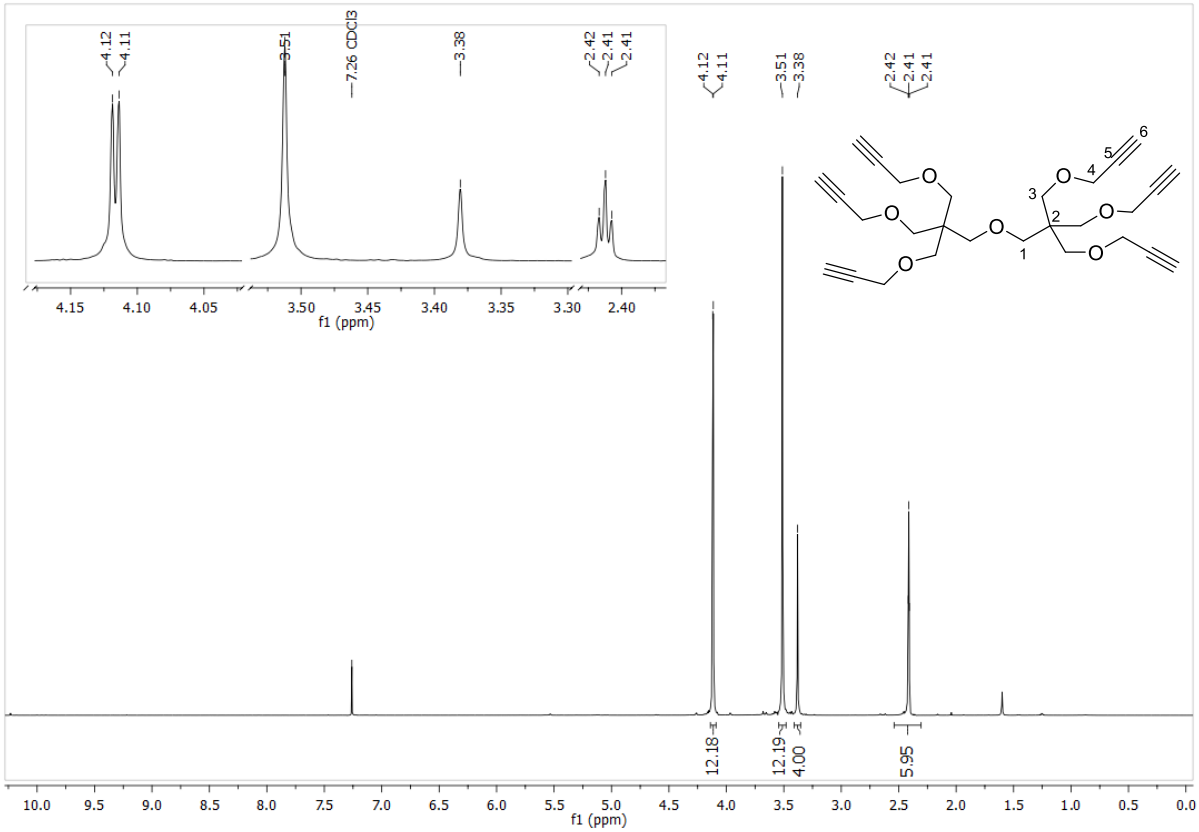
RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

Tetra-*O*-propargil-pentaeritritol 17

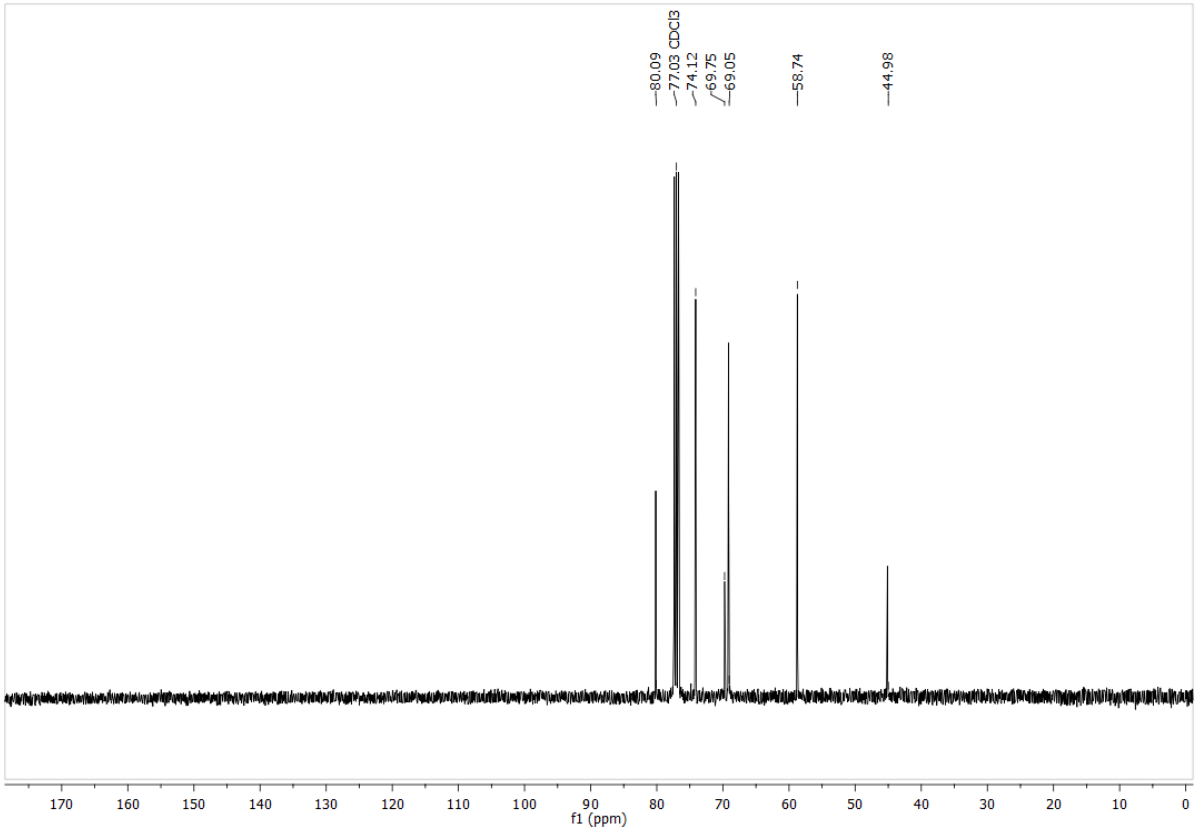
HRMS m/z calculada para $C_{17}H_{21}O_4^+$ 289,1434, encontrada 289,1436 [M+H$^+$].



Hexa-*O*-propargil-pentaeritritol 18



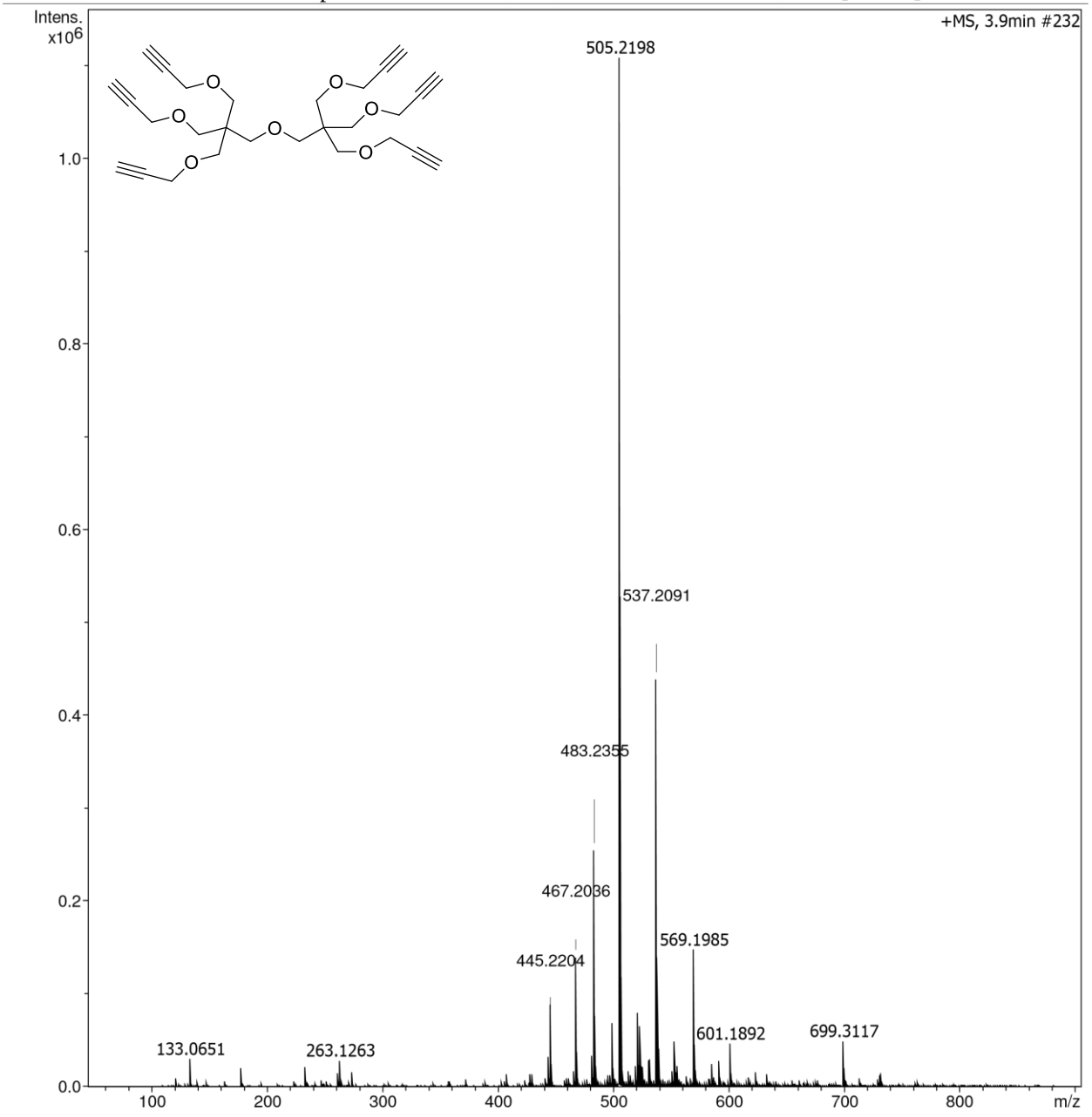
RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



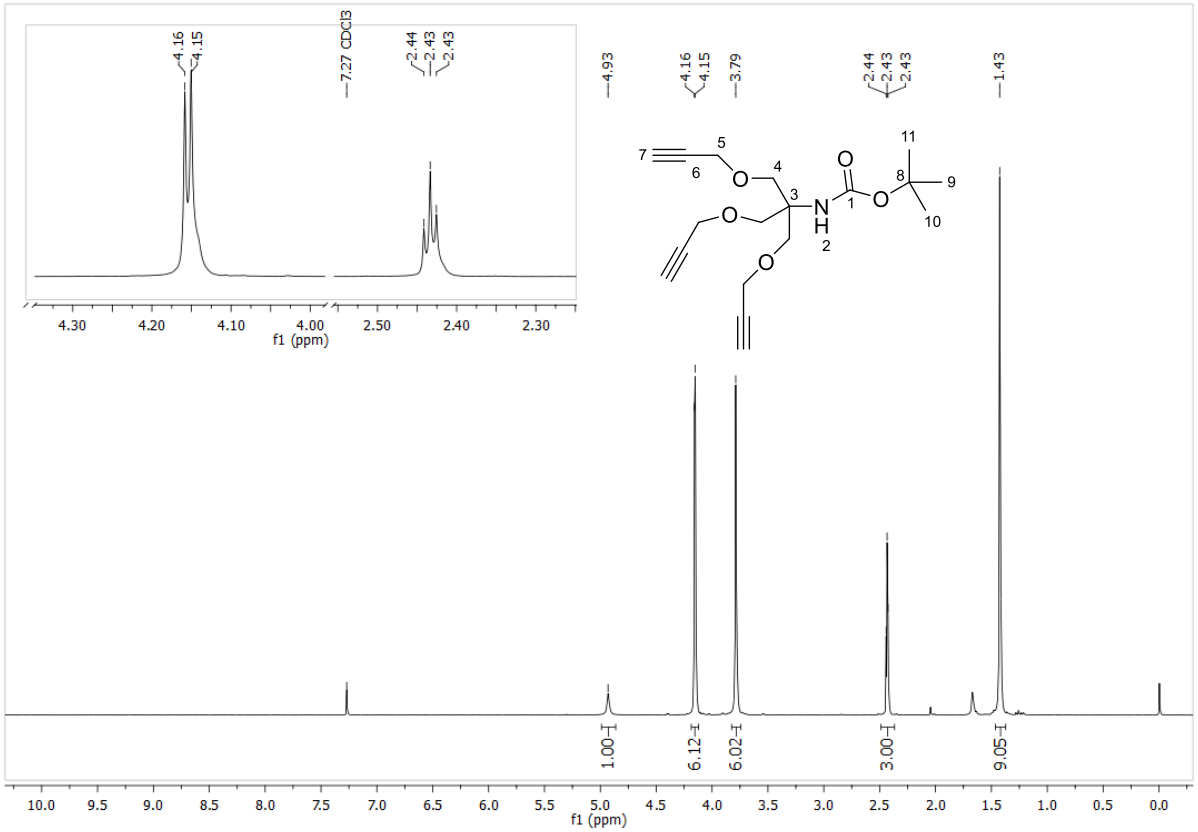
RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$)

Hexa-*O*-propargil-pentaeritritol 18

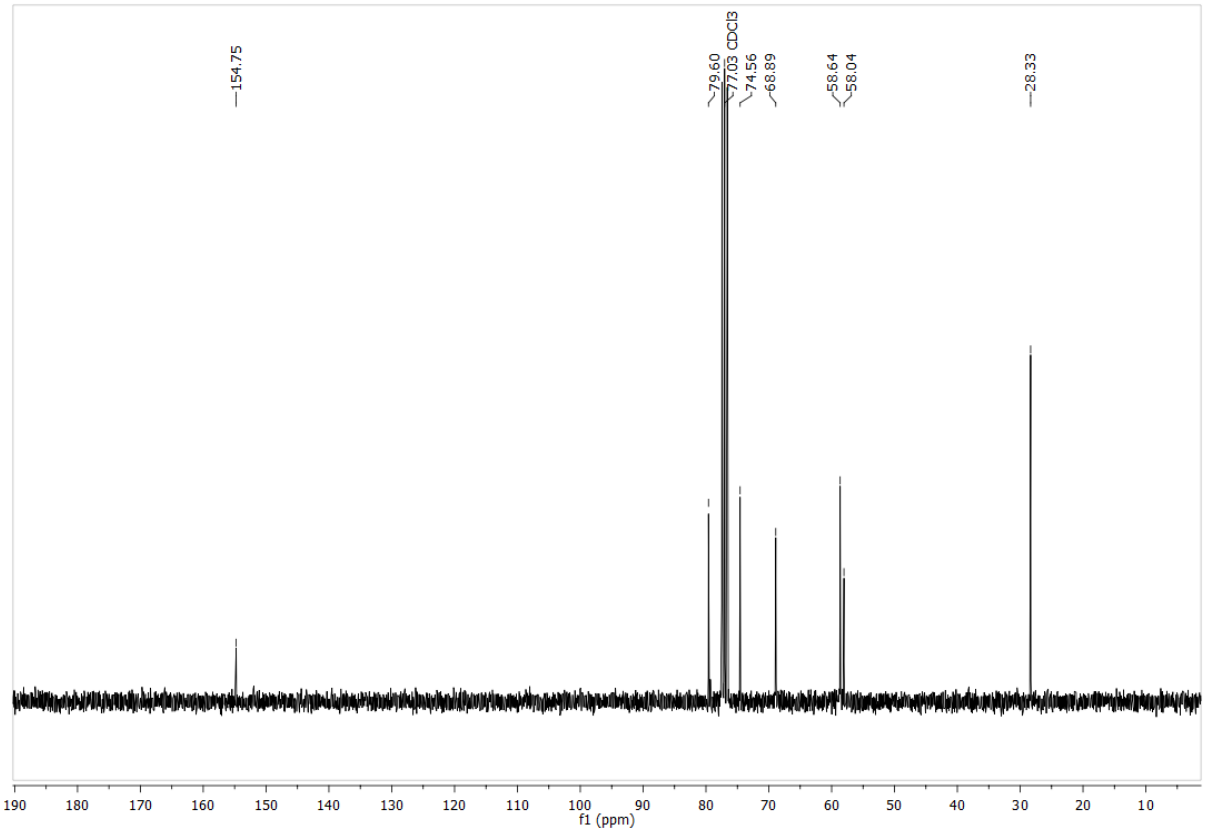
HRMS m/z calcd. para $C_{28}H_{34}NaO_7^+$, 505,2197 encontrada 505,2198 [M+H$^+$].



Tris-Boc propargil 29



RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)



RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

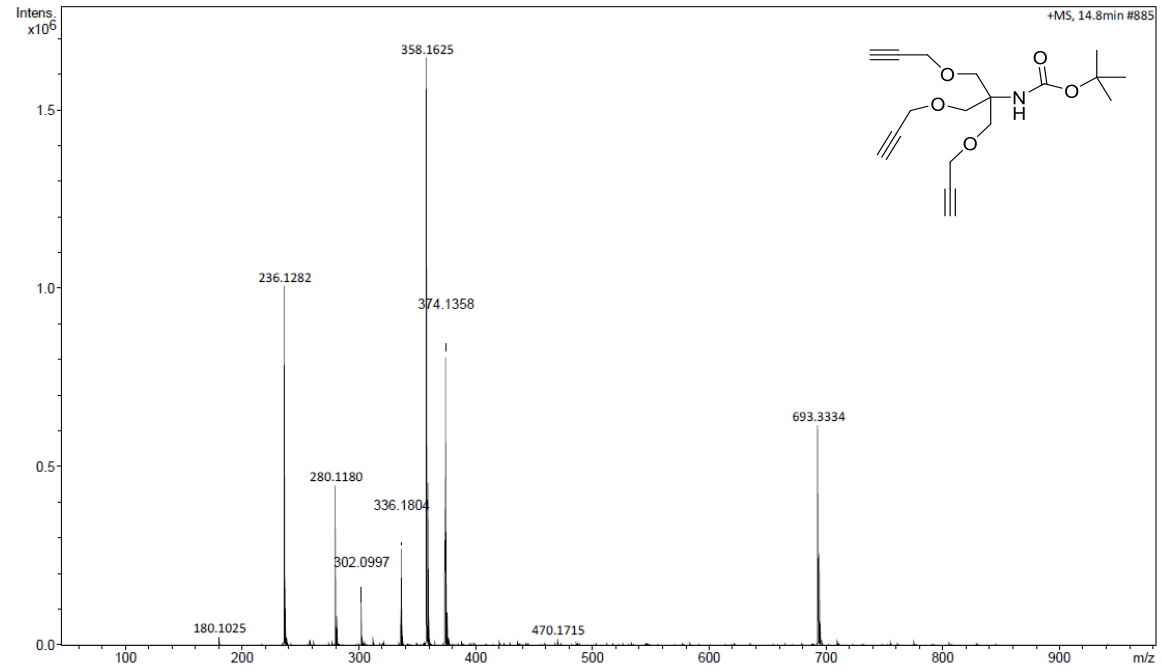
Tris-Boc propargil 29

HRMS m/z calculada para $C_{18}H_{25}NNaO_5^+$ 358,1625, encontrada 358,1625 [M+Na^+].

Generic Display Report

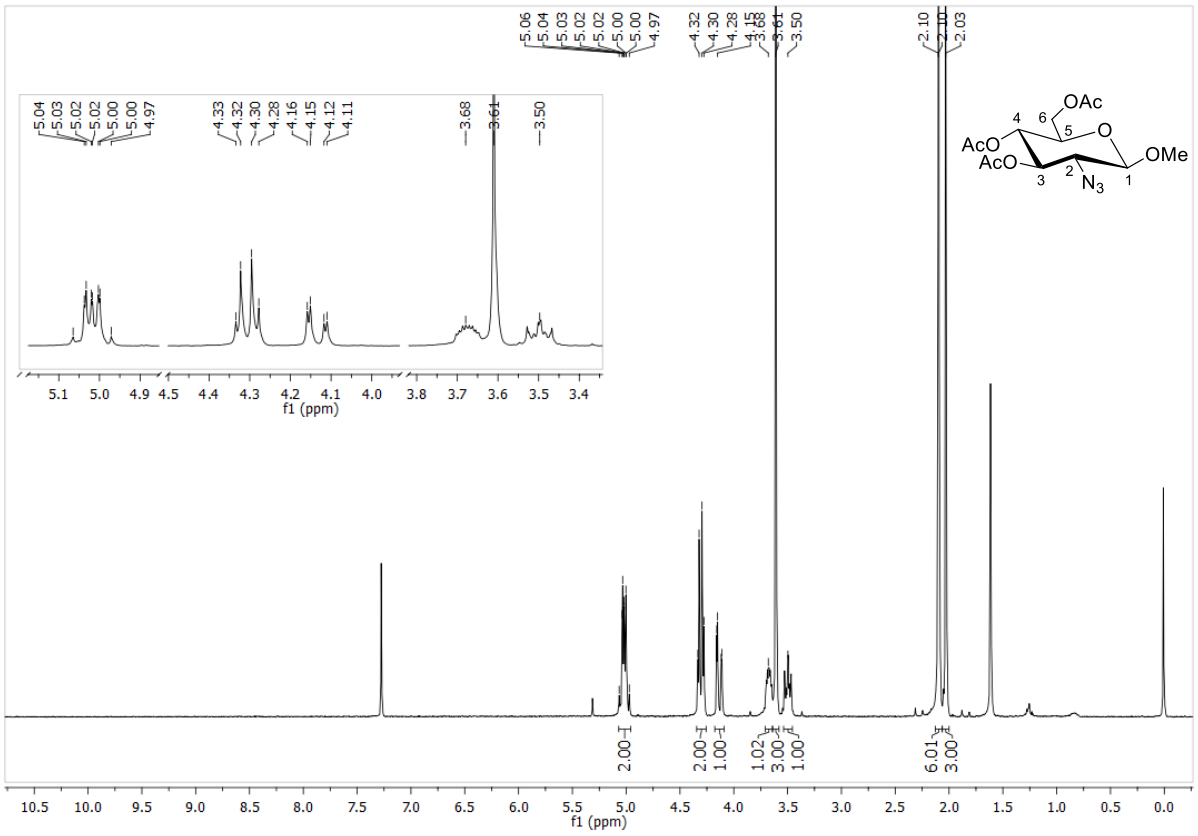
Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\PROF. IVONE\ASF 184_POS.d	Acquisition Date	10/31/2017 8:39:51 AM
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_Willian 1.m	Operator	TOMAZ
Sample Name	ASF 184_POS	Instrument	micrOTOF-Q
Comment			

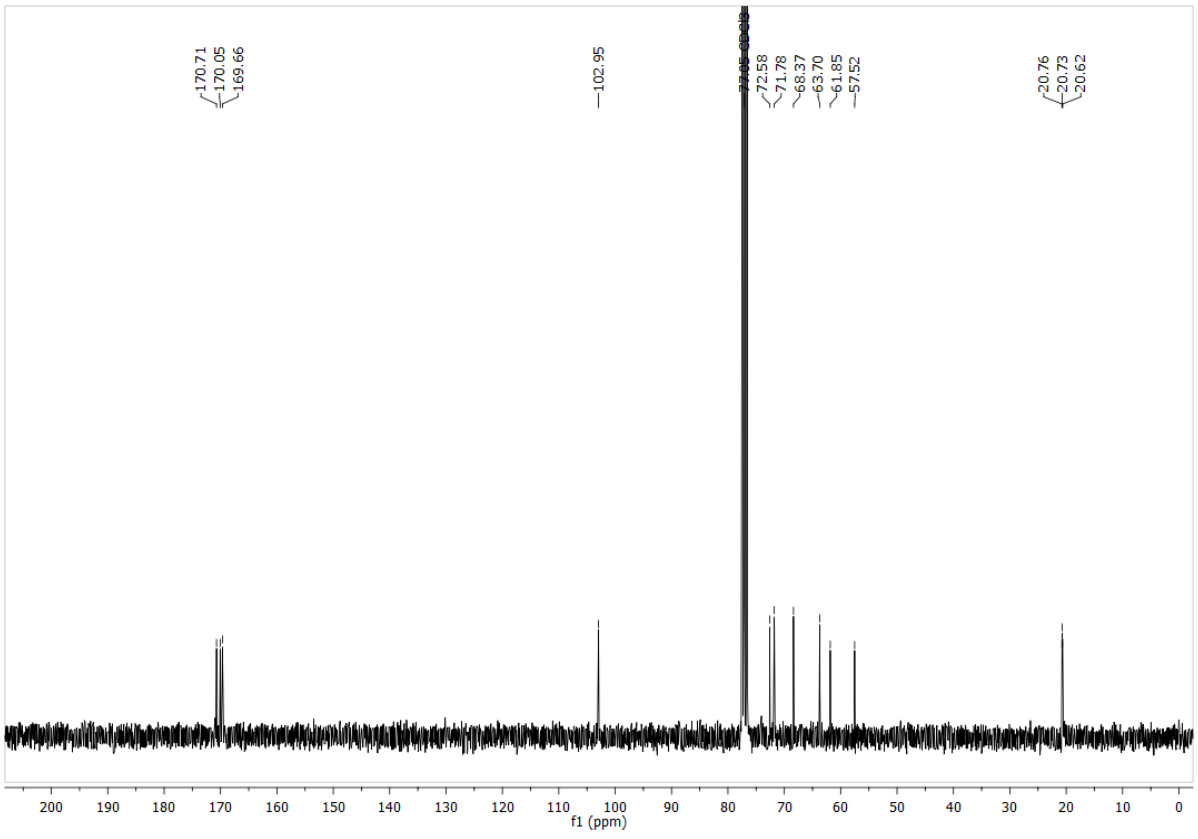


Bruker Compass DataAnalysis 4.3 printed: 10/31/2017 9:04:13 AM by: TOMAZ Page 1 of 1

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-*β*-D-glicopiranosídeo de metila 20

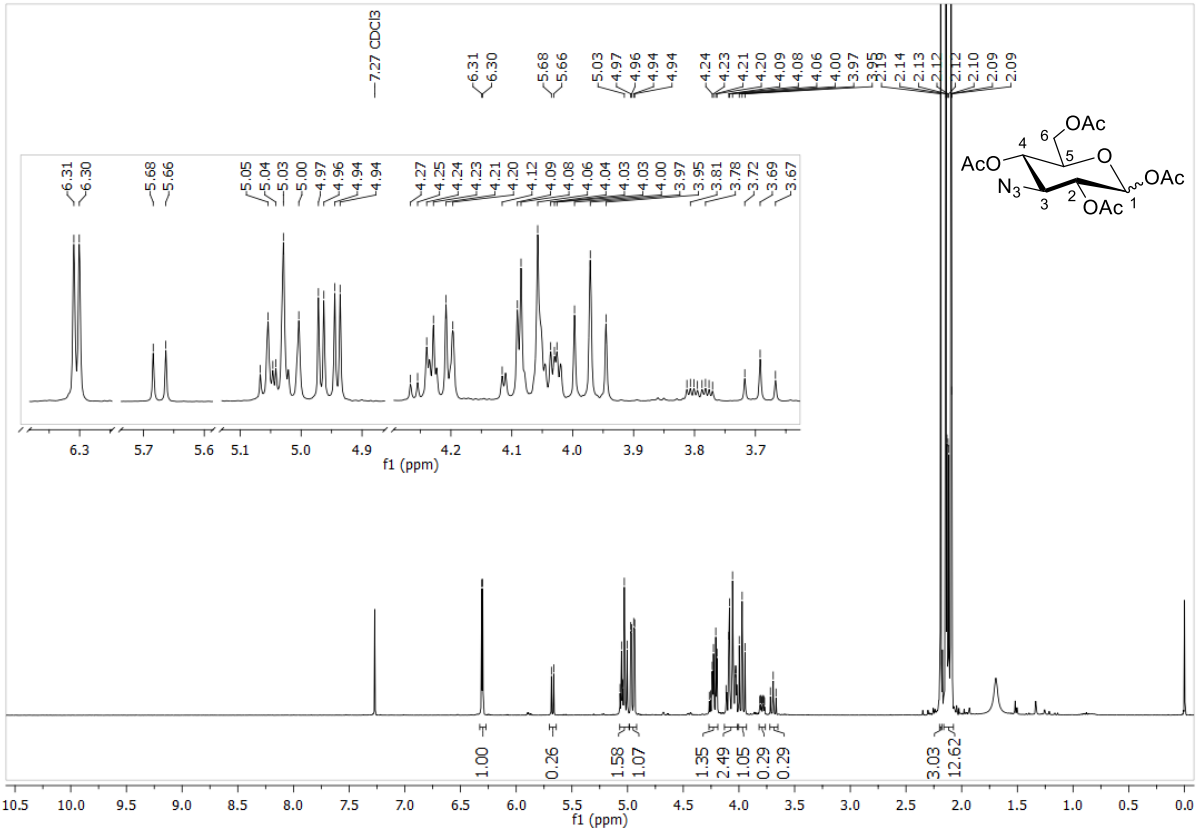


RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

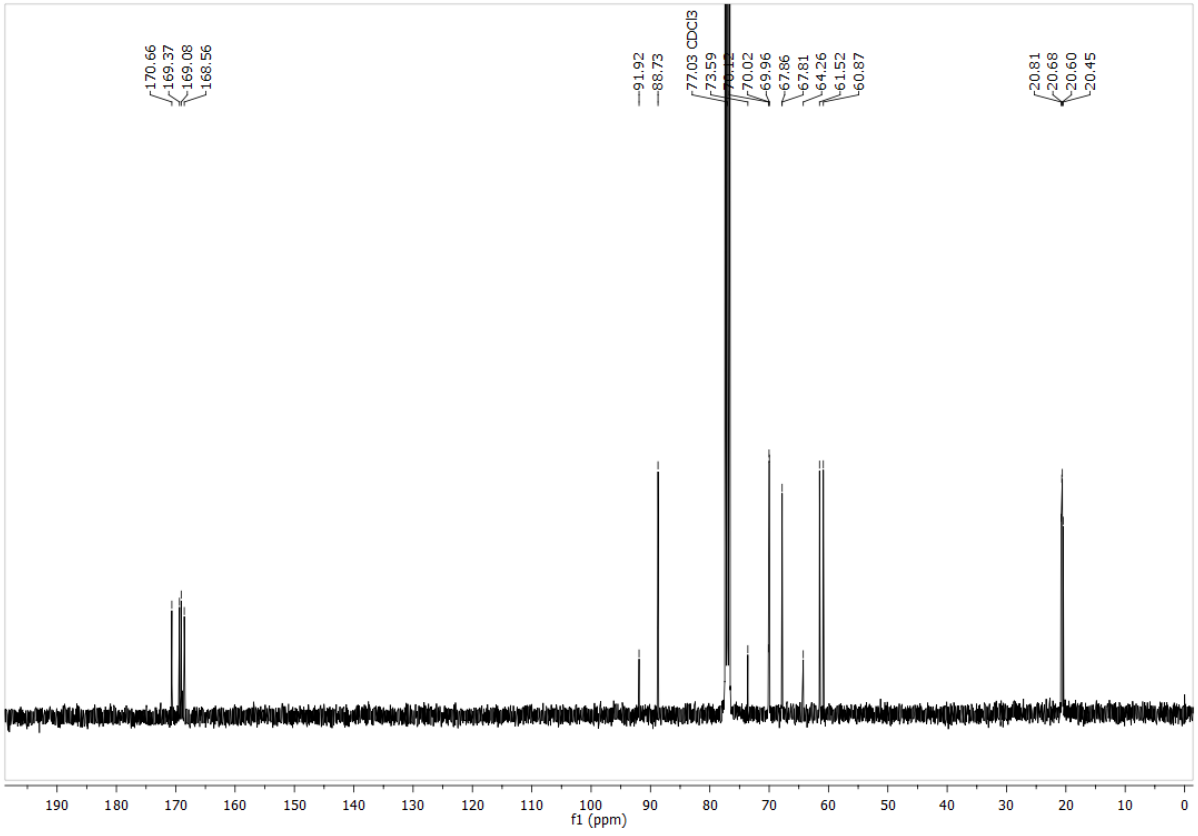


RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

1,2,4,6-tetra-*O*-acetil-3-azido-3-desoxi-*α,β*-D-glicopiranose 21

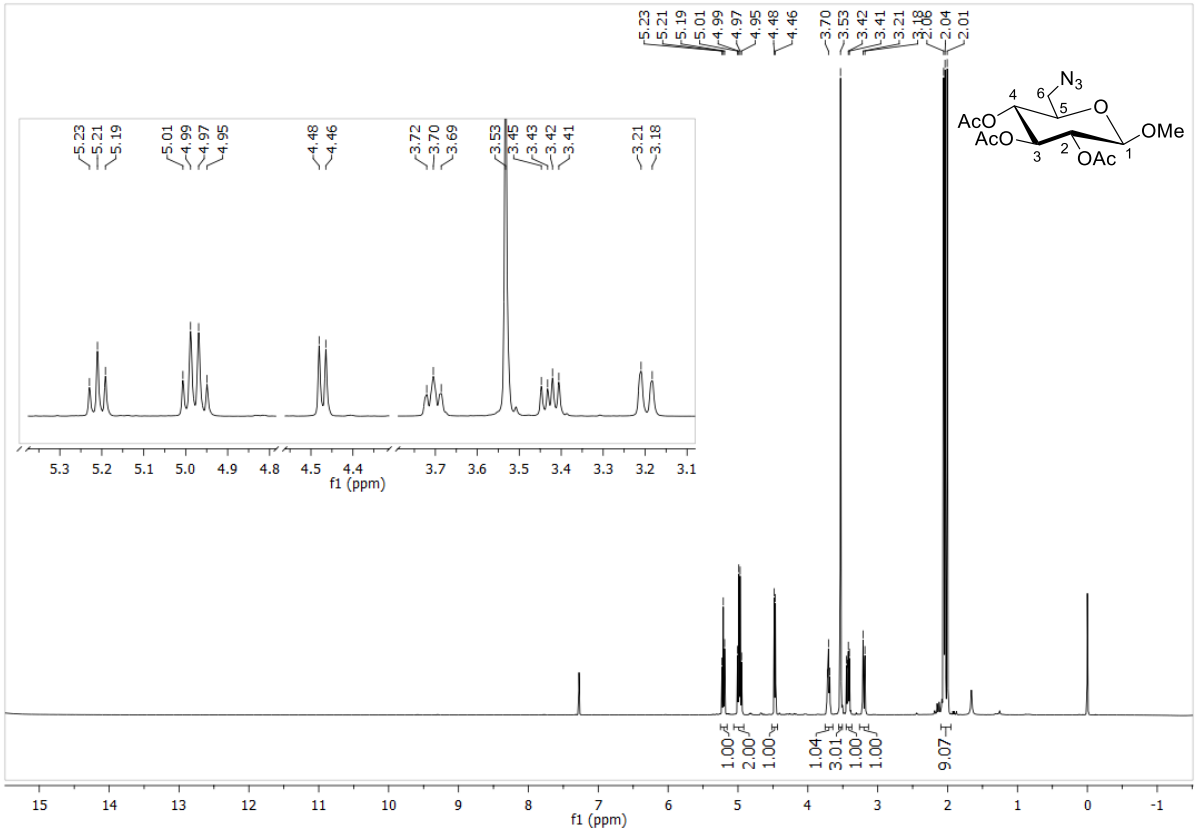


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

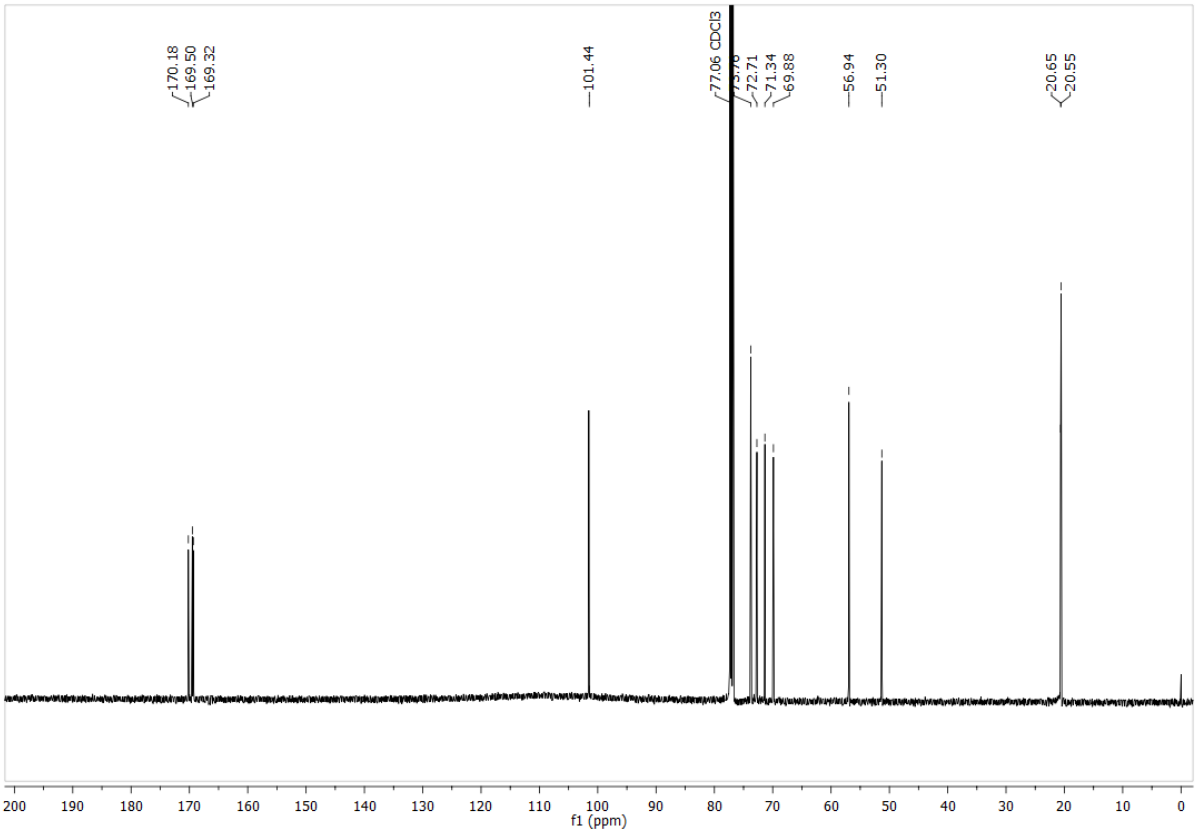


RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-*β*-D-glicopiranosídeo de metila 22

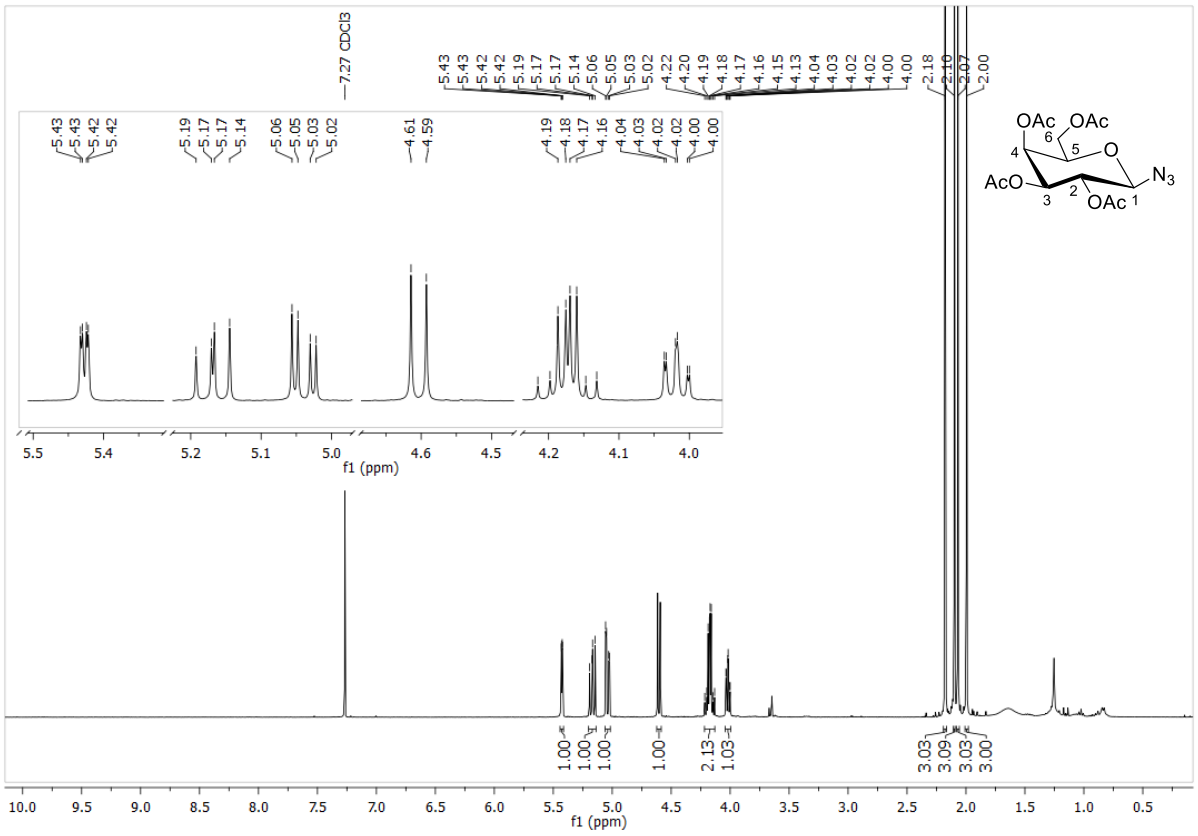


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

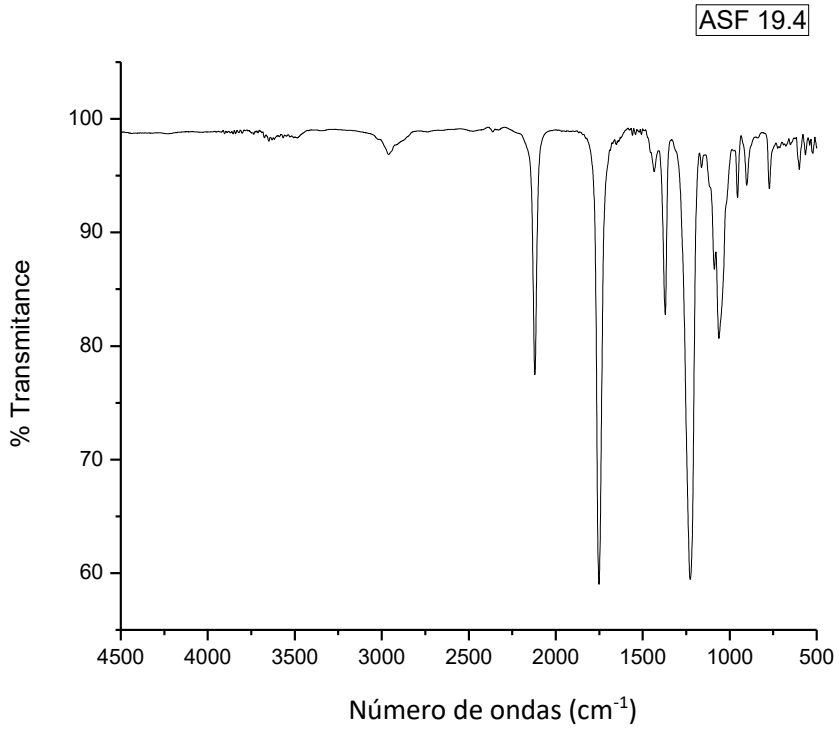


RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-*β*-D-galactopiranose azido 23

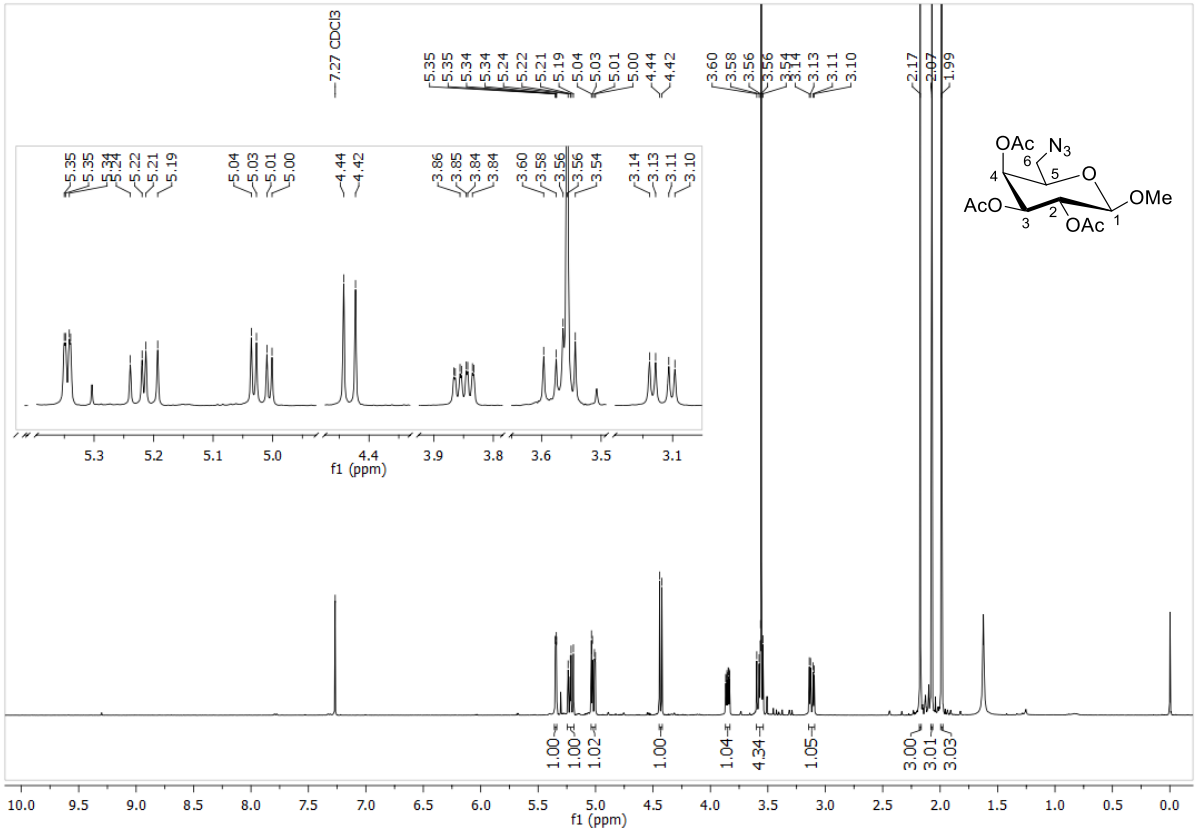


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

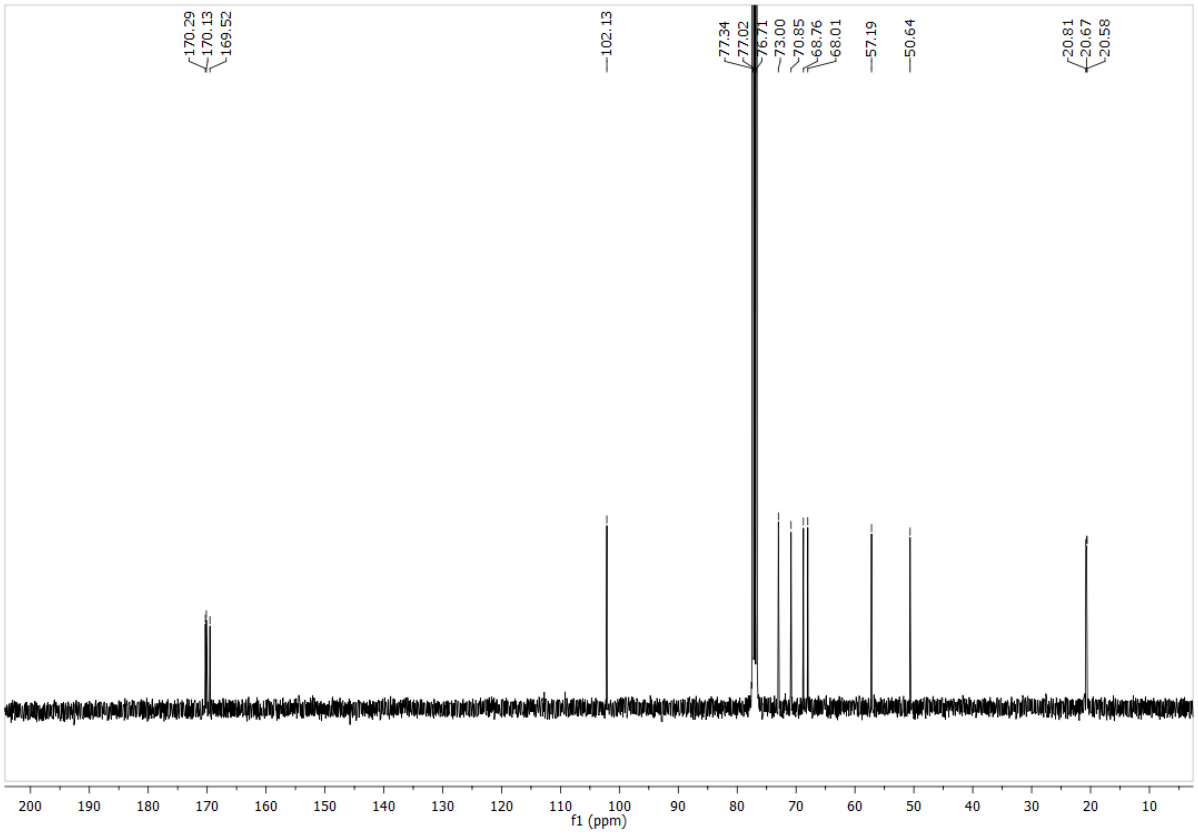


Espectro na região do infravermelho (IV) para o composto **23**

2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi-*β*-D-galactopiranosídeo de metila 24

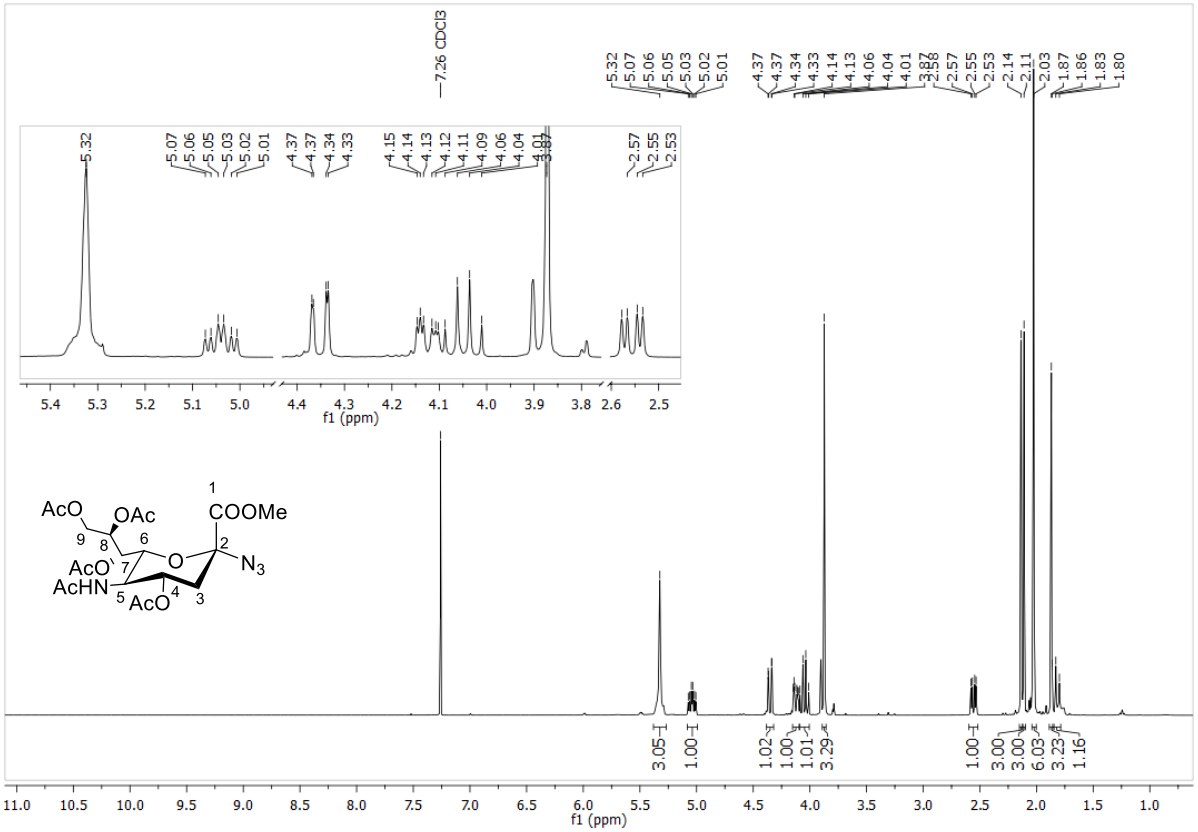


RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$)

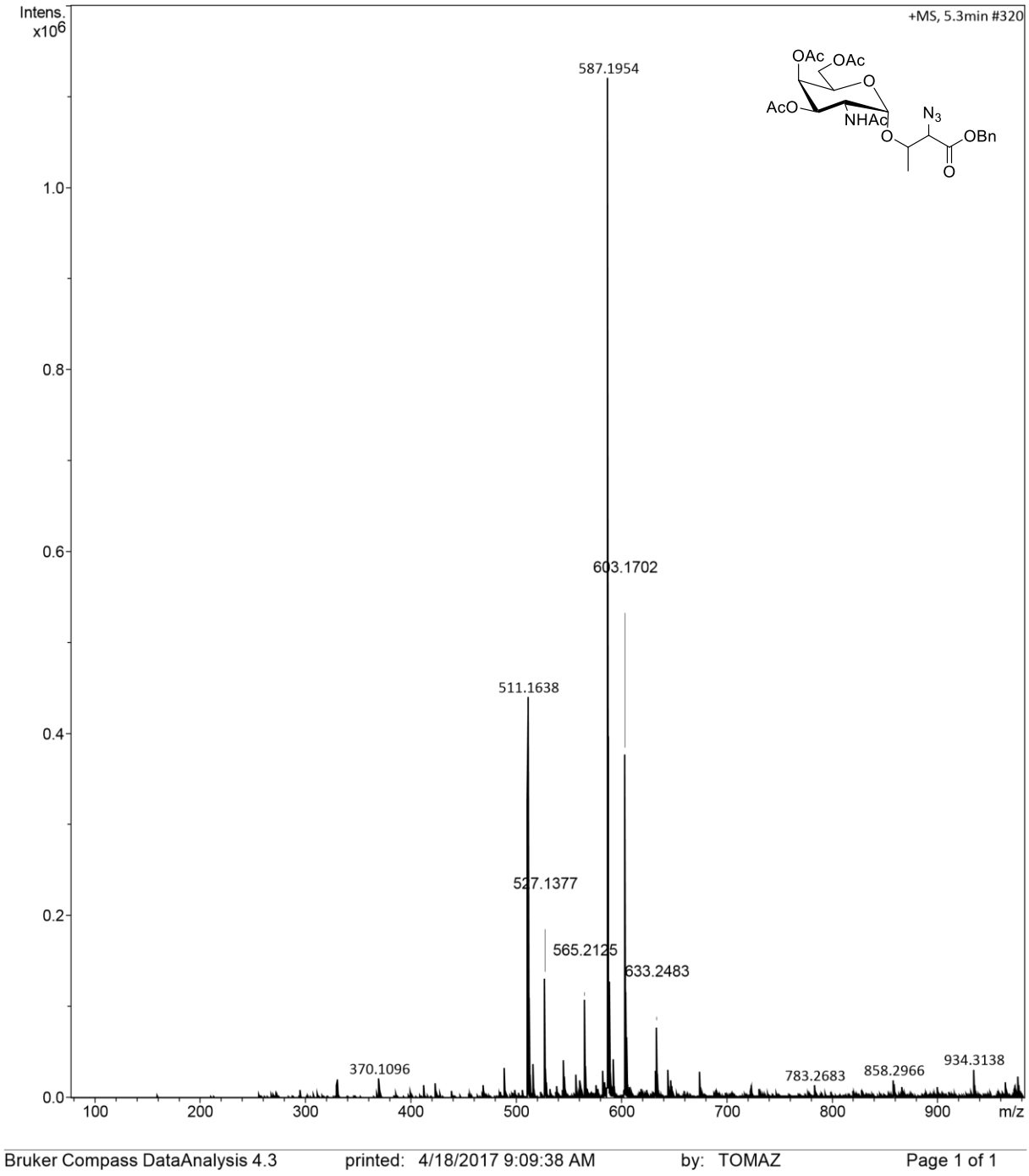
5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetil-2-azido-2,3,5-trideoxi-D-*glicero*-*β*-D-*galacto*-2-nonulopiranosonato de metila 25



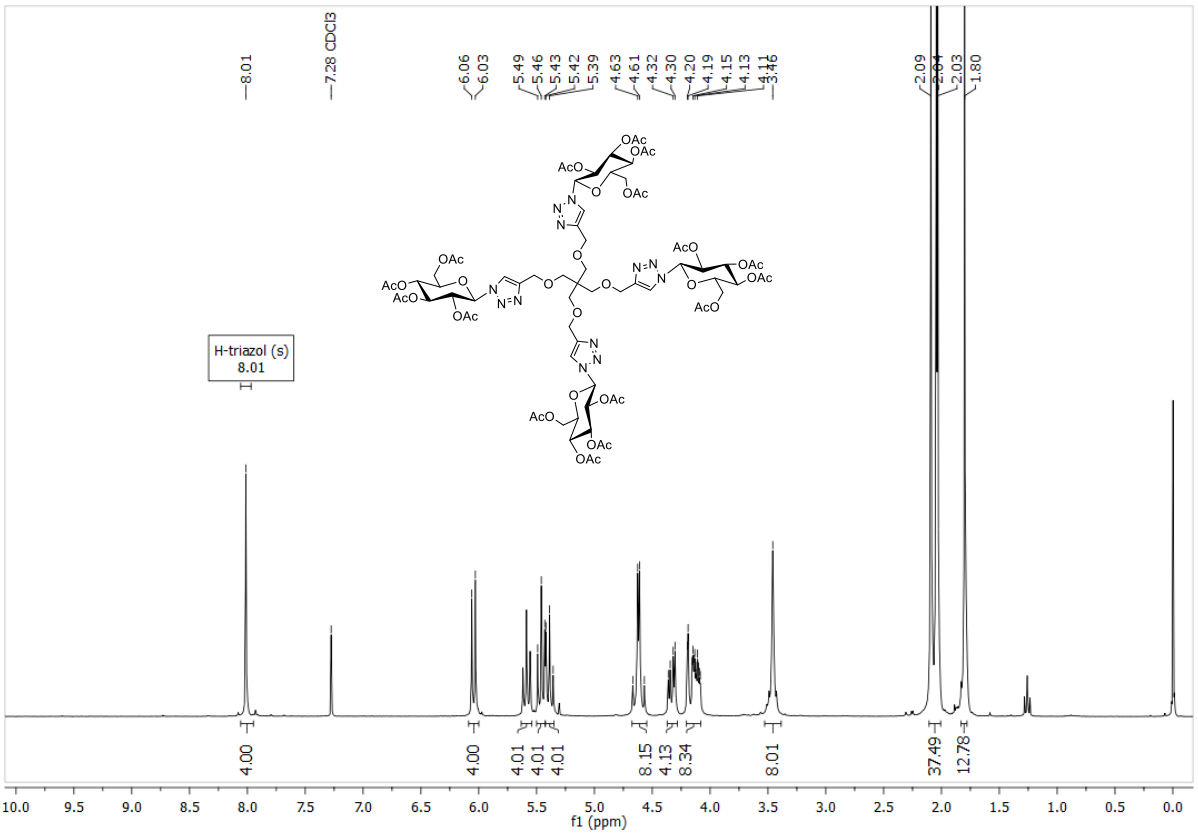
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

Éster benzílico de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil-*α*-D-galactopiranosilazido-treonina 26

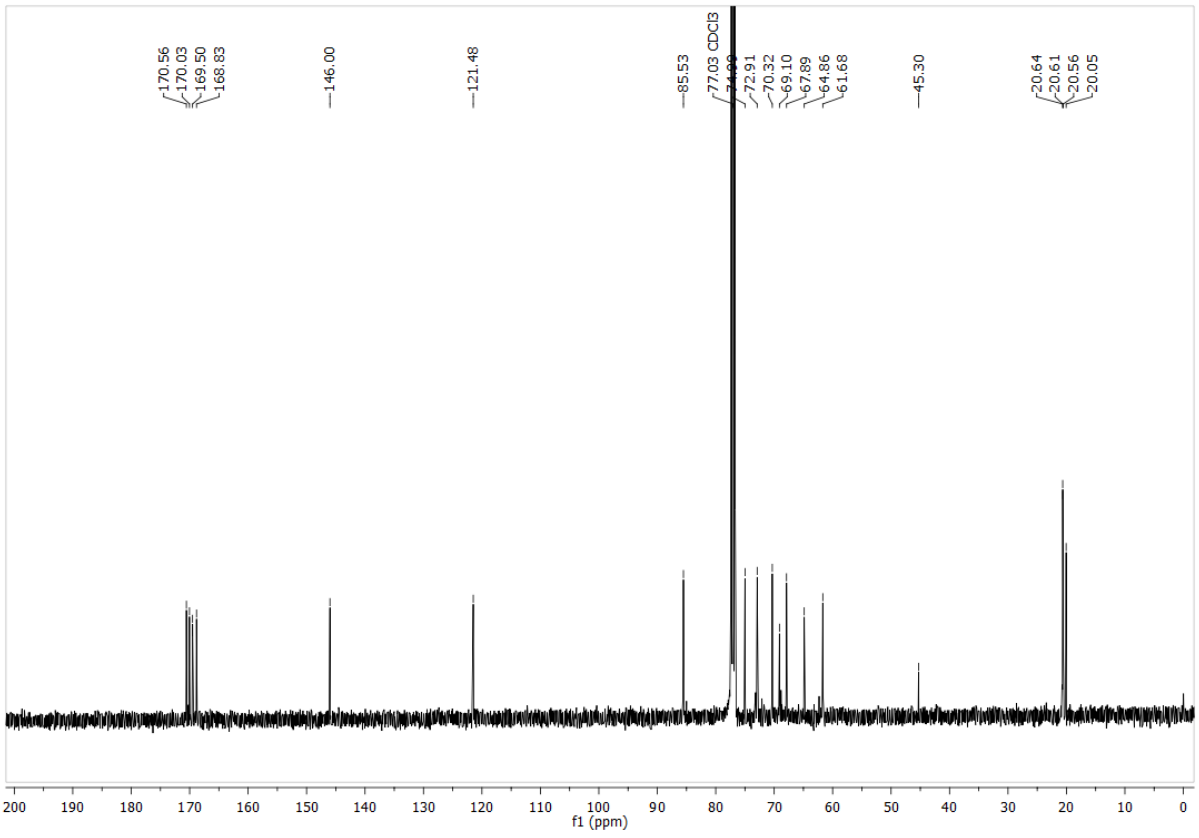
HRMS m/z calcd. para $C_{25}H_{32}N_4NaO_{11}^+$ 587,1960, encontrado 587,1954 [M+Na^+].



***Glycocluster* 55**



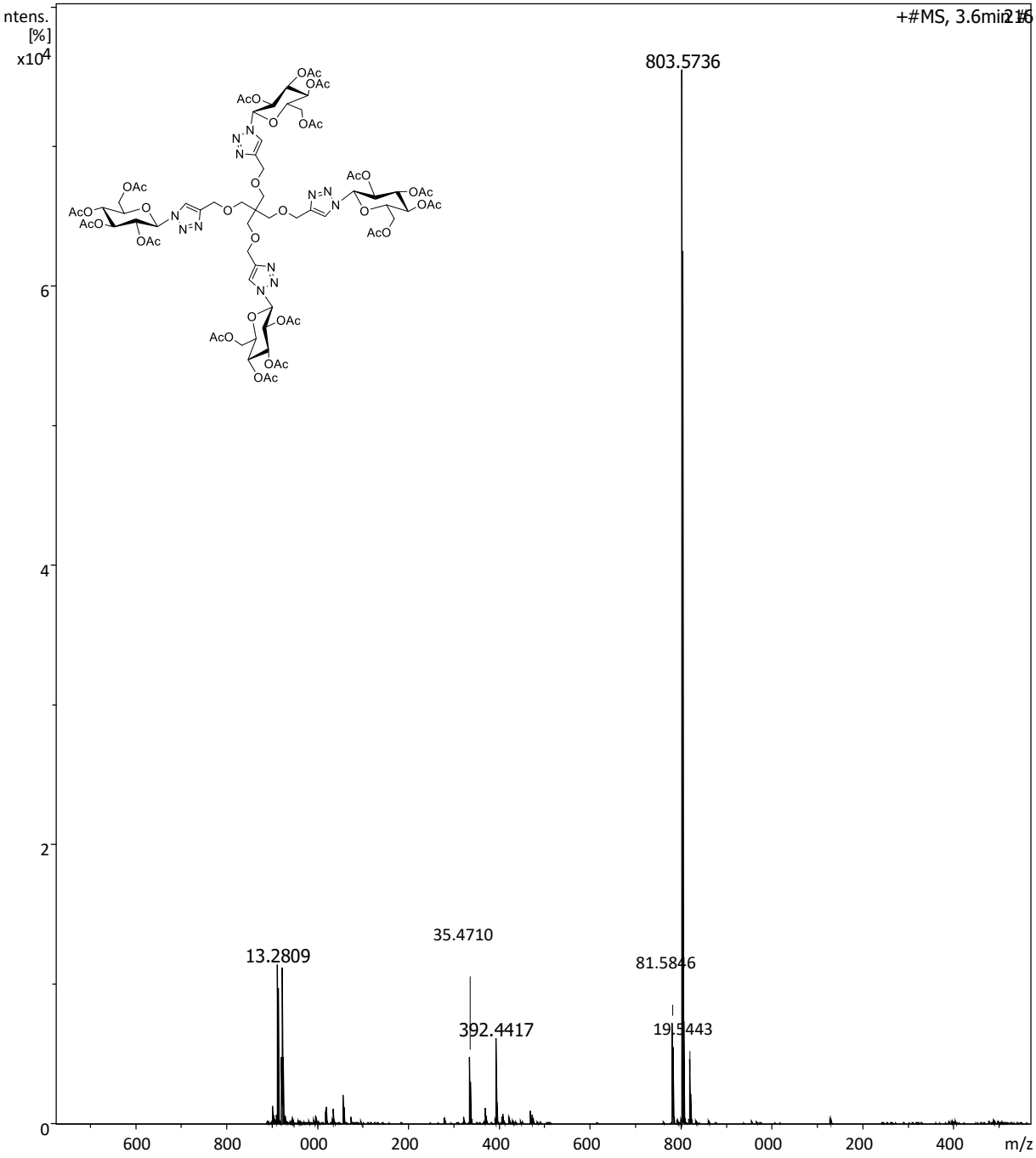
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



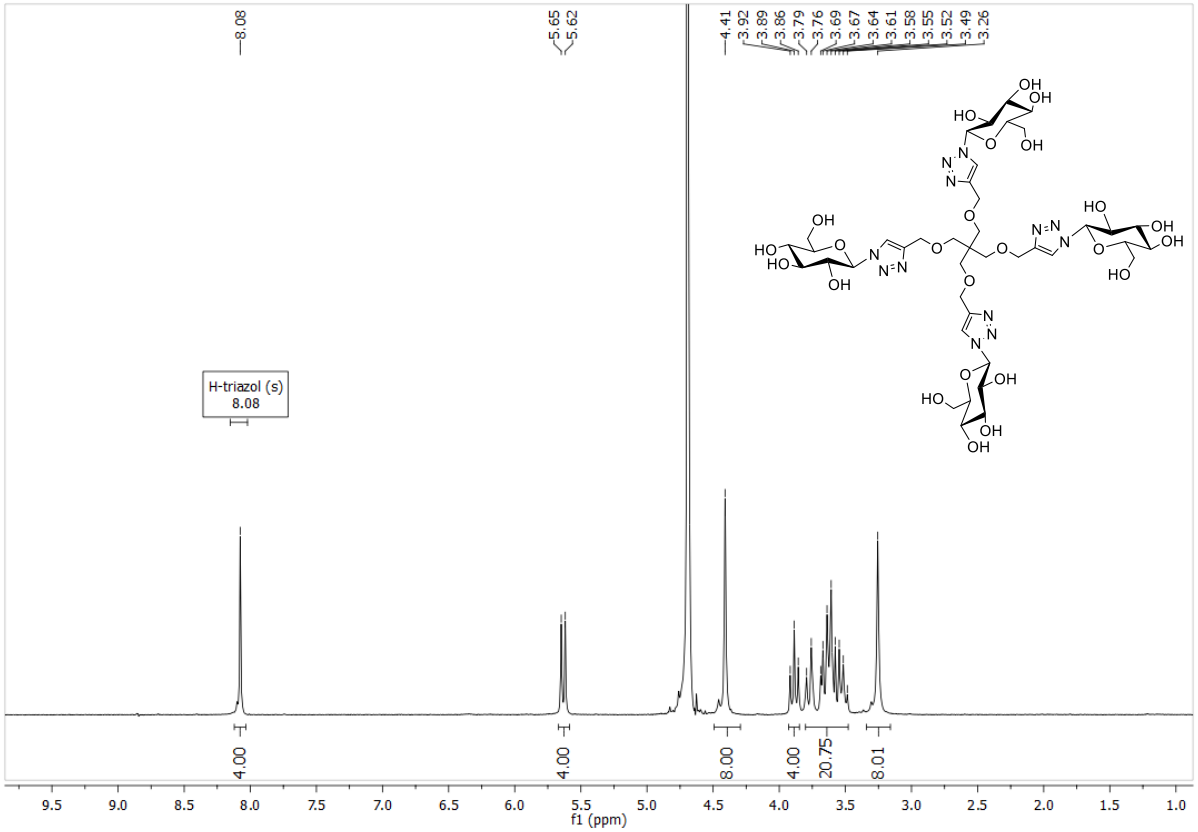
RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 55**

HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^{+}$ 1803,5739, encontrada 1803,5736 [M+Na^{+}].



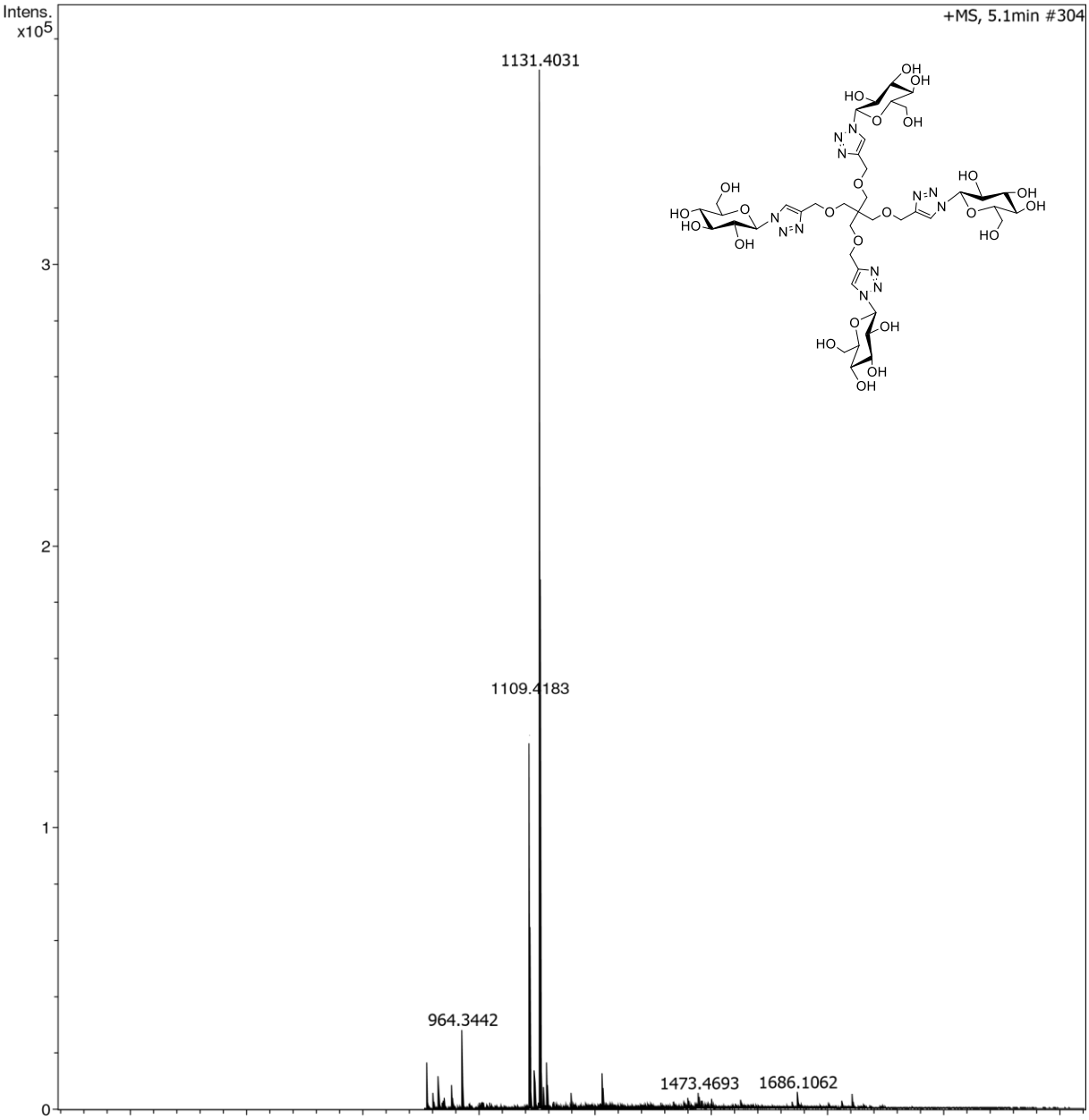
***Glycocluster* 1**



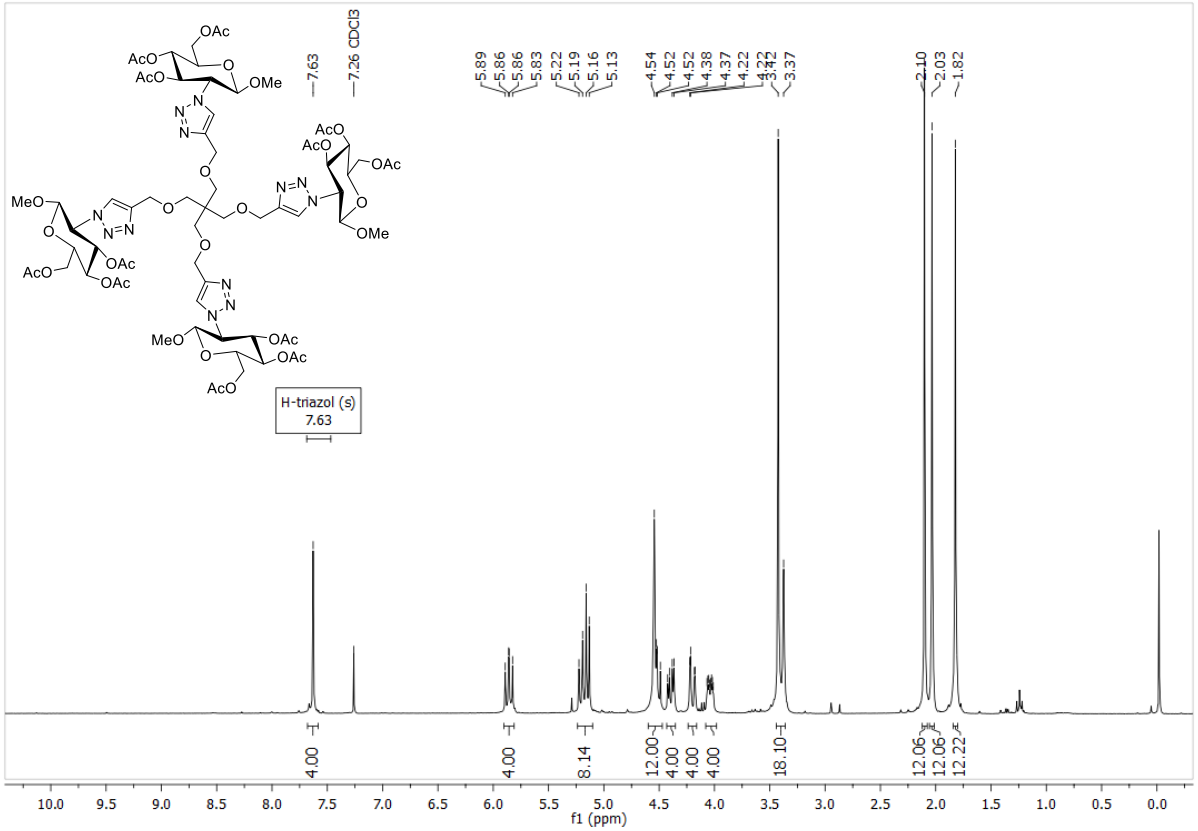
RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 1**

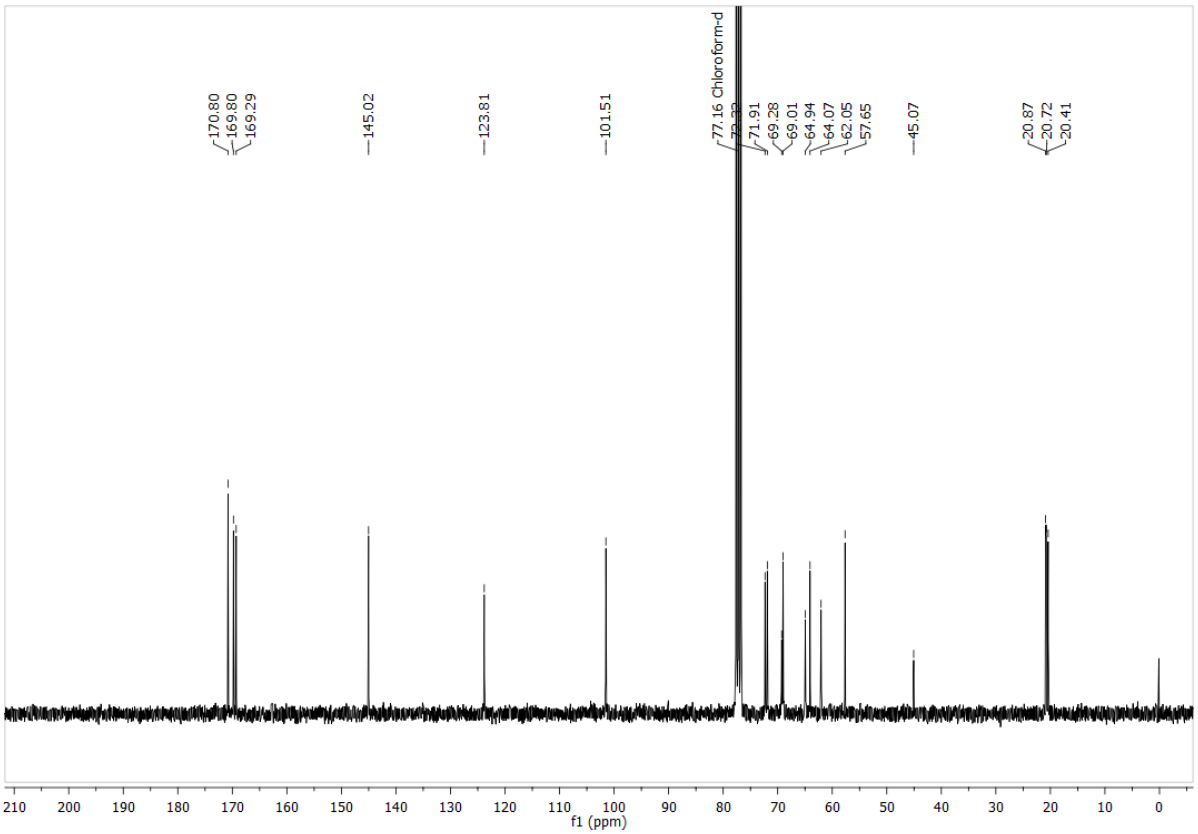
HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{64}N_{12}NaO_{24}^{+}$ 1131,4049, encontrada 1131,4031 [M+Na^{+}].



***Glycocluster* 56**



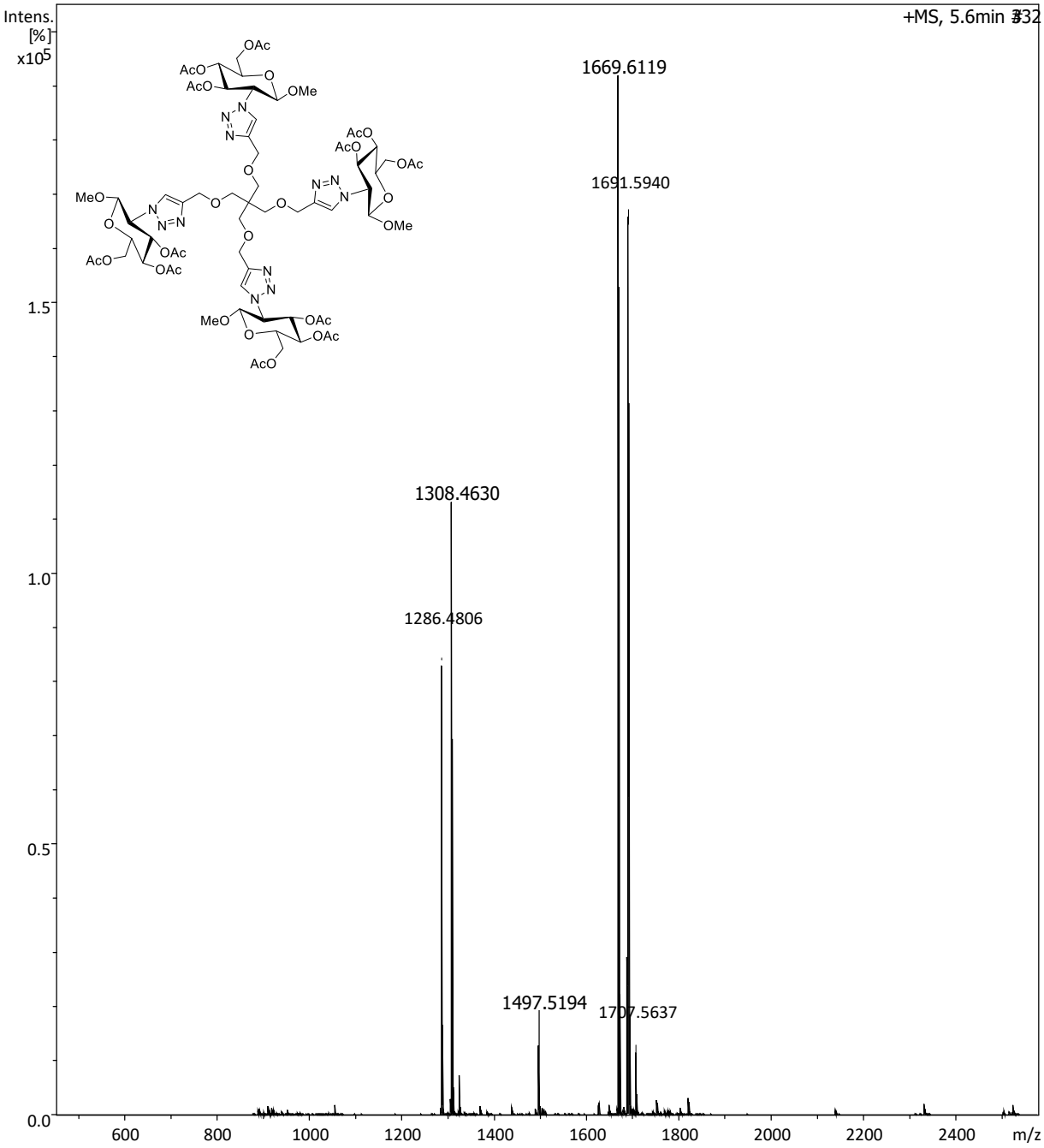
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)



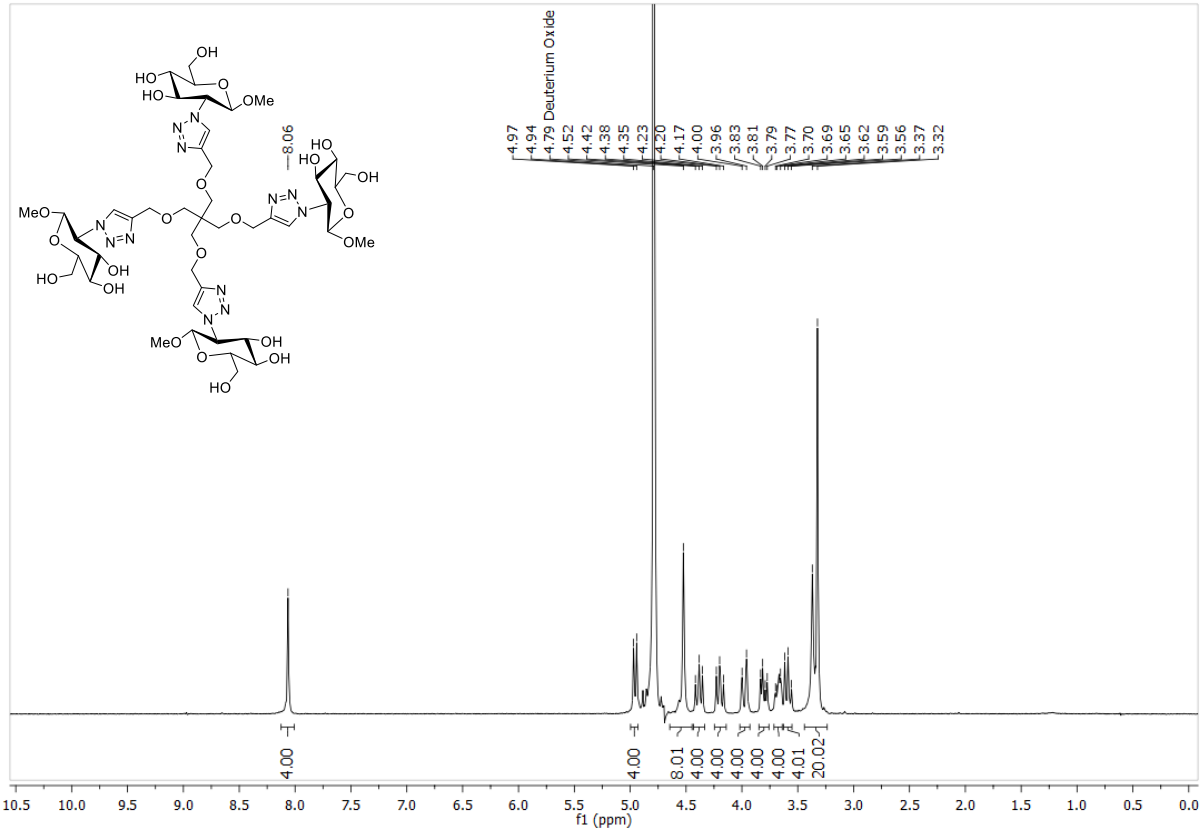
RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 56**

HRMS m/z calcd. para $C_{69}H_{96}N_{12}NaO_{36}^{+}$ 1691,5942, encontrada 1691,5940 [M+Na^{+}].

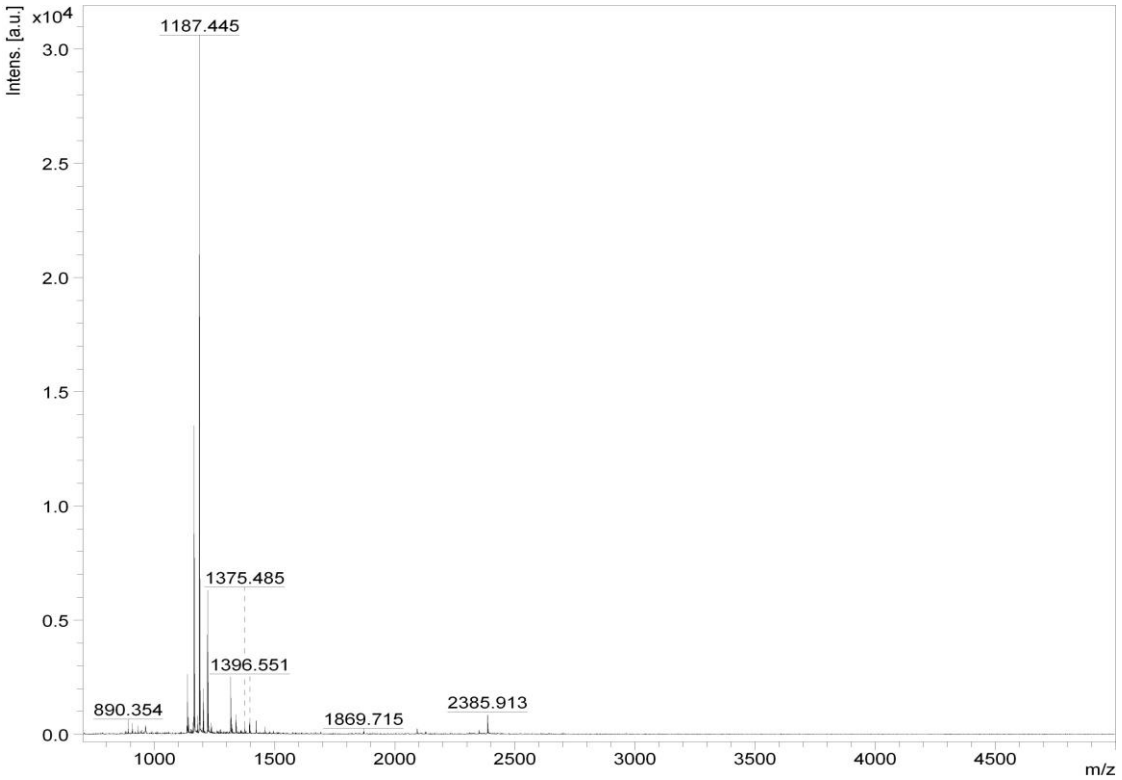


***Glycocluster* 2**

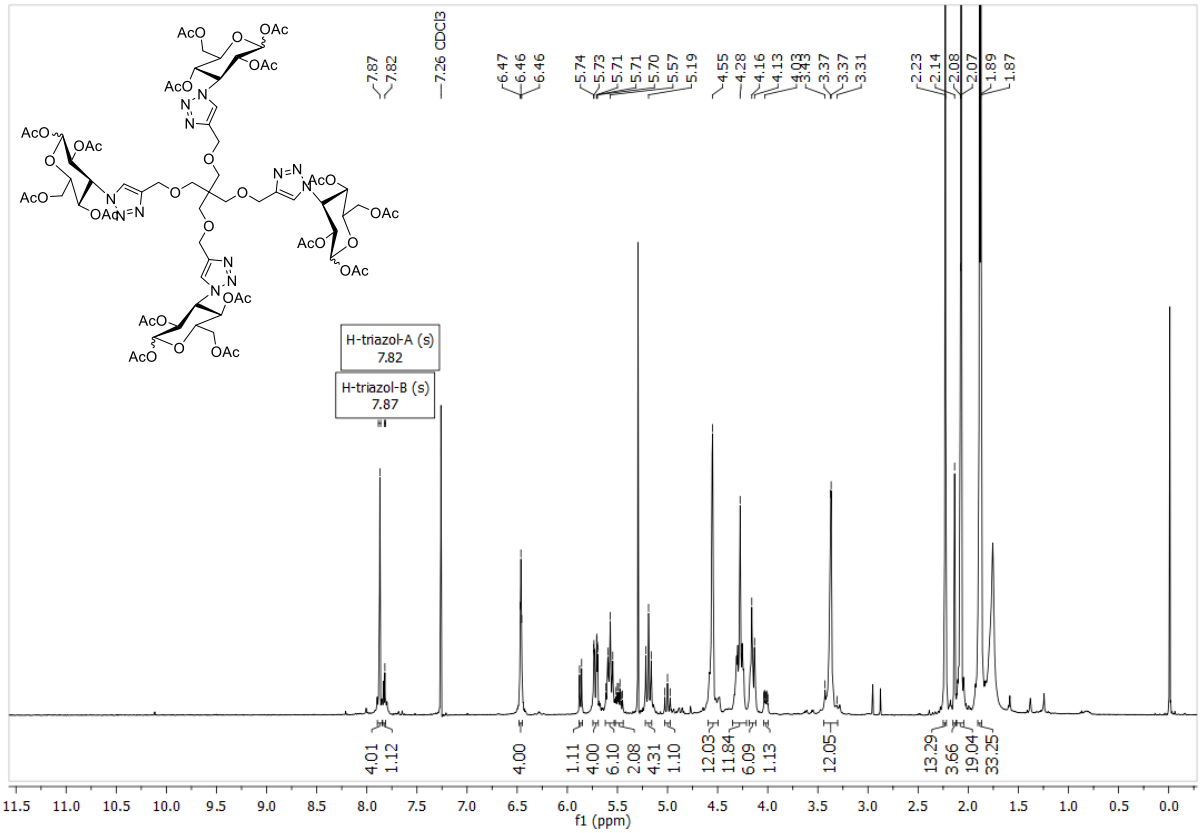


RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

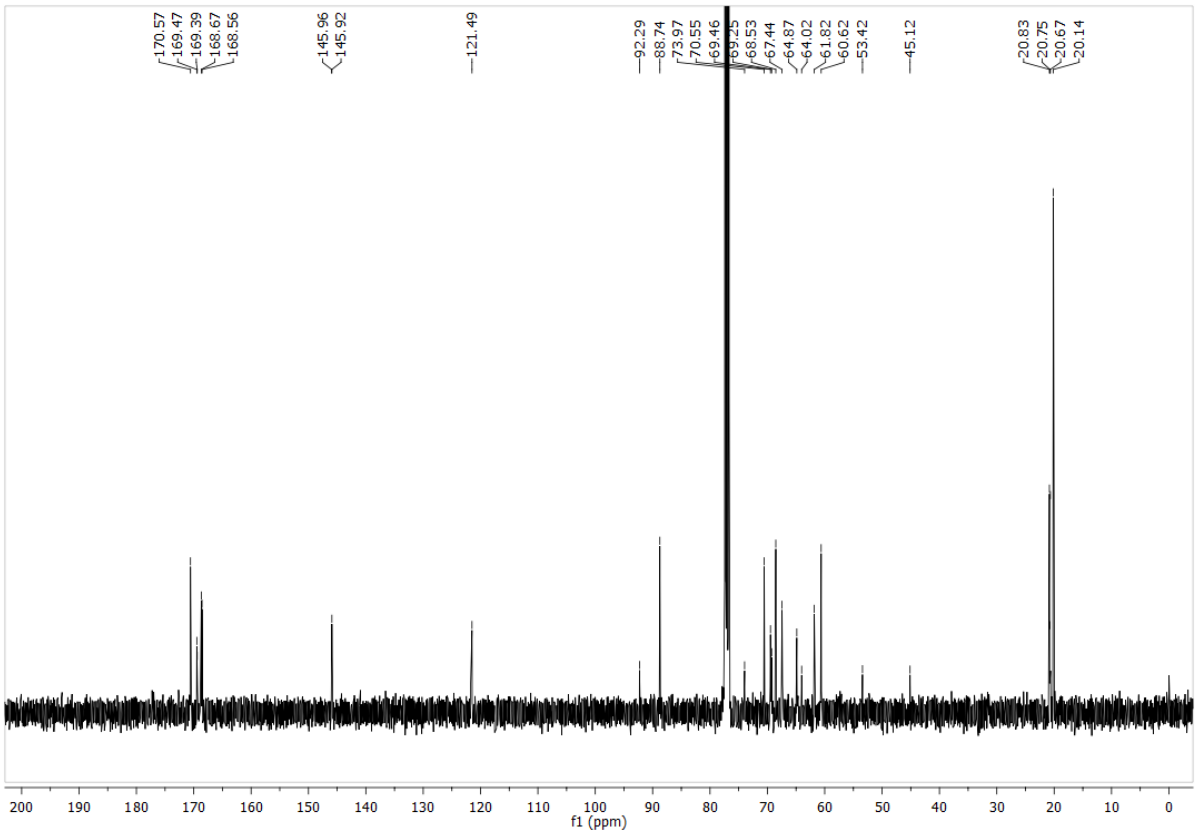
MALDI-TOF m/z calcd. para $C_{45}H_{73}N_{12}NaO_{24}^{+}$ 1187,4675, encontrada 1187,445 [M+Na^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.



***Glycocluster* 57**



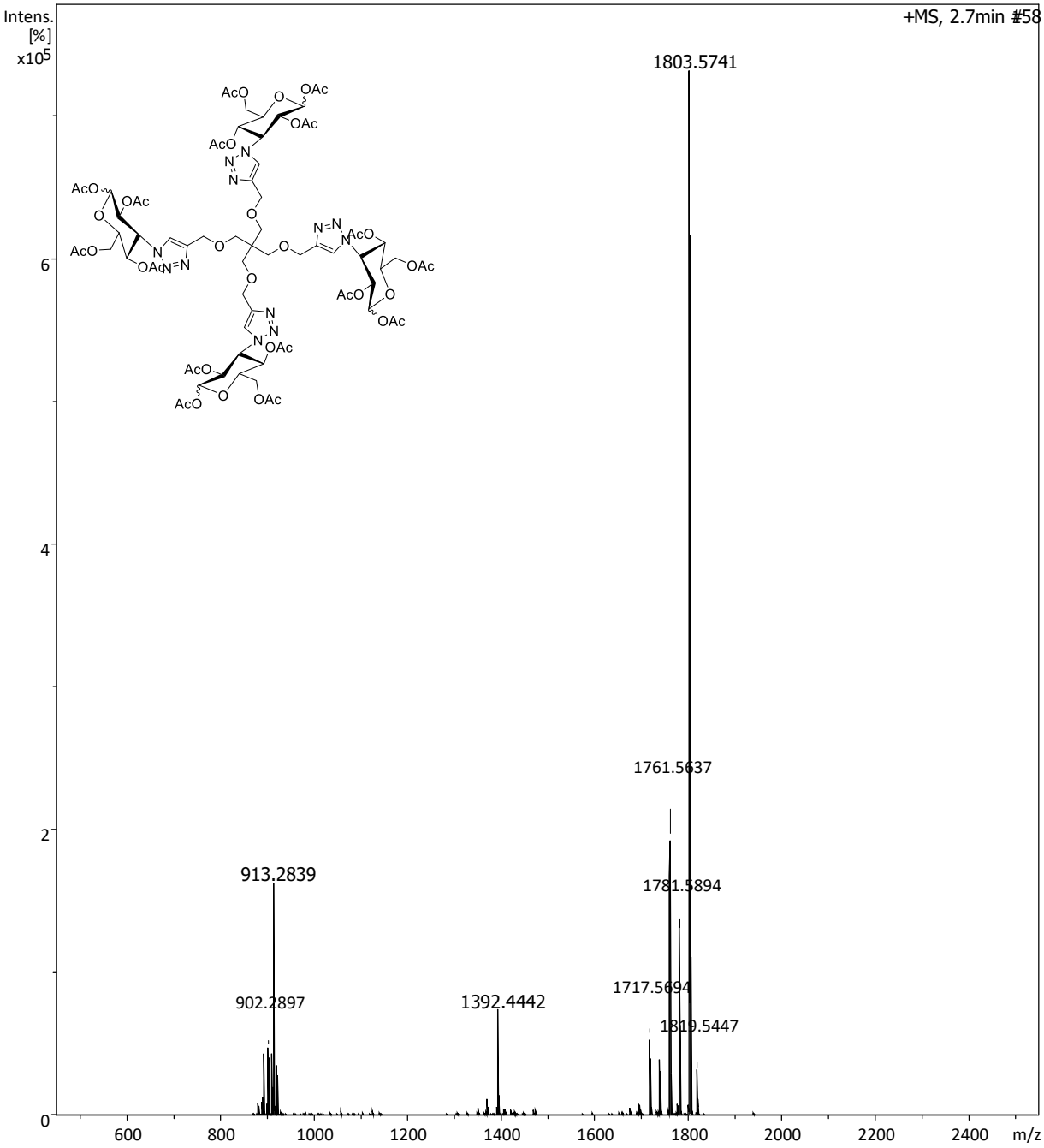
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)



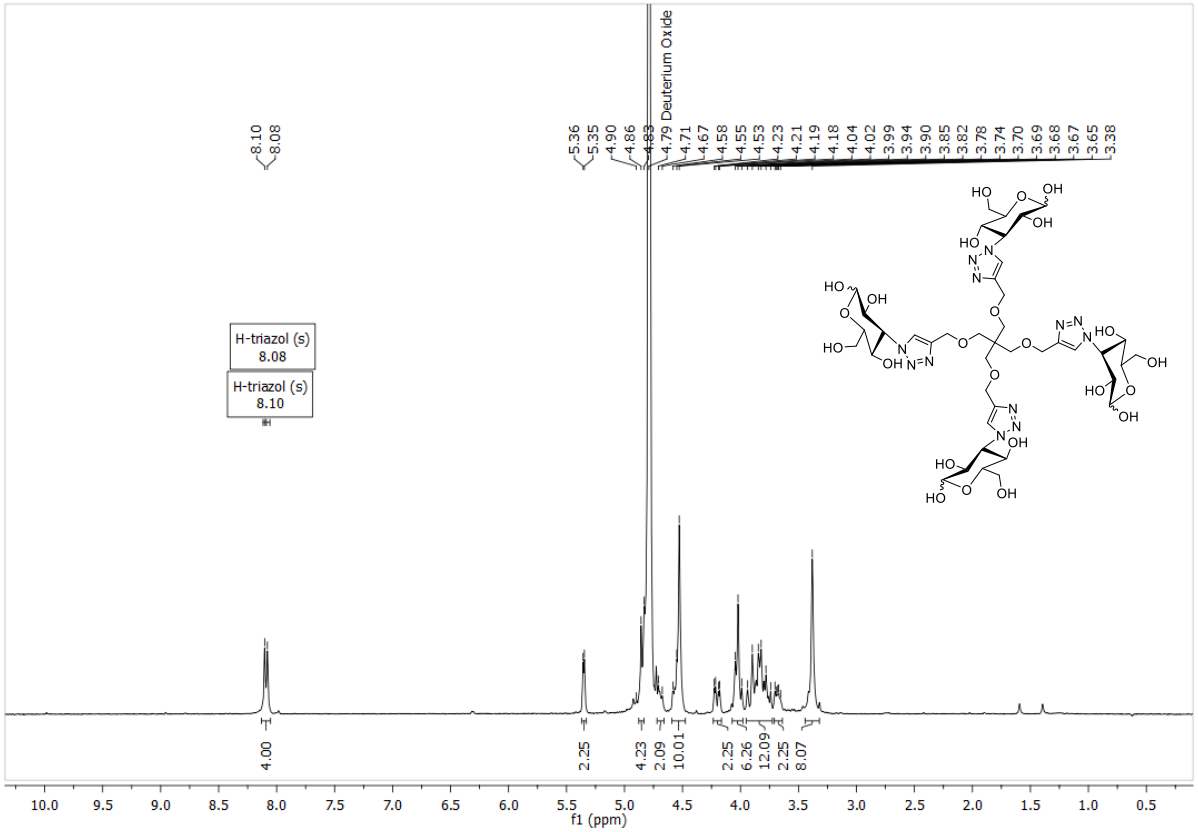
RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 57**

HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^{+}$ 1803,5739, encontrada 1803,5741 [M+Na^{+}].



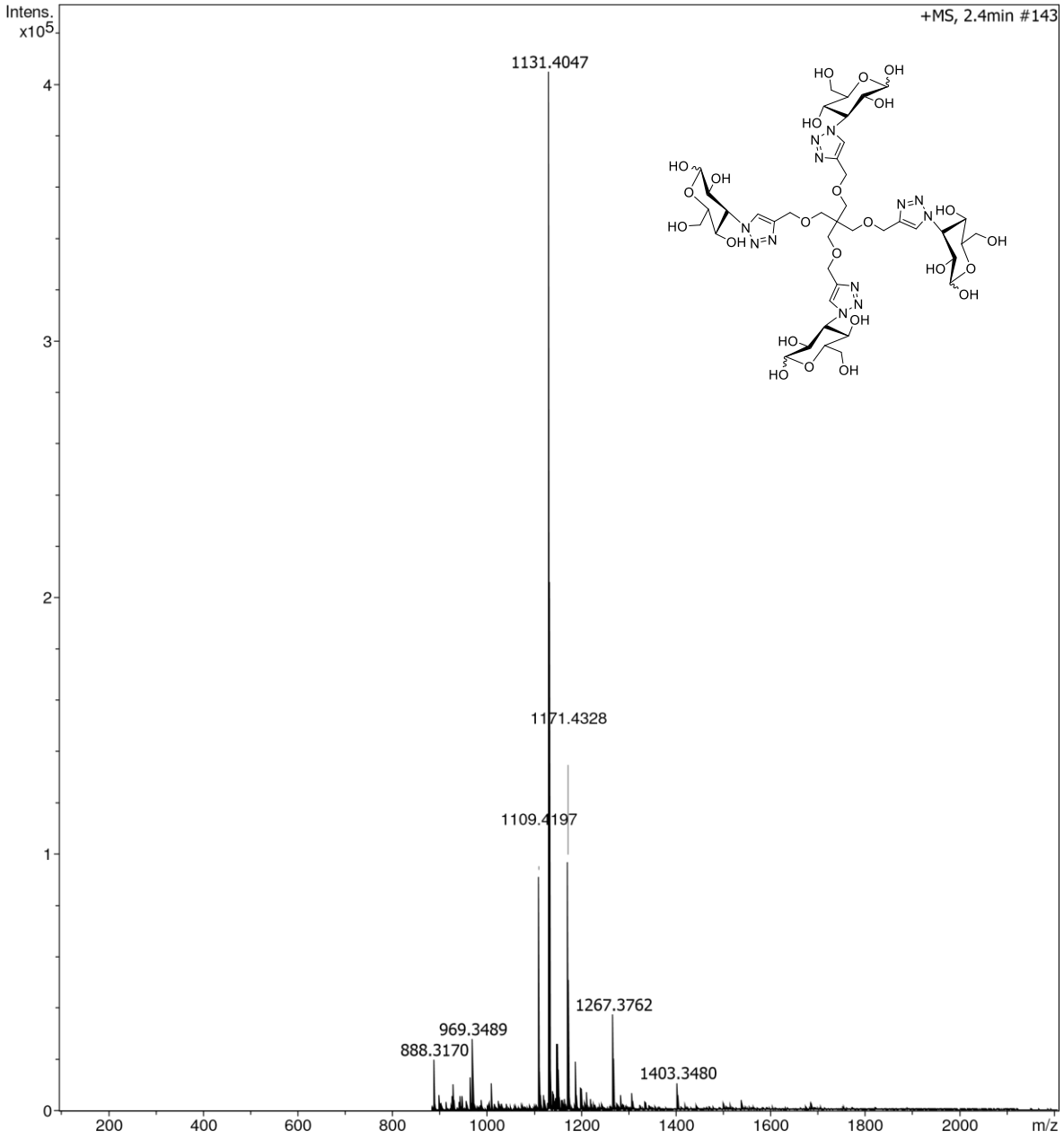
***Glycocluster* 3**



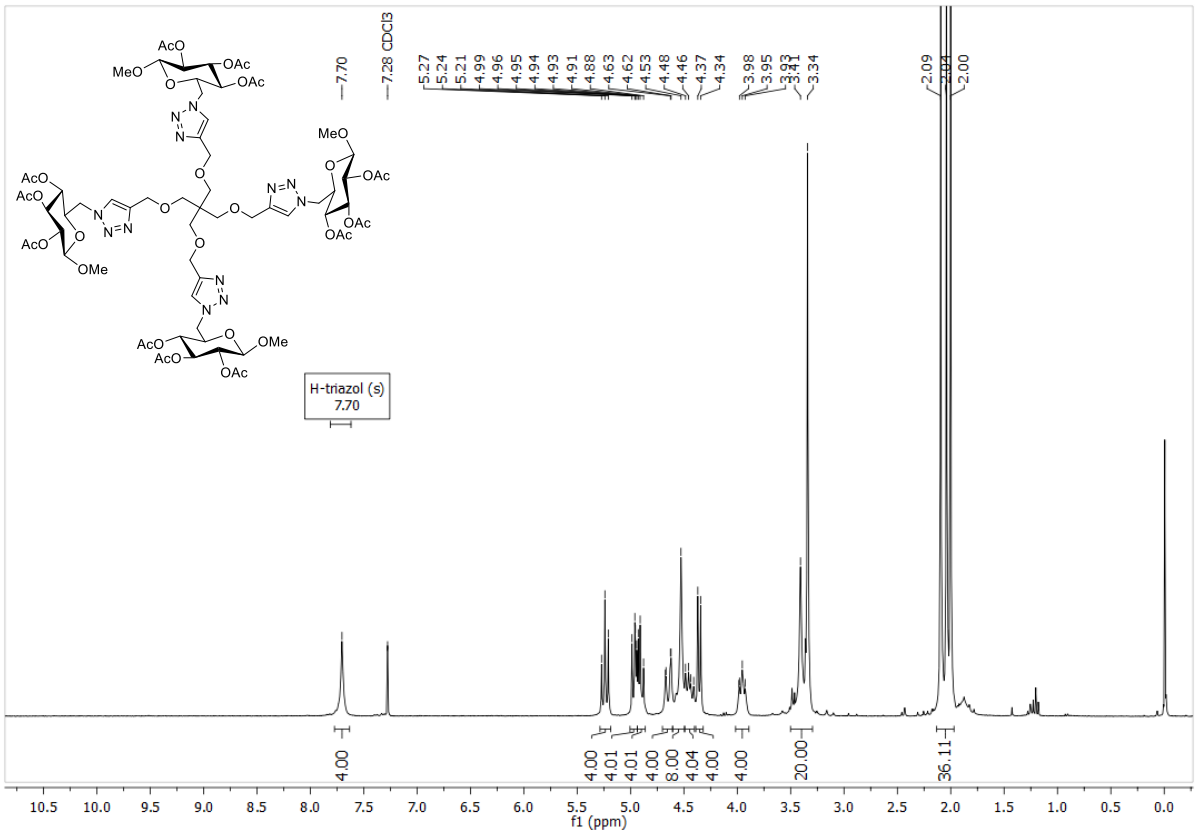
RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 3**

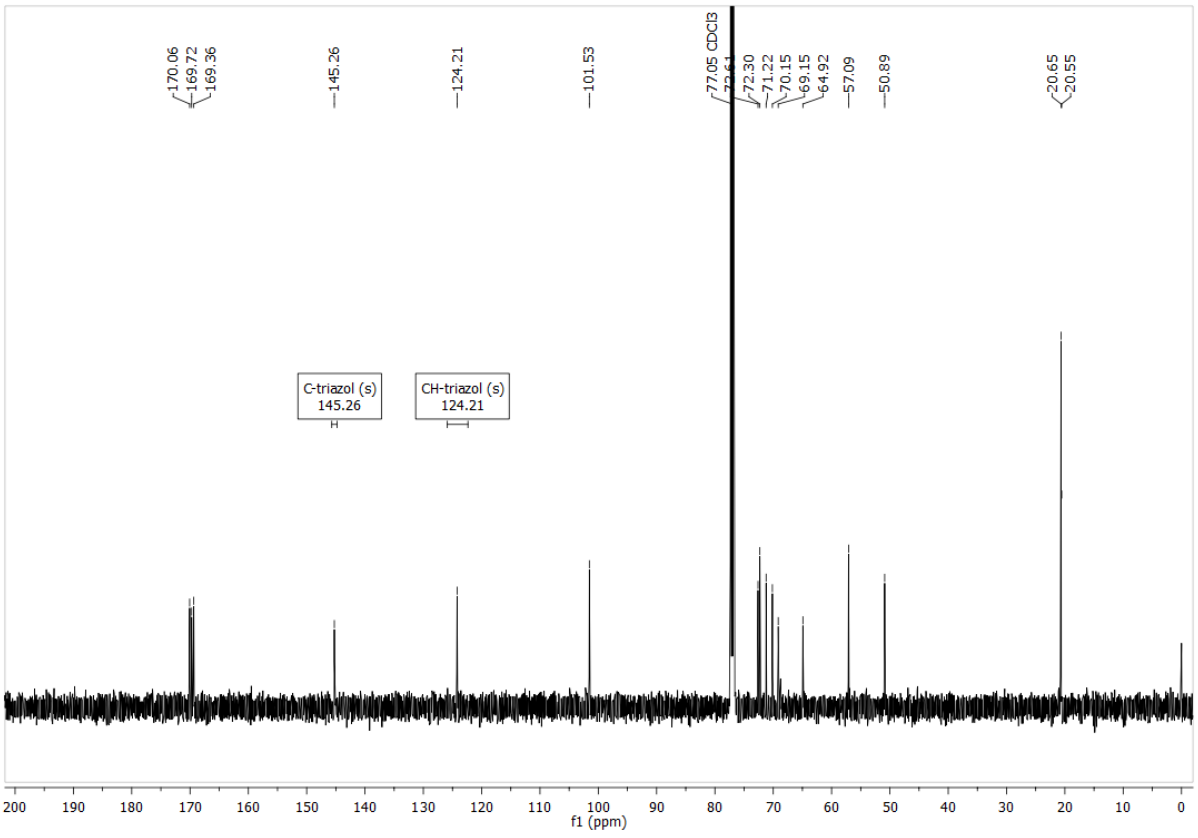
HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{64}N_{12}NaO_{24}^{+}$ 1131,4049, encontrada 1131,4047 [M+Na^{+}].



***Glycocluster* 58**



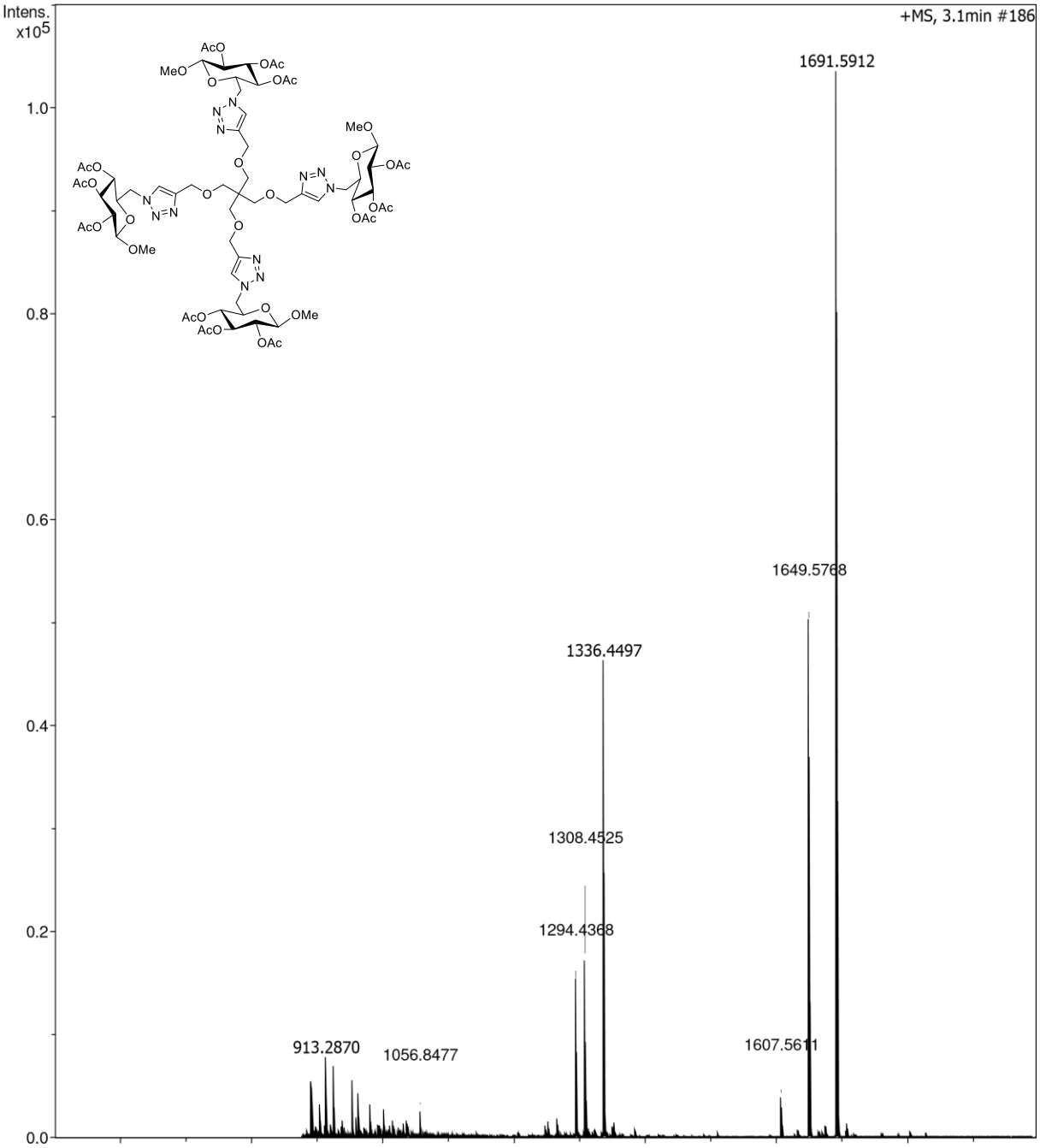
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



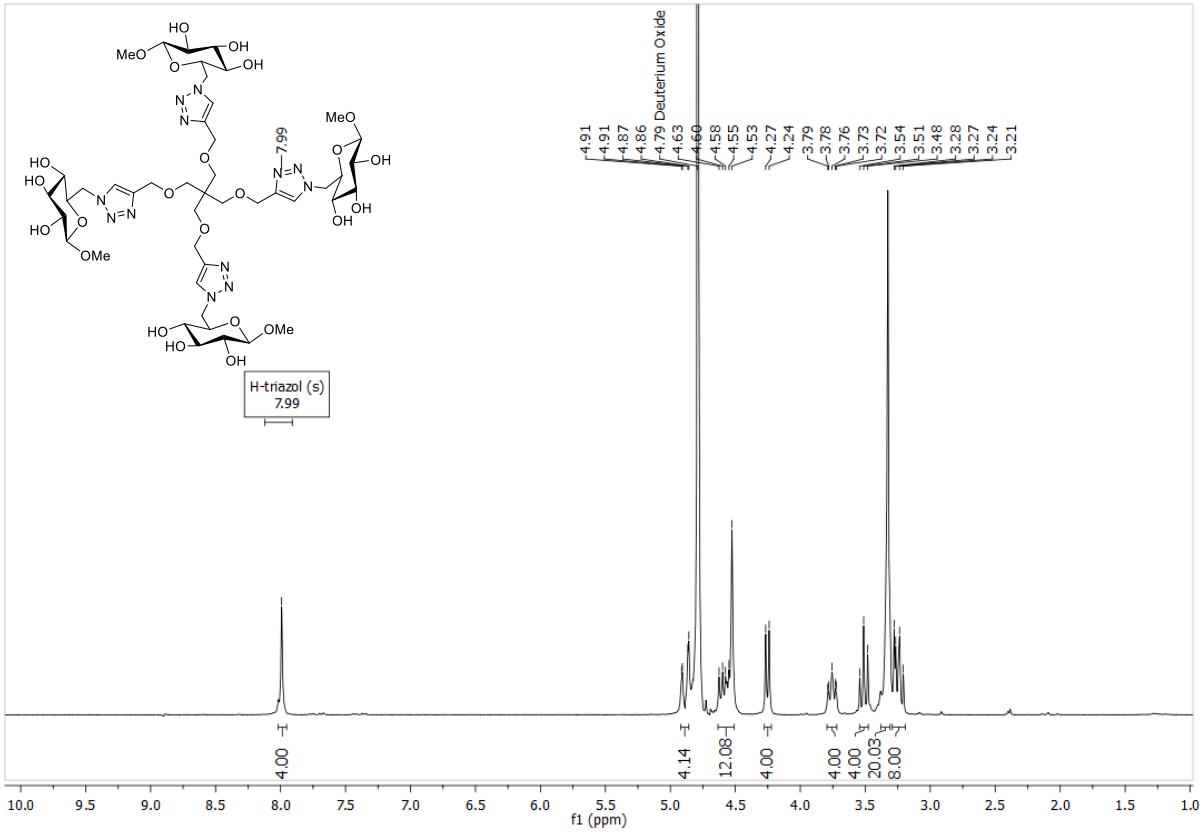
RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 58**

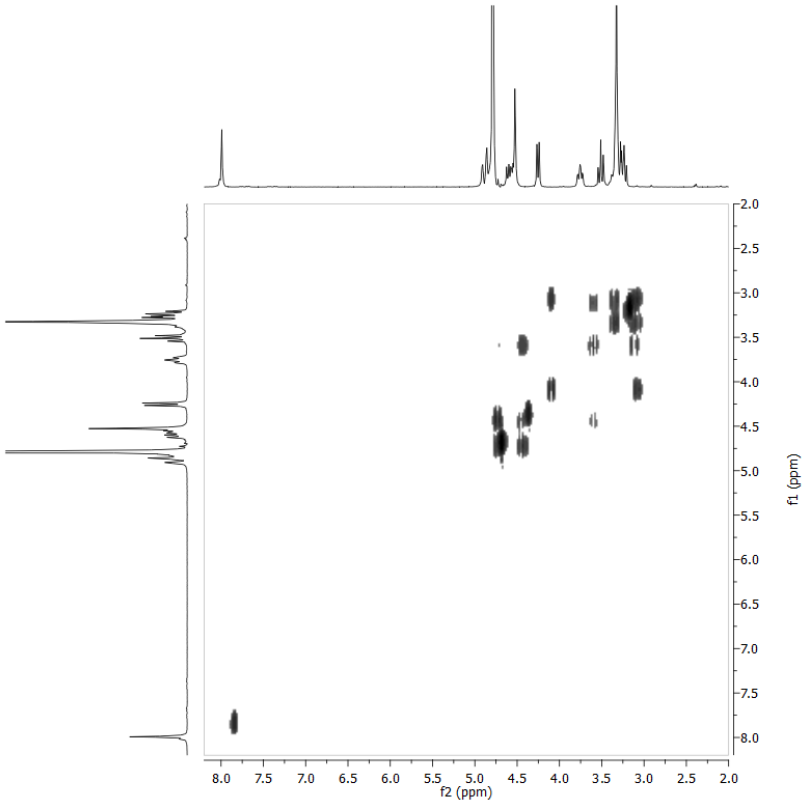
HRMS m/z calcd. para $C_{69}H_{96}N_{12}NaO_{36}^{+}$ 1691,5942, encontrada 1691,5912 [M+Na^{+}].



***Glycocluster* 4**

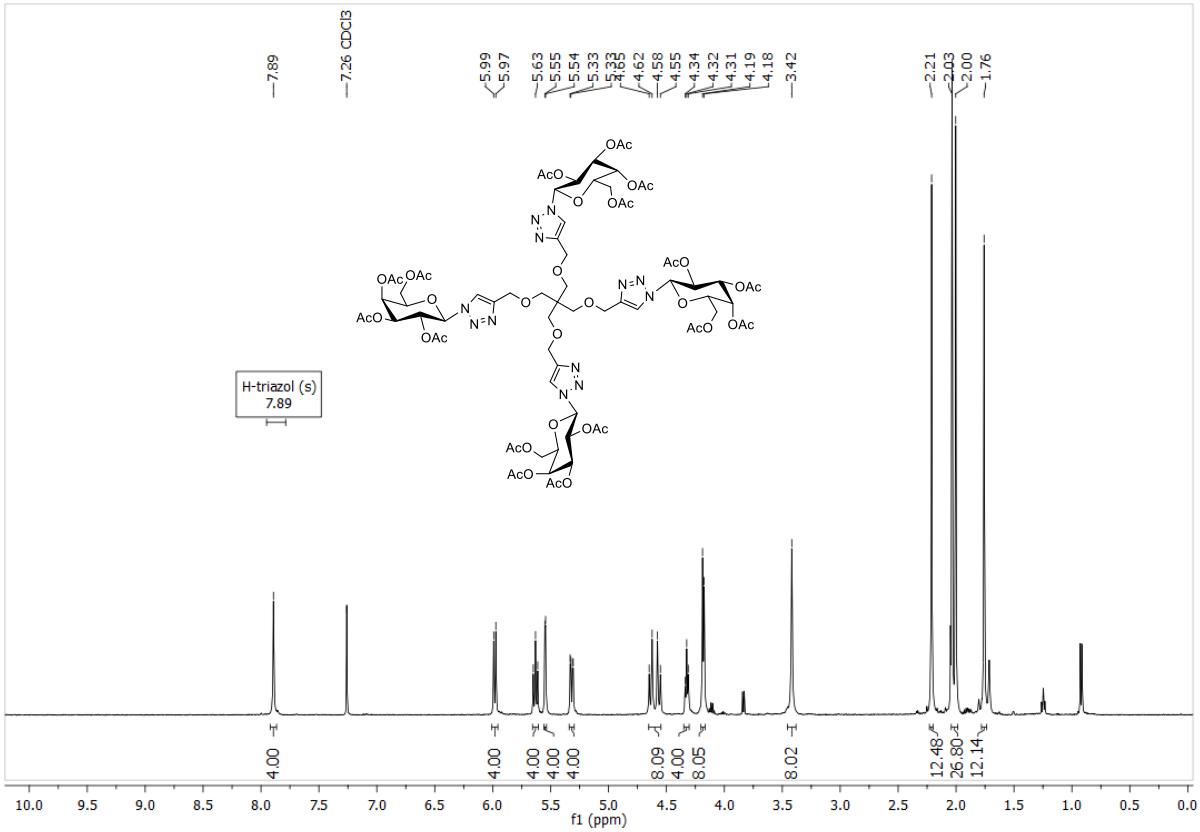


RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O)

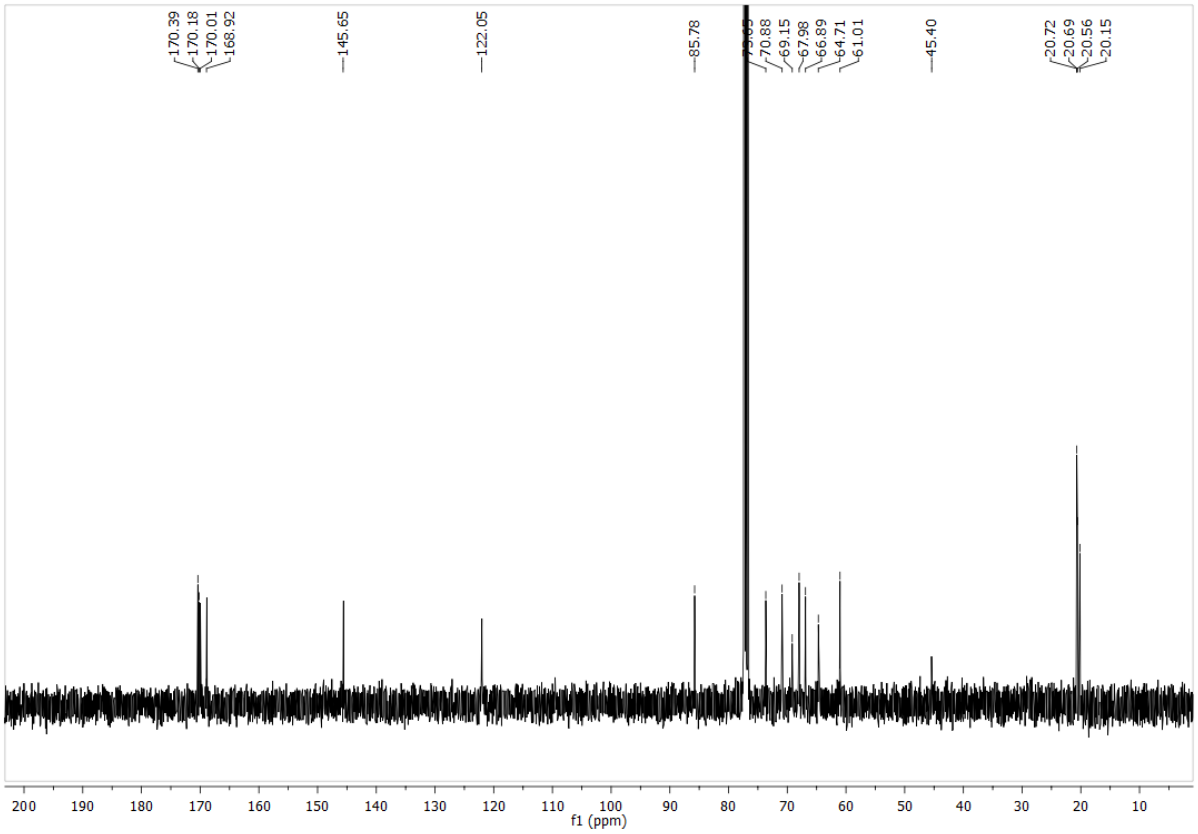


Mapa de contornos COSY - ^{1}H-^{1}H

***Glycocluster* 79**



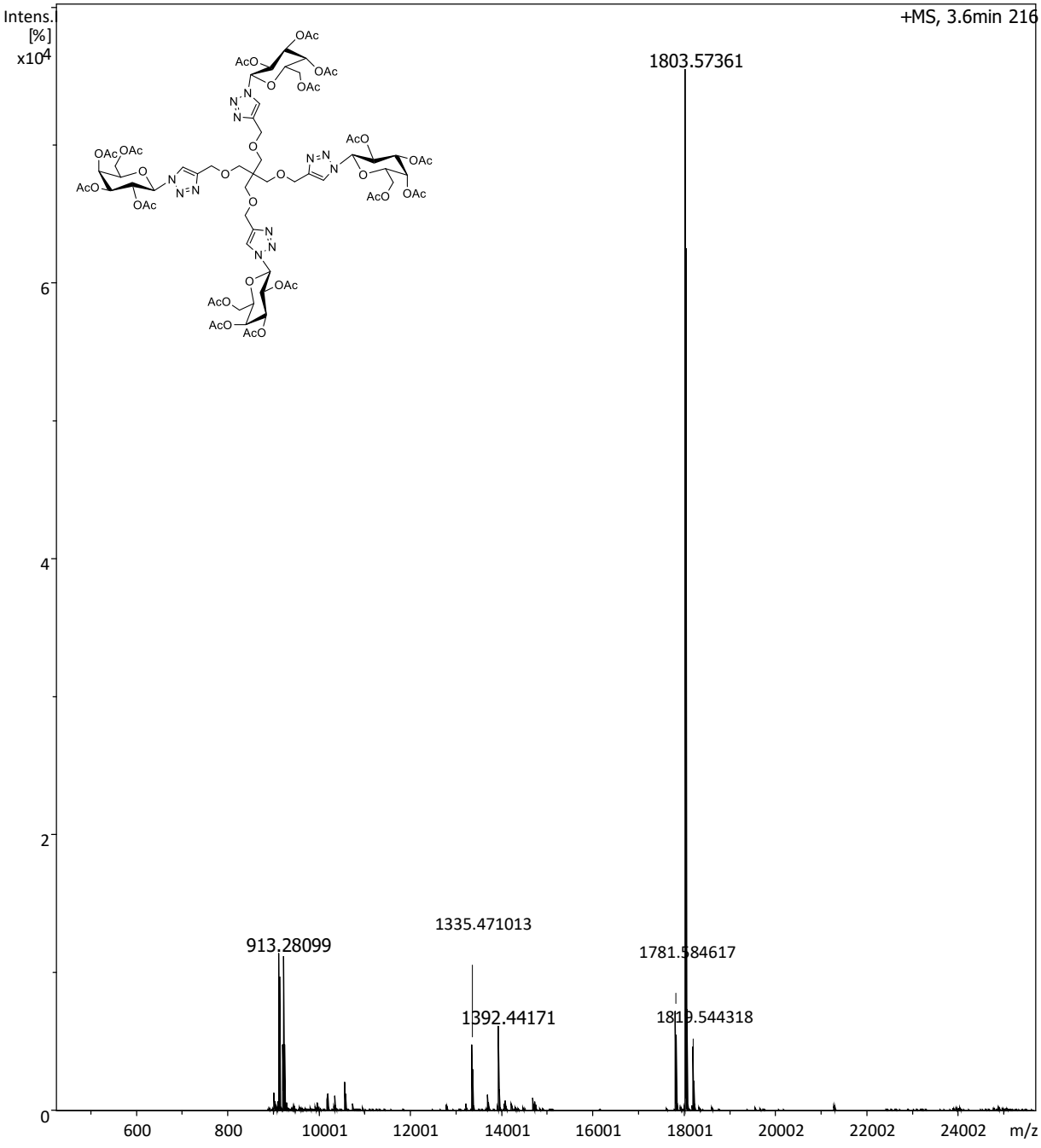
RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



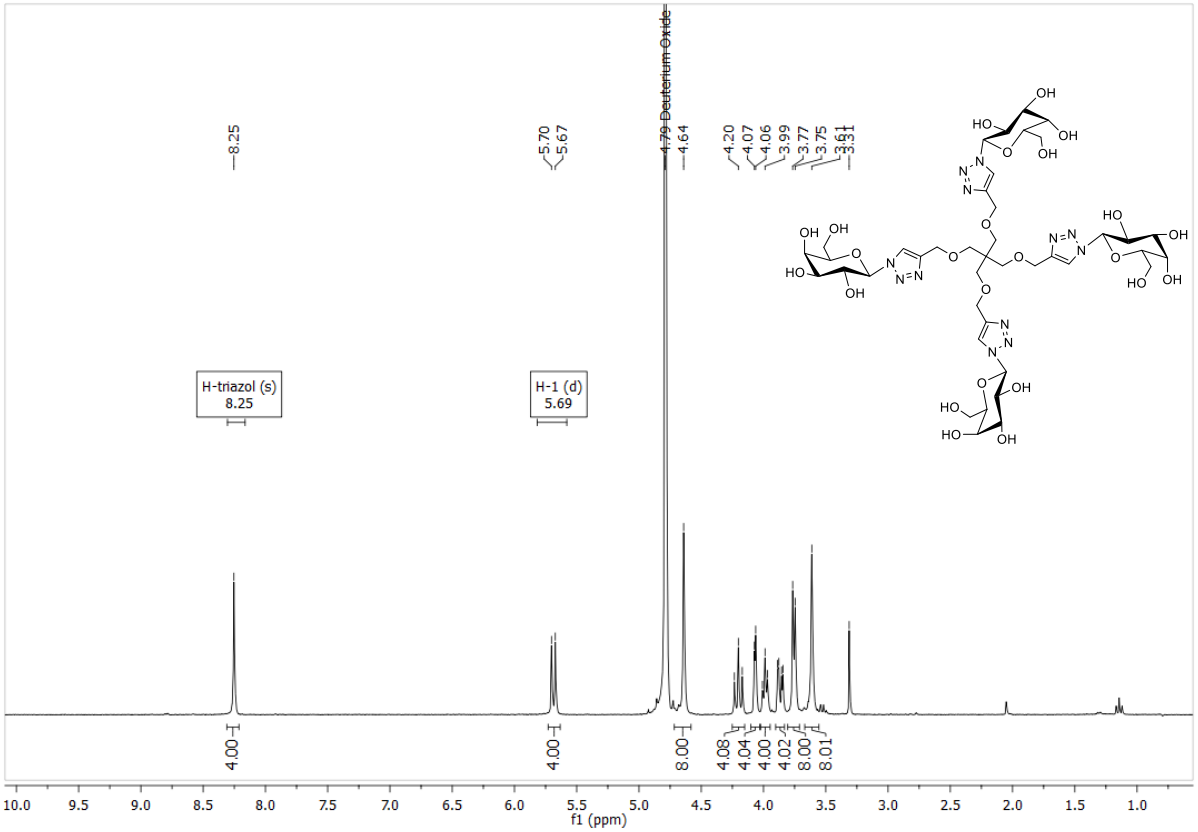
RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$)

Glycocluster 79

HRMS m/z calcd. para $C_{73}H_{96}N_{12}NaO_{40}^{+}$ 1803,5739, encontrada 1803,5736 [M+Na^{+}].



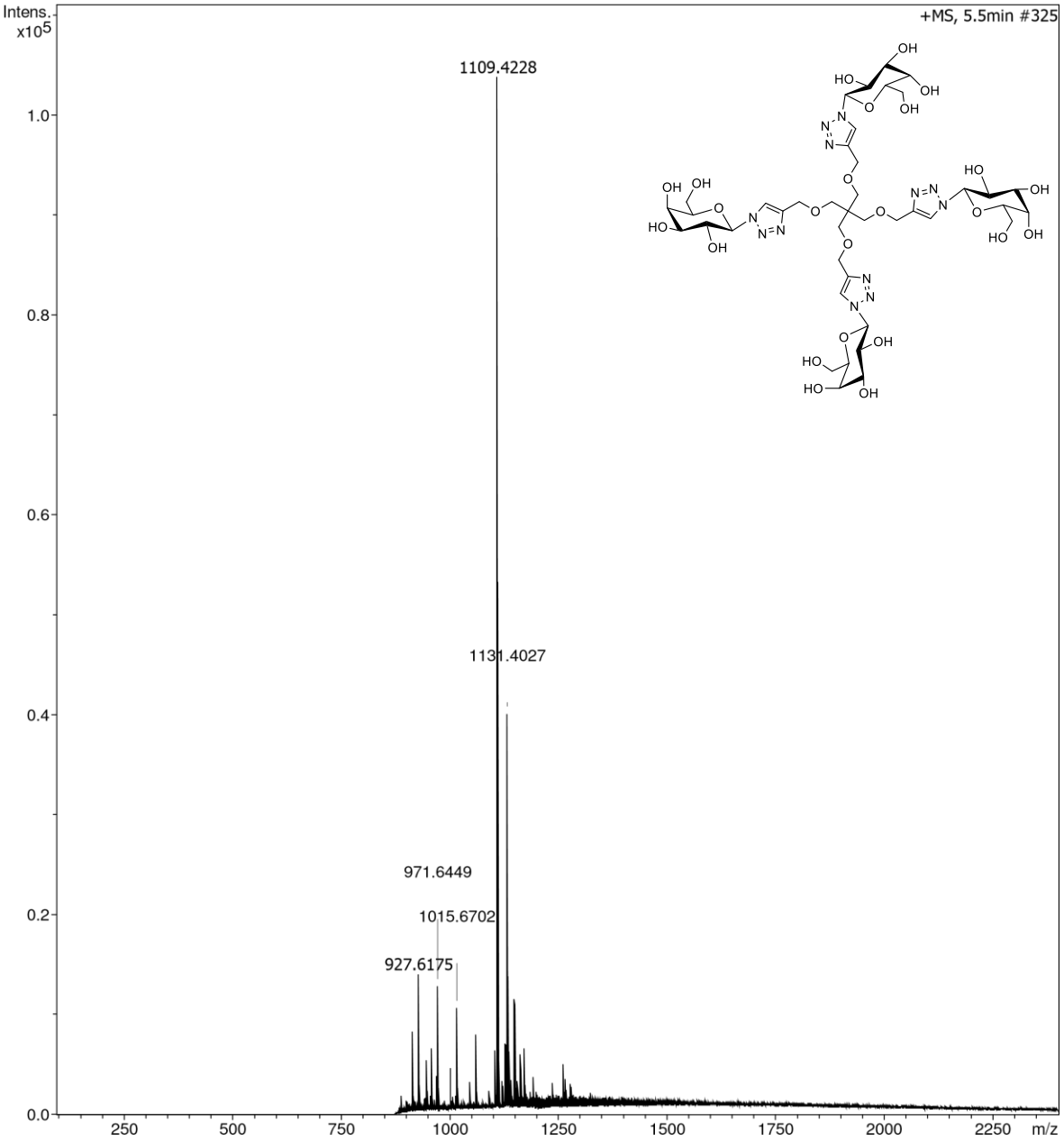
***Glycocluster* 5**



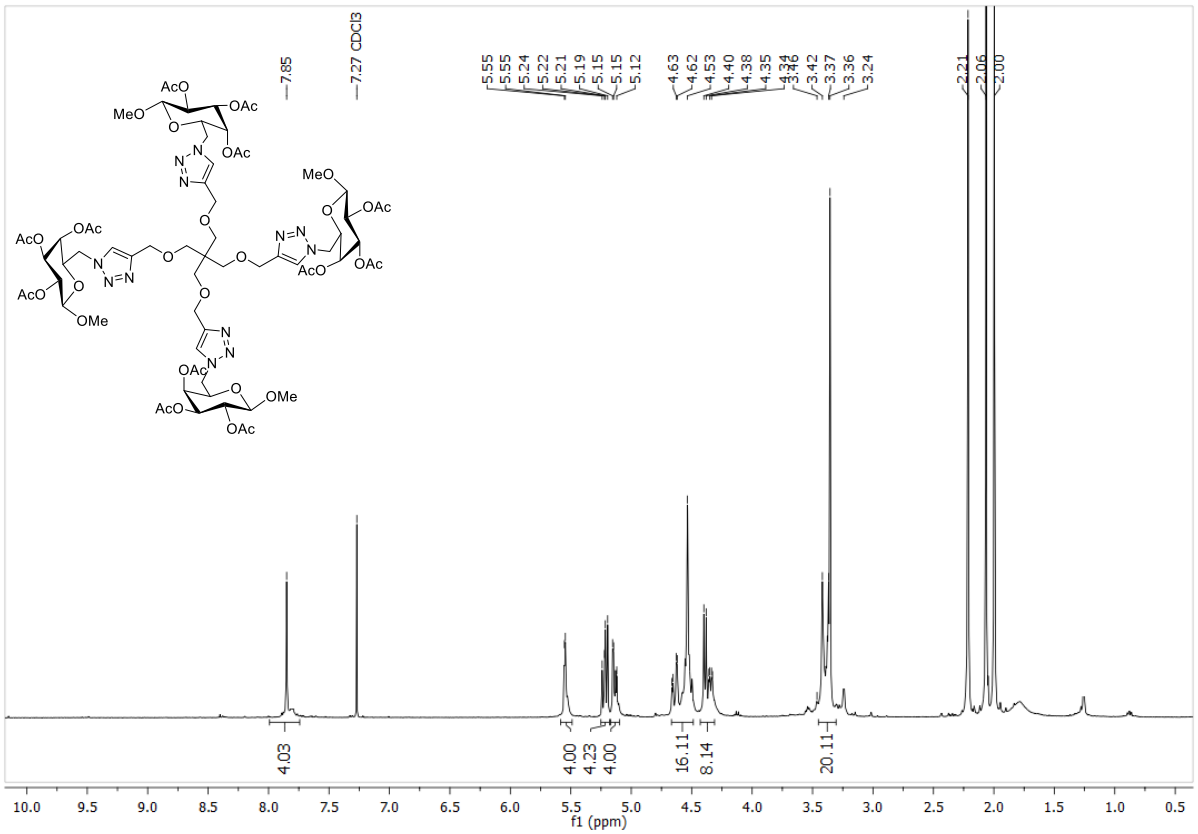
RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 5**

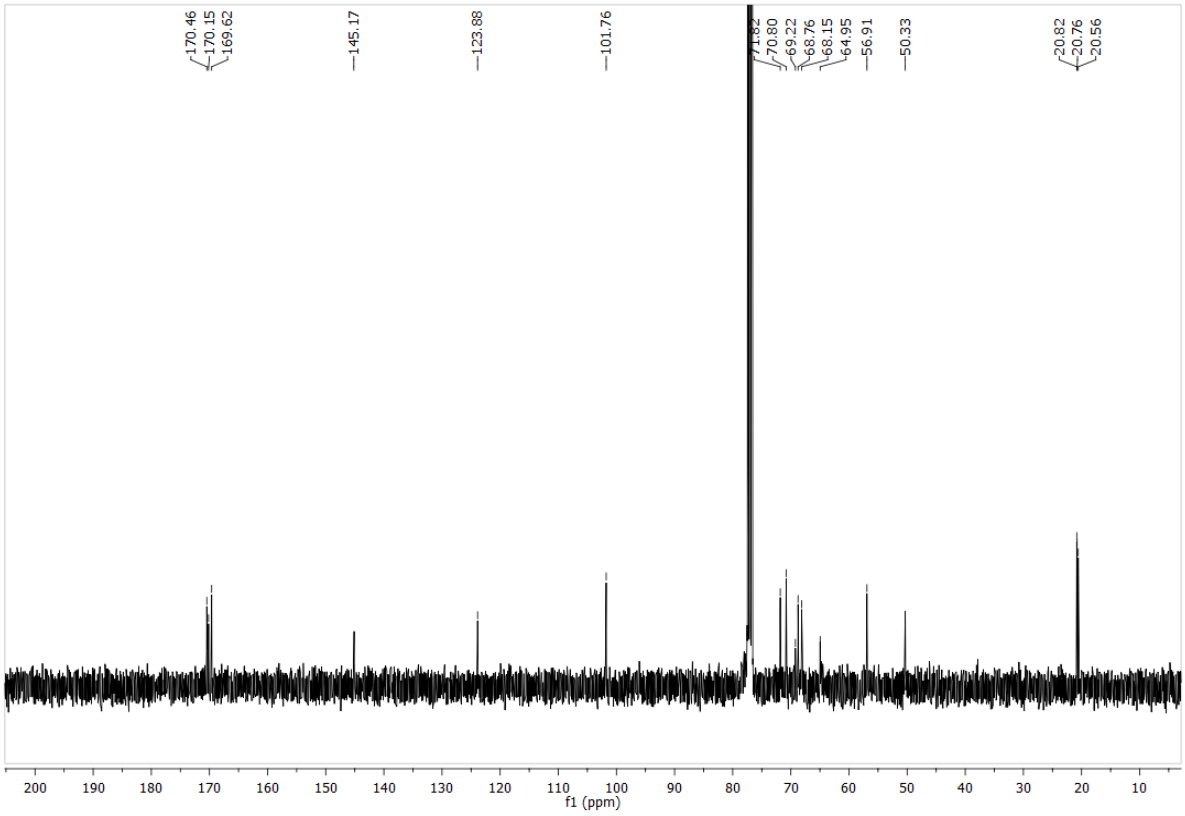
HRMS m/z calcd. para $C_{41}H_{65}N_{12}O_{24}^{+}$ 1109,4229, encontrada 1109,4228 [M+H^{+}].



***Glycocluster* 80**

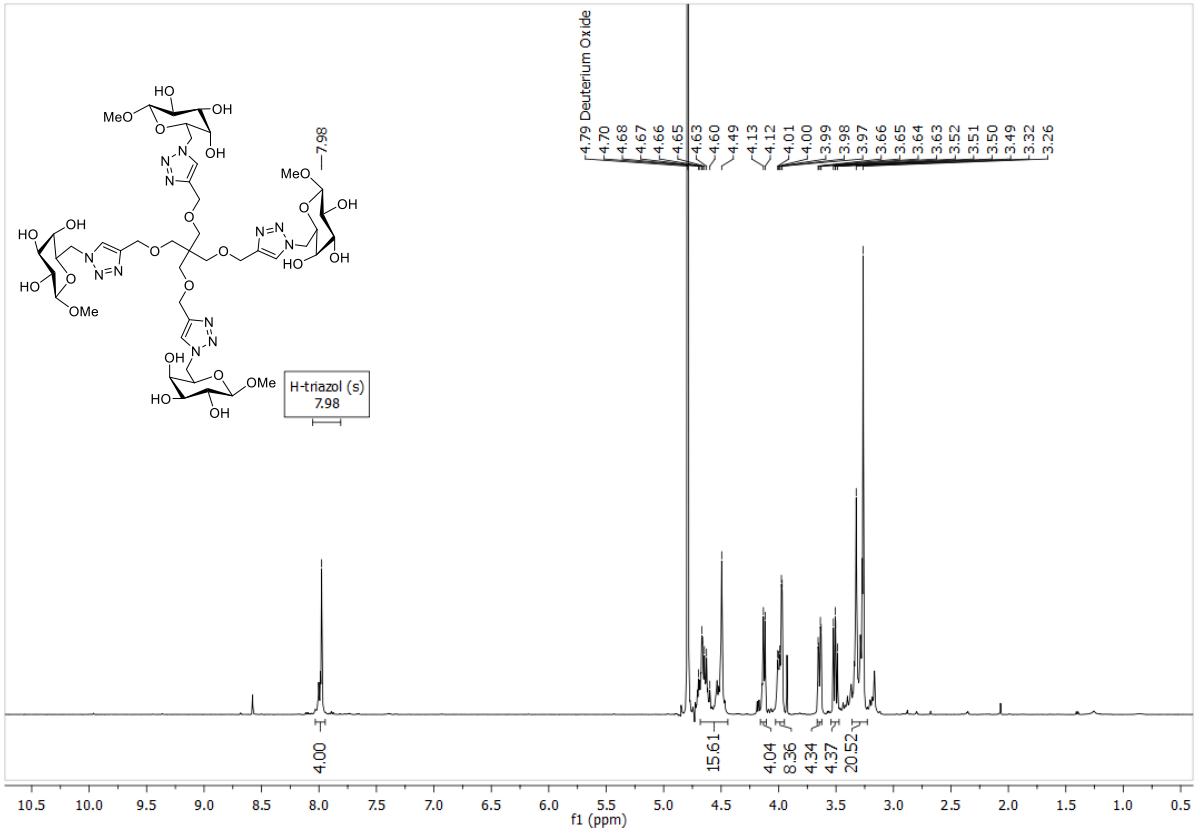


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

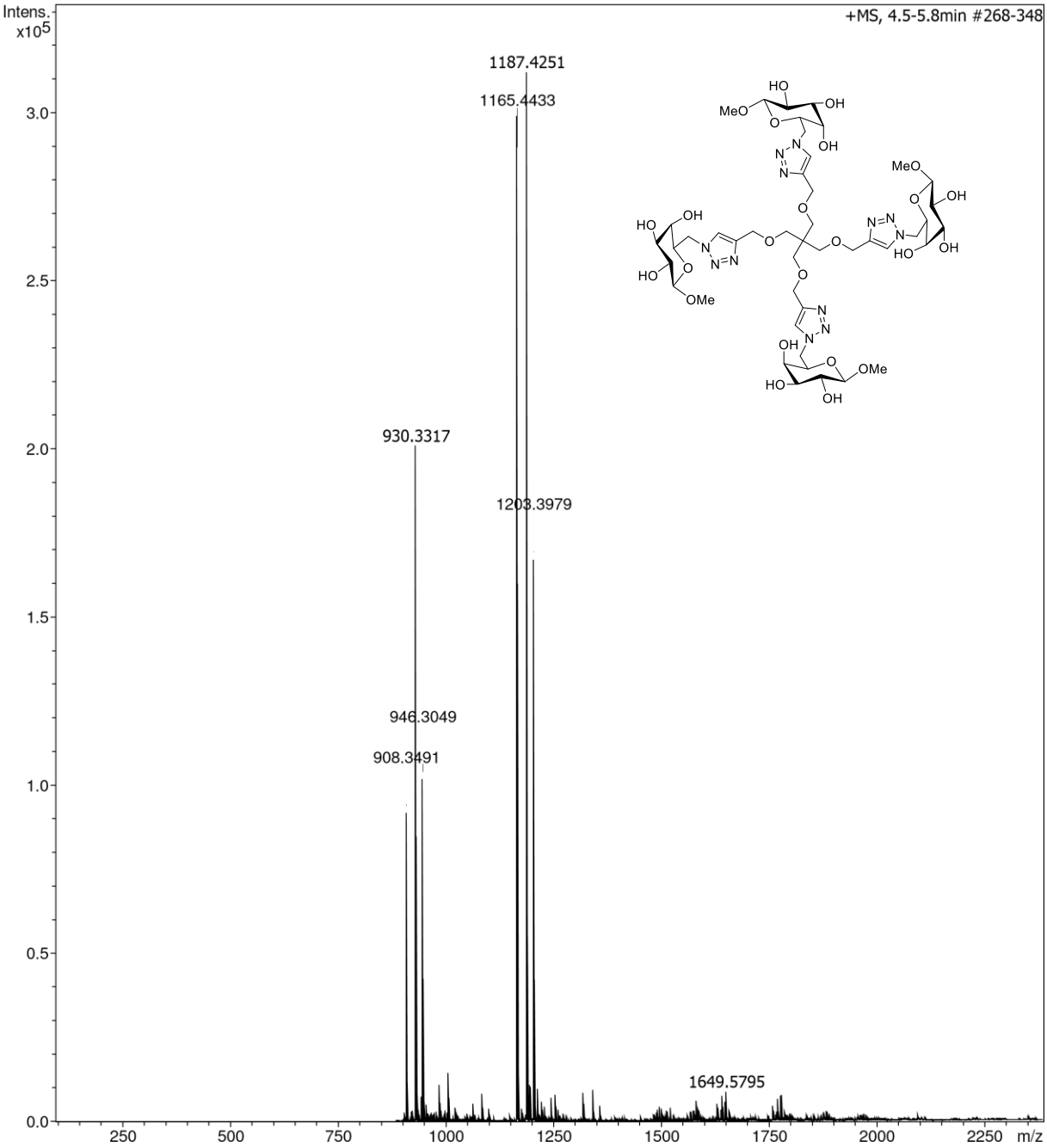
***Glycocluster* 6**



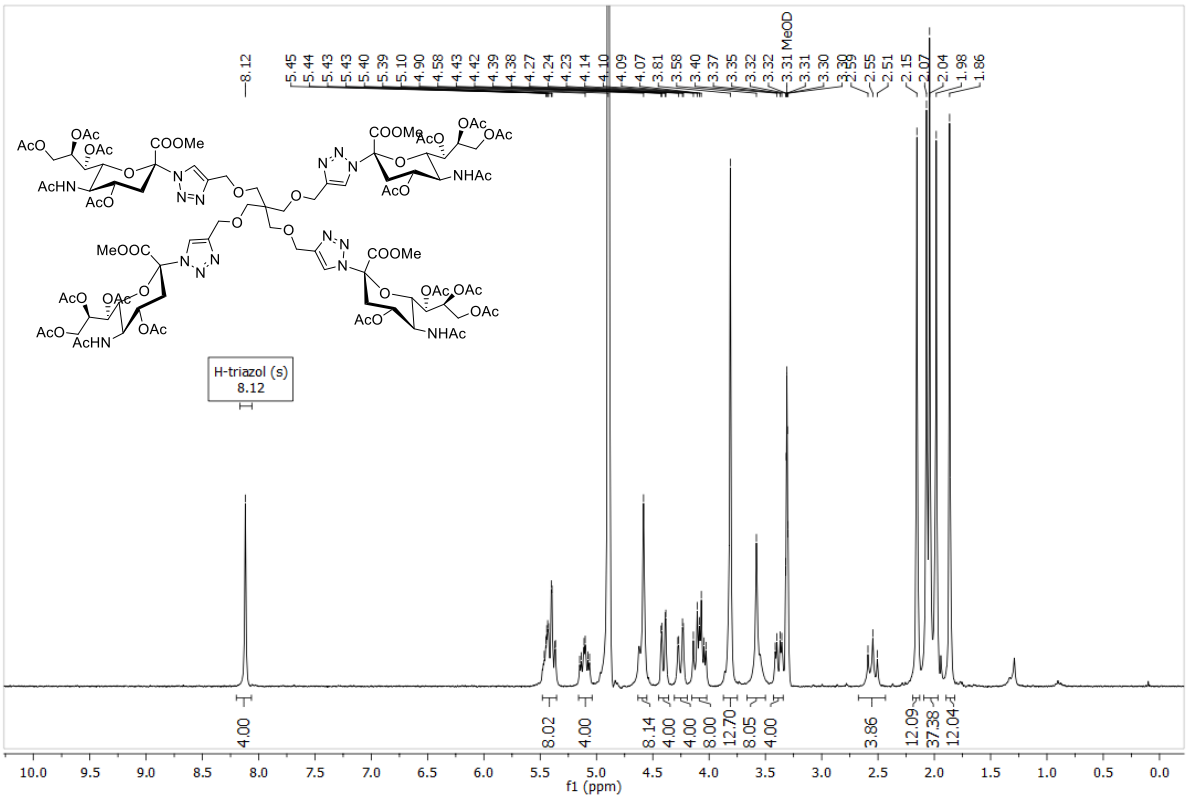
RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 6**

HRMS m/z calcd. para $C_{45}H_{73}N_{12}O_{24}^{+}$ 1165,4855, encontrada 1165,4433 [M+H^{+}].

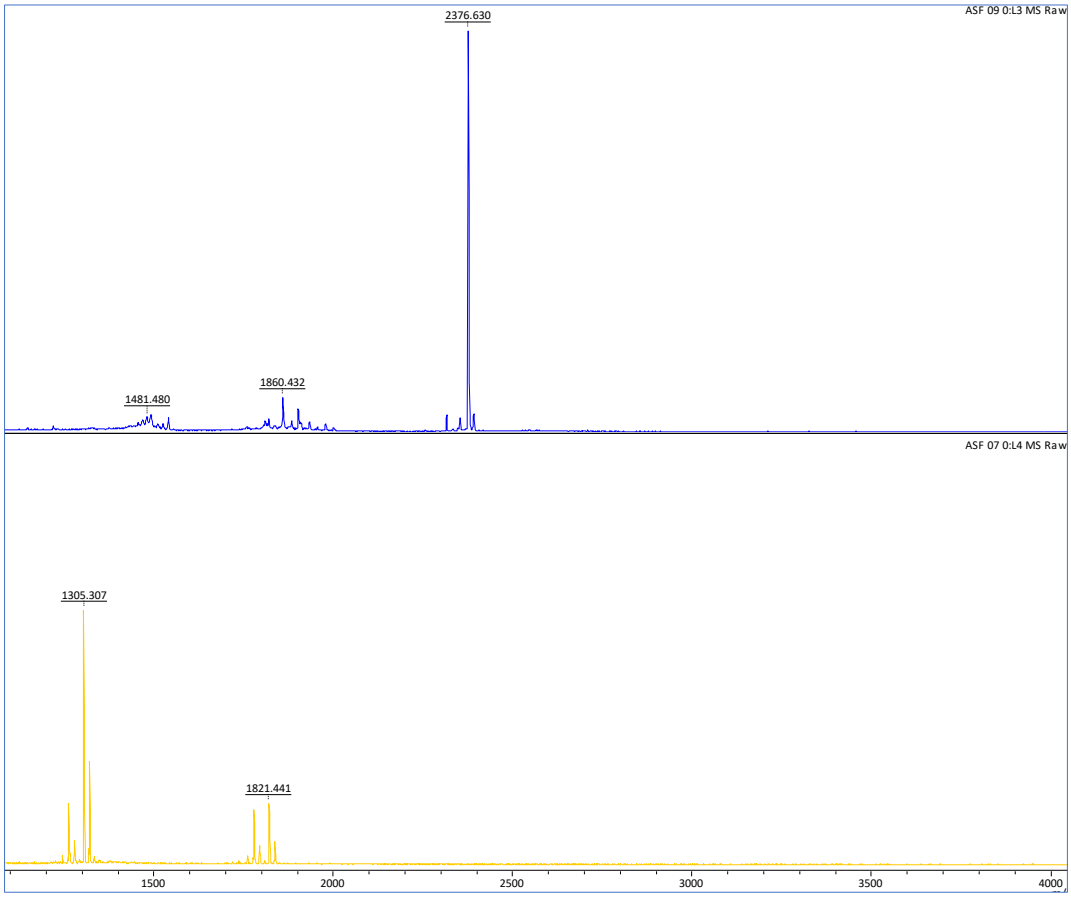


Glycocluster protegido de ácido siálico 84

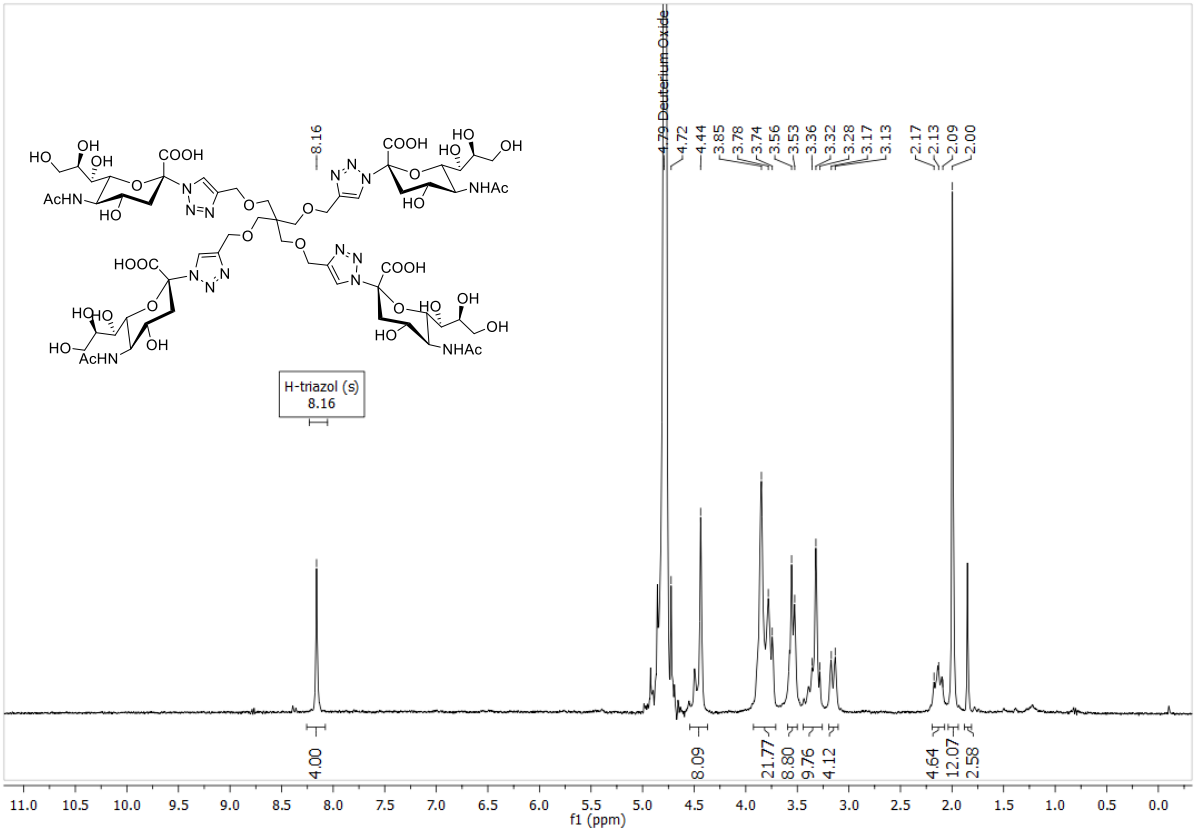


RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOD)

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{97}H_{132}NaN_{16}O_{52}$ 2375,8060, encontrada 2376.630 [M +Na^{+}].

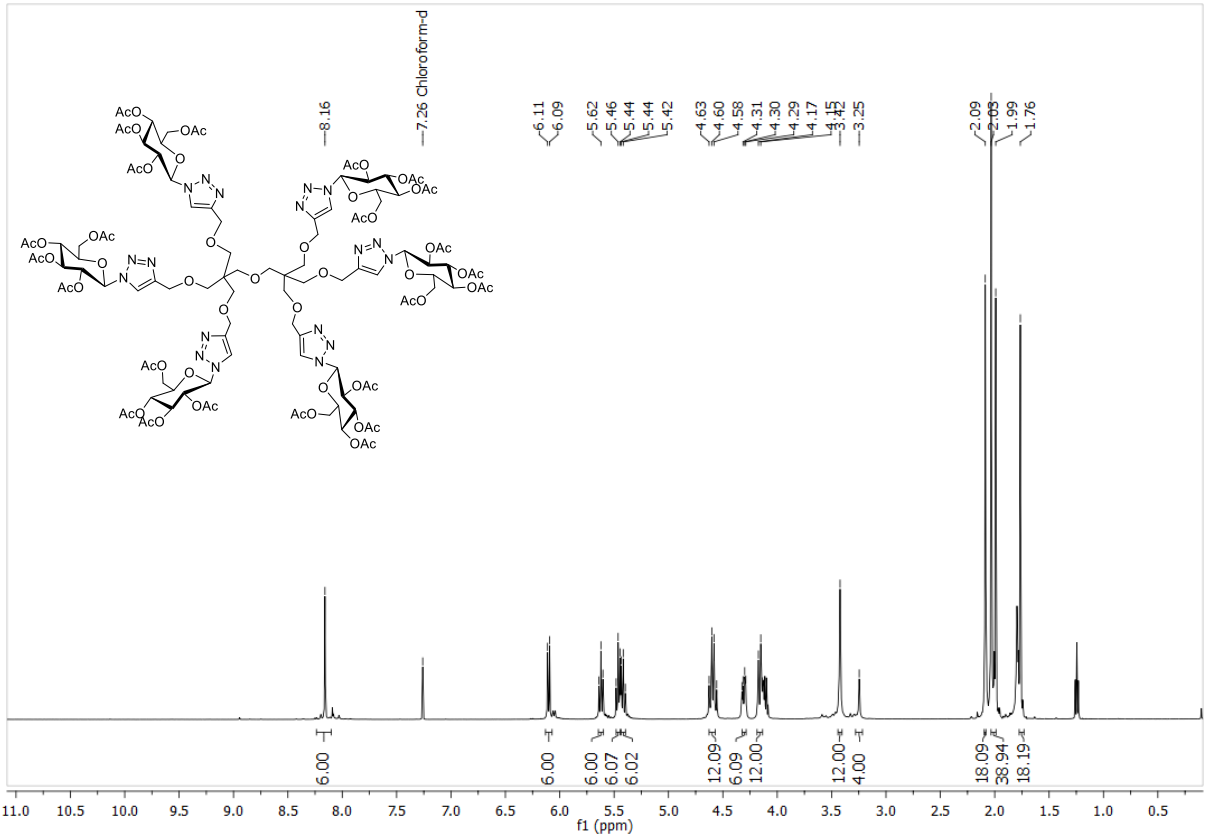


***Glycocluster* 7**

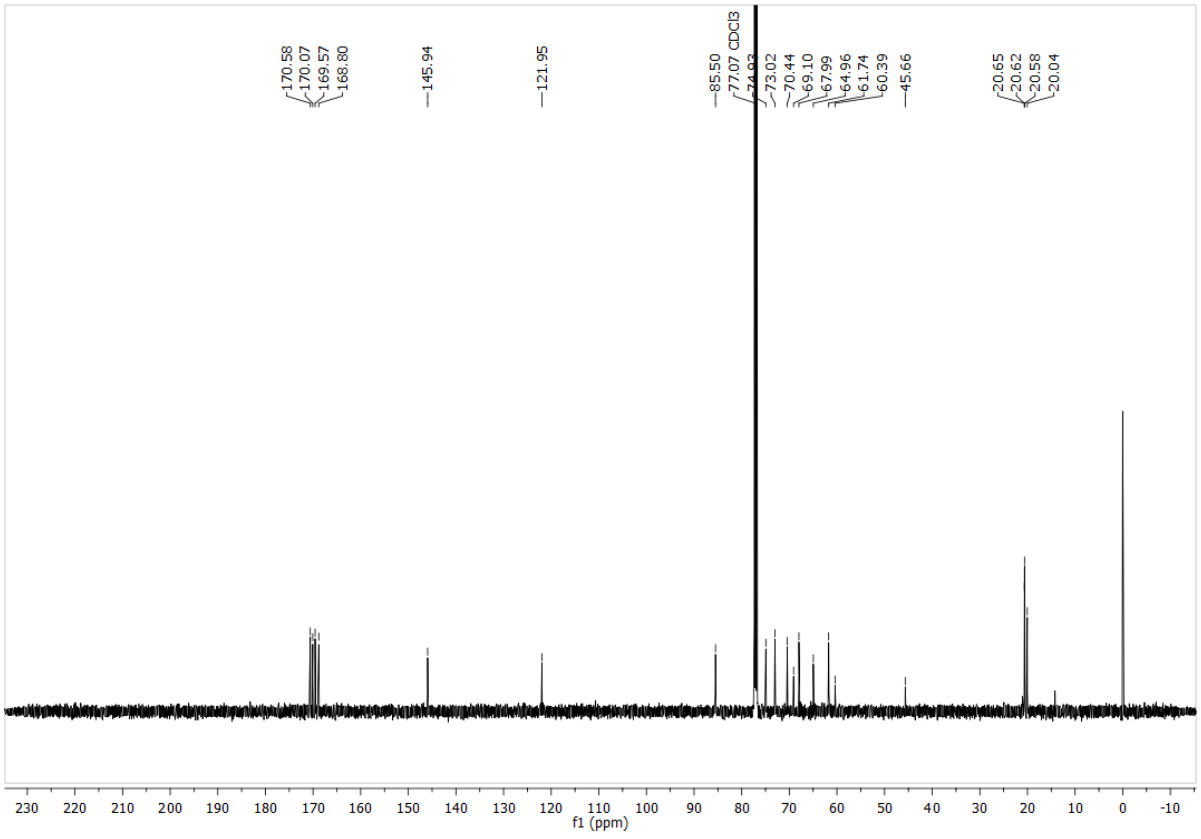


RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 59**

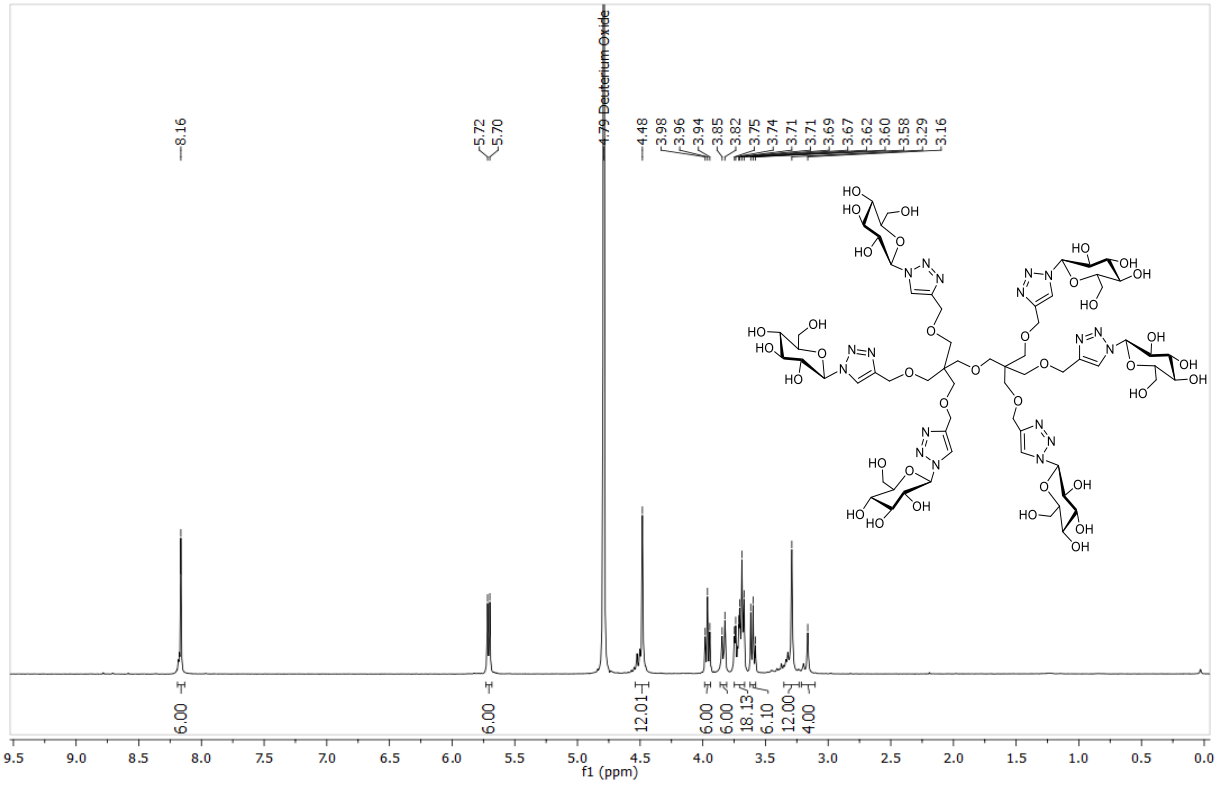


RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



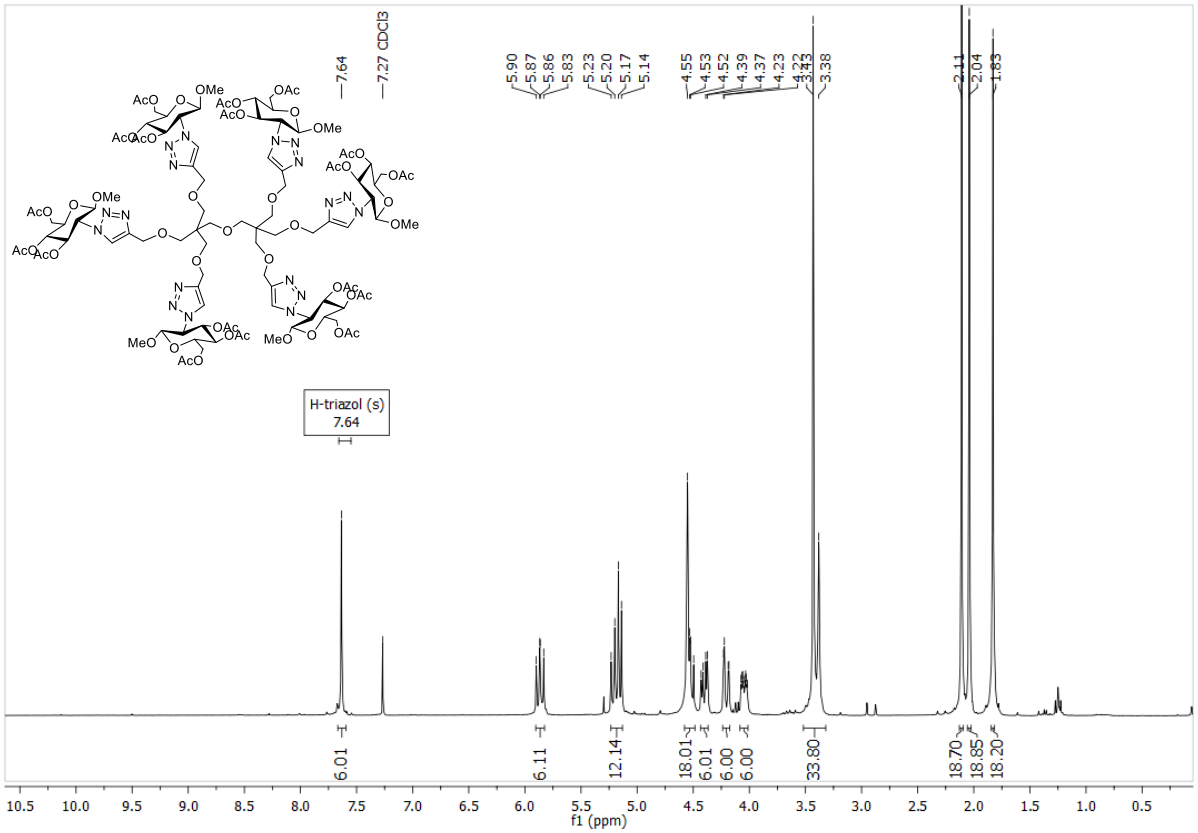
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 9**



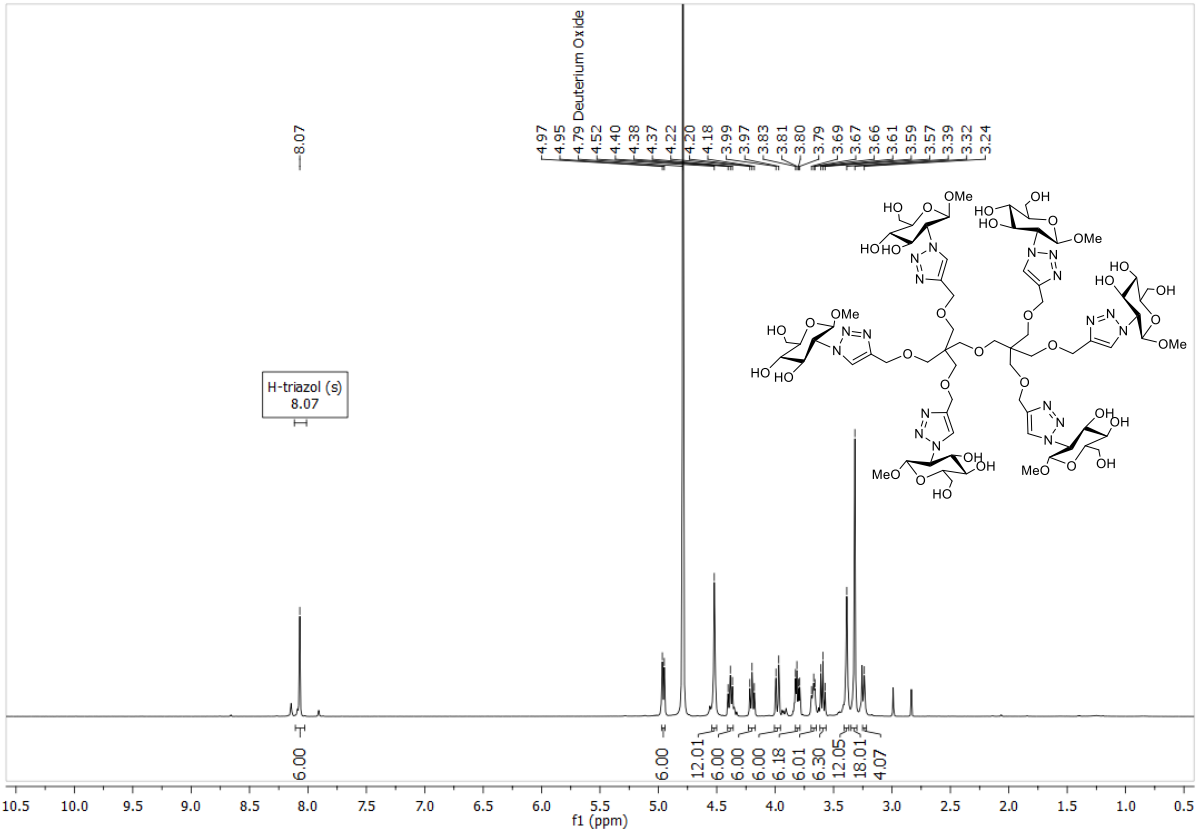
RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 60**



RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

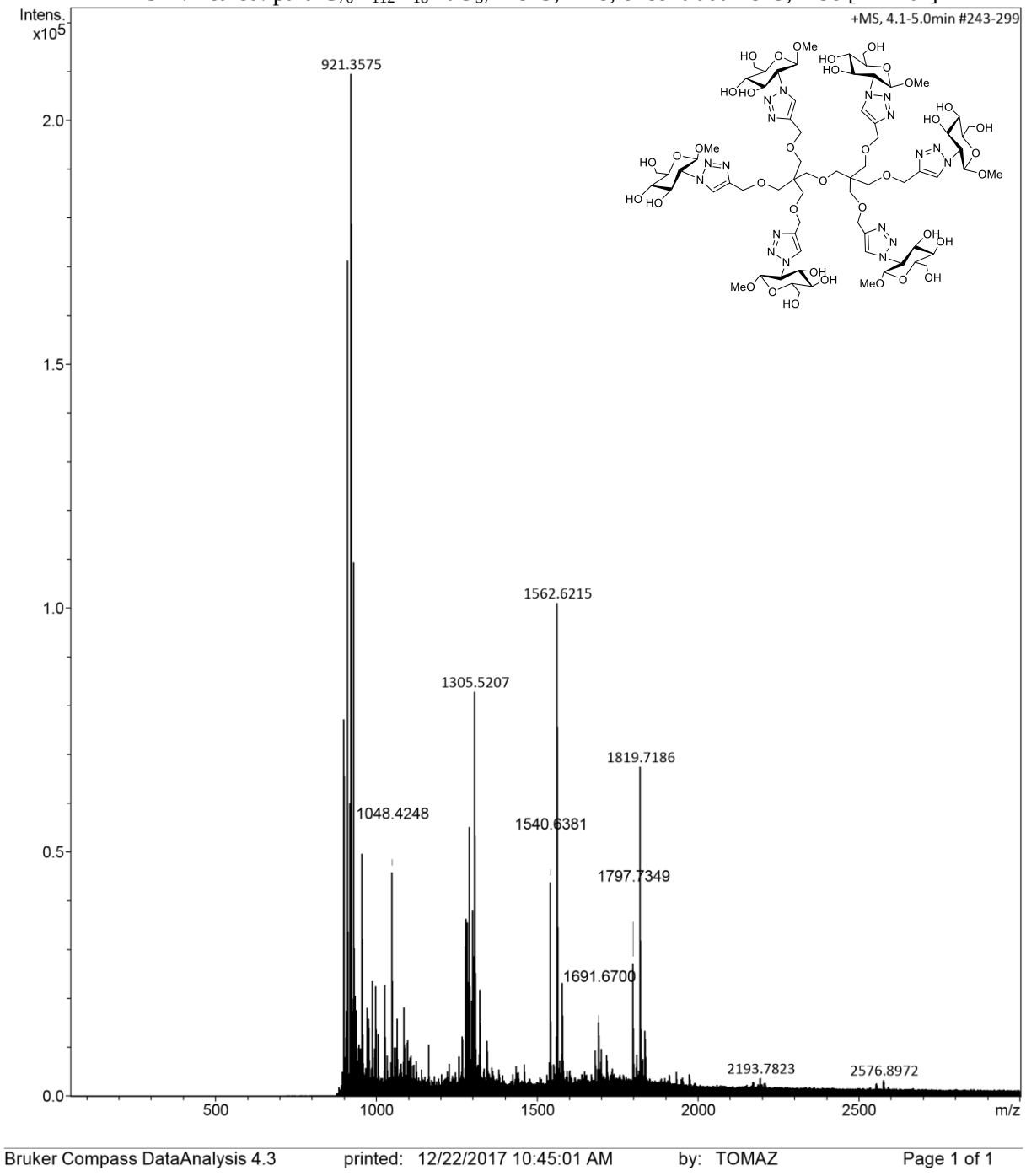
***Glycocluster* 10**



RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

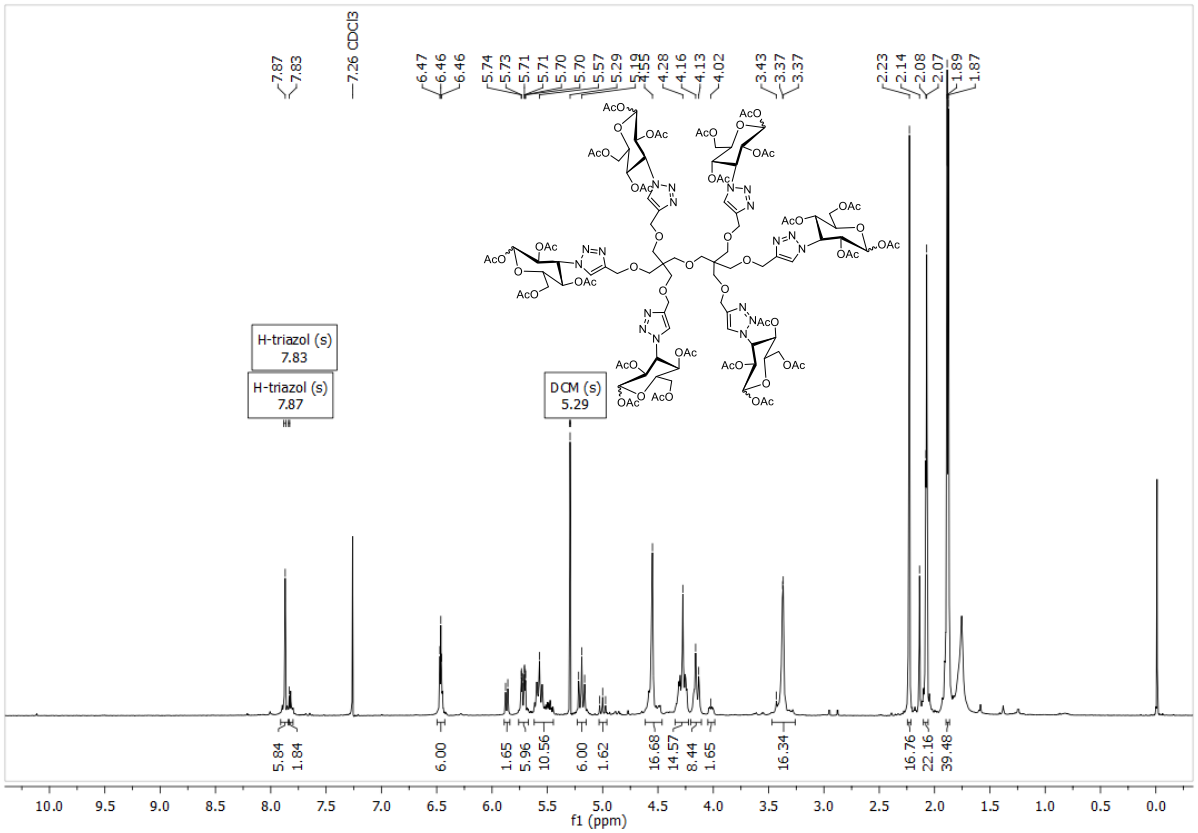
***Glycocluster* 10**

HRMS m/z calcd. para $C_{70}H_{112}N_{18}NaO_{37}^{+}$ 1819,7128, encontrada 1819,7186 [M+Na^{+}]



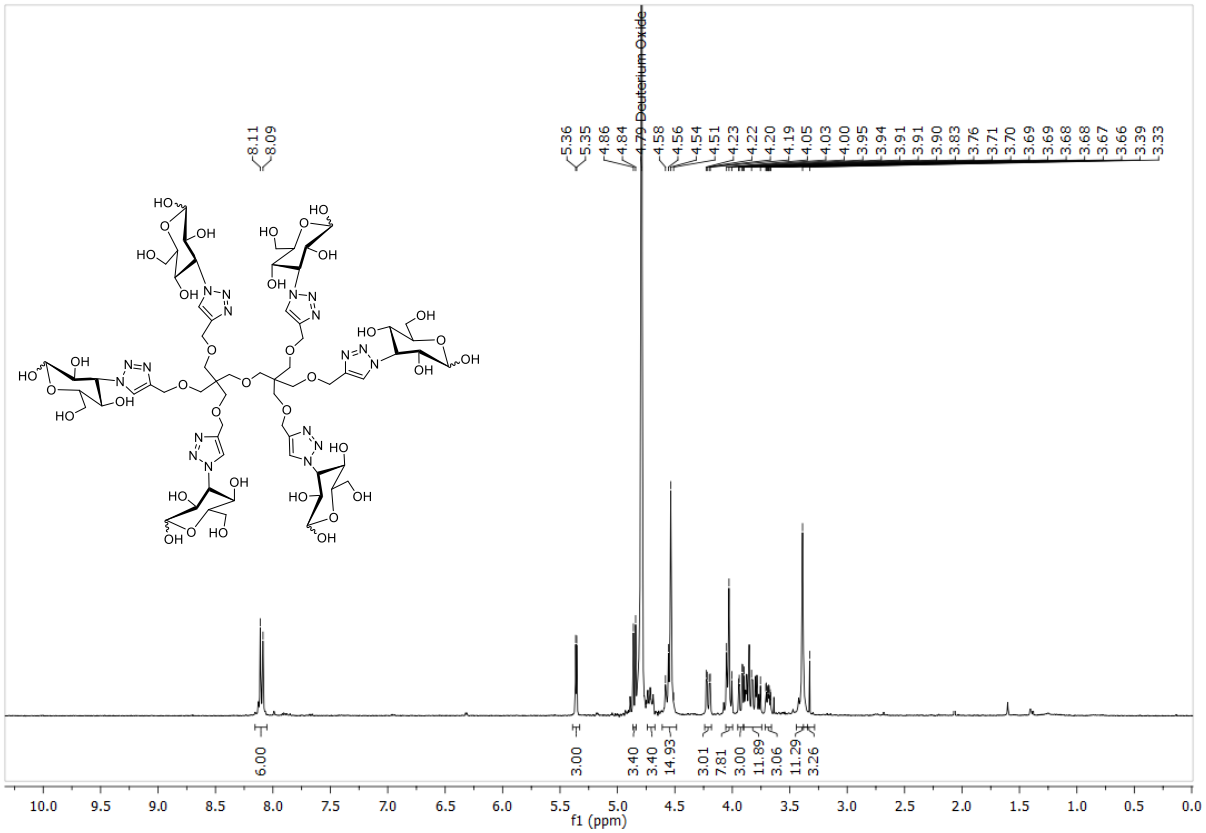
Bruker Compass DataAnalysis 4.3 printed: 12/22/2017 10:45:01 AM by: TOMAZ Page 1 of 1

***Glycocluster* 61**



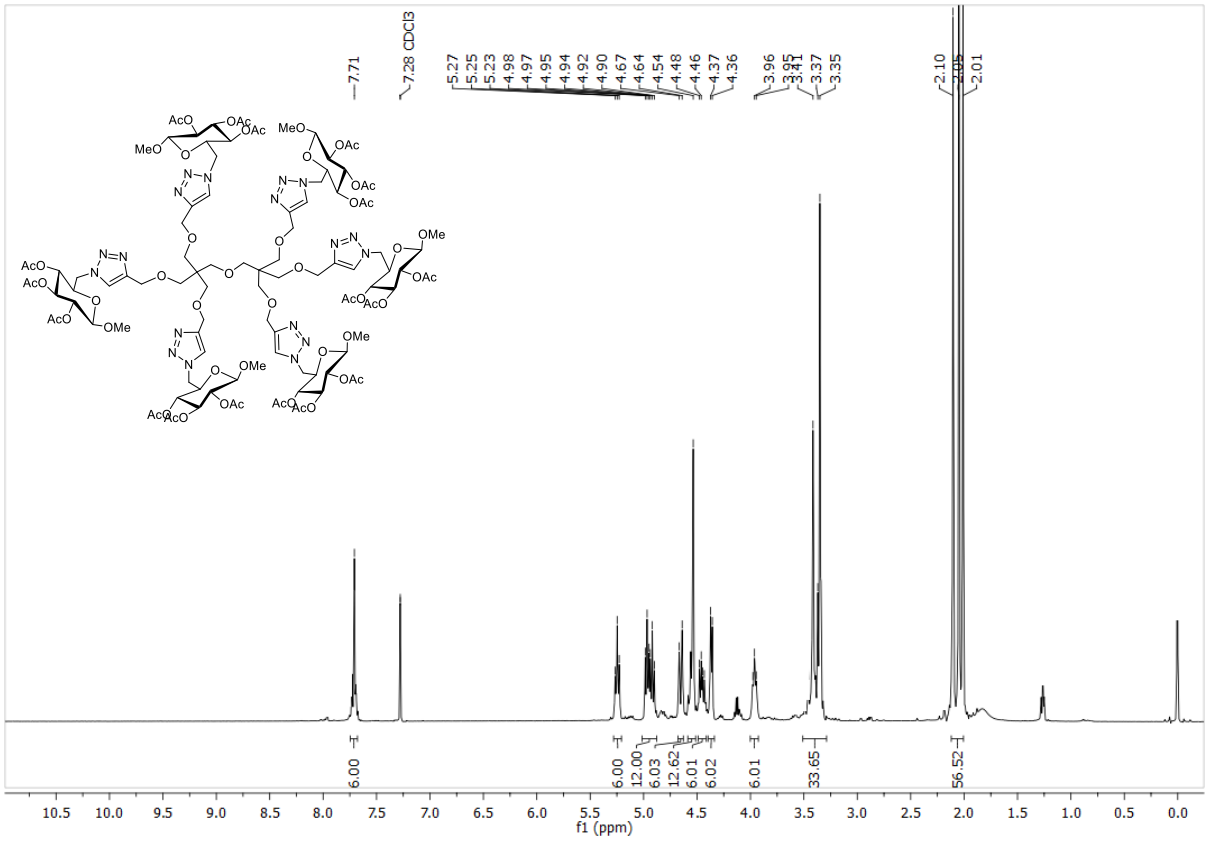
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 11**

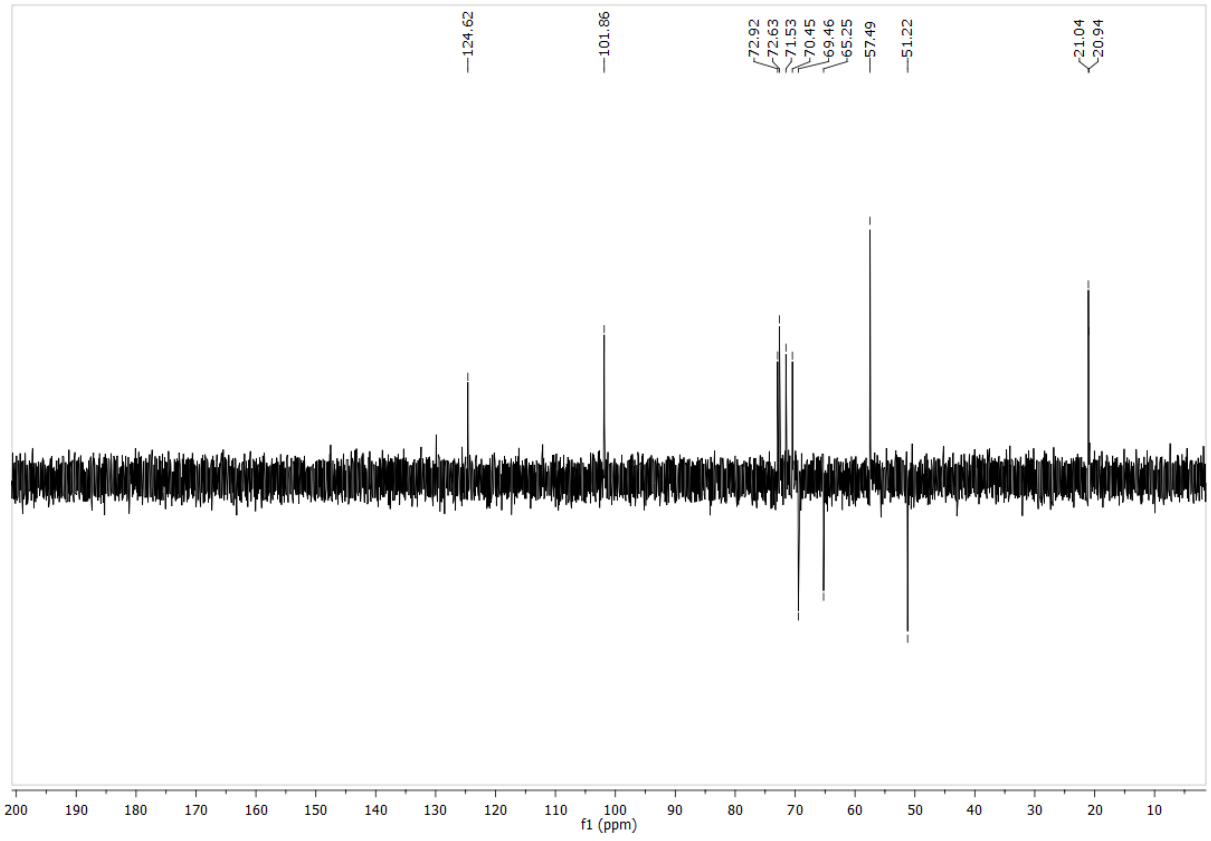


RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 62**

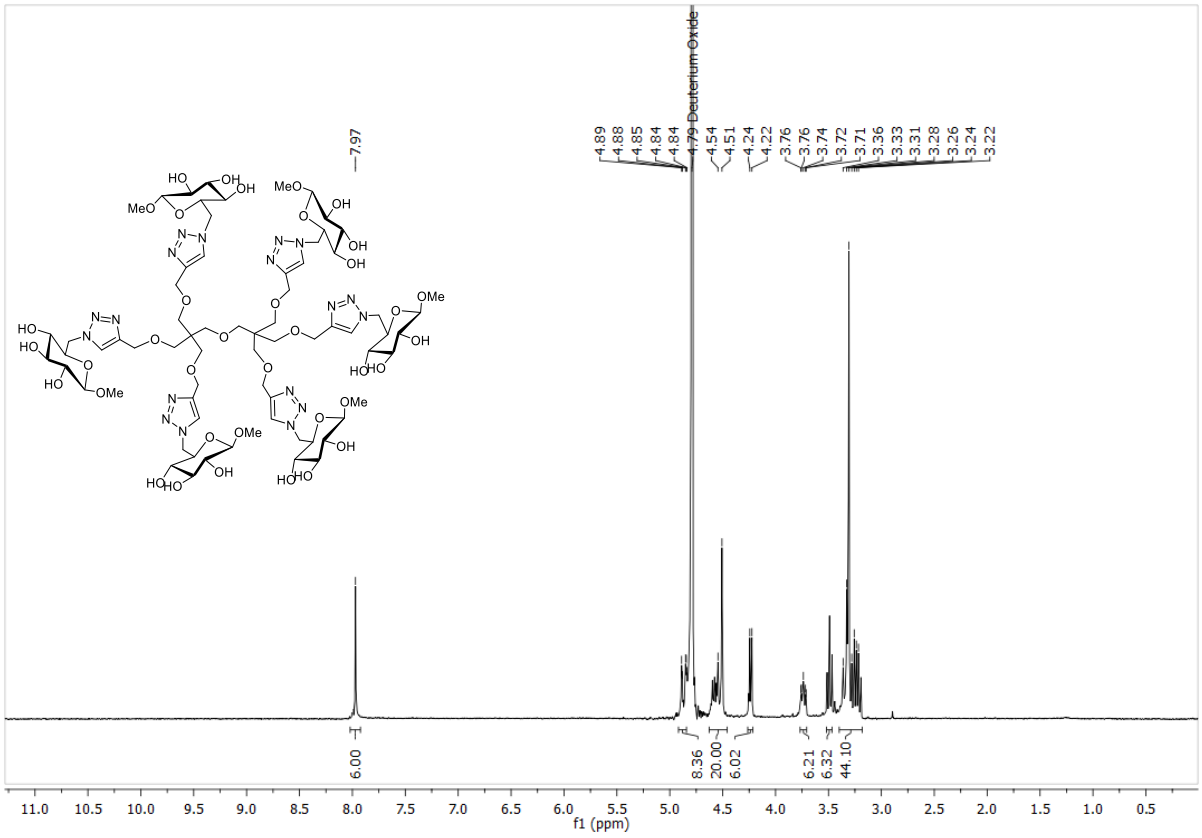


RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



RMN de ^{13}C – DEPT 135

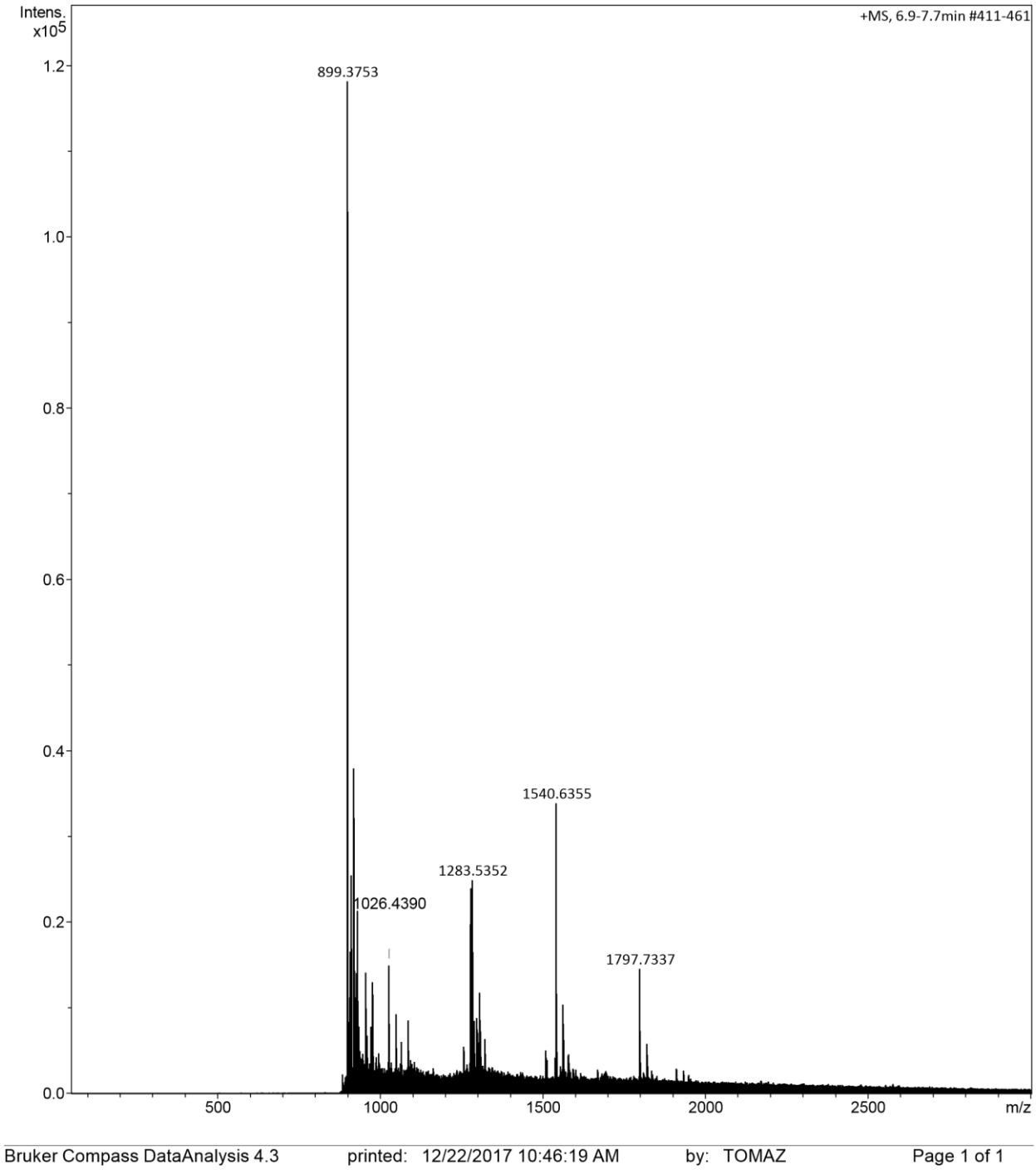
***Glycocluster* 12**



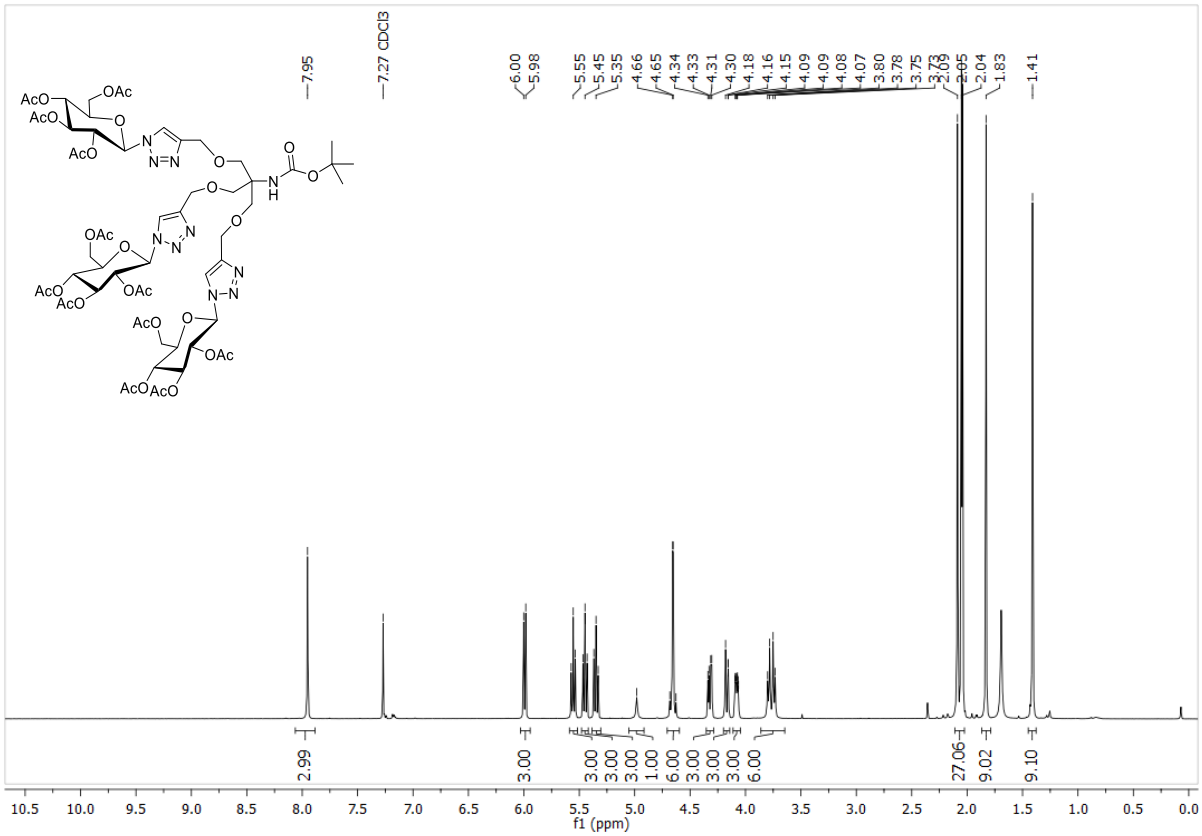
RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O)

***Glycocluster* 12**

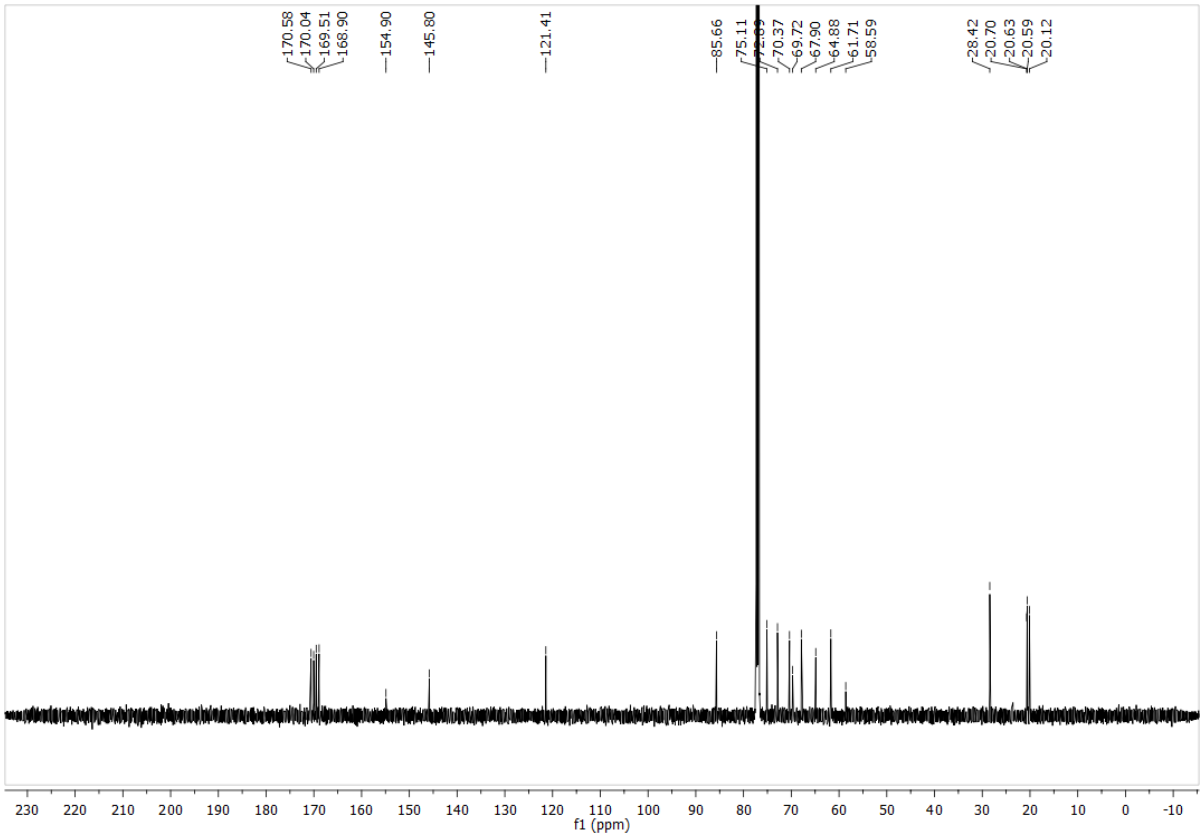
HRMS m/z calcd. para $C_{70}H_{113}N_{18}O_{37}^{+}$ 1797,7369, encontrada 1797,7337 [M+H^{+}].



***Glycocluster* 70**



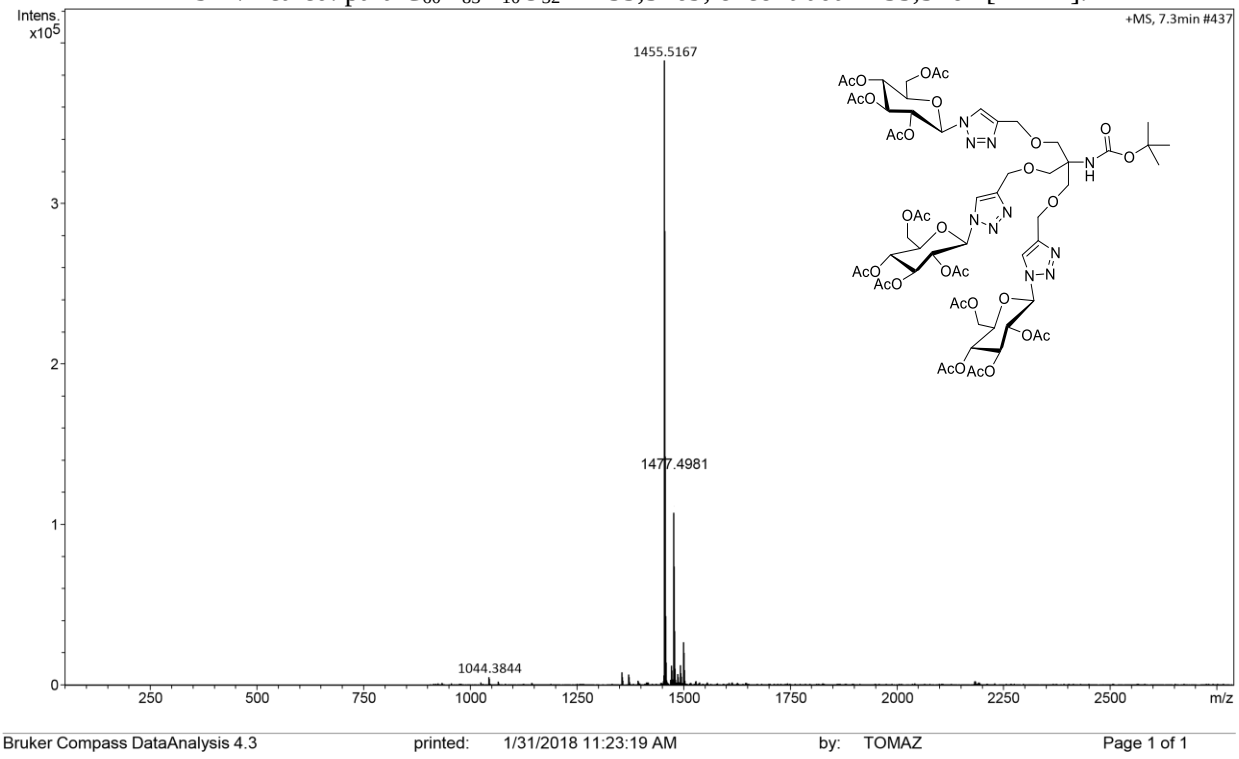
RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$)



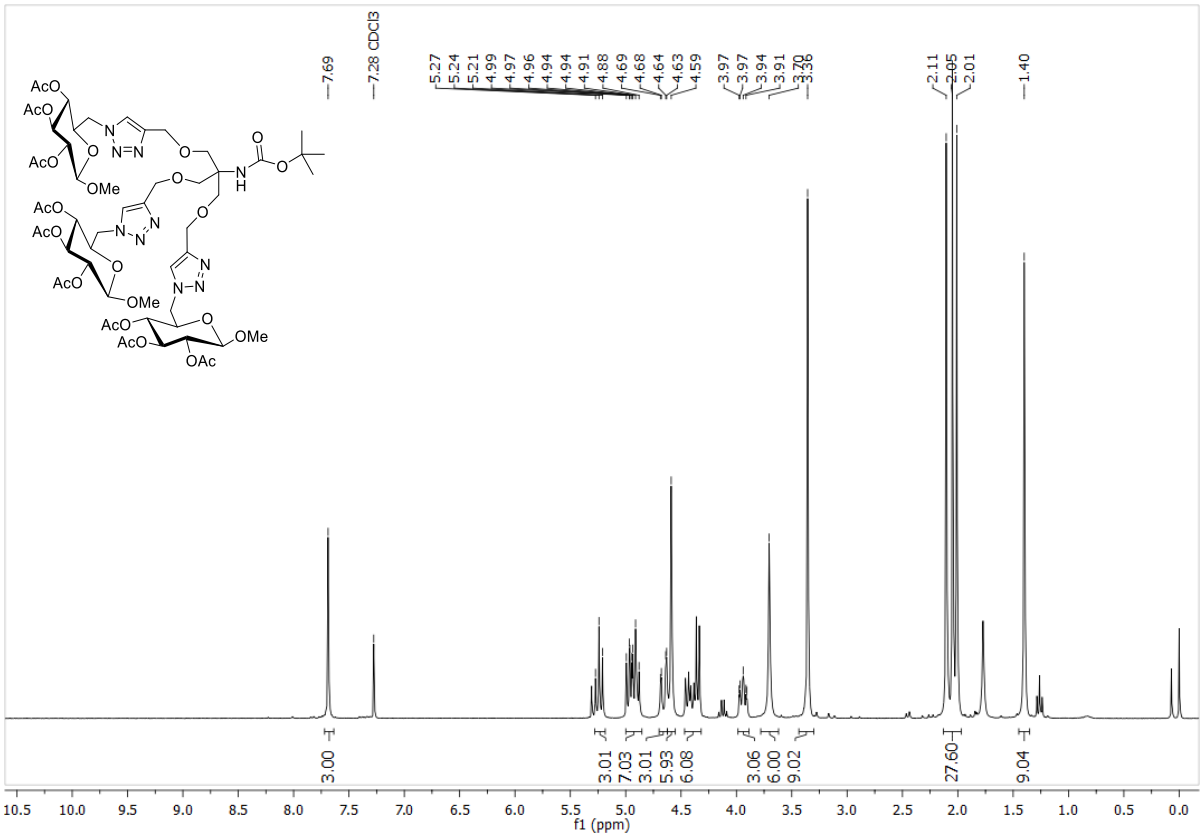
RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 70**

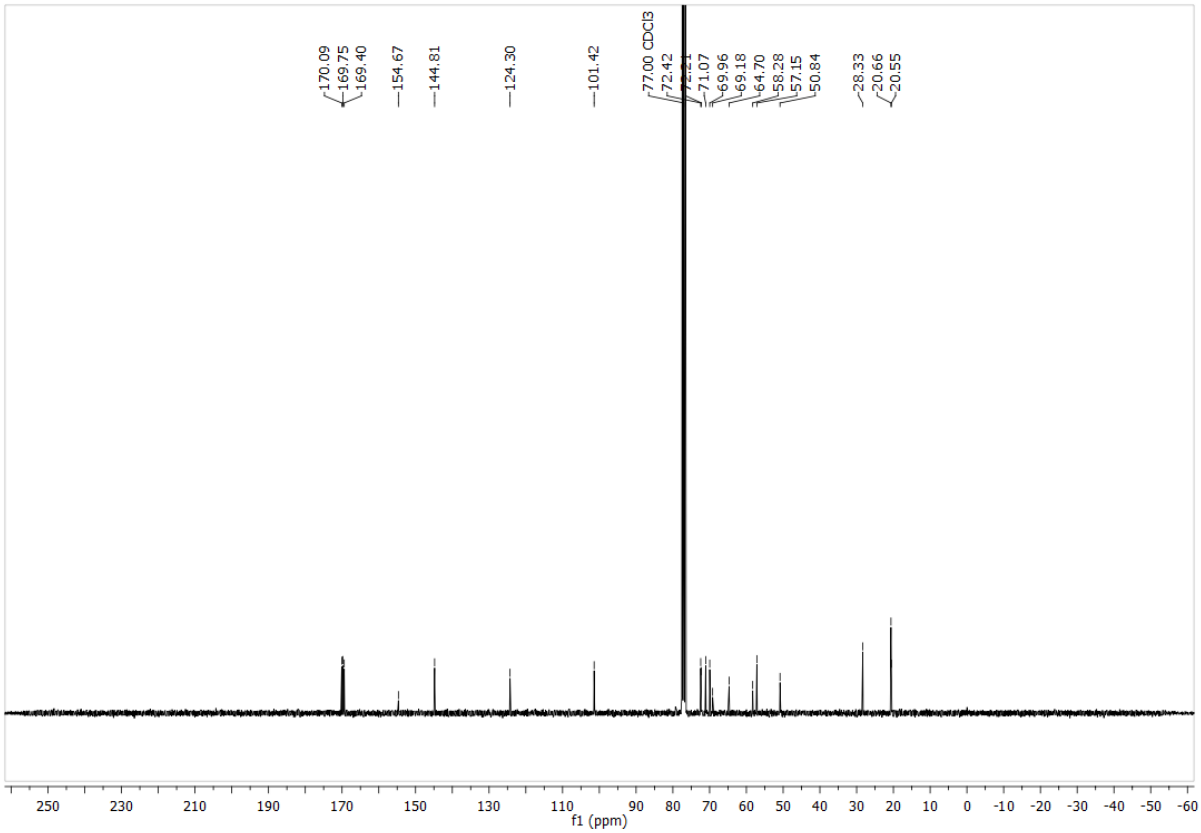
HRMS m/z calcd. para $C_{60}H_{83}N_{10}O_{32}^{+}$ 1455,5169, encontrada 1455,5167 [M+H^{+}].



***Glycocluster* 74**



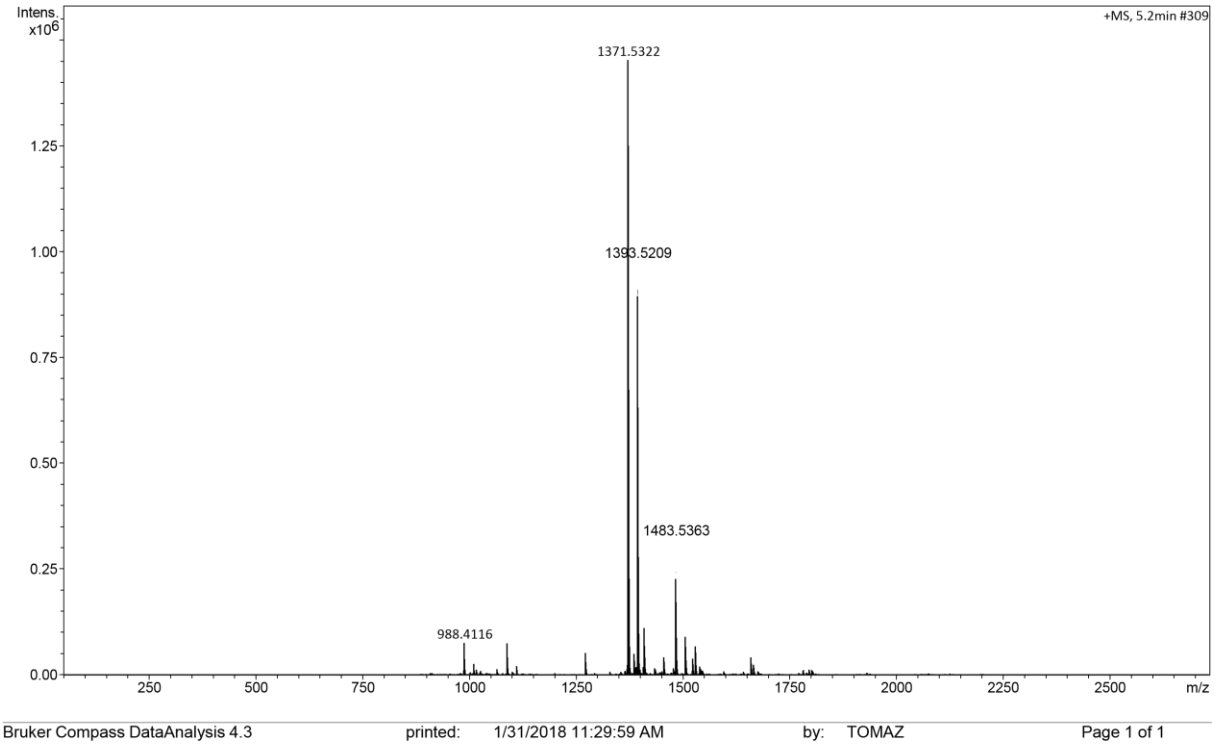
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)



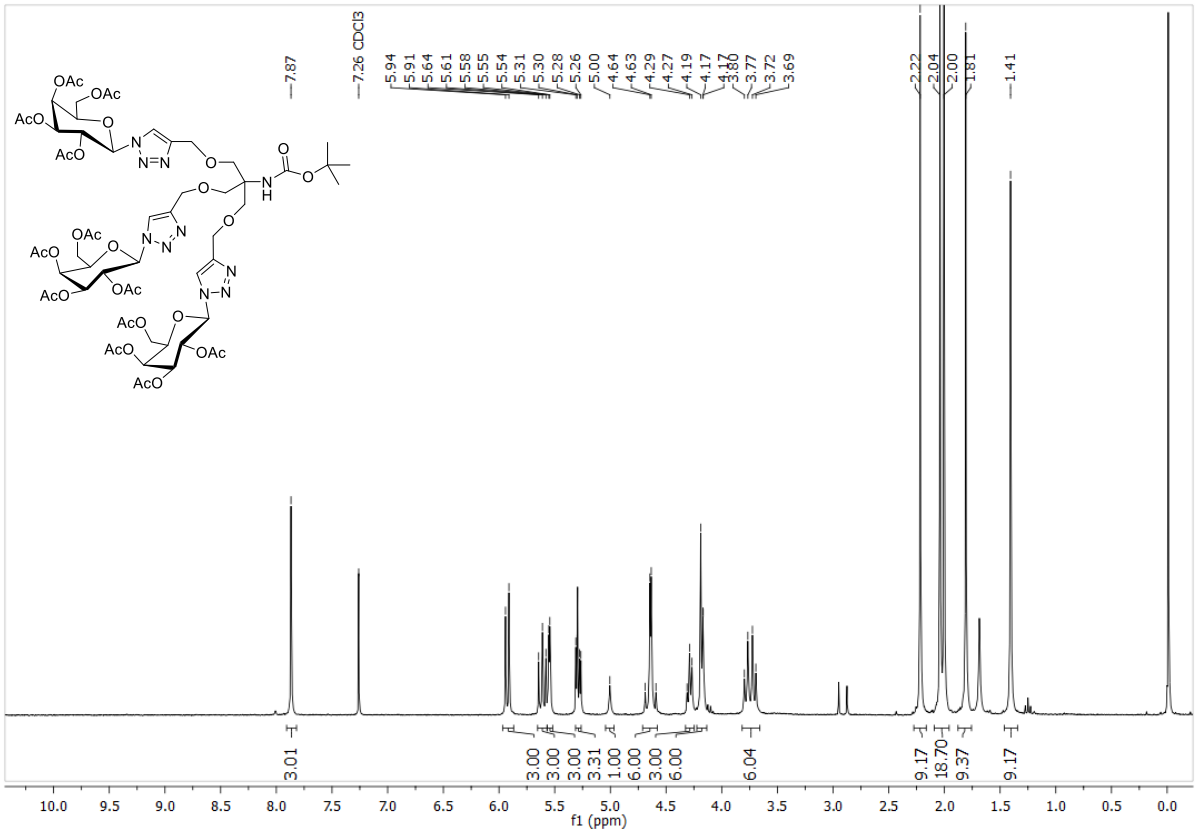
RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 74**

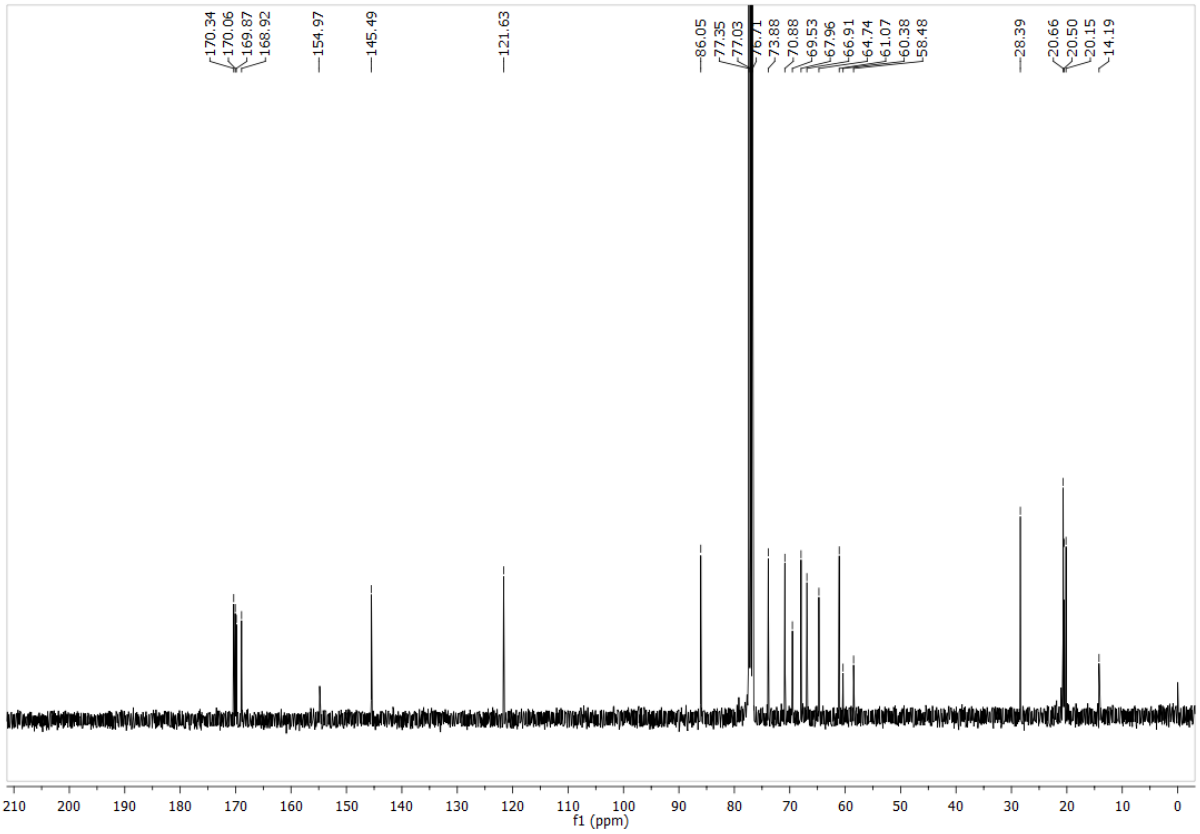
HRMS m/z calcd. para $C_{57}H_{83}N_{10}O_{29}^{+}$ 1371,5322, encontrada 1371,5322 [M+H^{+}].



***Glycocluster* 86**

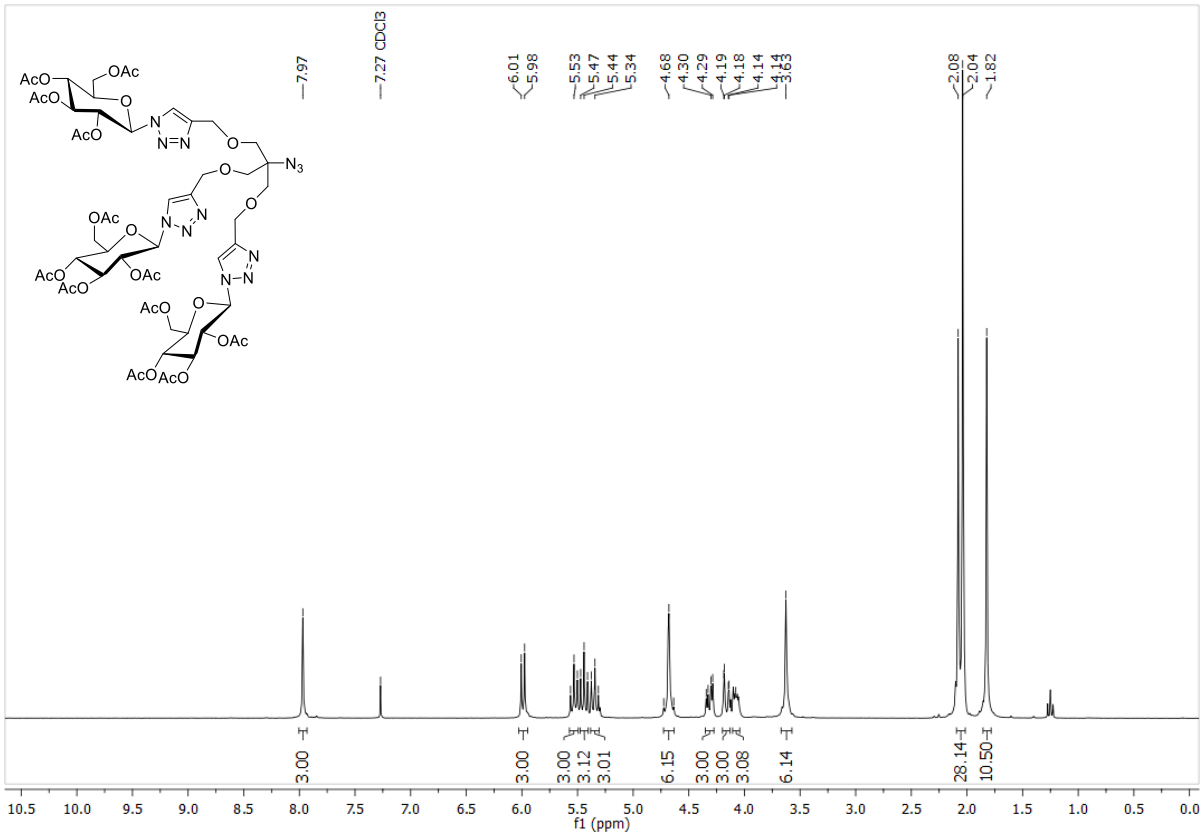


RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)



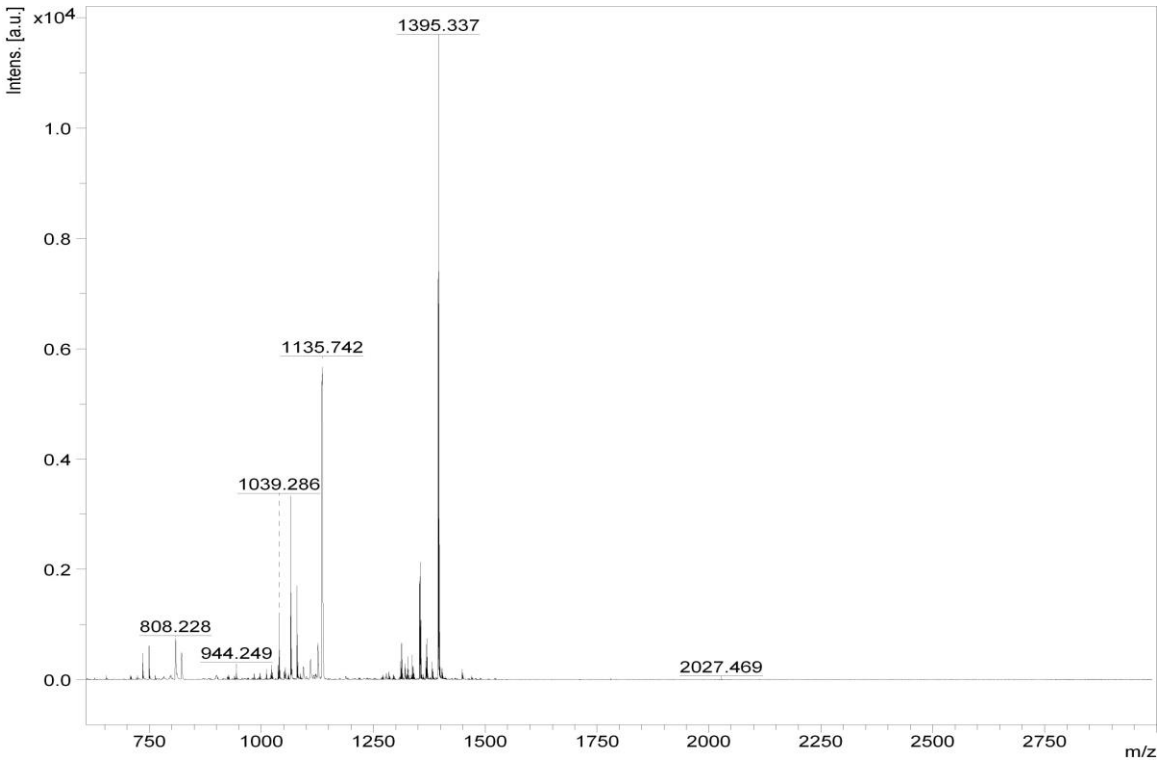
RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 67**

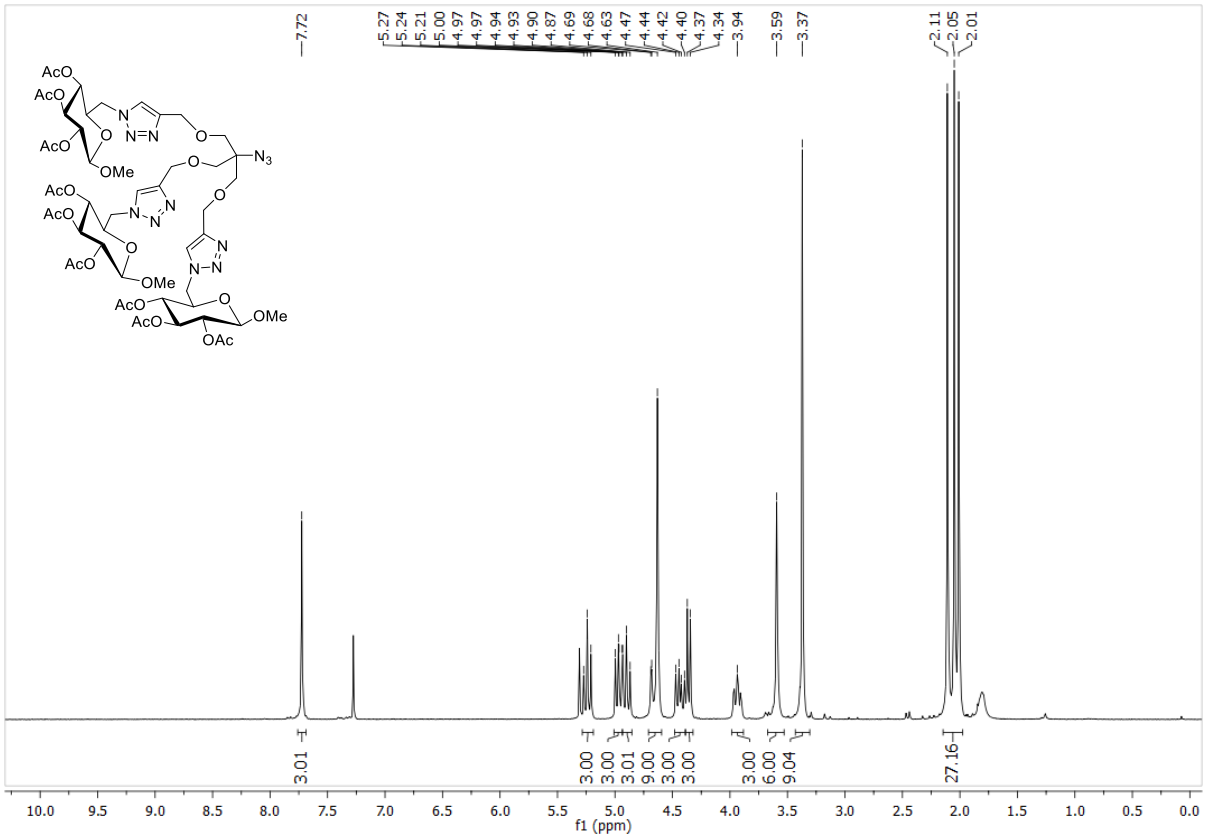


RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{55}H_{73}N_{12}O_{30}^{+}$ 1381,4550, encontrada 1395,337.
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

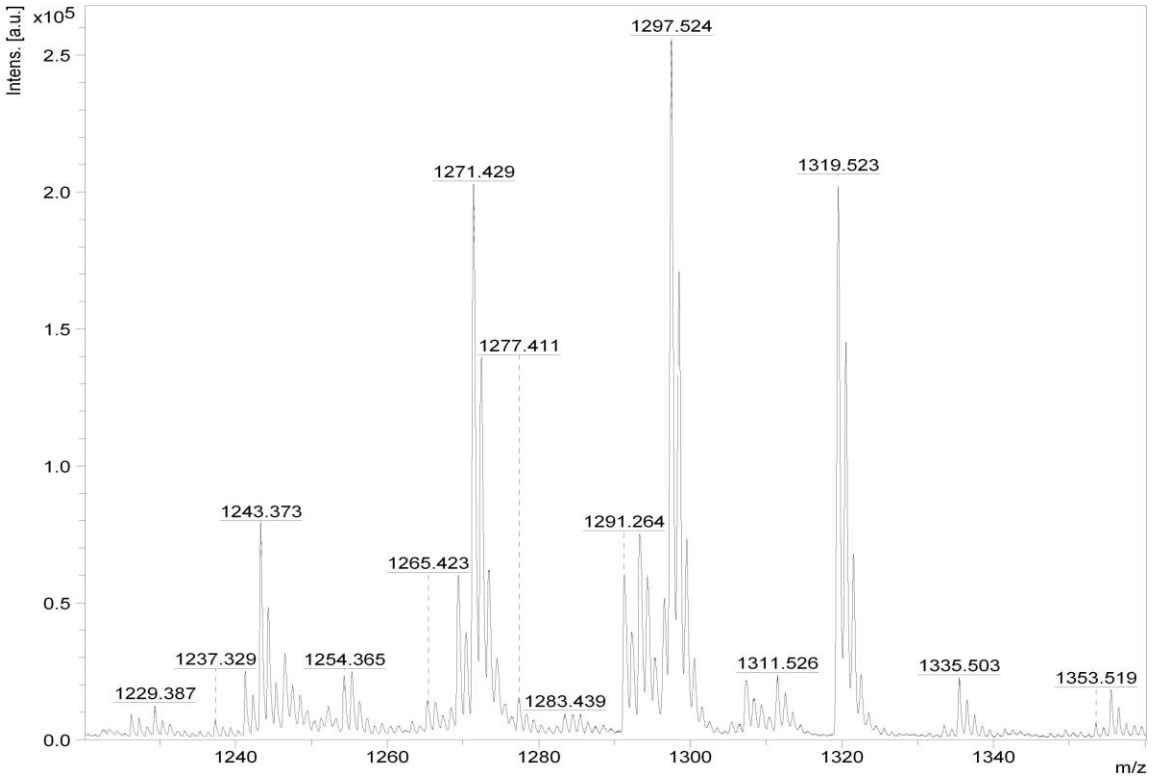


Glycocluster 76

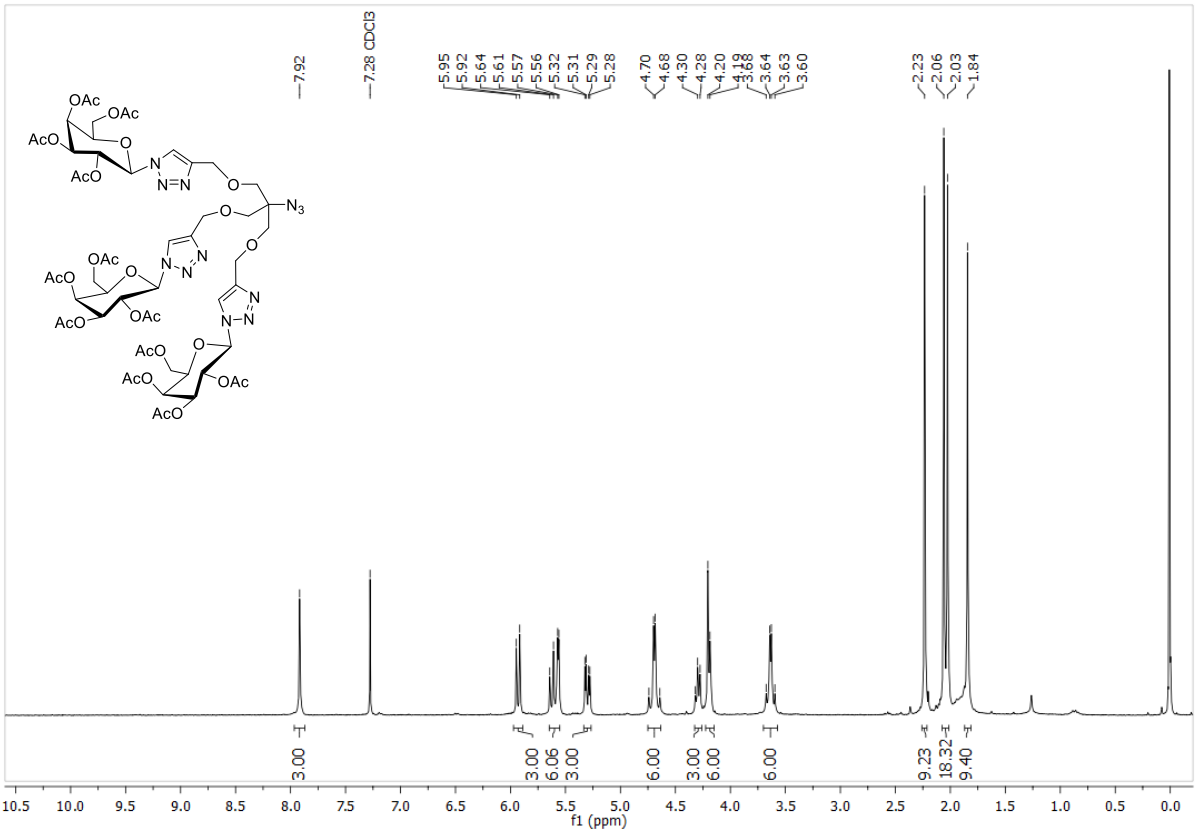


RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{52}H_{73}N_{12}O_{27}^{+}$ 1297,4703, encontrado 1297,524 [M+ H^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

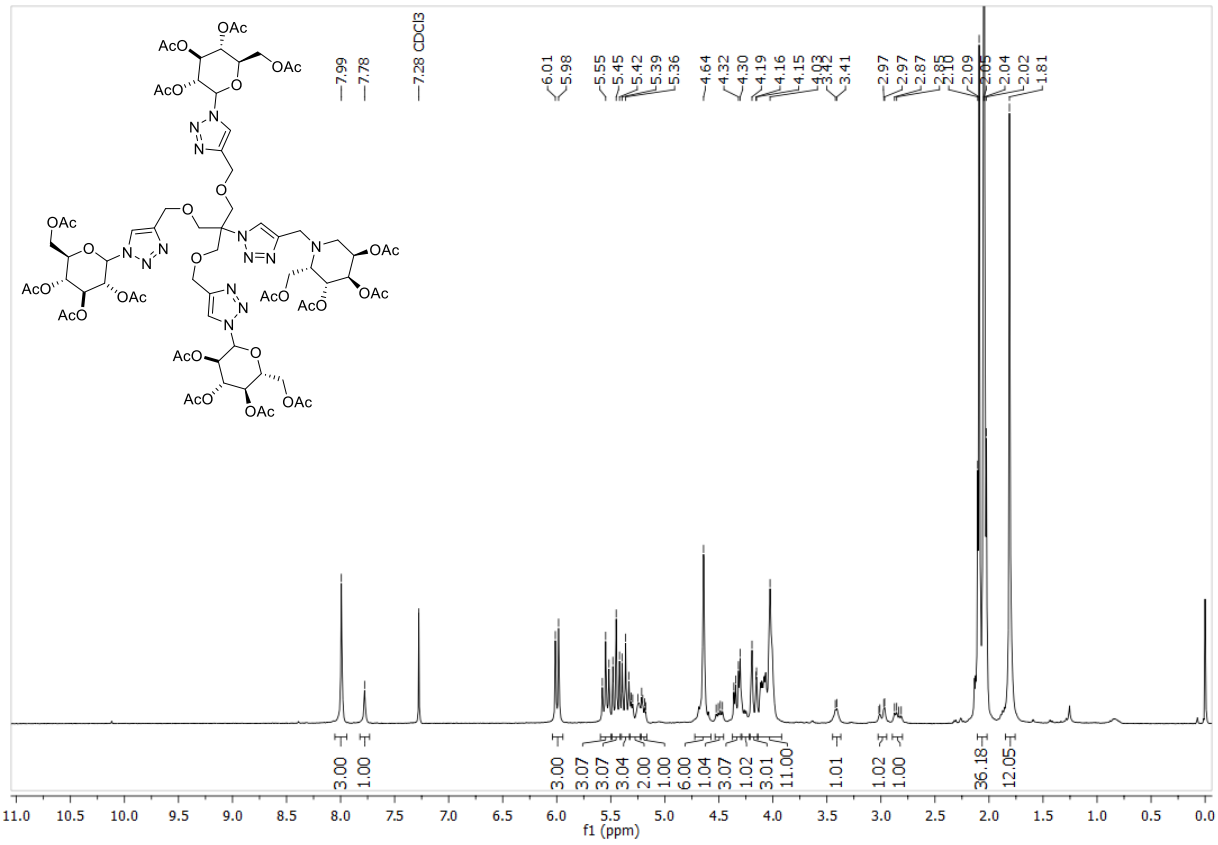


***Glycocluster* 89**

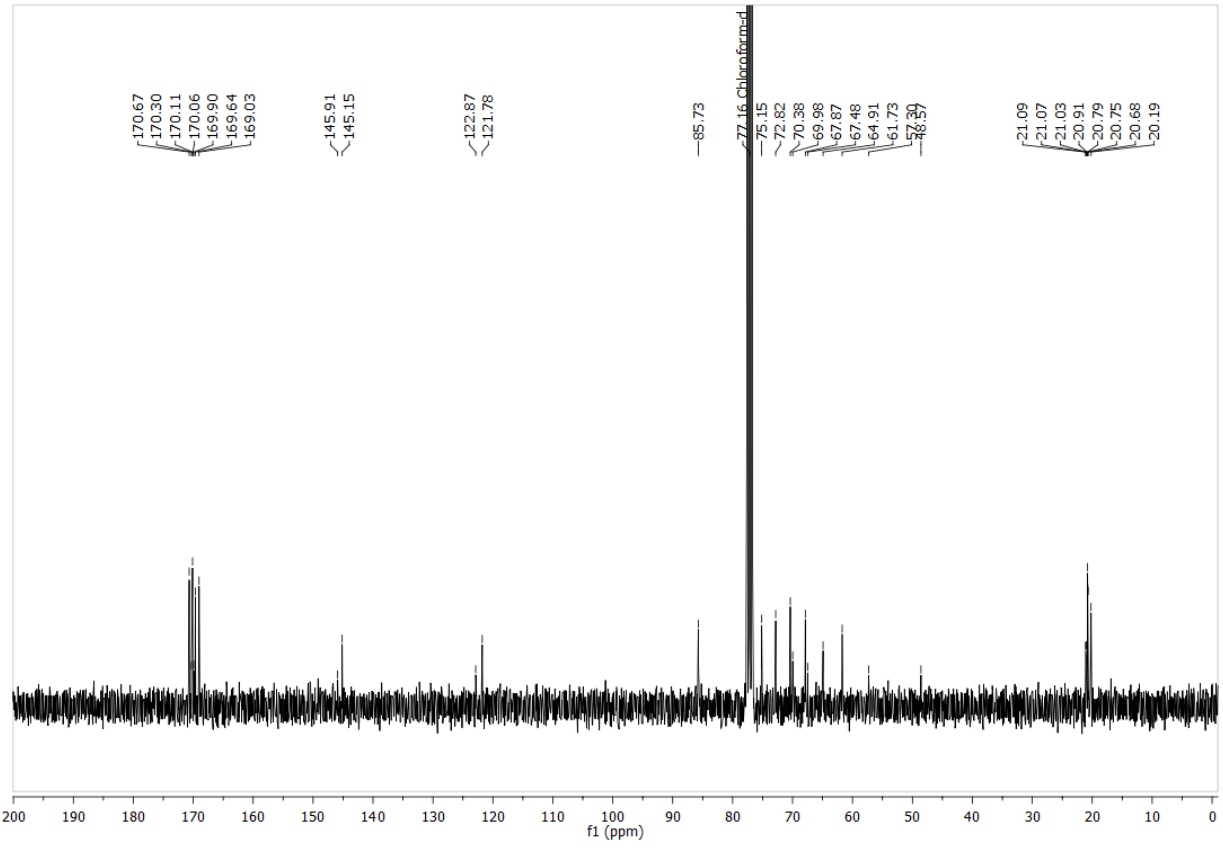


RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 72**



RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$)

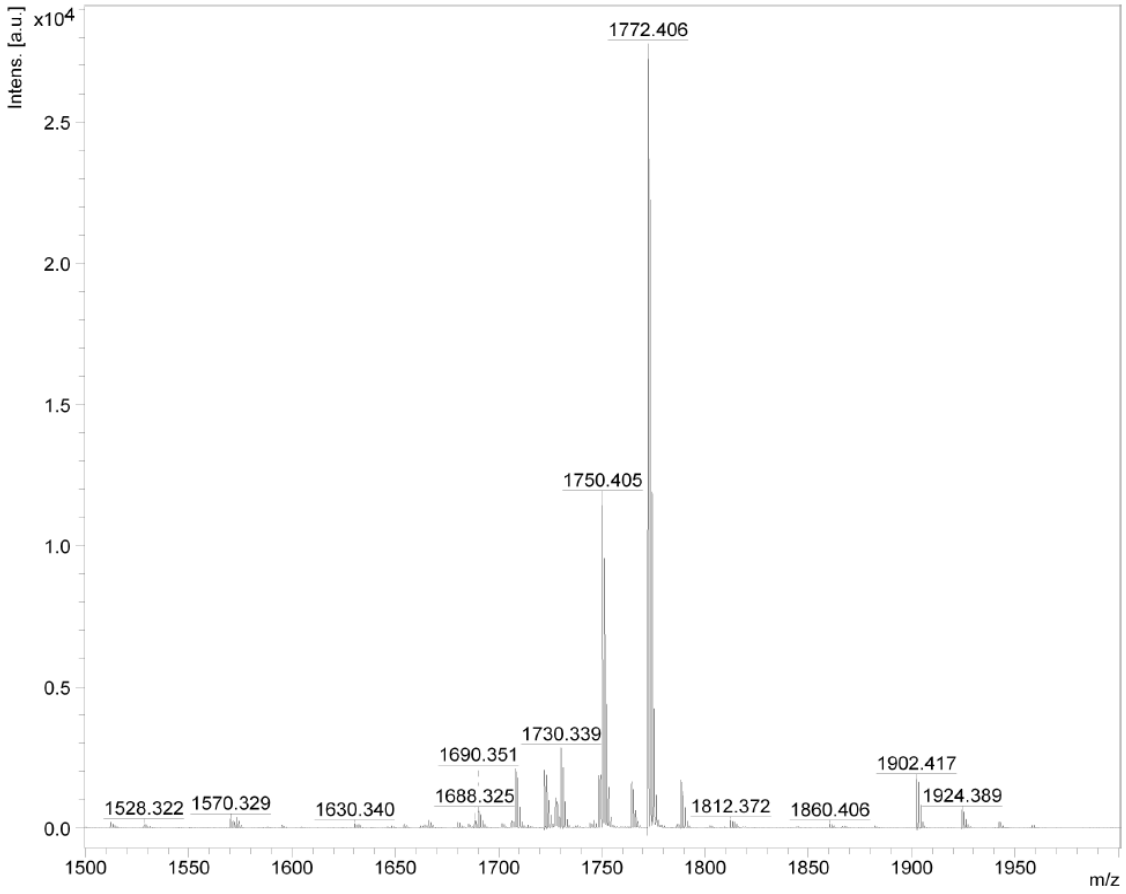


RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$)

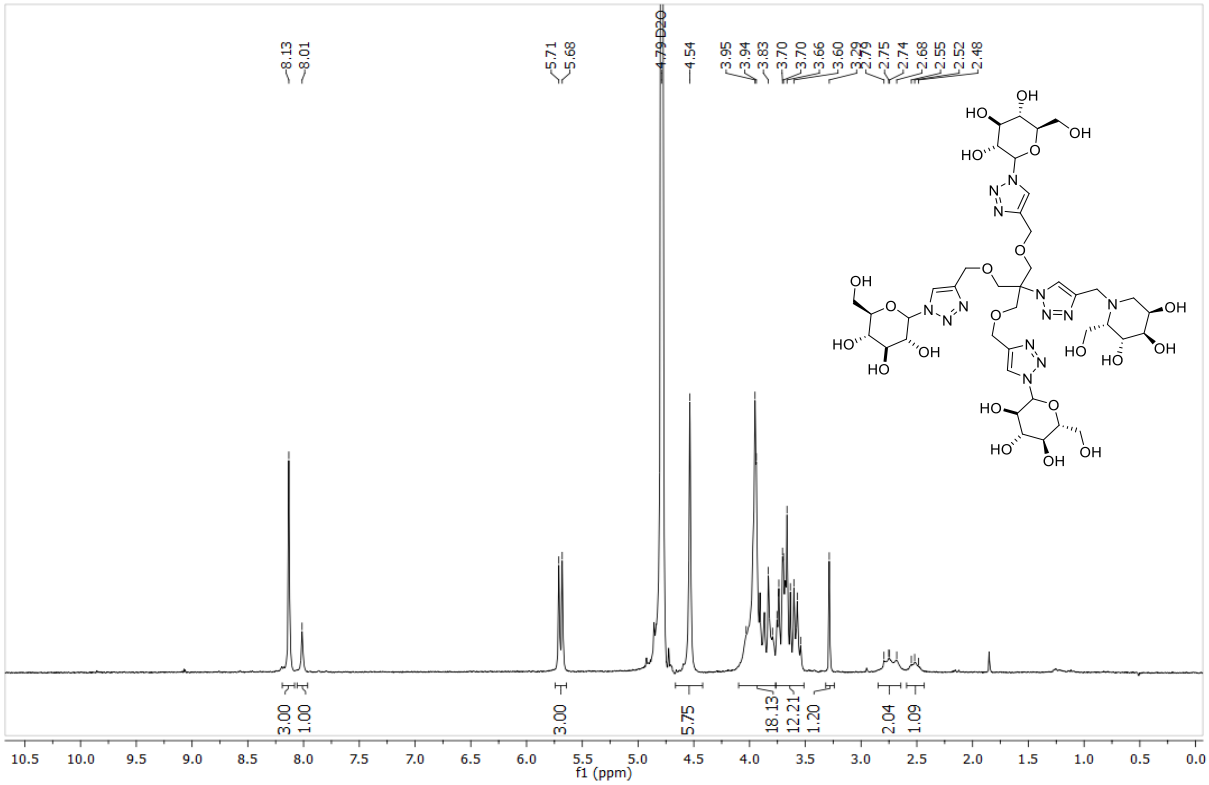
***Glycocluster* 72**

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{72}H_{95}N_{13}NaO_{38}^{+}$ 1772,5793, encontrada 1772,406 [M+Na^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

D:\Data\Amostras_analises\Prof. Ivone\07-07-17_Andreza\ASF 196_DHB_02\0_B10\1\1SRef

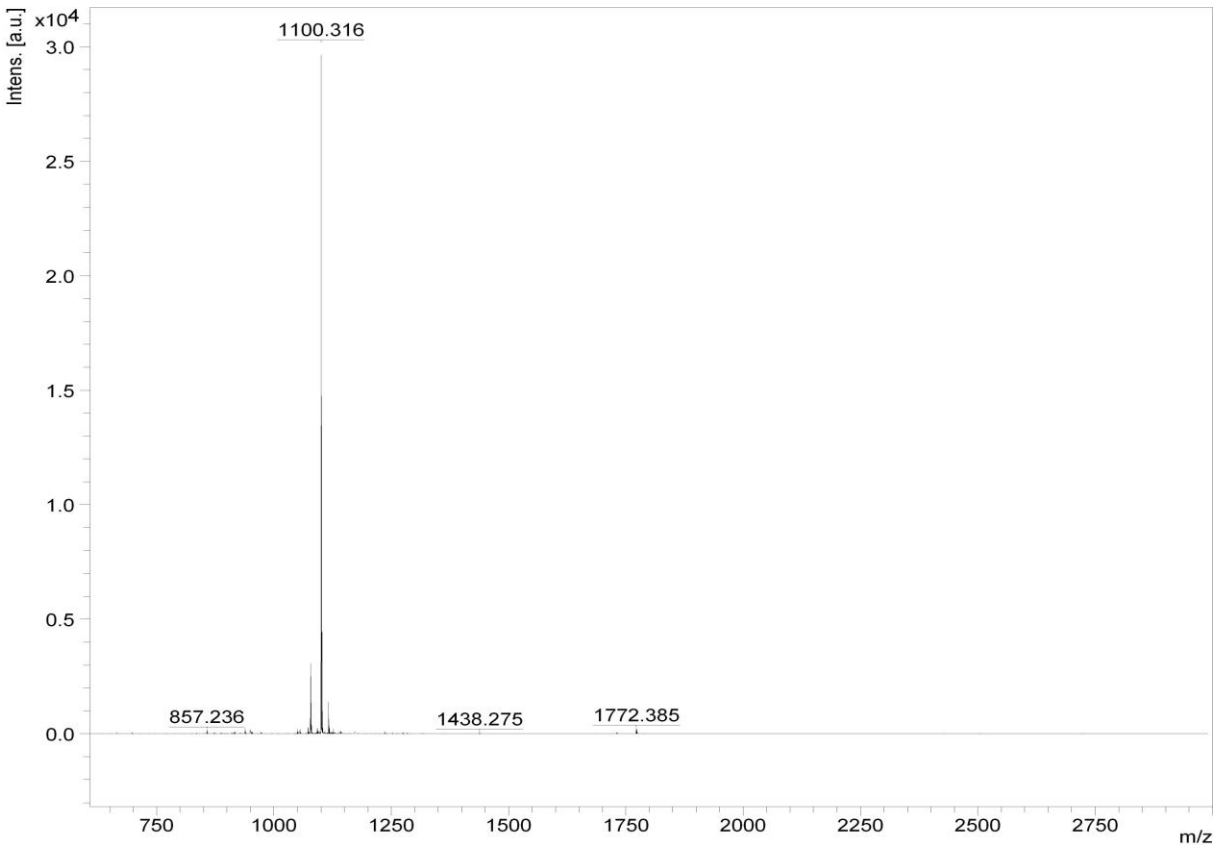


***Glycocluster* 63**

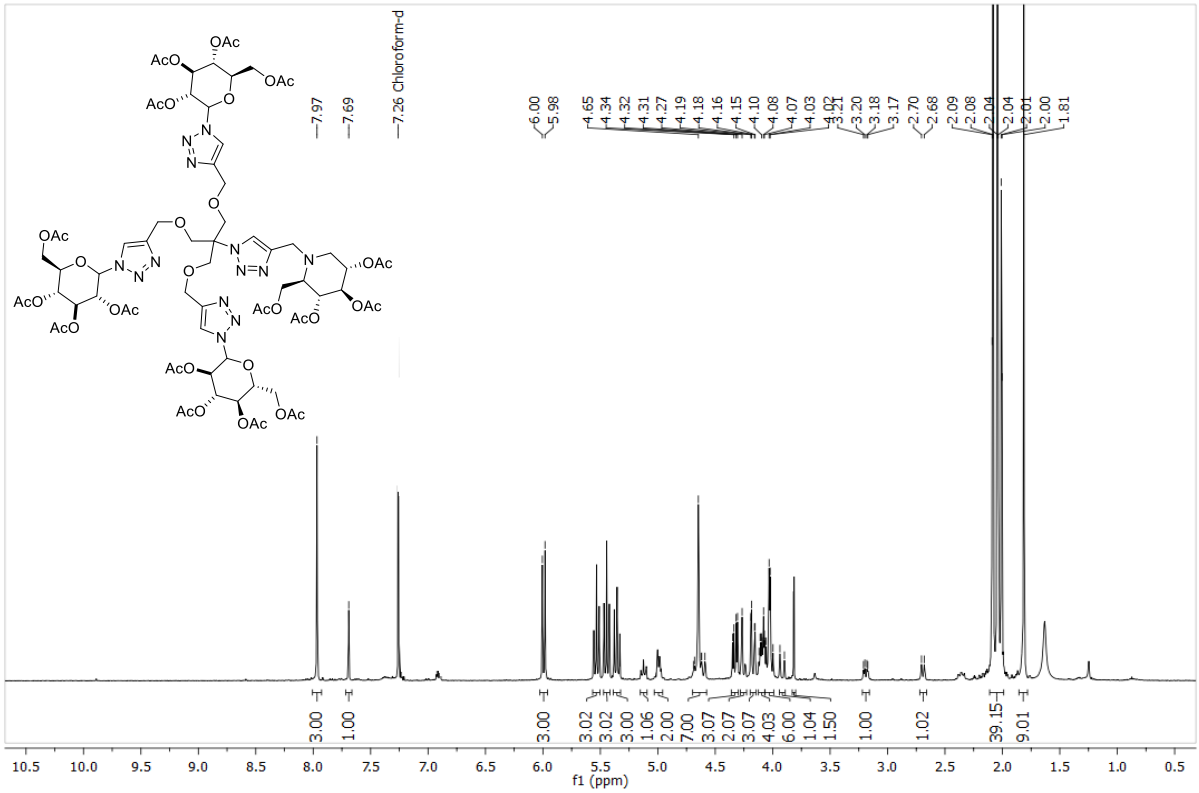


RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O)

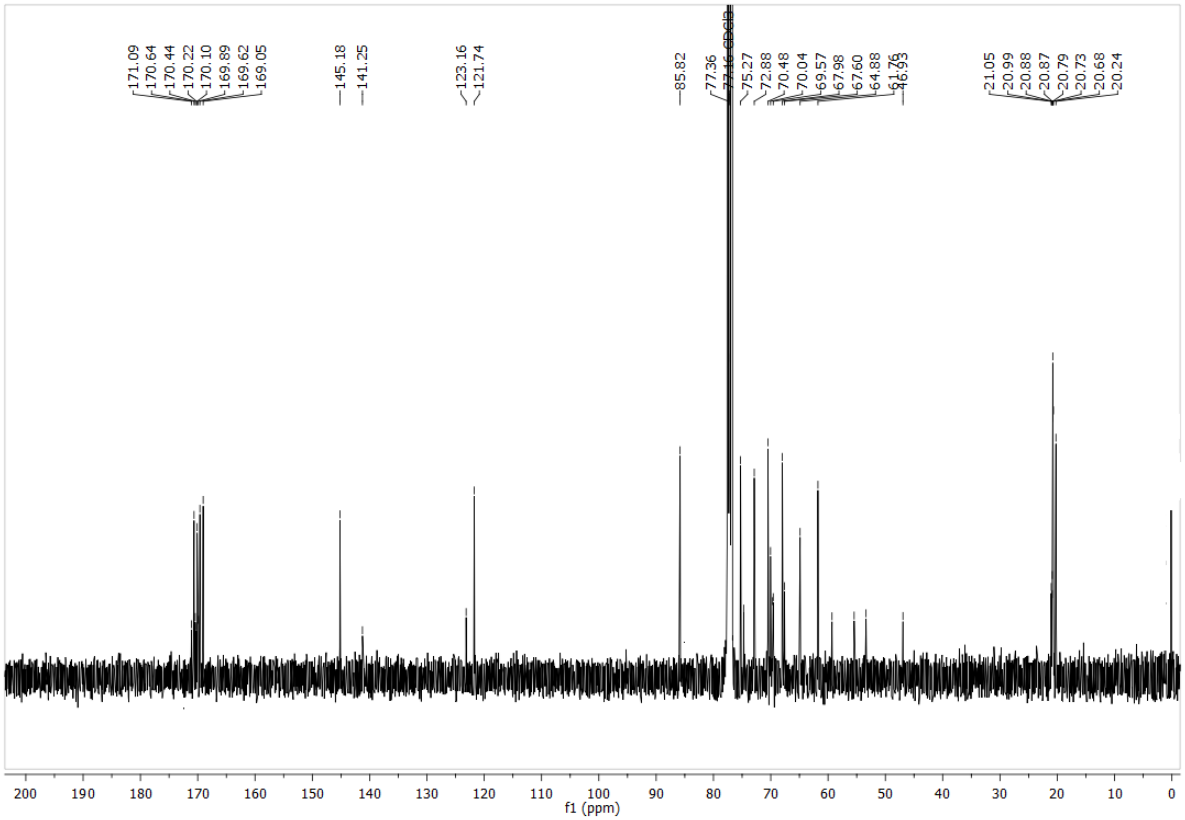
MALDI-TOF MS, calcd. para $C_{40}H_{63}N_{13}NaO_{22}^{+}$ 1100,4103, encontrada 1100,316 [M + Na^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.



***Glycocluster* 73**



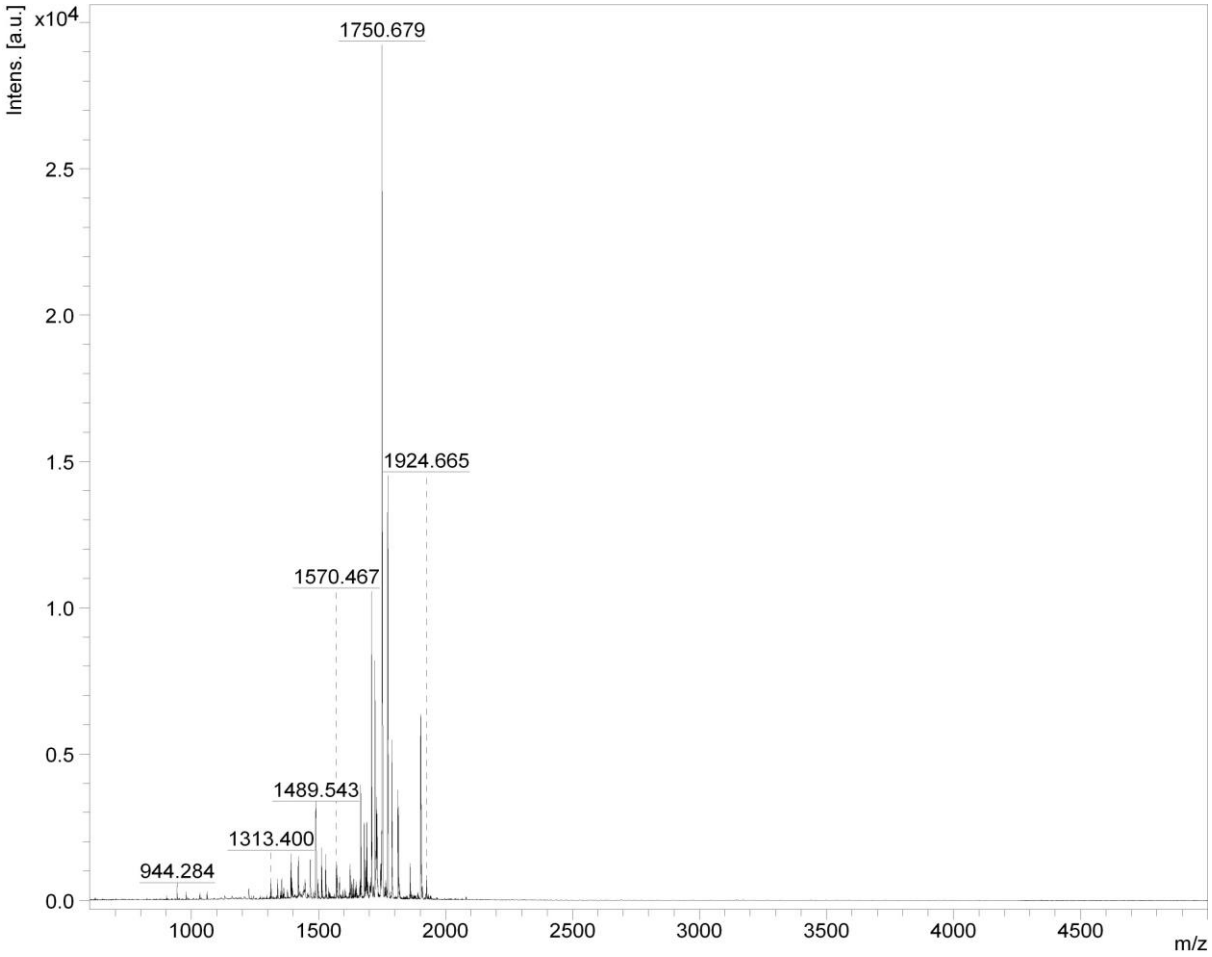
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



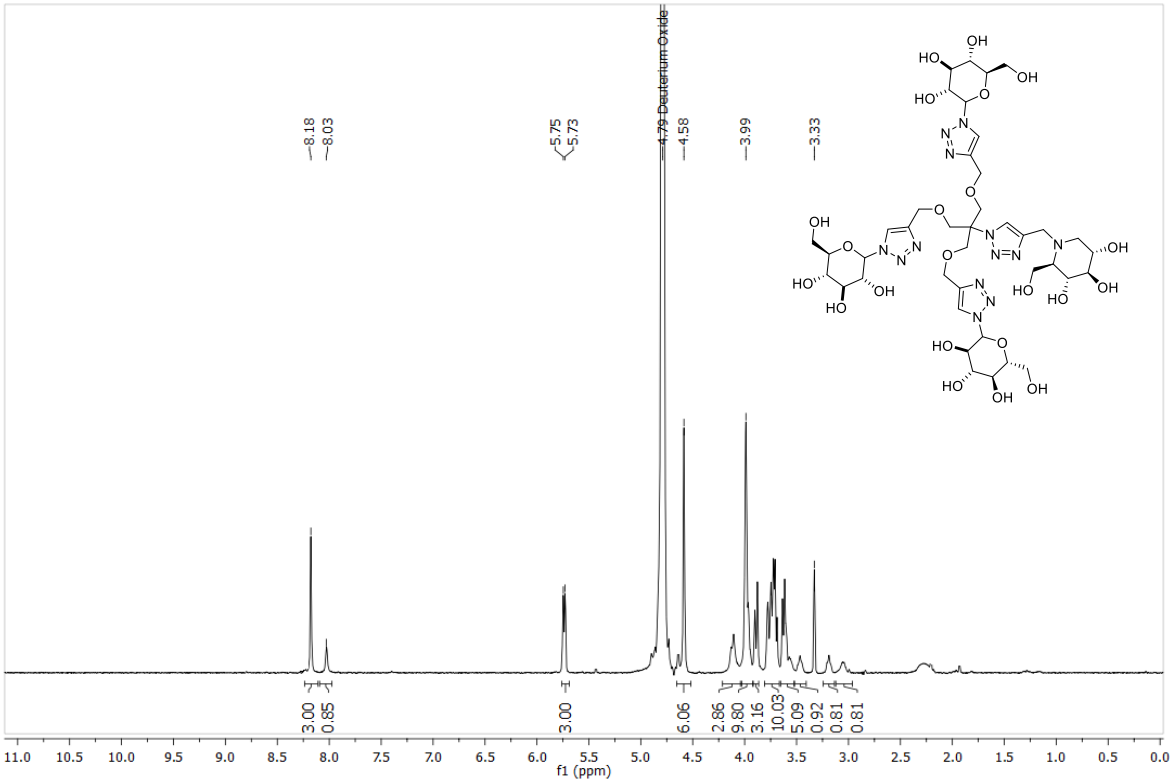
RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 73**

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{72}H_{96}N_{13}O_{38}^{+}$ 1750,5974, encontrada 1750,679 [M + H^{+}]. Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

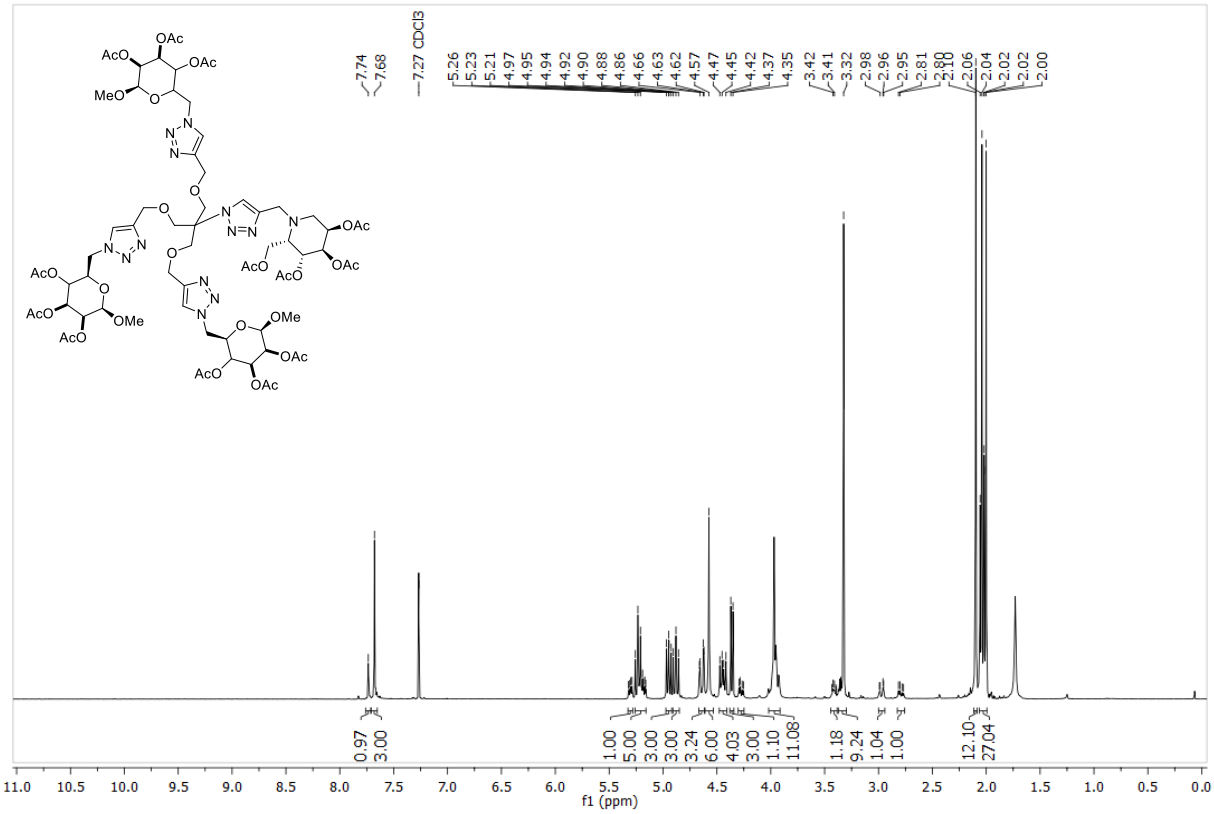


***Glycocluster* 64**

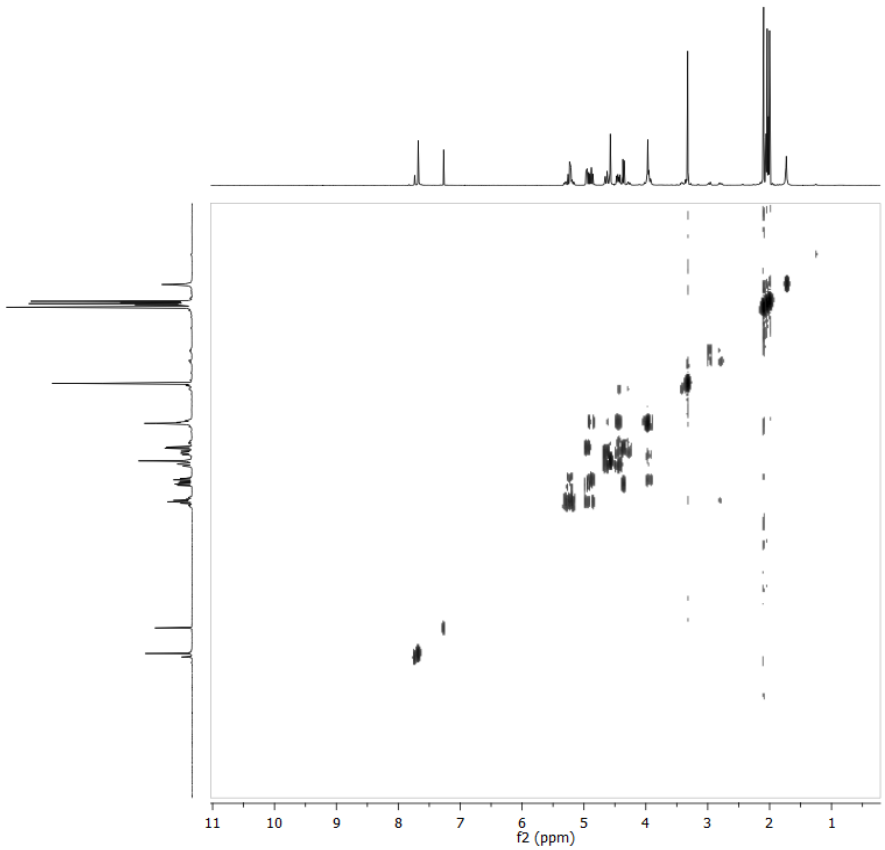


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 77**

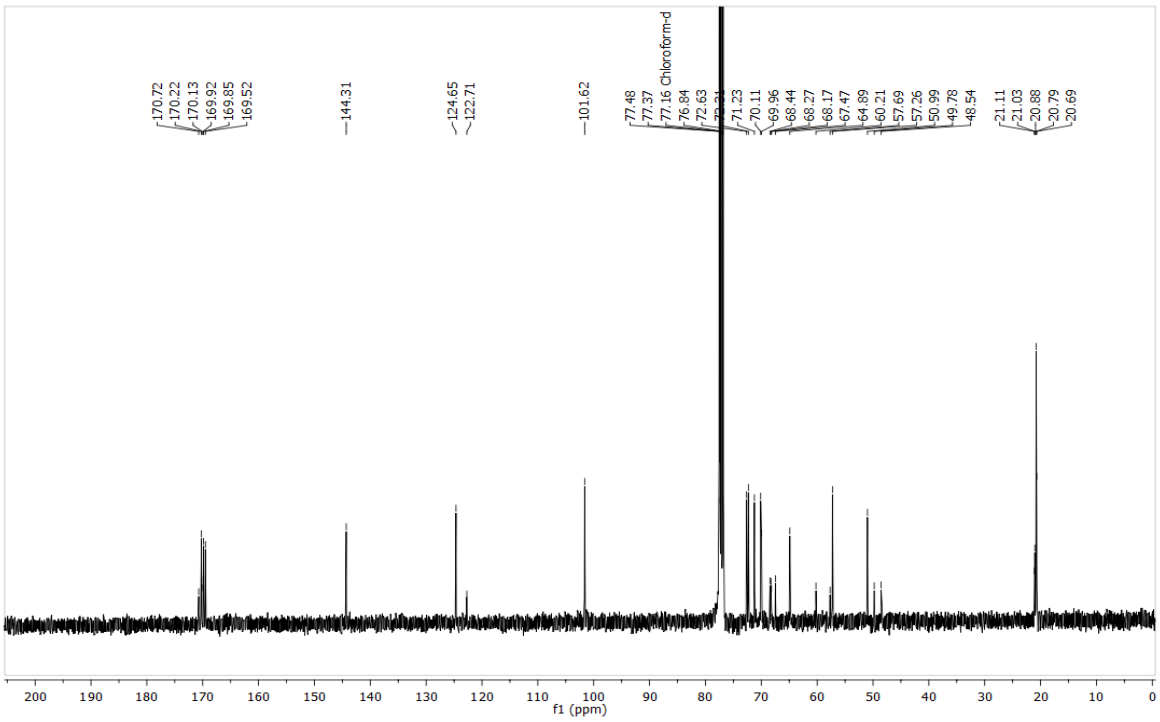


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



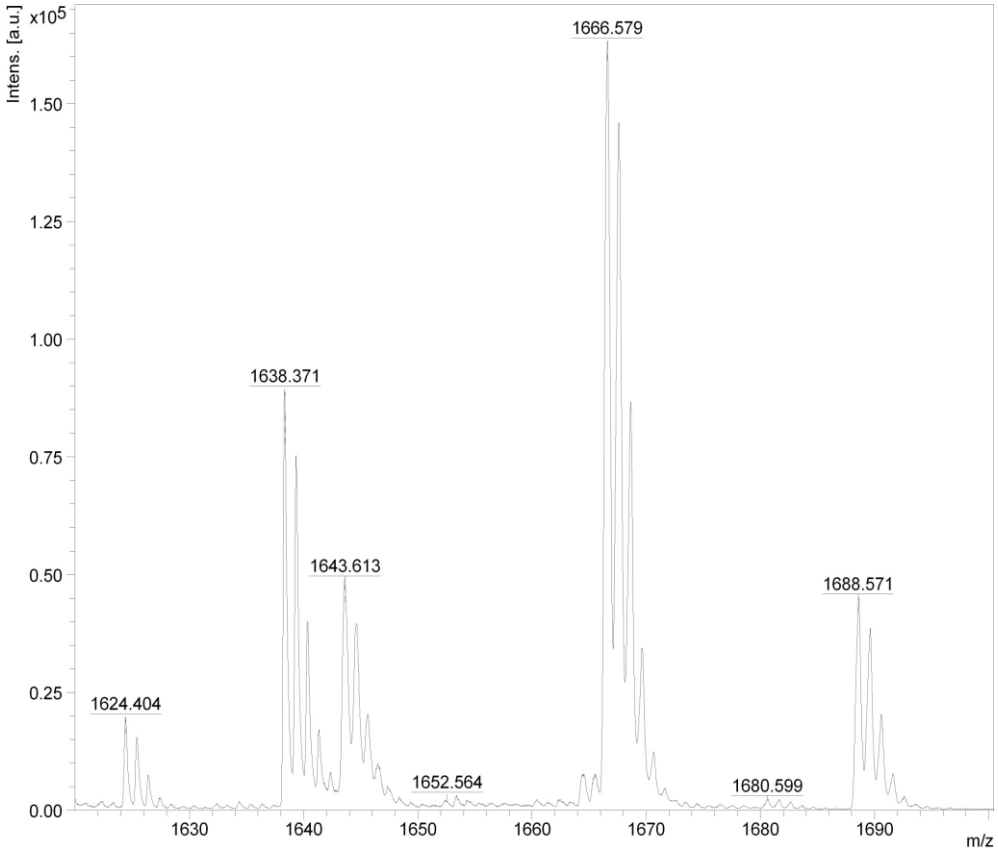
Mapa de contornos - COSY - ^{1}H-^{1}H

***Glycocluster* (77)**

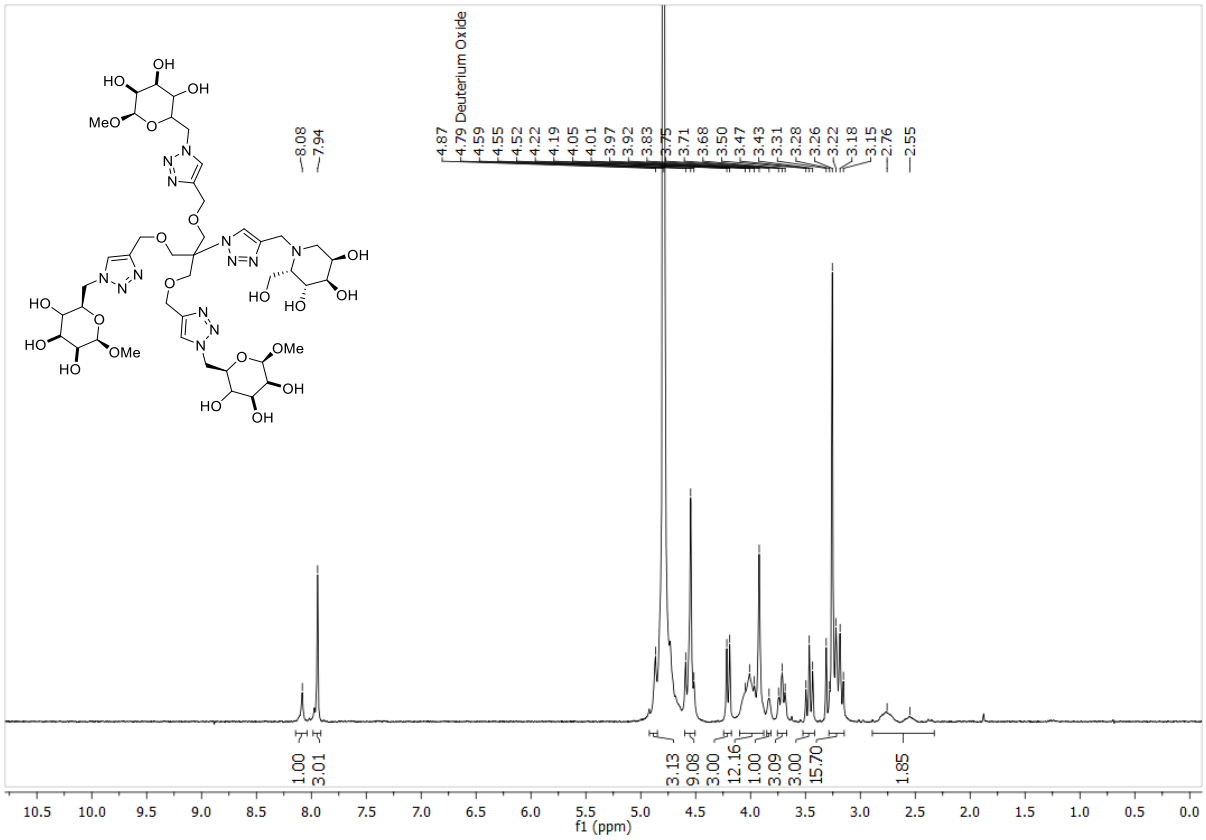


RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{69}H_{96}N_{13}O_{35}^{+}$ 1666,6126, encontrada 1666,579 [M+H^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.

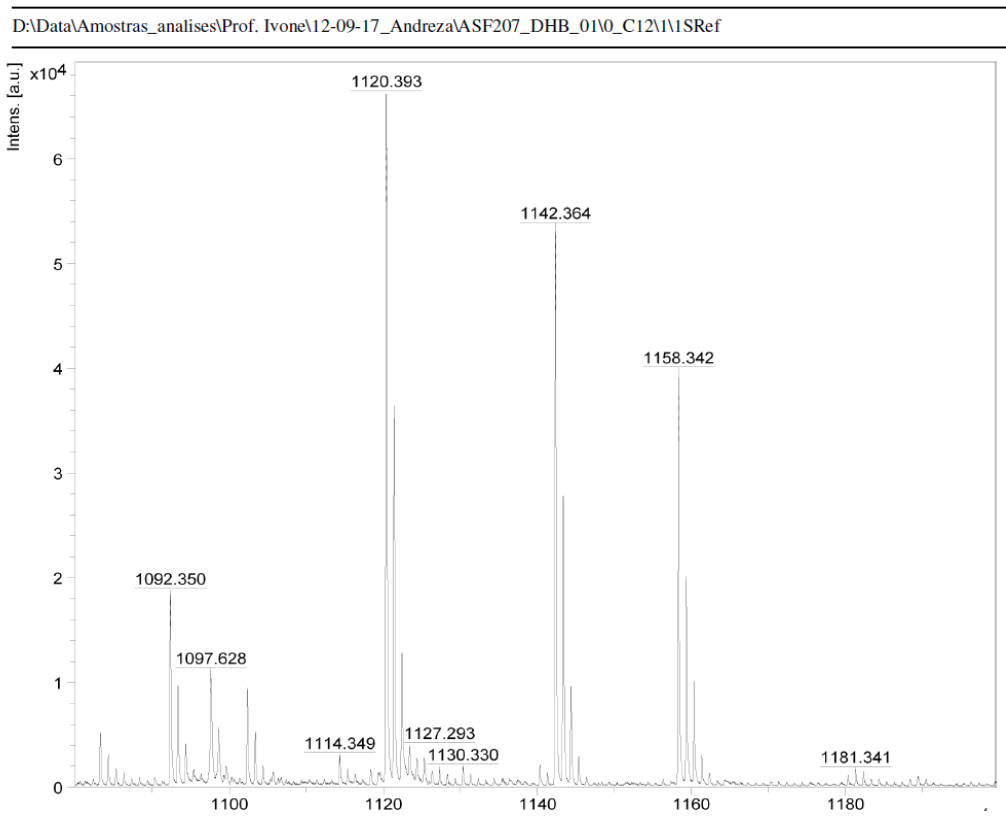


***Glycocluster* 65**

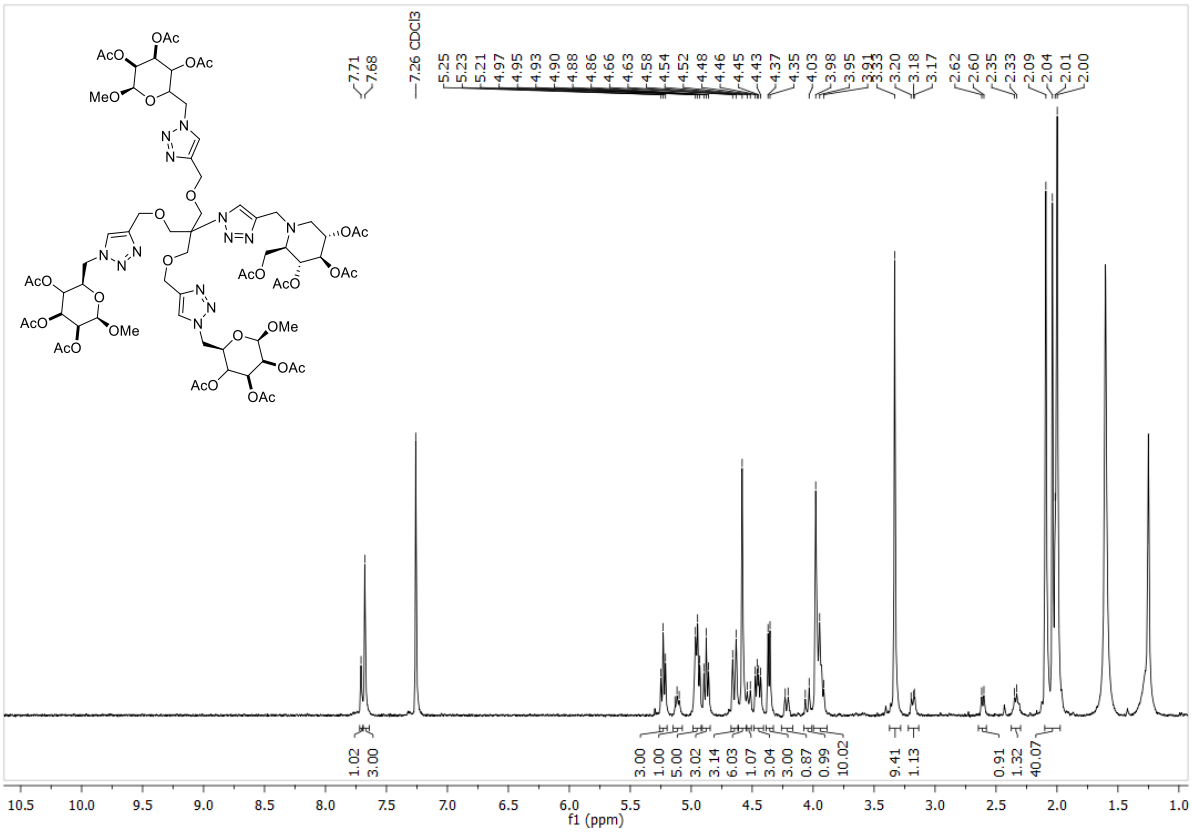


RMN de ^{1}H (300 MHz, D_2O)

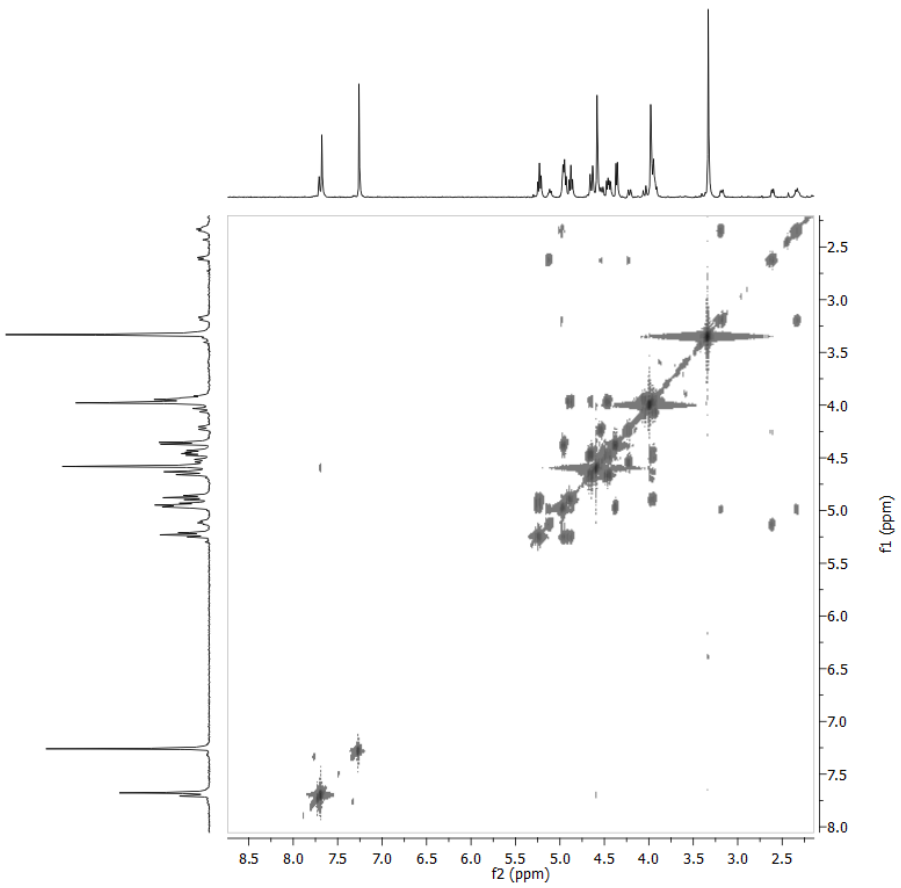
MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{43}H_{69}N_{13}NaO_{22}$ 1142,4572, encontrada 1142,364 [M + Na^{+}].
Dados de massas de alta resolução estão sendo adquiridos.



***Glycocluster* 78**

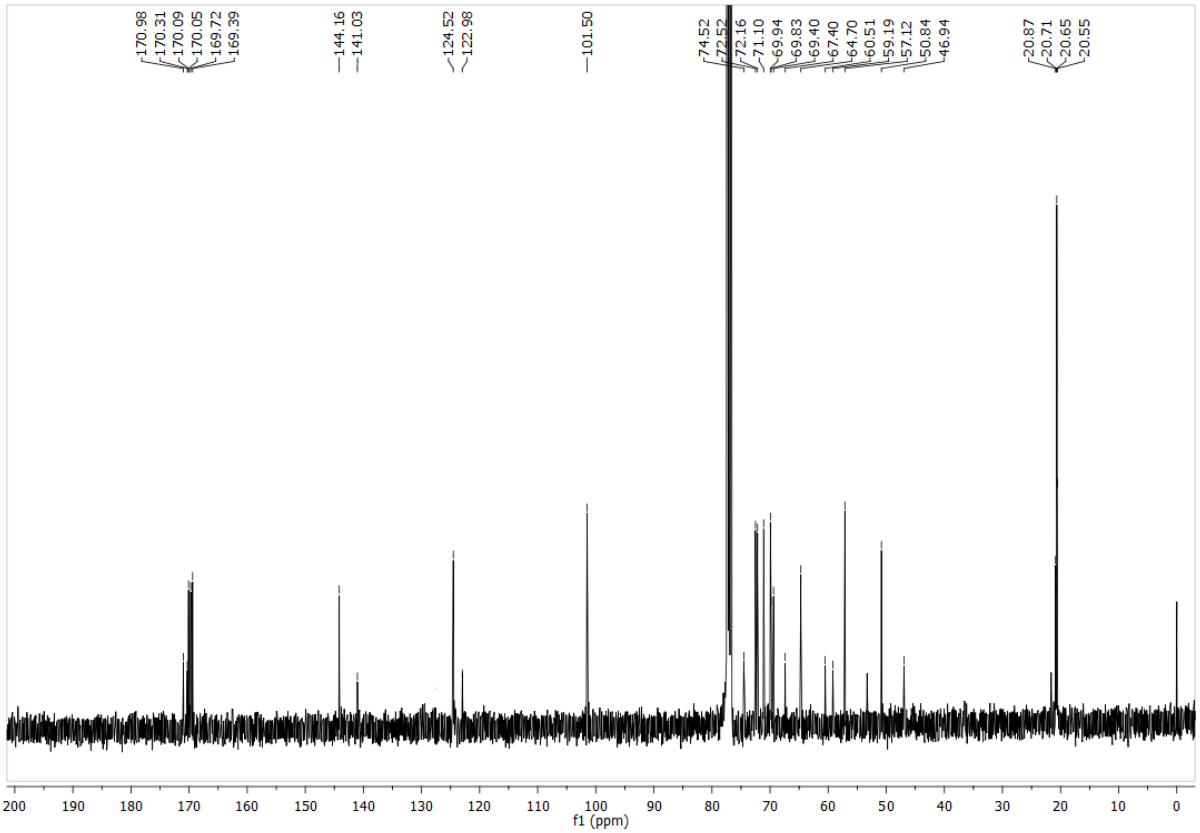


RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



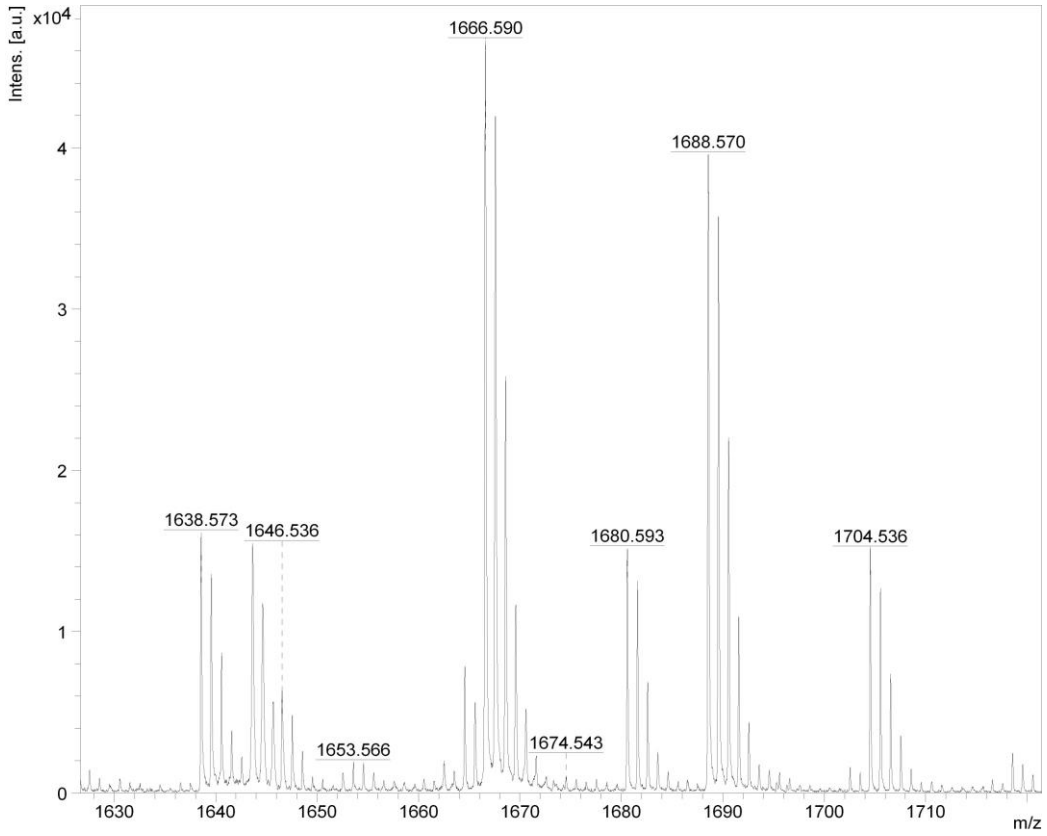
Mapa de contornos - COSY ^{1}H-^{1}H

***Glycocluster* 78**

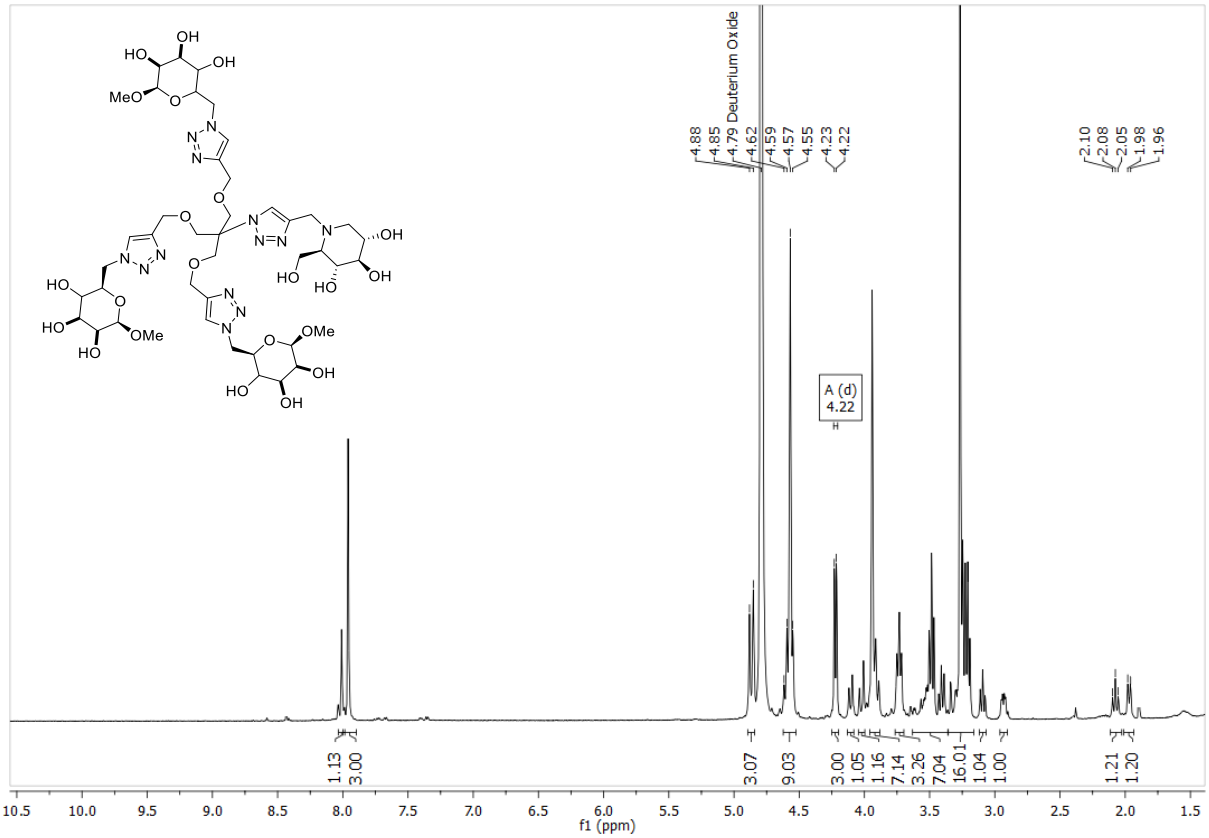


RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{69}H_{95}N_{13}NaO_{35}^{+}$ 1688,5746, encontrada 1688,570 [M+Na^{+}].

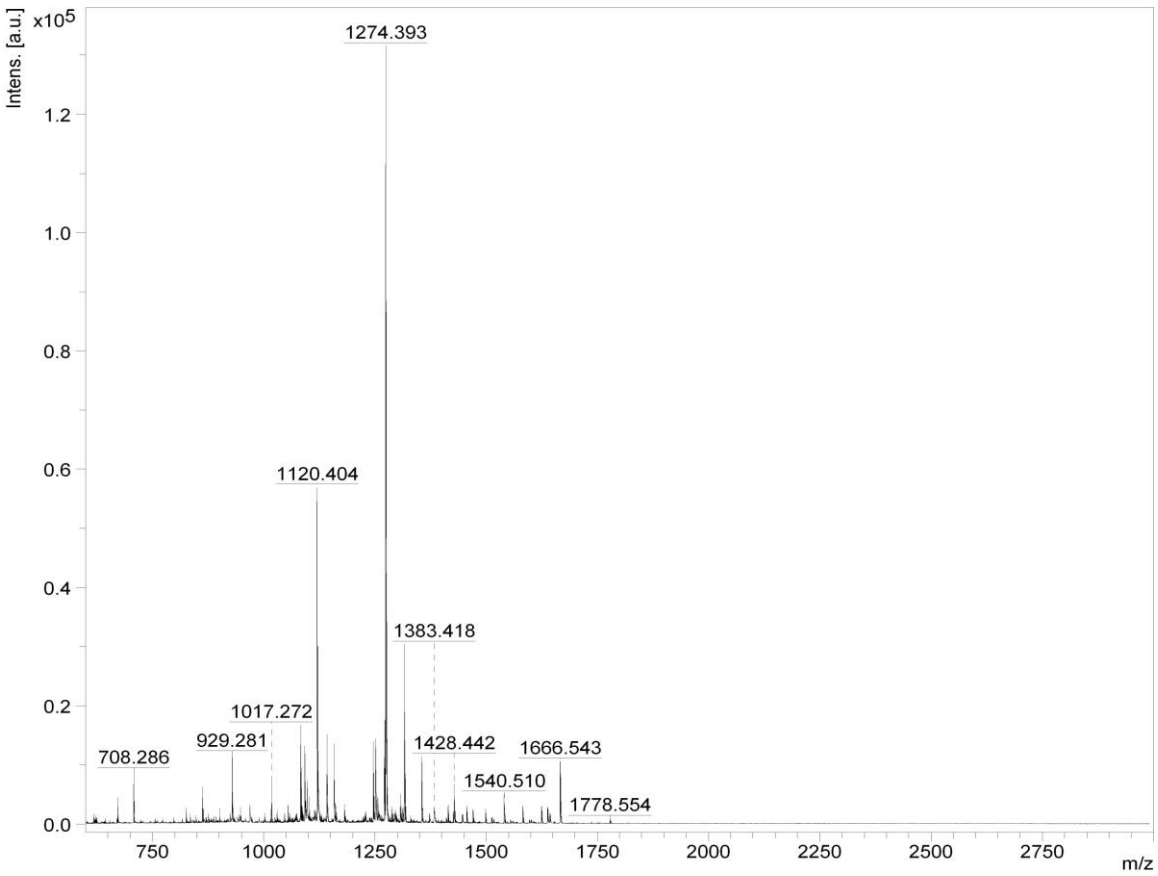


***Glycocluster* 66**

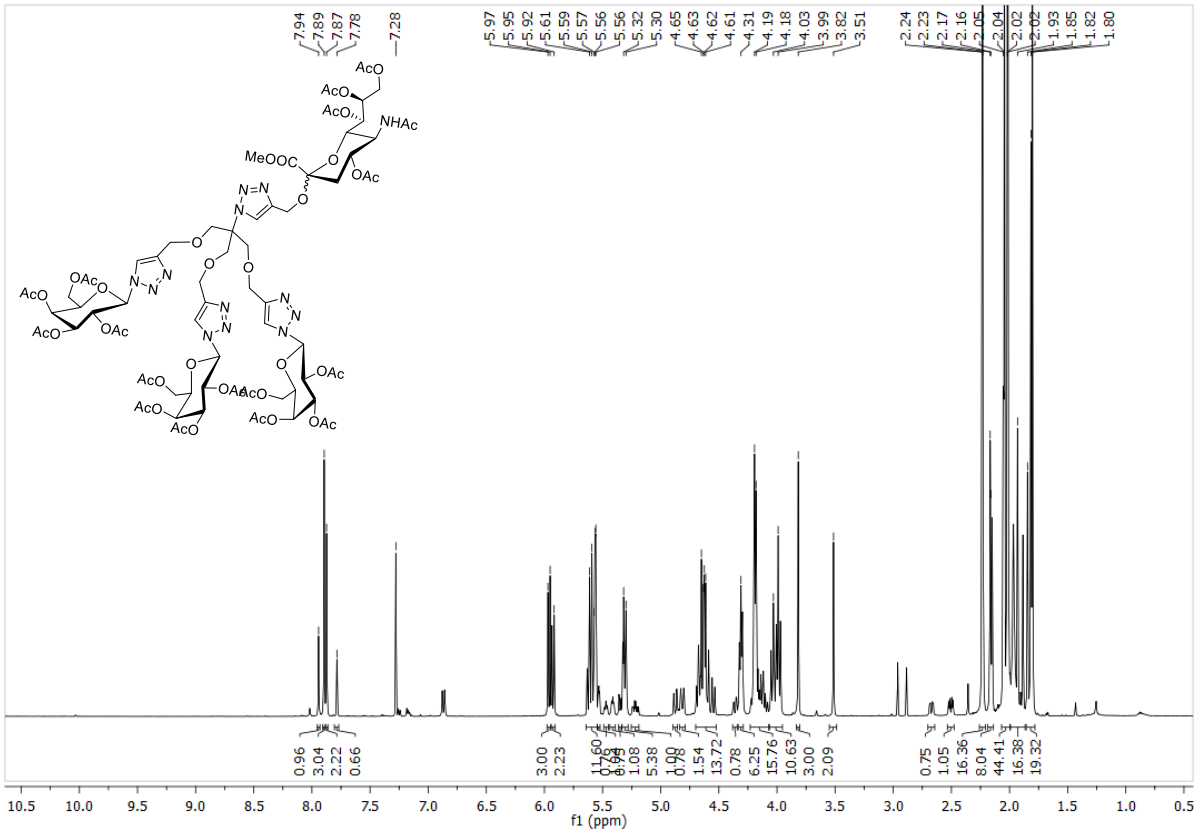


RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O)

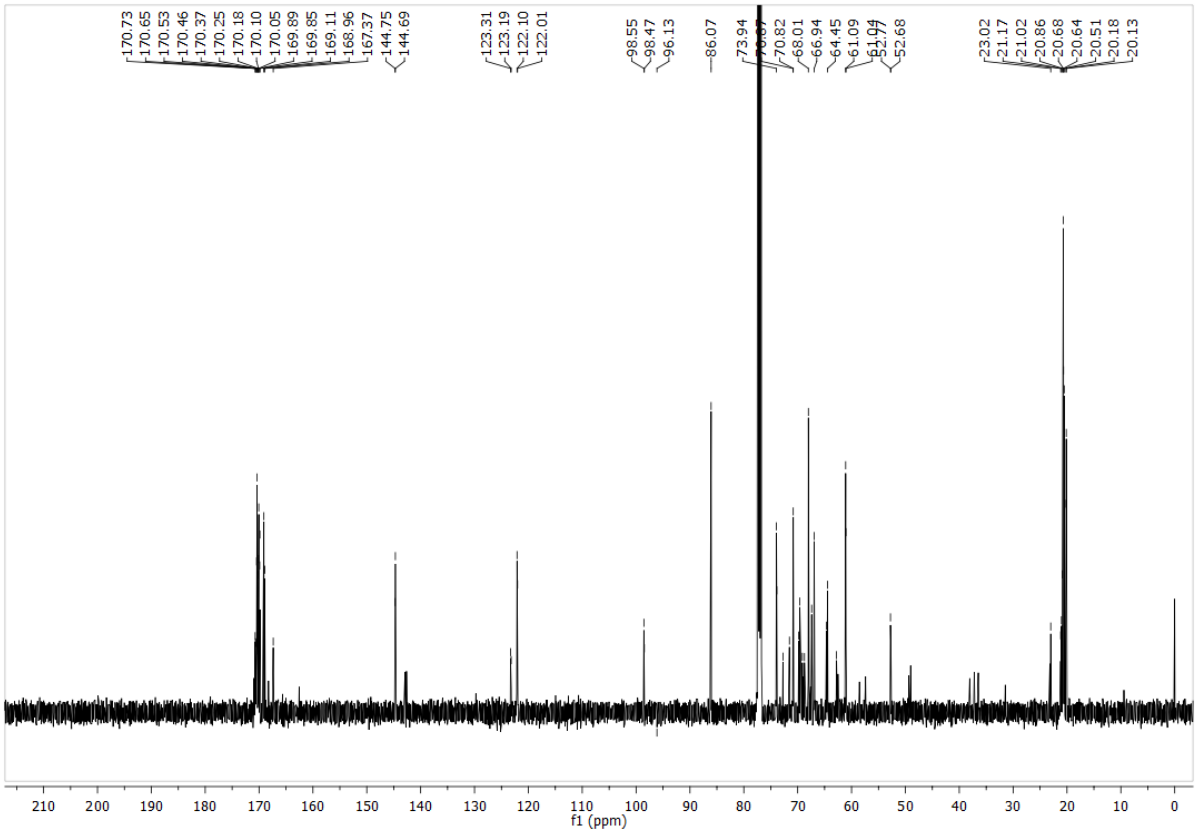
MALDI-TOF MS m/z, calcd. para $C_{43}H_{70}N_{13}O_{22}^{+}$ 1120,4753, encontrada 1120,404 [M+H^{+}].



***Glycocluster* 90**



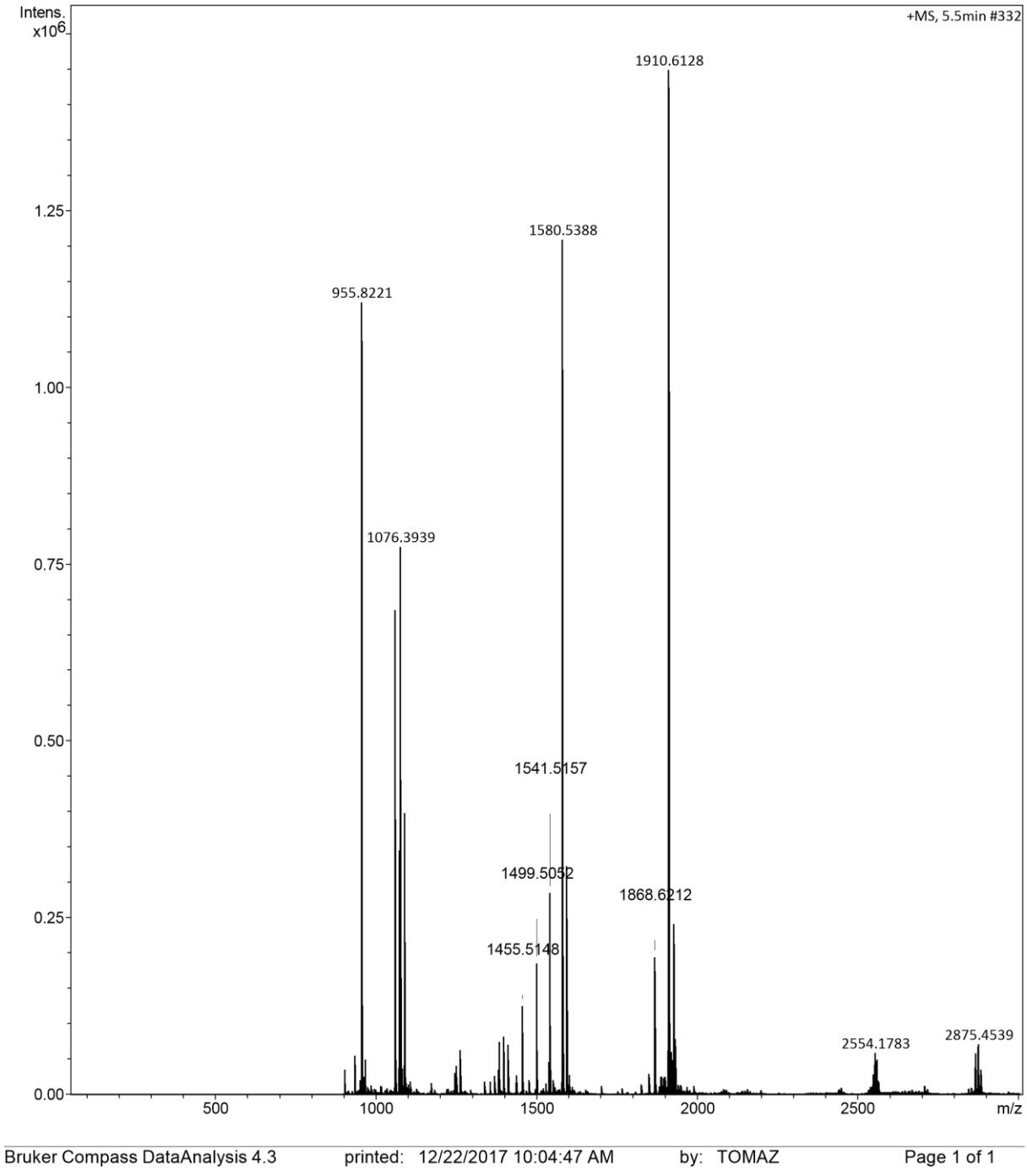
RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)



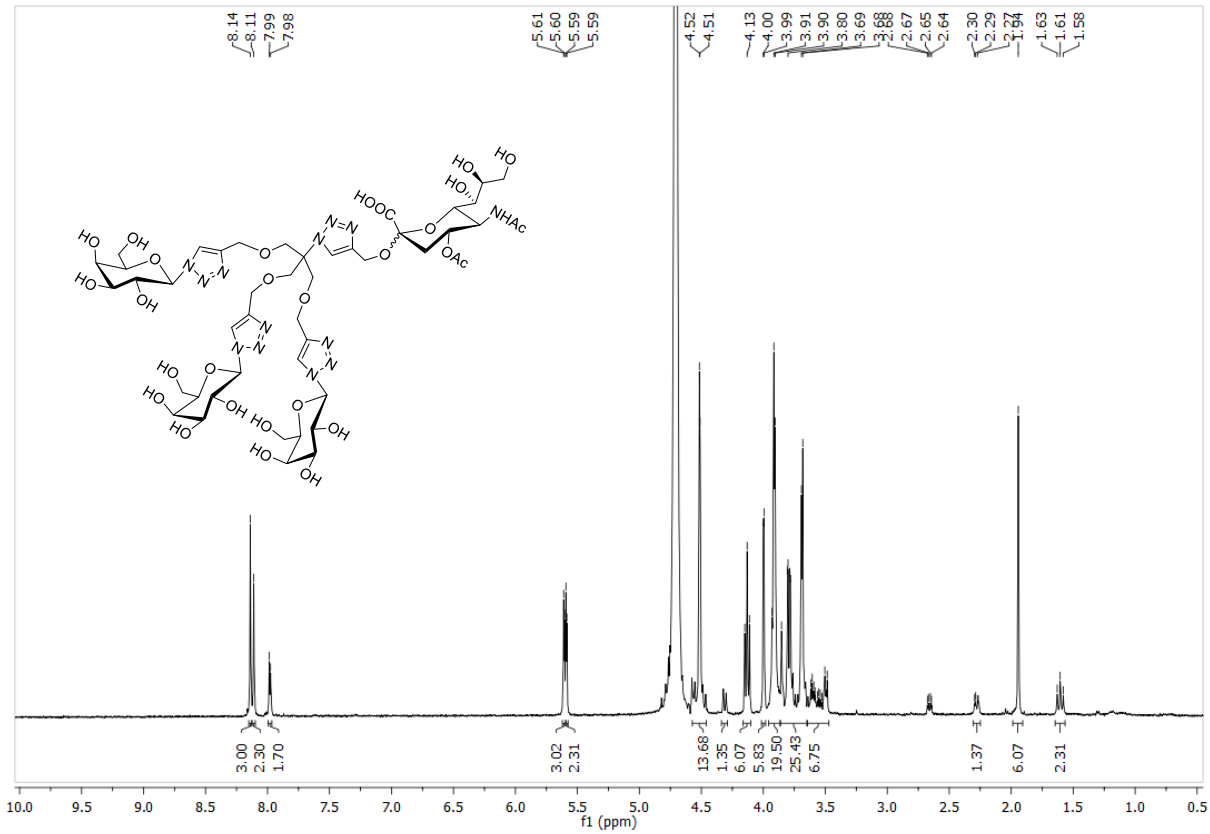
RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)

***Glycocluster* 90**

HRMS m/z calcd. para $C_{78}H_{104}N_{13}O_{43}^{+}$ 1932,6351, encontrada 1910,6128 [M + Na^{+}].



***Glycocluster* 85**



RMN de ^{1}H (500 MHz, D_2O)