

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados
aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um
fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière**

Flávio Roberto Pinsetta

RIBEIRÃO PRETO
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados
aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um
fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Flávio Roberto Pinsetta

Orientadora: Ivone Carvalho

RIBEIRÃO PRETO

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto / USP

Pinsetta, Flávio Roberto

Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière. Ribeirão Preto, 2010.

99 p.; 30cm

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

Orientadora: Carvalho, Ivone.

1. Aminoglicosídeos.
2. Ototoxicidade.
3. Relação estrutura-atividade.
4. Derivados aminoglicosídeos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávio Roberto Pinsetta

Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Ivone Carvalho

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Nelson Roberto Pinsetta, Claudete
Maria Scardovelli Pinsetta, Walter Roberto
Pinsetta, Walter Domingos Pinsetta,
Sublime Pinsetta e Rosa Cecília Scardovelli,
com todo o meu amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me guiar e me orientar em meus momentos mais difíceis, me abençoando sempre com muita saúde.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela amizade e orientação dedicada, e pelo exemplo de força, superação e persistência.

Ao Professor Dr. Miguel Ângelo Hyppolito e a aluna de mestrado Eliane de Oliveira Silva, pela grande colaboração com o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.

Aos meus queridos pais, Nelson Roberto Pinsetta e Claudete Maria Scardovelli Pinsetta, que sempre me deram força nos momentos difíceis. Tudo que sou e que conquistei é reflexo da dedicação e do carinho de vocês.

Ao meu irmão Walter Roberto Pinsetta, pelo incentivo.

À minha namorada Paulinha, por todo o seu amor, dedicação, carinho e estímulo.

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Química Farmacêutica, Julierme, Daniel, Peterson, Pedro, Luís Otávio, Mônica, Armando, Adriane, Lílian, Vanessa, Valquíria, Maristela, Vinícius, Cláudia, por dividirem comigo as alegrias, as conquistas e, também, os momentos de dificuldade.

Aos seguranças do Bloco M, Henrique e Paulão, pelos momentos de descontração.

Aos técnicos José Carlos Tomaz, Vinícius e Virgínia, pela disponibilidade e dedicação para a realização das análises de Massa e RMN.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, Rosana e Rossana, pelos importantes serviços prestados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e pelo amparo prestado durante minha formação.

**“Quanto mais um homem se aproxima de
suas metas, tanto mais crescem as
dificuldades.”**

Goethe (1749 a 1832)

RESUMO

PINSETTA, F. R. **Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière.** 2010. 99f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os aminoglicosídeos são antibióticos utilizados para o tratamento de muitas infecções bacterianas graves. A maioria é produzida por microorganismos (gêneros *Streptomyces* e *Actinomyces*), mas a semi-síntese resultam na descoberta de notáveis aminoglicosídeos. Apesar de seu mecanismo de ação seletivo, os aminoglicosídeos são extremamente tóxicos. A nefrotoxicidade e ototoxicidade são mais freqüentemente observadas. Sabe-se que a Doença de Ménière pode ser tratada através da destruição seletiva das células vestibulares, preservando-se as células cocleares (tecidos da orelha interna). Antibióticos aminoglicosídeos são usados para esta finalidade, mas podem paralelamente causar danos cocleares (surdez). O estudo de relação estrutura-toxicidade dos resíduos de fragmentação de antibióticos aminoglicosídeos pode originar produtos simplificados, com atividade vestibular seletiva, dissociada da atividade coclear, mais seguros para o tratamento da Doença de Ménière. Em trabalhos anteriores, os ensaios envolvendo 2-desoxiestreptamina e estreptidina demonstraram que não são tóxicos ao tecido coclear, quando comparados com os compostos originais. Neamina, outro fragmento de neomicina, se mostrou mais tóxica ao vestíbulo que a própria neomicina, mas apresentou também grande toxicidade coclear. A substituição da unidade diaminoglicosídica de neamina, contendo o grupo 2-desoxiestreptamina, por outras unidades glicosídicas (glicose, galactose, glicosamina) representa uma tentativa de eliminar a atividade cocleotóxica e manter a atividade vestibulotóxica original (100%). A mesma idéia pode ser também aplicada ao resíduo de estreptidina. Desta forma, foram sintetizados, dois pseudos-dissacarídeos, 2-desoxiestreptamina ligado a galactose (**48**) e 2-desoxiestreptamina ligado a glicose (**49**), ambas as ligações em posição β referente ao carbono glicosídico anomérico. Apenas o pseudo-dissacarídeo 2-desoxiestreptamina ligado a galactose (**48**) foi obtido com massa suficiente para análise ototóxica, o qual apresentou atividade vestibular seletiva como desejado, no tratamento da doença de Ménière. Ensaio de atividade antimicrobiana foram realizados empregando ambos pseudos-dissacarídeos sintetizados, 2-desoxiestreptamina ligada a galactose (**48**) e 2-desoxiestreptamina ligada a glicose (**49**), porém não apresentaram uma concentração inibitória mínima (MIC) significativa para as cepas testadas.

Palavras chave: aminoglicosídeos, pseudos-dissacarídeos, atividade vestibular, atividade coclear, doença de Ménière.

ABSTRACT

FLÁVIO, F. R. **Synthesis and structure-toxicity relationship of aminoglycosides derivatives as a lead in the search for a selective drug for the treatment of Ménière disease.** 2010. 99f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Aminoglycosides are antibiotics used for the treatment of many serious bacterial infections. Most are produced by microorganisms (genera *Streptomyces* and *Actinomyces*), but products obtained by semi-synthesis resulted in the discovery of remarkable aminoglycosides. Despite their selective mechanism of action, the aminoglycosides are highly toxic. The nephrotoxicity and ototoxicity are more frequently observed. It is known that Ménière's disease can be treated by selective destruction of the vestibular cells, preserving the cells cochlear (inner ear tissues). Aminoglycoside antibiotics are used for this purpose but may cause cochlear damage (deafness). The study of structure-toxicity of residues fragmentation of aminoglycoside antibiotics may lead to simplified products, with selective vestibular activity, dissociated from the cochlear activity, safer for the treatment of Ménière's disease. In previous work, the experiments involving 2-deoxy-streptamine and streptidine demonstrated that they are not toxic to the cochlear tissue, when compared with the original compound. Neamina, another fragment of neomycin, was more toxic to the vestibular tissue than neomycin, but also presented great cochlear toxicity. The replacement of the diamino-glycoside unit of neamina containing the 2-deoxy-streptamine by other glycosidic units (glucose, galactose, glucosamine) is an attempt to eliminate the cochlear toxicity and maintain the original vestibular toxicity (100%). The same idea can also be applied to the streptidine residue. Thus, two pseudo-disaccharides, 2-deoxy-streptamine linked to galactose (**48**) and 2-deoxy-streptamine linked to glucose (**49**), both linked to the β position on the glycoside anomeric carbon. Only the pseudo-disaccharide 2-deoxy-streptamine linked to galactose (**48**) was obtained in sufficient quantity to perform the ototoxic assay, which presented selective vestibular activity as desired in the treatment of Ménière's disease. Antimicrobial activity assays were performed with both pseudo-disaccharides synthesized 2-deoxy-streptamine linked to galactose (**48**) and 2-deoxy-streptamine linked to glucose (**49**), but did not show a minimum inhibitory concentration (MIC) significant against the strains tested.

Key words: aminoglycosides, pseudo-disaccharides, vestibular activity, cochlear activity, Meniere's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos principais antibióticos aminoglicosídeos da classe das 2-desoxi-estreptaminas.....	04
Figura 2. Antibióticos cujo anel derivado ciclitol não é a 2-desoxi-estreptamina.....	05
Figura 3. Estrutura cristalográfica do complexo de paromomicina com a hélice 44 da subunidade 16S do RNAr do sitio bacteriano.....	06
Figura 4. Sítios de modificação pelas enzimas bacterianas na molécula da canamicina B.....	09
Figura 5. Derivados aminoglicosídeos	13
Figura 6. Complexo entre paromomicina e sítio A do ribossomo bacteriano ...	16
Figura 7. Orelha humana	18
Figura 8: Compostos pseudodissacarídeos (derivados de 2-desoxi-estreptamina e estreptidina, ligadas a unidades de glicose, galactose e glicosamina) de interesse deste projeto	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antimicrobiana (CIM) de diferentes amostras derivadas de neomicina.....	65
Tabela 2: Avaliação audiológica funcional por emissões otoacústicas por produtos de distorção. Exame pré aplicação do produto 48	66
Tabela 3: Avaliação audiológica funcional por emissões otoacústicas por produtos de distorção. Exame pós aplicação do produto 48	67
Tabela 4: Avaliação por microscopia eletrônica dos danos causados pelo produto 48 aos sistemas coclear e vestibular, localizados na orelha interna.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
AAC	aminoglicosídeo-acetil-transferase
Ac₂O	Anidrido Acético
Ac-CoA	acetil coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ANT	Enzima Aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase
APH	Enzima Aminoglicosídeo Fosfotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Carbono
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCl₃CN	Tricloroacetoneitrila
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CoMFA	análise comparativa de campos moleculares
CoMSIA	análise comparativa de índices de similaridade molecular
CTT	Cloreto de trifeniltetrazólio
CuSO₄	sulfato de cobre
d	dubleto
dB	Decibel
DBU	1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno
dd	duplo dubleto

ddd	–	duplo duplo dubleto
dt	–	duplo tripleto
DL₅₀	–	Dose Letal
DMAP	–	4-dimetilaminopiridina
DMSO	–	Dimetil-Sulfóxido
DNA	–	Ácido Desoxiribonucléico
D₂O	–	Óxido de Deutério
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
EOAPD	–	Testes de Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção
ESI	–	ionização por electrospray
FRET	–	Fluorescence Resonance Energy Transfer
H	–	Hidrogênio
HBr	–	Ácido Bromídrico
HIV	–	Vírus da Imunodeficiência Humana
H₂NNHAc	–	acetato de hidrazina
HPLC	–	High performance liquid chromatography
Hz	–	Hertz
I₂	–	iodo
IHC	–	células ciliadas internas
IV	–	Infravermelho
J	–	Constante de acoplamento
K	–	Potássio
KBr	–	Brometo de Potássio
k₂CO₃	–	carbonato de potássio
Kg	–	Quilogramas

KHz	–	Quilohertz
m	–	multiplete
M	–	Molar
MDR	–	multi-drogas resistentes
MeOH	–	Metanol
MEV	–	Microscopia Eletrônica por Varredura
mg	–	miligramas
Mg	–	Magnésio
MHz	–	Megahertz
mL	–	mililitros
N	–	Normal
NaN₃	–	azida de sódio
Na₂CO₃	–	carbonato de sódio
Na₂SO₄	–	Sulfato de Sódio
Na₂S₂O₃	–	tiosulfato de sódio
NMDA	–	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO	–	Óxido Nítrico
NOS	–	Óxido Nítrico Sintetase
OHC	–	células ciliadas externas
PEATE	–	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
pH	–	potencial Hidrogeniônico
pKa	–	constante de dissociação ácida
ppm	–	partes por milhão
q	–	quadruplete
Q	–	quadrupolo

QSAR	–	Quantitative Structure-Activity Relationships
q.s.p	–	quantidade suficiente para
REA	–	Relação estrutura-atividade
RET	–	Relação estrutura-toxicidade
R_f	–	Fator de retenção
RMN ¹H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RMN ¹³C	–	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹⁵N	–	Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio 15
RNA	–	Ácido Ribonucléico
RNA_m	–	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA_r	–	Ácido Ribonucléico ribossômico
ROS	–	espécies reativas de oxigênio
s	–	singleto
t	–	triplete
tap	–	triplete aparente
Tf₂O	–	Anidrido Triflico
TMS	–	Tetrametilsilano
TOF	–	tempo de voo
V	–	Volts
δ	–	deslocamento químico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e símbolos	v
1. Introdução	1
1.1. Estrutura geral de aminoglicosídeos	3
1.2. Mecanismo de ação dos antibióticos aminoglicosídeos	5
1.3. Mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos.	6
1.4. Toxicidade	9
1.5. Relação estrutura atividade (REA) e Relação estrutura toxicidade (RET)	12
1.6. Estudos computacionais	15
1.7. Anátomo-fisiologia da orelha e a Doença de Ménière.	17
1.8. Experiência anterior	19
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1 Preparação dos derivados aminoglicosídeos	24
3.1.1. Preparação de acceptor derivado de neomicina	24
3.1.2. Preparação de acceptor derivado de estreptomicina	30
3.1.3. Preparação de doadores de galactose	32
3.1.4. Preparação de doador de glicose	34
3.1.5. Preparação de doador de glicosamina	36
3.1.6. Preparação dos pseudos-dissacarídeos derivados de neomicina	38
3.2. Testes de atividade biológica	41
3.2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras	41
3.2.2. Testes de ototoxicidade ⁷⁰⁻⁷²	43
4. Resultados e Discussão	47
4.1. Planejamento sintético	47
4.2. Preparação de acceptor derivado de neomicina	49
4.2.1. Obtenção de cloridrato de neamina e neamina base livre	49
4.2.2. Obtenção de bromidrato de 2-desoxi-estreptamicina	51
4.2.3. Preparação de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamicina	52
4.2.4. Preparação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamicina	53
4.3. Preparação de acceptor derivado de estreptomicina	55
4.3.1. Tentativa de peracetilação de estreptomicina e posterior fragmentação	55
4.3.2. Obtenção e peracetilação de estreptidina	56
4.4. Preparação de doadores glicosídicos	57
4.4.1 Preparação do doador de galactose	58
4.4.2. Preparação de doador de glicose	60
4.4.3 Preparação de doador de glicosamina	61
4.5. Preparação dos pseudos-dissacarídeos derivados de neomicina	62
4.6. Testes de atividade biológica	64
4.6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras	64
4.6.2. Testes de Ototoxicidade	65
5. Conclusão	68
6. Referências Bibliográficas	69
7. Anexos	78

Introdução

1. Introdução

Os antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microorganismos (bactérias, fungos, actinomicetos) e estão entre as medicações mais frequentemente prescritas. Em muitos casos a utilidade clínica dos antibióticos naturais tem sido aumentada através de manipulações químicas medicinais das estruturas originais, alargando o espectro de ação, aumentando a potência, diminuindo a toxicidade, facilitando a administração etc^{1,2}.

Os aminoglicosídeos pertencem a uma das classes de antibióticos mais antigos, sendo a estreptomicina a primeira a ser descoberta, em 1944. Rapidamente, foi seguida pelo lançamento de outra série de substâncias similares, como neomicina, paromomicina, canamicina, gentamicina e tobramicina. A partir de 1970, os antibióticos semi-sintéticos amicacina, dibecacina, sisomicina e netilmicina foram introduzidos na terapêutica com o objetivo de contornar problemas de desenvolvimento de resistência bacteriana¹.

A neomicina foi descoberta por Waksman e Lechevalier em 1949. As altas incidências de nefro e ototoxicidade impediram seu uso por via parenteral. A paromomicina, descoberta em 1956, apresenta potência muito reduzida para ser usada por via sistêmica. Esta situação foi amplamente modificada por Umezawa, ao descobrir em 1957 a canamicina, antibiótico bastante ativo que, embora não fosse atóxico, era bem tolerado por via parenteral. Até a descoberta da gentamicina em 1963, por Weinstein, a canamicina foi extensamente utilizada no tratamento de infecções sistêmicas por bactérias Gram-negativas³.

A descoberta da gentamicina foi um marco na história dos aminoglicosídeos, porque além de sua tolerabilidade razoável, é ativa contra muitas espécies de bactérias, inclusive a *Pseudomonas aeruginosa*. O sucesso clínico da gentamicina constituiu grande estímulo para a procura de antibióticos semelhantes, não tardando a descoberta de vários outros, como a tobramicina em 1968, a sisomicina e ribostamicina em 1970, lividomicina em 1971 e verdomicina em 1972. Desta nova lista de aminoglicosídeos naturais, somente a tobramicina e a sisomicina encontram aplicação terapêutica. Os dois antibióticos apresentam espectro de ação semelhante à gentamicina, sendo, entretanto, mais ativos contra algumas espécies bacterianas, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*³.

Outro caminho na história dos aminoglicosídeos surgiu com a descoberta dos mecanismos químicos da resistência mediada por fatores R (de resistência). A identificação de grupos funcionais presentes nos aminoglicosídeos, susceptíveis a metabolização por enzimas, foi particularmente estudada por Umezawa, no sentido de eliminá-los ou protegê-los sem que o antibiótico sofresse redução de sua atividade ou elevasse a sua toxicidade. As manipulações da molécula de canamicina resultaram na síntese de amicacina, antibiótico bastante ativo e resistente à maioria das enzimas que inativa a gentamicina. Mais recentemente, manipulações semelhantes levaram à síntese de netilmicina, cujo destaque principal é a menor toxicidade³.

Os antibióticos aminoglicosídeos são derivados de *Streptomyces* spp. (estreptomicina, neomicina e tobramicina), ou *Micromonospora* spp. (gentamicina) ou obtidos por semi-síntese (netilmicina, amicacina, arbecacina e isepamicina). Eles exibem atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microorganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, micobactérias e protozoários⁴.

Os aminoglicosídeos são transportados pela membrana plasmática em um processo dependente de oxigênio, não exercendo atividade em microorganismos anaeróbios⁴. Estes se difundem através dos canais aquosos formados por proteínas do tipo porina na membrana externa das bactérias Gram-negativas e, desse modo, penetram o espaço periplasmático. Dada a sua alta polaridade, a difusão através da membrana celular é difícil e por isso, os aminoglicosídeos se ligam a lipopolissacarídeos externos, podendo ser difundidos em pequenas quantidades para dentro da bactéria. Já no citoplasma, eles se ligam ao sítio A da região decodificadora na porção 16S do RNA ribossômico bacteriano, ocasionando uma falha no processo de tradução ou a interrupção prematura da síntese protéica, levando a bactéria à morte^{1,2,5}.

Na prática clínica, as moléculas mais freqüentemente prescritas são gentamicina, tobramicina e amicacina, enquanto estreptomicina ainda se mantém como importante ferramenta no tratamento da tuberculose, brucelose, tularaemia e peste bubônica⁴.

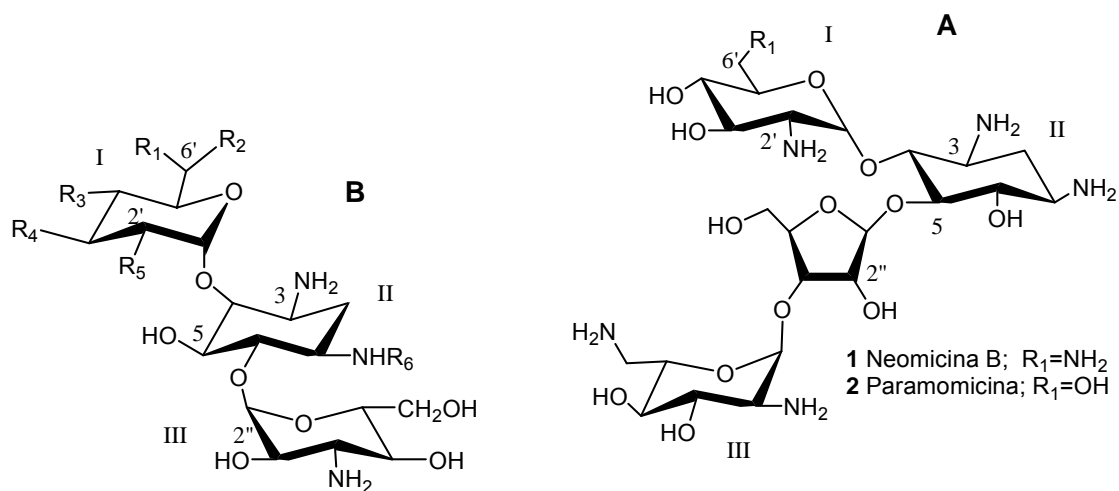
Apesar de seu mecanismo de ação seletivo, os aminoglicosídeos são extremamente tóxicos⁶. A nefrotoxicidade e ototoxicidade são mais freqüentemente observadas, já o bloqueio neuromuscular é mais raro. O mecanismo exato da toxicidade destes antibióticos é desconhecido, embora se saiba que eles se

acumulam nas células corticais renais sendo capazes de provocar danos aos túbulos proximais. A nefrotoxicidade é dose dependente e geralmente reversível quando o tratamento é interrompido. O maior problema está na ototoxicidade que pode levar, dependendo do fenótipo do paciente, a um dano vestibular e/ou coclear irreversível⁷.

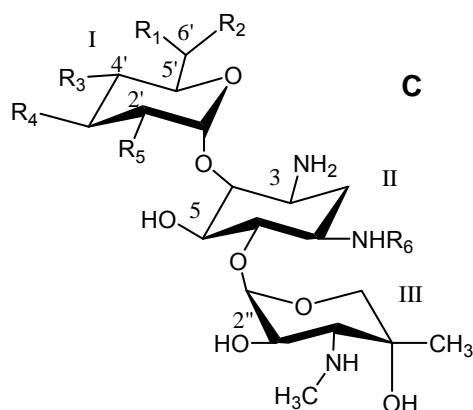
Os antibióticos aminoglicosídeos foram os primeiros fármacos a chamar atenção para o problema da ototoxicidade (toxicidade coclear e vestibular) quando estreptomicina e diidroestreptomicina foram usadas para o tratamento da tuberculose⁸.

1.1. Estrutura geral de aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são moléculas hidrofílicas, formadas por um anel aminociclitol ligado a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica. Na maioria destes compostos com utilidade clínica, o grupo aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, que pode ser dissubstituída na posição 4 e 5, ou 4 e 6 (**Figura 1**). A classificação mais usada refere-se ao anel **I** como sendo o amino açúcar que se liga na posição 4 da 2-desoxi-estreptamina. O anel **II** é o grupo aminociclitol central (2-desoxi-estreptamina), enquanto que o anel **III** é o amino açúcar que se liga à posição 5 ou 6 da desoxi-estreptamina. O anel **IV** corresponde a qualquer anel adicional ligado ao anel **III**⁹.



- 3 Canamicina A; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OH}$, $R_6 = \text{H}$
 4 Canamicina B; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 5 Tobramicina; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 6 Dibecacina; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 7 Amicacina; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OH}$, $R_6 = \text{COCOH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$



- 8 Gentamicina B; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OH}$, $R_6 = \text{H}$
 9 Gentamicina C1; $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{NHCH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 10 Gentamicina C1A; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 11 Gentamicina C2; $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$
 12 Sisomicina; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{H}$ (dupla ligação entre 4' e 5')
 13 Netilmicina; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{NH}_2$, $R_6 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (dupla ligação entre 4' e 5')

Figura 1: Estrutura química dos principais antibióticos aminoglicosídeos da classe das 2-desoxi-estreptamínas. **A** são 4,5 dissustituídos, enquanto **B** e **C** são do grupo das 4,6 dissustituídos.

Contudo existem aminoglicosídeos atípicos (**Figura 2**), que não se encaixam nesta classificação como, por exemplo, a estreptomicina que possui como aminociclitol estreptidina (**II'**), e a espectinomicina que consiste em três anéis fundidos, onde o anel aminociclitol é a espectinamina (**II''**)⁹.

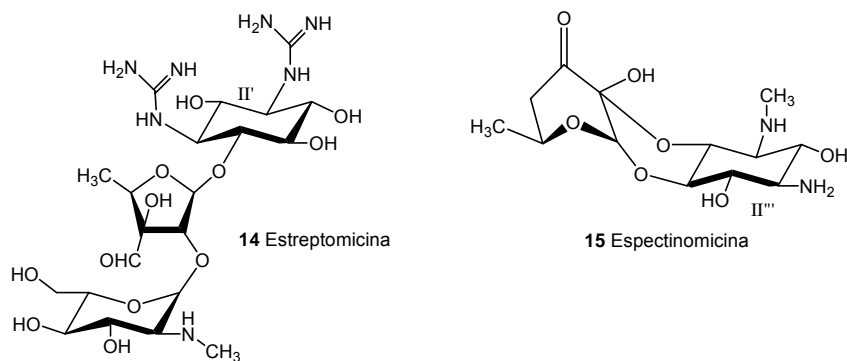


Figura 2: Antibióticos cujo anel derivado ciclitol não é a 2-desoxi-estreptamina.

1.2. Mecanismo de ação dos antibióticos aminoglicosídeos

Um dos principais alvos de fármacos bactericidas é o ribossomo. O ribossomo é um grande complexo de ribonucleoproteína responsável pela síntese de cadeias polipeptídicas, baseadas em informações contidas no RNA mensageiro (RNAm)¹⁰.

No citoplasma, os antibióticos ligam-se ao sítio A da região decodificadora na porção 16S da subunidade 30S do RNA ribossômico bacteriano. Em consequência, ocorre falha na tradução e seleção de aminoácidos incorretos, formando proteínas aberrantes. Estas proteínas “não naturais” são utilizadas na formação da membrana bacteriana e suas presenças destroem a semipermeabilidade levando à morte do microorganismo².

O mecanismo molecular de ação bactericida dos aminoglicosídeos está relacionado com sua ligação intra-hélice do sítio A. Ao se ligar, a região de neamina, de neomicina, por exemplo, promove a estabilização de duas bases adenina (A1492 e A1493) em uma conformação extra-hélice, o que aumenta a sua interação com o RNA-t, fazendo com que ocorram erros de tradução das cadeias peptídicas, levando a bactéria à morte¹⁰.

O complexo do antibiótico paromomicina com a subunidade 16S do RNAr do sítio bacteriano está demonstrado na **figura 3** a seguir:

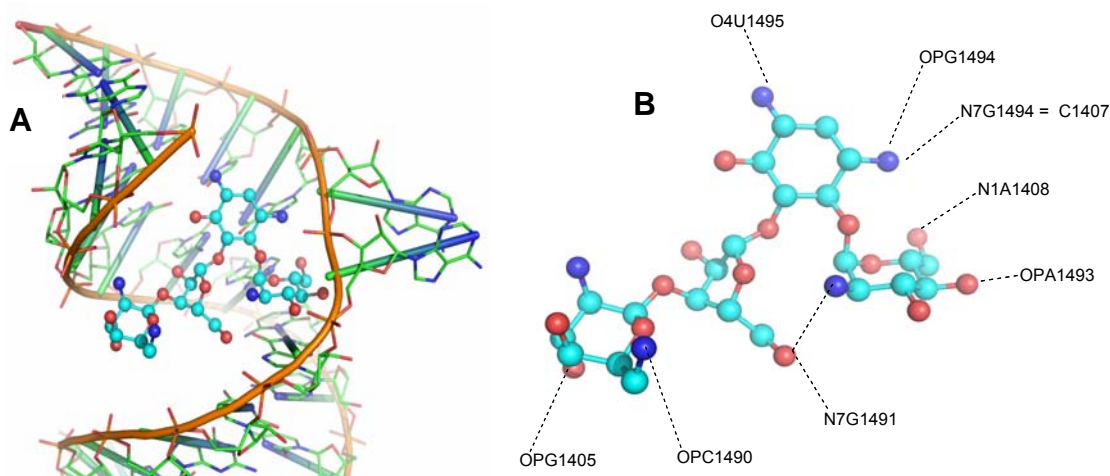


Figura 3: **A.** Estrutura cristalográfica do complexo de paromomicina com a hélice 44 da subunidade 16S do RNAr do sítio bacteriano, código PDB 1J7T. Paromomicina está representada em “ball and stick” (azul claro: carbono, azul escuro: nitrogênio, e vermelho: oxigênio) e RNAr em “stick” (verde: carbono, azul escuro: nitrogênio, e vermelho: oxigênio). **B.** Principais interações entre paromomicina e o subdomínio 16S do RNAr, indicado pelos números dos nucleotídeos para os ribossomos homólogos de *E. coli* e o correspondente grupo funcional do nucleotídeo¹¹ (da Silva).

1.3. Mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos.

Os mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos têm sido objeto de vários estudos genéticos e bioquímicos^{12,13}. As bactérias podem ser resistentes à atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos em virtude da diminuição da permeação do antibiótico, da baixa afinidade do fármaco ao ribossomo bacteriano (devido a alterações no sítio ligante ribossômico) ou a inativação do fármaco por enzimas microbianas. Este último mecanismo é nitidamente a explicação mais importante para a resistência encontrada na prática clínica^{1,14}.

A diminuição na concentração de aminoglicosídeos dentro da célula alvo, pela redução da penetração do fármaco e/ou ativação do efluxo do fármaco, afeta a suscetibilidade da cepa a todas as classes de compostos aminoglicosídeos e pode ser causa de resistência intrínseca ou adquirida. Embora o mecanismo exato da penetração dos aminoglicosídeos permaneça desconhecido, é aceito que o processo consiste em três etapas consecutivas^{15,16}. A primeira etapa consiste na adsorção do aminoglicosídeo (composto catiônico) à superfície da bactéria através de interações eletrostáticas com os lipopolissacarídeos, carregados negativamente. As próximas duas etapas são dependentes do potencial de *trans*-membrana, gerado pela cadeia respiratória, que é caracterizado pelo aumento na taxa de penetração do

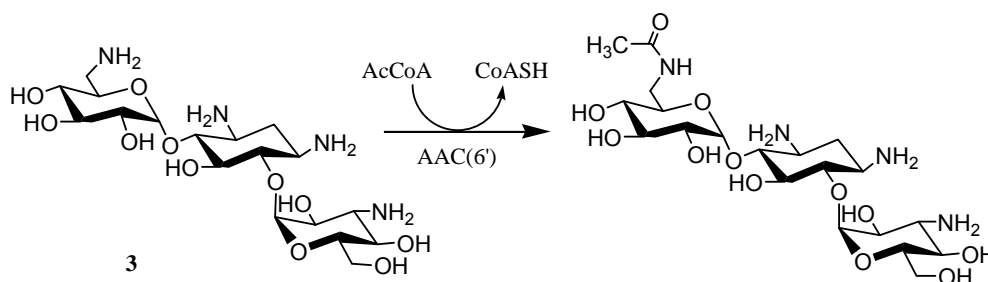
fármaco. Como resultado, bactérias anaeróbicas são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos devido à impermeabilidade. Similarmente, cepas contendo mutações funcionais em suas ATP sintases apresentam suscetibilidade reduzida aos aminoglicosídeos. Tais mutantes têm sido isolados de endocardites clínicas ou experimentais causadas por infecções com *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*^{9,17,18}.

Metilação do 16S RNAr no interior da subunidade 30S em espécies como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, e *Klebsiella* prejudica a ligação dos aminoglicosídicos, conferindo resistência ao fármaco. Esse tipo de mecanismo é natural dos actinomicetos para resistir ao próprio aminoglicosídeo produzido⁴.

Resistência aos aminoglicosídeos pela mutação do alvo ribossômico é clinicamente relevante somente para a estreptomicina no *M. tuberculosis*. *Mycobacterium* é o único gênero de eubactéria com espécies que contém uma cópia simples do *operon* ribossômico, o qual implica que uma simples mutação pode levar a produção de uma população homogênea de ribossomos mutantes e isto pode resultar em resistência, indiferente da natureza recessiva da mutação envolvida⁹.

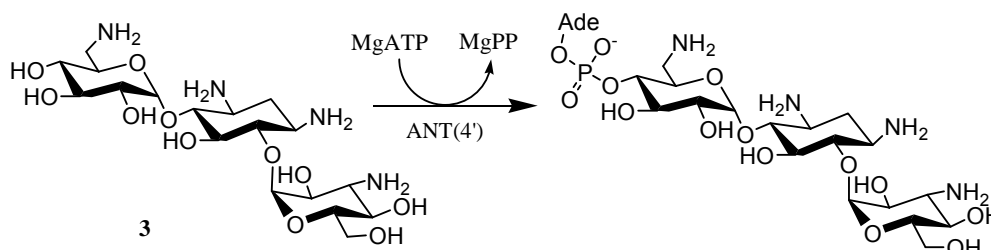
A maioria da resistência aos aminoglicosídeos é causada pela inativação por enzimas bacterianas intracelulares¹⁹. Devido às diferenças estruturais, amicacina (**7**) não é inativada pelas enzimas comuns que inativam a gentamicina (**8-11**) e tobramicina (**5**). Conseqüentemente, com o aumento do uso de amicacina (**7**), uma menor incidência de resistência tem sido observada quando comparada com gentamicina (**8-11**) e tobramicina (**5**)²⁰.

As aminoglicosídeo-acetil-transferases (AACs) catalisam a acetilação regioseletiva de um dos grupos amino do antibiótico aminoglicosídeo (**Esquema 1**). A acetilação reduz a afinidade destes compostos pelo seu alvo (subunidade 30S do ribossomo) na ordem de até quatro vezes. A acetilação dos aminoglicosídeos acontece após a ligação de ambos, acetil-CoA (cofator) e grupo amino dos aminoglicosídeos, à enzima. Foi proposto que o mecanismo de ligação é por via ataque nucleofílico direto do amino ao tioéster do acetilCoA²¹.



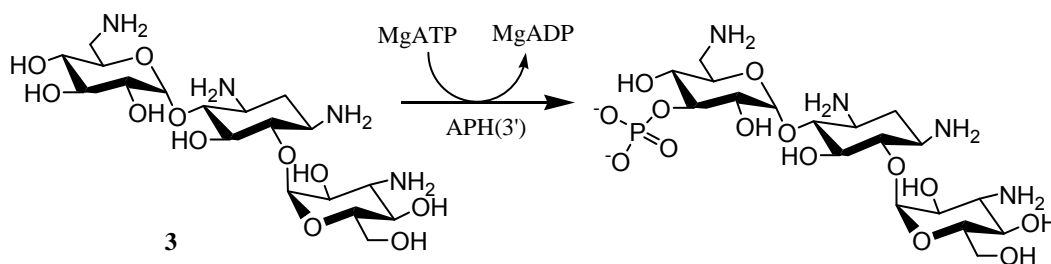
Esquema 1. Modificação na molécula de canamicina A (**3**) promovida pela enzima bacteriana Aminoglicosídeo-acetil-transferase AAC(6').

As aminoglicosídeo-nucleotidil-transferases (ANTs) representam a menor classe das enzimas inativantes. Aminoglicosídeos importantes na clínica tais como gentamicina (**8-11**) e tobramicina (**5**) são modificados por essas enzimas. Existem 10 ANTs identificadas. Estas enzimas catalisam a reação entre Mg-ATP e aminoglicosídeo para formar O-adenilato aminoglicosídeo e quelato de magnésio de pirofosfato inorgânico (**Esquema 2**). A enzima funciona como um dímero, com o sítio ativo na interface e com os monômeros contribuindo com resíduos para estabilizar os substratos. O posicionamento direciona o ataque nucleofílico da hidroxila do antibiótico ao α -fosfato do ATP¹⁹.



Esquema 2. Modificação na estrutura de canamicina A (**3**) promovida pela enzima bacteriana Aminoglicosídeo-nucleotidiltransferase ANT(4').

A fosforilação do antibiótico resulta em um dramático efeito em sua capacidade de ligar em seu alvo no sítio A do ribossomo. Aminoglicosídeos fosfotransferases (APHs) catalisam a transferência régio-específica do grupo γ -fosforil do ATP para uma das hidroxilas substituintes presentes no aminoglicosídeo (**Esquema 3**). As APHs incluem um grande número de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e são as mais relevantes para resistência clínica aos aminoglicosídeos pelos organismos Gram-positivos²².



Esquema 3. Modificação na estrutura de canamicina A (3) promovida pela enzima bacteriana Aminoglicosídeo-fosfotransferase APH (3').

O aminoglicosídeo mais susceptível às alterações por enzimas bacterianas é a canamicina B (4)²³. A **Figura 4** demonstra os sítios de ação das enzimas bacterianas na molécula de Canamicina B (4), inativando o antibiótico aminoglicosídeo.

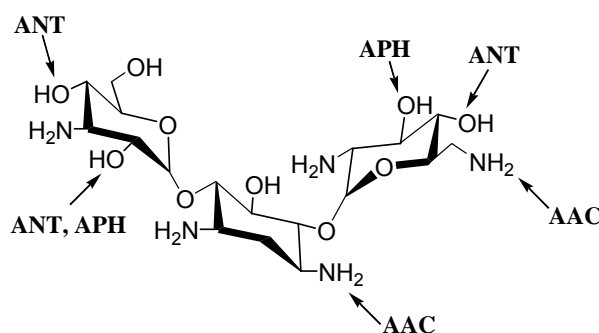


Figura 4. Sítios de modificação pelas enzimas bacterianas na molécula da **canamicina B (4)**, onde **AACs** promovem a acetilação dos grupamentos amino apontados na molécula; **APHs** promovem a fosforilação das hidroxilas apontadas; e **ANTs** promovem a adenilação das hidroxilas apontadas.

1.4. Toxicidade

Durante muitos anos os aminoglicosídeos e seus derivados foram extensivamente estudados em relação estrutura-atividade com o objetivo de aumentar sua ação antibacteriana e reduzir o aparecimento de bactérias resistentes. No entanto, os estudos sobre toxicidade são restritos, as conclusões apresentadas são gerais e mostram apenas certa ordem de toxicidade geral. Em termos de DL₅₀, neomicina é cerca de cinco vezes mais tóxica que canamicina A, enquanto o derivado *N*-acetilado de canamicina A é trinta vezes menos tóxico que o correspondente composto com grupo amino livre. Adicionalmente, os estudos realizados por Owada em cobaias, envolvendo produtos de hidrólise de canamicina A, mostraram que 2-desoxi-estreptamina possui alta toxicidade aguda, semelhante a

canamicina, enquanto as unidades 6-aminoglicose e 3-aminoglicose produzem efeitos letais apenas em doses bem mais elevadas²⁴.

Nefrotoxicidade pode ser observada pelo aumento na concentração de creatinina no soro, ≥ 44 $\mu\text{mol/l}$ (0.5 mg/ml), proteinúria leve, hipofosfatemia, hipocalemia e hipocalcemia²⁵.

As células do epitélio tubular proximal são as mais sensíveis aos aminoglicosídeos, entretanto, sua capacidade regenerativa pode ajudar rejuvenescer a função renal²⁶.

Uma hipótese levantada é que hipofunção renal poderia resultar em aumento da concentração de antibióticos aminoglicosídeos, o que poderia causar ototoxicidade, porém, existem alguns estudos mostrando que a nefrotoxicidade e ototoxicidade são independentes, como o estudo em que pacientes com níveis de gentamicina e tobramicina no soro entre 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ ou amikacina entre 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ pode exibir perda de audição concomitantemente com função renal normal ou anormal função renal com normal função auditiva. Adicionalmente, um estudo relata que a chance de ocorrência simultânea de nefrotoxicidade e ototoxicidade é de 3,1% e vários estudos têm revelado não haver nenhum significado estatístico relevante²⁷.

A susceptibilidade dos pacientes a ototoxicidade depende de vários fatores, como via de administração (perfusão sistêmica ou através da membrana timpânica), genótipo, e condição médica pré-existente²⁷.

Embora todos os aminoglicosídeos sejam capazes de afetar as funções coclear e vestibular, é evidente que existe certa seletividade entre os diversos fármacos. Os efeitos ototóxicos de aminoglicosídeos foram testados em cultura de células cocleares, em concentrações variando entre 0,25 e 1,0 mM. O antibiótico que apresentou maior capacidade de provocar danos às células cocleares foi a neomicina, seguida pela gentamicina, diidroestreptomicina, amicacina, neamina (produto de fragmentação da neomicina) e espectinomicina²⁸.

Em outro estudo, foram comparados os efeitos tóxicos de alguns aminoglicosídeos, administrados por via sistêmica (doses de 125 mg/kg, 50 mg/kg, 150 mg/kg ou 37,5 mg/kg, duas vezes ao dia por 1 semana) e por via trans-timpânica (0,25 mL/kg em solução salina a 4%, duas vezes por dia por 1 semana) à cóclea de cobaias. Gentamicina foi a mais tóxica dos testados, seguida por amicacina, estreptomicina e netilmicina. Não foi detectada diferença estatística entre o dano coclear resultante da administração sistêmica e tópica²⁹.

Já em relação à toxicidade ao vestíbulo, foi realizado um estudo comparando os efeitos vestibulares pela administração sistêmica e trans-timpânica dos aminoglicosídeos mais utilizados na prática clínica. As duas vias de administração estudadas apresentaram alterações histopatológicas semelhantes no vestíbulo. A maior alteração foi observada para a estreptomicina, seguida pela gentamicina, amicacina e netilmicina³⁰.

Até o momento, o mecanismo relacionado com esta seletividade (vestibulotóxica ou cocleotóxica) observada é desconhecido. Embora várias publicações descrevam os danos vestibulares e cocleares provocados pelos aminoglicosídeos, existem poucos experimentos comparativos³¹.

As moléculas de antibióticos aminoglicosídeos não são tóxicas por si só, mas requerem a capacidade redox de um metal de transição para induzir a ototoxicidade⁸. Os grupos amino e hidroxila desprotonados dos aminoaçúcares participam da quelação dos íons metálicos para a produção de complexos. Estes complexos metálicos são redox-ativos e geram espécies reativas de oxigênio (ROS), o que induz danos oxidativos nas biomoléculas. Acredita-se que complexos de aminoglicosídeos com ferro potencializam os danos ao ouvido interno²⁷.

Song e Schacht (1996)³² mostraram que a ototoxicidade a gentamicina pode ser inibida por quelantes de ferro e seqüestradores de radicais livres.

Conlon e Smith (1998)³³ demonstraram que suplemento de ferro exacerba a ototoxicidade dos aminoglicosídeos, tratando cobaias com gentamicina e suplemento de ferro. Não houve diferenças estatísticas significantes do nível de gentamicina no soro entre os grupos que receberam gentamicina sozinha e com o suplemento. Em cobaias tratadas apenas com suplemento de ferro não foram observados danos.

Poucos estudos têm mostrado que o genótipo pode contribuir para a suscetibilidade dos pacientes aos aminoglicosídeos, entretanto existem vários estudos que sugerem que a existência de condições médicas pré-existentes, podem aumentar a ototoxicidade dos aminoglicosídeos²⁷.

A análise histopatológica pós-morte dos ossos temporais de humanos fornece valiosas informações sobre a vulnerabilidade das células do ouvido interno e o padrão espaciotemporal de degeneração do tecido²⁷.

Huizing e Groot (1987)³⁴ relataram os resultados histopatológicos da ototoxicidade dos aminoglicosídeos de 21 pacientes. Os resultados mostraram que

as células ciliadas externas (OHC) na base da cóclea são predominantemente afetadas, seguidas pelas células ciliadas internas (IHC). Degeneração das fibras nervosas, neurônios do gânglio espiral e células de sustentação foram secundários em relação aos danos das células ciliadas.

Sone e col. (1998)³⁵ relataram achados histopatológicos de pacientes com fibrose cística, tratados com tobramicina (i.v.). Quatro ossos temporais tiveram perda das células ciliadas e neurônios do gânglio espiral na base da cóclea. Seis ossos temporais apresentaram perda difusa ou nenhuma perda das células ciliadas entre os neurônios do gânglio espiral degenerado. Os autores concluíram que a degeneração dos gânglios espirais pode ocorrer independente do dano das células ciliadas.

1.5. Relação estrutura atividade (REA) e Relação estrutura toxicidade (RET)

Os estudos de relação estrutura atividade (REA) apresentam conclusões formuladas a partir da comparação das estruturas de ocorrência natural dos aminoglicosídeos, das obtidas por modificações semi-sintéticas e a descoberta dos sítios de inativação pelas enzimas bacterianas²³.

O anel I é de fundamental importância para a atividade de amplo espectro e também é o principal alvo para as enzimas inativantes bacterianas. As funções amino em 6' e 2' são particularmente importantes como na canamicina B (6'-amino, 2'-amino) que é mais ativa que a canamicina A (6'-amino, 2'-hidroxil), que por sua vez é mais ativa que a canamicina C (6'-hidroxil, 2'-amino). Metilação nas posições 6' ou 2' não diminuem muito a atividade antibacteriana e conferem resistência à acetilação enzimática do grupo amino em C-6'. A remoção da hidroxila em 3' ou em 4', ou em ambas as posições nas canamicinas, não reduz a potência antibacteriana. As gentamicinas também não têm funções hidroxila nestas posições, assim como sisomicina e netilmicina, que também possuem uma dupla ligação entre as posições 4' e 5'. Nenhum desses derivados é inativado pela enzima fosfotransferase, que fosforila a hidroxila da posição 3'. Evidentemente os derivados fosforilados em 3' têm muito menos afinidade pelo sítio ativo no ribossomo bacteriano²³.

Poucas modificações são possíveis no anel II, já que este é o principal envolvido na ligação do antibiótico ao receptor. Contudo, o grupo amino na posição

1 da canamicina A pode ser acilado (amicacina, por exemplo) sem perder a atividade. Netilmicina conserva a potência antibacteriana da sisomicina sendo resistente a várias enzimas bacterianas²³.

Os grupos funcionais do anel III parecem ser menos sensíveis às modificações estruturais quando comparado com o anel I ou II. Embora as 2''-desoxigentamicinas serem significativamente menos ativas em relação às 2''-hidroxi-, os derivados 2''-amino são mais ativos. O grupo amino em C-3'' das gentamicinas pode ser primário ou secundário com alta potência antibacteriana. Além disso, a hidroxila em 4'' pode ser axial ou equatorial com pequena mudança na potência²³.

Um estudo recente sobre relação estrutura toxicidade de derivados pseudodissacarídeos (NB23 e Gentamina C_{1A}), contendo o anel aminociclitol 2-desoxiestreptamina, miméticos a neamina, sugeriu que a basicidade de 2'-NH₂ esta relacionada com a toxicidade aguda dos aminoglicosídeos. Baseado nos dados obtidos, foi sintetizado um novo pseudo-trissacarídeo (NB45) que apresentou atividade antibacteriana significativa e baixa toxicidade aguda³⁶, **Figura 5**.

Os pKas dos grupos amina foram analisados individualmente por RMN de ¹⁵N, através da comparação dos deslocamentos químicos do grupo amino em questão em diferentes valores de pH. Quanto mais blindado o nitrogênio do grupo amina, maior seu caráter básico. Como já era previsto o grupo 2'-NH₂ da Gentamina C_{1A} é o mais básico, pois não possui grupos vizinhos sacadores de elétrons, como hidroxila ou metilenodioxí, sendo o oxigênio do grupo metilenodioxí menos sacador de elétrons devido ao efeito indutivo do grupo metileno de NB23³⁶.

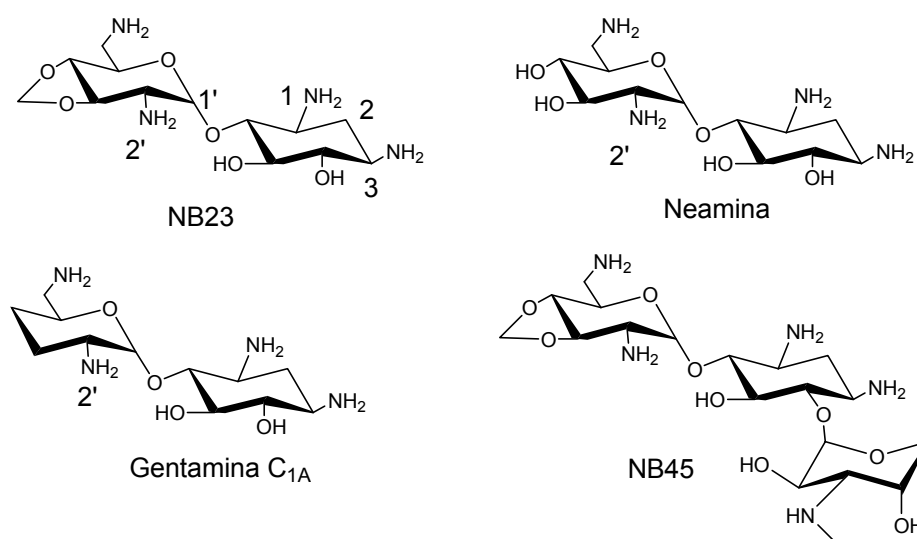


Figura 5. Derivados aminoglicosídeos.

Ensaio de toxicidade letal aguda (DL₅₀) e de atividade antibacteriana (MIC) mostraram que o composto NB23, embora seja consideravelmente menos tóxico (pKa 6,02, DL₅₀ 303 mg/kg, MIC = >384 ug/mL) que neamina (pKa 7.2, DL₅₀ 160 mg/kg, MIC = 96 ug/mL) e quase três vezes menos tóxico que a Gentamina C_{1A} (pKa 8.4, DL₅₀ 103 mg/kg, MIC = 192 ug/mL), apresenta a menor atividade antimicrobiana³⁶.

Os compostos foram também analisados em relação à enzima de resistência APH(3'), sendo que NB23 e Gentamina C_{1A} não foram bons substratos para esta enzima³⁶.

Com estes dados, portanto, almejando a obtenção de um composto com baixa toxicidade e boa atividade antimicrobiana, foi realizada a síntese de NB45, mimética a Gentamicina C_{1A} (**10**), a partir de NB23, e comparadas também suas atividades antibacterianas (MICs), as quais foram similares, porém o composto NB45, foi aproximadamente três vezes menos tóxico que Gentamicina C_{1A} (DL₅₀ 226 e 70 mg/kg, respectivamente)³⁶.

Owada²⁴ avaliou a cocleotoxicidade das diferentes unidades que compõe a canamicina A (I, II, III) e verificou que a unidade **III**, relacionada ao grupo 3-aminoglicose, foi o mais tóxico e promoveu surdez em cobaias em período de tratamento três vezes menor do que a própria canamicina. Em contrapartida, as unidades de 2-desoxi-estreptamina (**II**) e 6-diaminoglicose (**I**) foram praticamente atóxicas em termos de cocleotoxicidade. Estes resultados são bastante interessantes porque a unidade **III** é a que apresenta a menor toxicidade letal aguda em relação às outras unidades e a própria canamicina A, quando usada em camundongos, mas não em cobaias. A importância do anel **III** na ototoxicidade é ainda mais evidente quando derivados O-metilados e N-acetilados de **III** são, reconhecidamente, muito menos tóxicos do que os correspondentes derivados O ou N-desprotegidos.

Outro estudo que relata sobre a relação estrutura-toxicidade de aminoglicosídeos concluiu que a cocleotoxicidade está diretamente relacionada com o número de grupamentos amino ionizáveis presentes nas porções glicosídicas ligadas ao anel de 2-desoxi-estreptamina³⁷.

1.6. Estudos computacionais

A maioria dos métodos computacionais foi desenvolvida para ligantes de proteína e não podem ser facilmente transferido para os RNAs. A natureza química do RNA, diferentemente das proteínas, prefere ligantes altamente carregados, oferecendo pouco ou nenhum contato hidrofóbico³⁸.

O ribossomo bacteriano tem sido reconhecido como um alvo importante para a descoberta de antibióticos. Recentemente, grandes avanços na determinação da estrutura do ribossomo forneceram conhecimentos sem precedentes sobre a função do ribossomo e da ação de muitas classes de inibidores. Estes, juntamente com os avanços nos métodos computacionais para a concepção de fármacos e novas ferramentas genéticas, bioquímicas e biofísicas, fornecem uma base sólida para a concepção racional de fármacos³⁹.

Várias estratégias são utilizadas com o intuito de descobrir novos ligantes de RNA. Uma delas baseia-se em mimetizar os antibióticos aminoglicosídeos e usar uma abordagem combinatória para a construção de seus derivados. Outra abordagem baseia-se em planejar moléculas diméricas, usando-se como monômeros os antibióticos aminoglicosídeos já conhecidos, podendo estes dímeros possuírem monômeros iguais ou diferentes. Outra estratégia envolve o estudo da ligação de fragmentos derivados de aminoglicosídeos ao sítio farmacóforo, os quais podem ser usados como blocos de construção, almejando um melhor ligante. A concepção racional de derivados aminoglicosídeos com base nas informações estruturais por modelagem molecular através de análises dos complexos RNA-aminoglicosídeos é uma abordagem mais recente no planejamento destes derivados, a qual pode orientar uma busca mais efetiva de um bom ligante. Nesta revisão, os autores consideraram as importantes contribuições de cada anel dos antibióticos aminoglicosídeos, os últimos avanços na modificação dos aminoglicosídeos e as descrições pormenorizadas sobre a REA de derivados aminoglicosídeos, além de novas atividades exercidas pelos derivados⁴⁰.

Na maioria das estratégias de desenvolvimento de um novo candidato a ligante do sítio A, a estrutura de neamina é reconhecida como um bom protótipo na busca de novos fármacos. Setny e cols. (2009)¹⁰ desenvolveram um modelo computacional para a busca de pequenas moléculas baseado em relações estrutura-atividade de inibidores já conhecidos, contendo a estrutura de neamina presente na

sua estrutura final, com o objetivo de obter protótipos capazes de se ligar ao sítio A, explorando os oxigênios O-5 e O-6 da neamina. Para isso foram construídos dois modelos farmacofóricos, um para os derivados 2-desoxi-estreptamina 4,5-dissubstituídos e outro para os 2-desoxi-estreptamina 4,6-dissubstituídos, baseados no alinhamento 3D das estruturas cristalizadas ligadas ao sítio A, e usando como modelo a estrutura cristalina da paromomicina (**2**) ligada ao 16S RNA, **figura 6** (PDB, entrada 1J7T)⁴¹.

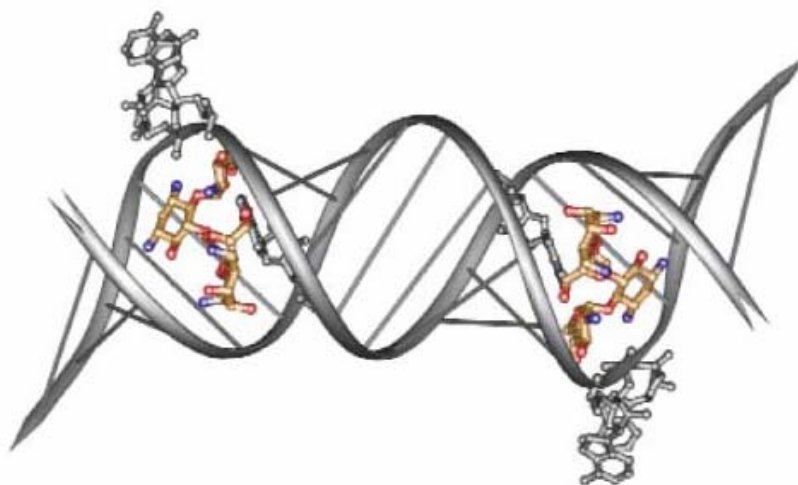


Figura 6. Complexo entre paromomicina (**2**) e sítio A do ribossomo bacteriano (figura modificada⁴¹).

Os estudos de “QSAR” (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) por CoMFA (análise comparativa de campos moleculares) e CoMSIA (análise comparativa de índices de similaridade molecular) descreveram a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo de prova. Estes estudos mostraram que quando as moléculas com substituintes distintos para o núcleo comum de neamina são consideradas, as diferenças em suas atividades dependem principalmente dos padrões de ligações de hidrogênio e da distribuição dos fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, ao invés de interações eletrostáticas, já que a maior contribuição para as interações eletrostáticas destes derivados vem da carga dos quatro grupos aminos protonados presentes na unidade em comum de neamina, e, portanto, não contribuiu muito para a variabilidade em suas atividades, demonstrando que estas interações eletrostáticas são de grande relevância para a atividade da molécula. Em contraste, as propriedades da ligação de hidrogênio dos substituintes de neamina são diversas e, portanto, responsável pelas diferenças de

interações ligante-RNA. A previsão de atividades dos quatro melhores compostos (derivados 2-desoxi-estreptamina 4,5 e 4,6 dissubstituídos) permaneceu dentro do intervalo de atividade dos antibióticos aminoglicosídeos menos potente, porém como este estudo não foi muito otimizado para interações com RNA, seu aperfeiçoamento ainda é possível¹⁰.

1.7. Anátomo-fisiologia da orelha e a Doença de Ménière.

Anatomicamente a orelha é dividida em três partes: orelha externa, orelha média e orelha interna. A orelha interna se localiza dentro do osso temporal e do ponto de vista funcional, ela se compõe em duas partes, o órgão vestibular ou labirinto posterior e o órgão auditivo ou labirinto anterior⁴², **Figura 7**.

O órgão auditivo é denominado cóclea. A cóclea é formada por três canais tubulares de disposição paralelamente enrolados, de modo a formarem uma estrutura helicoidal. Esses canais são conhecidos como rampa vestibular, rampa intermediária ou canal coclear, e rampa timpânica. No limite entre a rampa timpânica e a intermediária, aparece a importante membrana basilar, que sustenta o aparelho sensorial propriamente dito, o **órgão de Corti**. As células receptoras são as células ciliadas, visto que apresentam prolongamentos submicroscópicos com aspectos de pêlos, os estereocílios. O movimento destes cílios induzidos pelos líquidos peri e endolinfáticos provocam o estímulo auditivo^{42,43}.

O aparelho vestibular consta de três canalículos ou canais semicirculares e por duas estruturas otolíticas, o utrículo e o sáculo, que se ligam diretamente com a cóclea. O conjunto de canalículos semicirculares corresponde ao receptor ampular. Os receptores posturais angulares estão localizados na ampola, que se refere a uma estrutura dilatada do canal semicircular na base de implementação do mesmo. O órgão otolítico está representado pelo **utrículo** (onde se encontra a mácula, que tem caráter receptivo) e o **sáculo**, que também possuem células ciliadas que, quando estimuladas pelo movimento dos otólitos na endolinfa, fornecem importantes informações para o reconhecimento da direção e orientação no espaço^{42,43}.

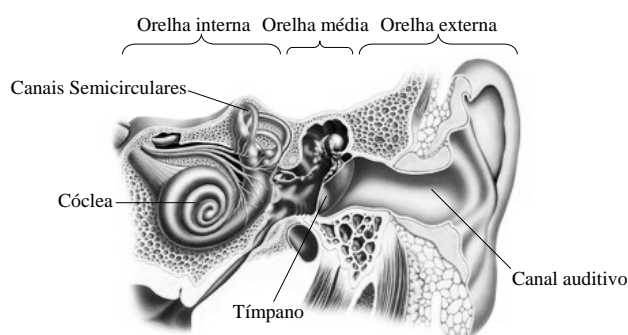


Figura 7. Orelha humana (figura modificada⁴⁴).

A doença de Ménière é uma patologia da orelha interna que se caracteriza por crises paroxísticas de vertigem típica, hipoacusia neurossensorial flutuante, zumbidos e sensações de pressão na orelha afetada^{45,46}.

O problema básico da doença, seja ela de causa conhecida ou não, reside na má absorção da endolinfa ao nível do ducto e/ou saco linfático. Na medida em que a produção de endolinfa se mantenha constante e a sua reabsorção diminuída ou abolida, ocorrerá um acúmulo desse líquido no interior do sistema endolinfático (hidropsia), elevação da pressão hidrostática e, finalmente, hipertensão do sistema acrescida de todas as suas conseqüências⁴⁵.

A vertigem paroxística é o sintoma mais incapacitante dessa doença, estando presente em 96,2% dos casos⁴⁵. Não existe tratamento eficaz da Doença de Ménière até o momento e os tratamentos clínicos ou cirúrgicos disponíveis não são efetivos ou promovem riscos para os pacientes. Devido a estes inconvenientes, o uso de antibiótico aminoglicosídeo vestibulotóxico, estreptomicina (**14**) e gentamicina (**8-11**), tem sido proposto para provocar uma labirintectomia química na orelha doente⁴⁶⁻⁴⁹. Com a lesão química do epitélio vestibular os principais sintomas incapacitantes, como a vertigem, são quase totalmente abolidos⁴⁹. O uso desta técnica é preferível em relação às intervenções cirúrgicas intracranianas por ser mais segura e apresentar resultados satisfatórios. Idealmente, a aplicação intratimpânica de aminoglicosídeo não poderia apresentar efeitos adversos em relação à audição. Entretanto, os aminoglicosídeos são tóxicos tanto ao vestíbulo quanto à cóclea, embora exista certa seletividade. Geralmente, o controle da vertigem acontece em 90-100% dos pacientes. Em contrapartida, cerca de 30% dos pacientes tratados sofrem com a perda da audição³².

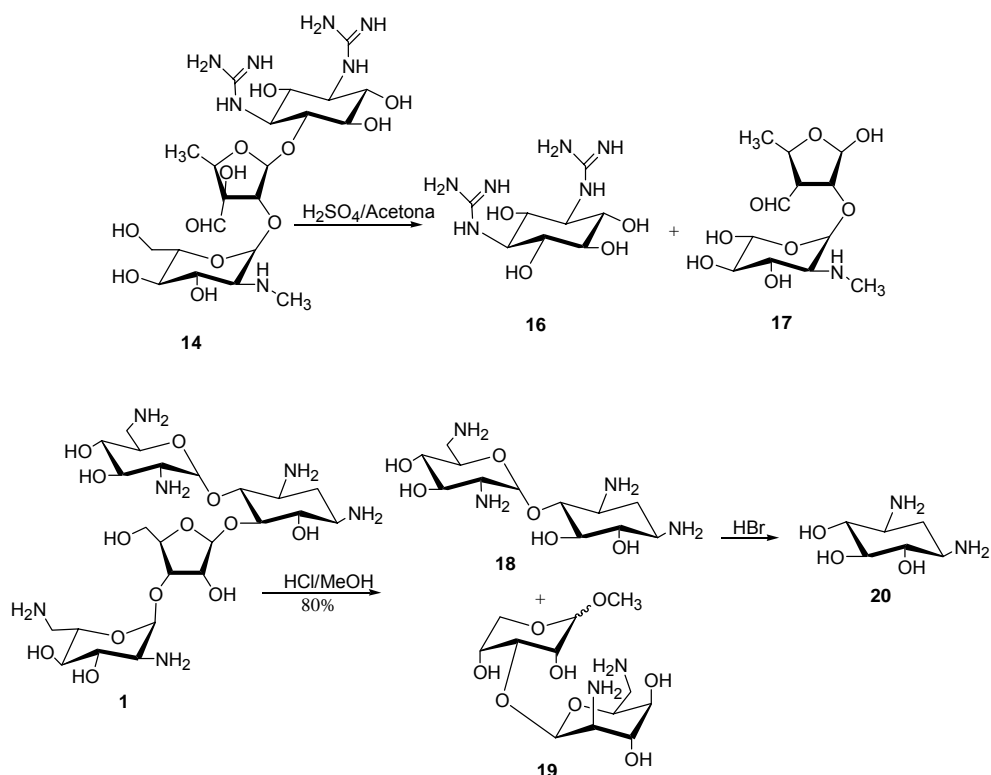
1.8. Experiência anterior

O estudo de relação estrutura-toxicidade dos resíduos de fragmentação de antibióticos aminoglicosídeos pode originar produtos simplificados, com atividade vestibular seletiva, dissociada da atividade coclear, mais seguros para o tratamento da Doença de Ménière. Nós temos realizado a fragmentação química dos antibióticos estreptomina e neomicina, no sentido de gerar derivados simplificados destes antibióticos e avaliar sua correspondente atividade coclear e vestibular.

A estreptidina foi empregada em experimentos de ototoxicidade em guinea-pigs (*in vivo*) e em ensaios antimicrobianos (*in vitro*). No entanto, os resultados obtidos com este resíduo, diferentemente da estreptomina original, não mostraram atividade antimicrobiana, vestibular ou coclear.

No estudo desenvolvido durante o trabalho de mestrado de Julierme Gonçalves da Silva, os resíduos de neamina e 2-desoxi-estreptamina obtidos a partir da hidrólise ácida de neomicina, foram submetidos a ensaios de atividades coclear e vestibular e apresentaram resultados interessantes. O antibiótico neomicina, como esperado, causou grande destruição dos cílios cocleares (100% de lesão) e das células sensitivas vestibulares (50%). Neamina apresentou o mesmo efeito de neomicina em relação à cóclea, porém causou destruição de 100% das células sensitivas vestibulares. A 2-desoxi-estreptamina foi inócua para ambas as estruturas.

As fragmentações químicas dos antibióticos neomicina e estreptomina, previamente realizadas em nosso laboratório, estão demonstradas no **Esquema 4**.



Esquema 4: Fragmentação química dos antibióticos aminoglicosídeos Estreptomicina (14) e Neomicina (1) para obtenção dos fragmentos estreptidina (16), estreptobiosamina (17), neamina (18), neobiosaminida de metila (19) e 2-desoxi-estreptamina (20), previamente realizadas.

Foram testados também derivados *N*-modificados de neamina. Os resultados demonstraram que o derivado *N*-acetilado (tetra-*N*-acetil-neamina) e o *N*-metil (tetra-*N*-metil-neamina) não apresentaram nenhuma toxicidade. O derivado tetra-*N*-benzil-neamina causou destruição das células externas da cóclea (100%), em oposição ao derivado tetra-*N*-*p*-metoxi-belzilimino-neamina, o qual causou destruição das células internas da cóclea (100%). O derivado azido de neamina apresentou alta toxicidade letal aguda, apesar de ter sido testado através de injeção intratimpânica (tratamento local).

O resultado mais interessante obtido até o momento foi do cloridrato de neobiosaminida de metila B (19), **esquema 4**, o qual foi o único a demonstrar seletividade na destruição apenas das células vestibulares (100%) sem causar dano às células cocleares, como demonstrado no recente trabalho de J. G. da Silva e cols⁵⁰. Este resultado indica que a maior seletividade observada nos ensaios com neobiosaminida de metila B poderia ser explorado para emprego deste composto no tratamento da doença de Ménière.

Objetivos

2. Objetivos

Utilizar as unidades de 2-desoxi-estreptamina (**20**) e estreptidina (**16**) na preparação de derivados pseudodissacarídeos, análogos à estrutura de neamina (**18**). Estes pseudodissacarídeos conterão diferentes unidades monossacarídicas, tais como mostradas nos compostos da **figura 8**, com resíduos de glicose (**21 e 24**), galactose (**22 e 25**) e glicosamina (**23 e 26**).

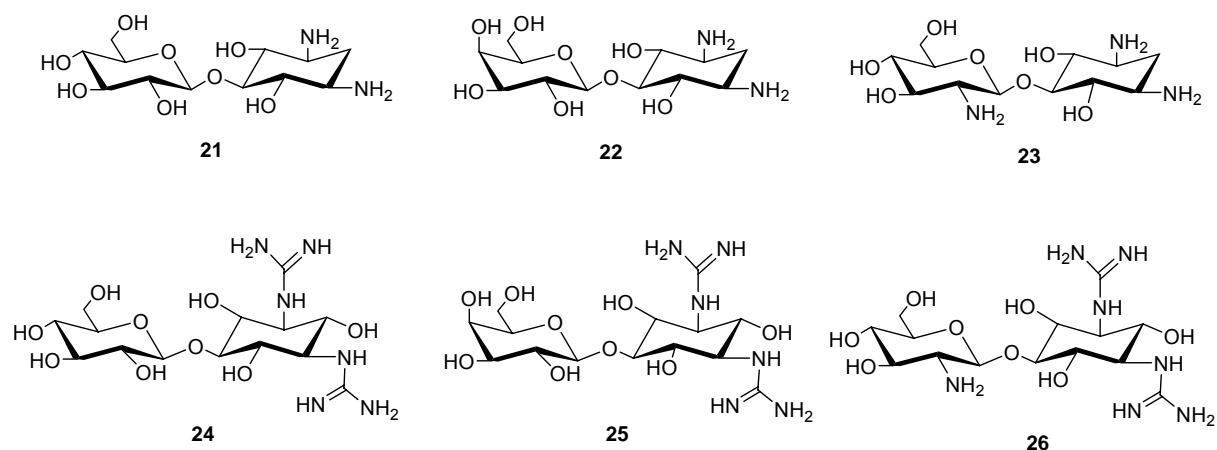


Figura 8: Compostos pseudodissacarídeos (derivados de 2-desoxi-estreptamina e estreptidina, ligadas a unidades de glicose, galactose e glicosamina) de interesse deste projeto.

Os produtos **21-26** serão analisados em termos de atividade coclear e vestibular (análise morfofuncional). Apesar do enfoque do trabalho não estar diretamente relacionado com a atividade antibacteriana, também será efetuado ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* com o objetivo de verificar se há alguma correlação entre estrutura química, toxicidade e atividade antibacteriana.

Materials e Métodos

3. Materiais e Métodos

Materiais

Aparelhagem analítica

Os produtos obtidos foram analisados por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) a 500 MHz em aparelho Bruker Advance DRX 500. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As multiplicidades dos sinais no espectro estão apresentadas como (s= singlete, d= dubleto, dd= duplo dubleto, ddd= duplo duplo dubleto, t= tripleto, tap= tripleto aparente, dt= duplo tripleto, m= multipleteo, q= quadrupleteo) assim como as constantes de acoplamento (J), dadas em Hertz (Hz), e o número de hidrogênios, deduzido a partir da integral relativa. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) foram registrados a 125 MHz em aparelho Bruker Advance DPX 500.

As análises por espectrometria na região do infravermelho (IV) serão realizadas em um espectrômetro IVFT – Nicole Modelo Protege 460, utilizando celas de KBr para líquidos (filme) e pastilhas de KBr para os sólidos.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, modelo Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, empregando ionização por electrospray (ESI) e analisadores quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF).

Análises cromatográficas

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ da MERCK®. A revelação foi feita por tratamento com solução ácida reveladora e aquecimento. A solução reveladora foi preparada seguindo a formulação:

Ácido sulfúrico concentrado -----	10%
Ácido molibídico -----	1,5%
Sulfato cérico -----	1,0%
Água destilada q.s.p -----	100 mL

As cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram efetuadas utilizando como fase estacionária sílica gel do tipo “flash” (40-63 μm) da Merck®.

Aparelhagem laboratorial

- Evaporador rotatório: Büchi RE
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Banho termostático: Tecnal TE-184
- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Ponto de fusão: Termolyne (com termômetro graduado até 300°C)

Principais solventes e reagentes

Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, conforme métodos usuais descritos⁵¹.

- Acetato de etila, grau HPLC – Mallinckrodt
- Acetona - Mallinckrodt
- Acetonitrila – J. T. Baker
- Ácido Bromídrico 48% (HBr) - Aldrich
- Ácido sulfúrico concentrado - Quemis
- Anidrido acético (Ac₂O) - Mallinckrodt
- Anidrido trifluormetanosulfônico ou anidrido trifílico (Tf₂O) - Aldrich
- Azida de sódio (NaN₃) - Aldrich
- Bicarbonato de sódio, p.a (NaHCO₃) – Merck
- Carbonato básico de chumbo (PbCO₃)₂.Pb(OH)₂ - Aldrich
- Carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) - Merck
- Cloreto de Sódio p.a – Merck
- Cloroformiato de benzila (ClCO₂Bn) - Aldrich
- Cloroformiato de Metila (ClCO₂CH₃) - Aldrich
- Diclorometano, grau HPLC – Mallinckrodt
- Dimetilformamida (DMF), 99,9 % - Alfa Aesar
- Dimetilsulfóxido (DMSO), 99,6% - Aldrich
- Dioxano, p.a - Mallinckrodt
- Dowex[®], resina de troca iônica fortemente básica (OH) - Aldrich
- Etanol, p.a - Merck

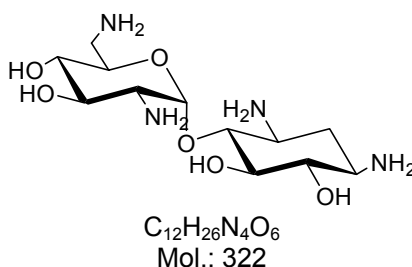
- Éter etílico, p.a – Mallinckrodt
- Formaldeído 38% em solução aquosa - Aldrich
- Hexano, grau HPLC – Mallinckrodt
- Hidróxido de amônio, p.a - Synth
- Hidróxido de potássio, p.a – Merck
- Hidróxido de sódio (NaOH) - Merck
- Metanol (MeOH), p.a – Mallinckrodt
- Óxido de deutério (D₂O) – Acrós Organics
- Piridina - Aldrich
- n-Propanol, p.a – J. T. Baker
- Sódio metálico - Merck
- Sulfato de cobre (CuSO₄) - Carlo Erba
- Sulfato de magnésio, 97% - Acrós Organics
- Sulfato de neomicina – GIBCO
- Sulfato de streptomicina - GIBCO
- Tetraidrofurano (THF), grau HPLC – J. T. Baker
- Trietilamina – Merck

Métodos

3.1 Preparação dos derivados aminoglicosídeos

3.1.1. Preparação de acceptor derivado de neomicina

3.1.1.1. Obtenção de cloridrato de neamina e neamina base livre⁵²



Sulfato de neomicina comercial GIBCO™ (**1**) foi utilizado como material de partida para a obtenção de neamina (**18**).

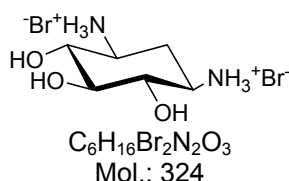
Metanol (250 mL) foi saturado com gás de ácido clorídrico (gerado pelo gotejamento de ácido sulfúrico concentrado sobre cloreto de sódio analítico e seco em “trap” com sílica azul) até verificação de $\text{pH} < 1$, avaliado com papel tornassol. Sulfato de neomicina (1) (2 g; 2,2 mmol) foi dissolvido no metanol ácido e este sistema foi submetido a refluxo, em temperatura média de 80 °C, por 3 horas. Em seguida, o meio reacional foi resfriado a 0 °C e tratado com éter etílico (80 mL) para formar um precipitado branco floculento que foi separado por filtração e lavado várias vezes com éter etílico. O produto (cloridrato de neamina bruto) foi seco em alto vácuo e gerou 900 mg.

Cloridrato de neamina bruto foi purificado pelo método de Botto e Coxon⁵³ que consiste em sua dissolução em metanol (200 mg/ 10 mL) seguida pela “titulação” da solução obtida com éter etílico até a verificação de turvação da solução. A fração insolúvel foi removida através de filtração em filtro com placa de vidro sinterizado de média porosidade. A pureza da solução foi monitorada através de cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel empregando metanol-acetona 2:1 como fase móvel. O procedimento de purificação foi repetido até a remoção do hexacloridrato de neomicina (R_f 0,05). Através deste método o cloridrato de neamina (560 mg) (R_f 0,4) foi obtido com ótimo grau de pureza e pôde ser utilizado como material de partida em outros procedimentos reacionais. O rendimento após a purificação variou entre valores de 70 a 80%. O produto obtido da purificação também foi submetido à análise por RMN de ^1H para identificação e avaliação da pureza.

Para a obtenção de neamina na forma de base livre foi empregado o método descrito por Leach e Teeters^{54,55}, onde o cloridrato de neamina impuro (900mg) foi dissolvido em metanol (56 mL) e, a solução obtida, saturada com amônia anidra. A amônia foi gerada em balão separado pelo aquecimento de hidróxido de amônio, seca pela passagem em “trap” com sílica azul e borbulhada diretamente na solução. O processo de saturação foi interrompido quando se observou precipitação. Após permanecer por 12 horas sob refrigeração, o precipitado (neamina na forma de base livre) foi filtrado em placa porosa (D3) sob pressão de nitrogênio (utilizado para evitar a degradação da neamina). A neamina recolhida (460 mg) foi mantida por 3 horas sob alto vácuo. O rendimento foi de 86%. O ponto de fusão verificado foi de 253 °C. O produto foi submetido a análises de RMN de ^1H e RMN ^{13}C gerando os seguintes sinais nos espectros:

RMN ^1H (400MHz/D₂O): δ 1,14 (1H, q, $J= 12,8$, H_{2'ax}), 1,91 (1H, dt, $J= 4,0$ e $12,8$, H_{2'eq}), 2,66 (1H, ddd, $J= 4,0$, $9,8$ e $12,8$, H_{1'}), 2,71-2,84 (3H, m, H₂, H_{3'}, H_{6a}) 2,98 (1H, dd, $J= 2,7$ e $13,6$, H_{6b}), 3,09 (1H, t, $J= 9,8$, H_{6'}), 3,19-3,28 (2H, m, H₄ e H_{4'}), 3,44 (1H, t, $J= 9,8$, H_{5'}); 3,51 (1H, t, $J= 9,8$, H₃); 3,72 (1H, ddd, $J= 2,7$; $7,3$ e $9,8$, H₅), 5,23 (1H, d, $J= 3,7$, H₁), (**Anexo B**). RMN ^{13}C (100 MHz/D₂O): δ 35,6 (C_{2'}), 41,7 (C₆), 49,5 e 50,6 (C_{1'} e C_{3'}), 55,4 (C₂), 71,60 e 72,6 (C_{4'} e C_{6'}), 73,7 (C₅), 76,2 (C_{5'}), 77,5 (C₃), 86,8 (C₄), 100,8 (C₁).

3.1.1.2. Obtenção de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina a partir do cloridrato de neamina^{54,55}



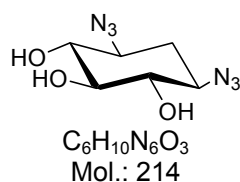
Cloridrato de neamina (**18**) (380 mg; 1,18 mmol), foi dissolvido em 8 mL de ácido bromídrico (HBr-48%) e o sistema foi refluxado por um período de 18 horas a temperatura mantida em 130 °C. A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório a 60 °C, diluída com água e novamente concentrada. O sólido avermelhado foi dissolvido em água e agitado em banho maria com carvão ativo por aproximadamente 30 minutos, filtrado em celite com placa de vidro sinterizado de média porosidade, lavado com pequenas porções de água e, o filtrado concentrado novamente, agora em alto vácuo. O resíduo foi lavado com metanol para melhor clarificação, tornando-se um pó branco, o qual foi raspado e seco em alto vácuo por aproximadamente 3 horas, originando 215 mg de um sólido branco (**20**), com rendimento de aproximadamente 81%. RMN ^1H (500 MHz, D₂O) δ_{H} : 3,4 (2H, m, H-4 e H-6); 3,3 (1H, dd, $J= 10,1$ e $9,1$, H-5); 3,22-3,14 (2H, m, H-1 e H-3); 2,3 (1H, dt, $J= 4,3$ e $12,4$, H-2eq), 1,66 (1H, q, $J= 12,4$, H-2ax), (**Anexo C**).

3.1.1.3. Obtenção de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina a partir do sulfato de neomicina⁵⁶

Sulfato de neomicina comercial (**1**) (5 g; 5,5 mmol) foi dissolvido em 50 mL de ácido bromídrico (HBr-48%) e submetido a uma temperatura de aproximadamente

100 °C aproximadamente por 5 dias, monitorando a concentração de HBr, que deve ser repostada a quantidade evaporada. O meio reacional foi seco em ar comprimido ou evaporador rotatório a 60 °C. O resíduo preto pastoso que ficou grudado no balão foi tratado com água (aproximadamente 30 mL) e carvão ativo e deixou-se agitar em temperatura ambiente por duas horas aproximadamente, sendo filtrado em celite com placa de vidro sinterizado de média porosidade, e lavado com água (aproximadamente 20 mL). O filtrado seco novamente, formando um sólido avermelhado. Foi concentrado em alto vácuo para retirar o máximo possível de água e lavado com metanol e filtrado em filtro de placa sinterizada para maior clarificação do produto e submetido em alto vácuo, fornecendo 0,8 gramas de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**), (rendimento de 59%). RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ_{H} : 3,4 (2H, m, H-4 e H-6); 3,3 (1H, dd, $J = 10,1$ e $9,1$, H-5); 3,22-3,14 (2H, m, H-1 e H-3); 2,3 (1H, dt, $J = 4,3$ e $12,4$, H-2eq), 1,66 (1H, q, $J = 12,4$, H-2ax), (**Anexo C**).

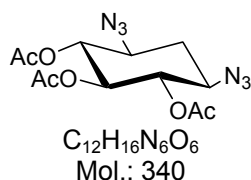
3.1.1.4. Preparação de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina⁵⁷



O substrato bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**) (0,9 g; 2,77 mmol) foi dissolvido em uma solução de 72 equivalentes de azida de sódio (NaN_3) e 10 equivalentes de carbonato de potássio ($\text{K}_2\text{CO}_3 / 2\text{H}_2\text{O}$) em água suficiente para a concentração final da azida de sódio igual a 6,05 M. A solução foi tratada com diclorometano (metade do volume da água) e colocada em banho de gelo. O anidrido trifílico (Tf_2O) (6 equivalentes) foi adicionado via seringa lentamente (aproximadamente 15 minutos), e a solução foi agitada por uma hora e meia. Foi adicionado metanol, (metade do volume da água) e o sulfato de cobre (CuSO_4) (5 mol % por amina). Depois de 18 horas a reação foi tratada com NaOH 1 Mol/L para tornar a mistura homogênea e feita a extração com acetato de etila, seca em evaporador rotatório, feita cromatografia em sílica flash com fase móvel diclorometano : acetona (1:1), seca as frações em evaporador rotatório e submetida a alto vácuo, dando uma massa bruta de 1,1 g do produto **27**. [Rf 0,4 (diclorometano1:1Acetona)]. RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ_{H} : 3,53-3,47 (2H, m, H-1 e H-

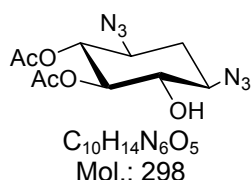
3); 3,41-3,35 (3H, m, H-4, H-5 e H-6); 2,3 (1H, dt, J= 4,5 e12,7, H-2eq); 1,44 (1H, q, J= 12,5, H-2ax), (**Anexo D**).

3.1.1.5. Preparação de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina⁵⁷



A massa bruta do 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**) obtida na etapa anterior (1,1 g) foi dissolvida em piridina (30 mL), acrescentado anidrido acético (18 mL) e 60 mg de DMAP (4-dimetilaminopiridina). Esta reação permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por aproximadamente três dias, quando não houve mais alteração das concentrações de produto formado pela análise em CCD (Hexano 1:1 Acetato de Etila). Concentrou-se, o meio reacional em evaporador rotatório de dedo frio, realizou-se extração em água e acetato de etila, concentrou-se a fase orgânica e realizou-se purificação por cromatografia de coluna clássica (hexano 6:4 Acetato de etila). As frações do produto foram concentradas em evaporador rotatório e em alto vácuo dando uma massa de 235 mg do produto **28** (rendimento global de 25% nas duas etapas), [Rf 0,64 (hexano1:1Acetato de etila)]. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 5,03-4,94 (3H, m, H-4, H-5 e H-6); 3,55-3,47 (2H, m, H-1 e H-3); 2,26 (1H, dt, J= 4,7 e 13,7, H-2eq); 2,02 (6H, s, -OAc) ; 1,94 (3H, s, -OAc); 1,5 (1H, q, J= 12,6, H-2ax), (**Anexo E**).

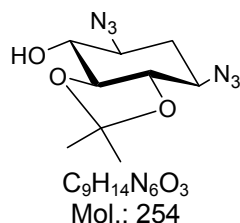
3.1.1.6. Preparação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina⁵⁸



Novozym 435 (*Cândida Antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa, Novo Nordisk, 33 mg) foi adicionada ao peracetilado de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**28**) (30 mg; 0,09 mmol) em uma mistura de tolueno (0,7 mL) e tampão fosfato de sódio pH 6.2 (0,7 mL), a qual permaneceu sob forte agitação a

temperatura ambiente por aproximadamente 72 horas, analisando-se em intervalos de tempo a formação do produto e consumo do material de partida por CCD (hexano 1:1 Acetato de Etila). O meio reacional foi filtrado em filtro de placa sinterizada e lavado com água e acetato de etila. A fase aquosa foi separada da orgânica e lavada com acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na₂SO₄, filtradas e concentradas em evaporador rotatório e depois em alto vácuo, obtendo-se uma massa de 16,5 mg do composto **29** (63% de rendimento). [Rf 0,52 (hexano1:1Acetato de etila)]. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 4,93-4,86 (2H, m, H-5 e H-6); 3,56-3,48 (2H, m, H-1 e H-3); 3,45-3,38 (1H, m, H-4); 2,22 (1H, dt, J= 4,5 e 13,4, H-2eq); 2,03 (3H, s, -OAc); 2,02 (3H, s, -OAc); 1,4 (1H, q, J= 12,5, H-2ax), (**Anexo H**).

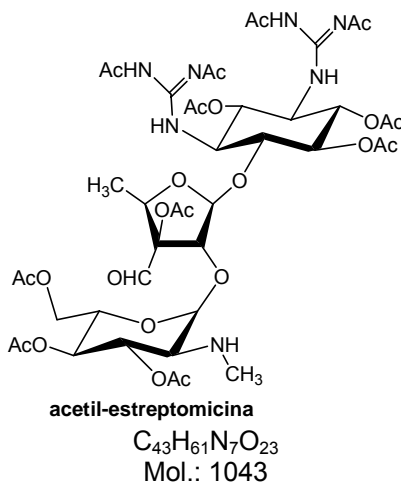
3.1.1.7. Tentativa de Preparação de 4,5-isopropil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina⁵⁹



A uma solução de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**20**) (150 mg; 0,7 mmol) em DMF tratado, foi adicionado três equivalentes de 2,2-dimetoxipropano e ácido paratoluenossulfônico em concentração catalítica (0,1 equivalente), confirmando o pH com papel tornassol, para que ficasse em torno de 2. O meio reacional foi refluxado à 100°C por aproximadamente 2 horas até ser observado formação do produto por CCD (hexano1:1acetato de etila) e consumo considerável do material de partida. O meio reacional foi seco em ar comprimido, por uma noite e realizada purificação através de cromatografia de coluna clássica (hexano1:1acetato de etila). As frações do produto foram concentradas em evaporador rotatório, secas em alto vácuo e uma amostra foi analisada em RMN de ¹H (**anexo F**) e RMN ¹³C (**anexo G**).

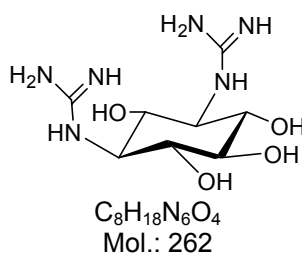
3.1.2. Preparação de acceptor derivado de estreptomicina

3.1.2.1. Tentativa de peracetilação de estreptomicina⁶⁰



Sulfato de estreptomicina (**14**) (0,5 g; 0,34 mmol), foi parcialmente dissolvido em 2,7 mL de piridina e 13,5 mL de metanol, posto em banho de gelo e tratado lentamente com 4,5 mL de anidrido acético e agitado por 14 horas. O meio reacional foi seco em evaporador rotatório e lavado duas vezes com éter etílico e concentrado até ficar pastoso. Foi adicionado 5,5 mL de piridina e 5,5 mL de anidrido acético e agitado por 20 horas a 50 °C, formando uma solução amarelada contendo ainda precipitado branco (provavelmente o material de partida). O meio reacional foi seco no ar comprimido e filtrado e sílica com fase móvel metanol:acetona (2:1) e seco em evaporador rotatório. O produto acetilado (**30**) foi concentrado em alto vácuo e analisado por RMN de ¹H, (**Anexo J**).

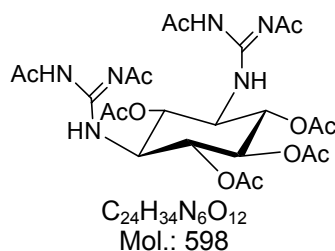
3.1.2.2. Obtenção de estreptitidina⁶¹



Uma solução de sulfato de estreptomicina (**14**) (1 g; 0,7 mmol) em água (78mL) foi tratada lentamente com H₂SO₄, (2 mL) e acetona (70 mL). A mistura

resultante foi aquecida a 60 °C durante 48 horas e o precipitado branco formado foi filtrado em filtro de placa sinterizada e redissolvido em aproximadamente 50 mL de uma solução H₂SO₄ (2 M), a quente (60 °C). As partículas insolúveis foram filtradas e o filtrado concentrado em um volume de aproximadamente 20 mL. Sulfato de estreptidina (**32**) não foi recristalizado em geladeira após 7 dias, como relatado na literatura. O meio foi concentrado, dando uma massa bruta de 300 mg, a qual não serve de base para cálculo do rendimento, visto q excedeu o rendimento teórico de 100% (180 mg), esta massa foi difícil de dissolver em água, pois continha cristais muito estável, porem foi analisada em espectrômetro de massas e RMN de ¹H(**Anexo K**), pesando uma massa maior deste produto e filtrando os cristais na seqüência.

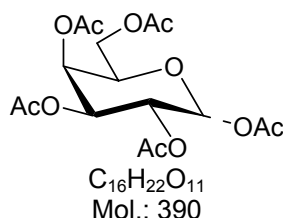
3.1.2.3. Peracetilação de estreptidina⁵⁷



Metade da massa bruta de estreptidina (**32**), obtida na etapa anterior (300 mg), foi dissolvida em piridina (6 mL), acrescentado anidrido acético (3,6 mL) e 12 mg de DMAP (4-dimetilaminopiridina). Esta reação permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por aproximadamente três dias. O meio reacional foi concentrado e purificado por cromatografia de coluna clássica com 300 mL de fase móvel hexano/acetato de etila (1:1) e mais 100 mL de diclorometano/metanol (9:1). O produto foi isolado e concentrado, dando 40 mg de um sólido branco (aproximadamente 10% de rendimento global para esta etapa e a etapa anterior), R_f aproximadamente 0,9 [diclorometano/metanol (9:1)], e analisadas em RMN de ¹H, indicando a formação do produto acetilado (**33**), (**Anexo L**).

3.1.3. Preparação de doadores de galactose

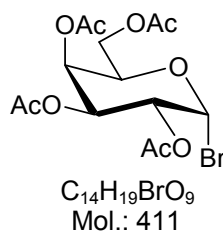
3.1.3.1. Preparação de 1,2,3,4,6-Penta-O-acetil-D-galactopiranosose⁶²



Uma suspensão de D-(+)-galactose (**34**) (5,0 g; 27,8 mmol) em anidrido acético (Ac_2O) (25,0 mL) foi tratada com iodo (I_2) (0,25 g; 1,0 mmol) e o sistema foi agitado à temperatura ambiente. Após 1 hora, todo açúcar havia se dissolvido formando uma solução castanho escura. O acompanhamento da reação por CCD [Hexano: Acetato de Etila ($AcOEt$) 1:1 (v:v)] mostrou a formação de apenas um produto. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano (DCM) e foi lavada com solução de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 5%. Em seguida, a fase aquosa foi lavada (2 vezes) com DCM. As fases orgânicas foram reunidas e neutralizadas com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). A secagem (sulfato de sódio - Na_2SO_4) e concentração (evaporador rotatório) da fase orgânica forneceram um óleo amarelo claro o qual foi cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O rendimento do composto **35** foi praticamente quantitativo (10,8 g; 27,7 mmol; 99%). A proporção entre os isômeros α/β foi 5:1.

Dados do composto α : δ_H (ppm) ($CDCl_3$, 400 MHz) 6,38 (1H, d, $J_{1,2}$ 1,7 Hz, H-1), 5,51 (1H, dd, $J_{3,4}$ 2,5 Hz; $J_{4,5}$ 1,3 Hz, H-4), 5,34 (2H, t, $J_{2,3}$ 1,7 Hz, H-2, H-3), 4,35 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 1,3 Hz; $J_{5,6b}$ 6,6 Hz; $J_{5,6a}$ 7,8 Hz, H-5), 4,10 (2H, dd, $J_{5,6b}$ 6,8 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,6 Hz, H-6a, H-6b), 2,17-2,01 (15H, 5s, 5 $COCH_3$).

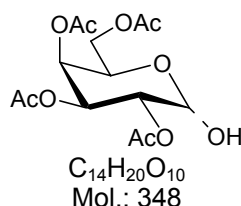
3.1.3.2. Preparação de Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila⁶²



Uma solução de penta-O-acetil- α -D-galactopiranosose (**35**) (10,3 g; 26,4 mmol) em ácido acético glacial (10 ml) foi resfriada em banho de gelo e tratada lentamente

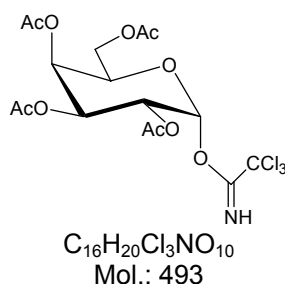
com solução de ácido bromídrico (25 ml, solução em 30% ácido acético m/v). A mistura foi agitada por 4 horas e armazenada na geladeira durante 12 horas, para conversão total. A mistura reacional foi diluída com diclorometano e vertida em mistura de gelo picado e água. A fase aquosa foi separada e extraída com diclorometano e os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução de bicarbonato de sódio 5%, previamente resfriado em banho de gelo, seco (sulfato de magnésio) e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi isolado como um óleo amarelo, viscoso, cristalizado na presença de éter etílico e éter de petróleo. Após purificação o produto **37** foi obtido com 64,4% de rendimento (7 g, 17 mmol). Rf 0,8 (AcOEt: Hexano 1:1 v:v), PF 82-84 C° (lit., 84-85 C°). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_H: 6,7 (1H, d, J= 3,9, H-1); 5,52 (1H, dd, J= 3,2, H-4); 5,4 (1H, dd, J= 3,2 e 10,6, H-3); 5,05 (1H, dd, J= 3,9 e 10,6, H-2); 4,5 (1H, dt, J= 6,5, H-5); 4,18 (1H, dd, J= 6,3 e 11,4, H-6a); 4,16 (1H, dd, J= 6,8 e 11,4, H-6b), (**Anexo M**)

3.1.3.3. Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosose^{63,64}



O reagente acetato de hidrazina (H₂NNHAc) (2,6 g; 27,7 mmol) foi adicionado à solução de 1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- α -D-galactopiranosose (**35**) (10,8 g; 27,7 mmol) em DMF (30,0 mL) e a reação foi deixada sob agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi diluído com AcOEt, lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água, seco com sulfato de magnésio (MgSO₄) e concentrado. A mistura obtida foi purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] e forneceu o composto 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosose (**36**) com rendimento de 70% (6,8 g; 19,4 mmol) na proporção α/β de 3:1. Dados do composto α : RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 5,53 (1H, t, J_{1,2} 3,5 Hz, H-1), 5,48 (1H, dd, J_{3,4} 3,5 Hz; J_{4,5} 1,2 Hz, H-4), 5,42 (1H, dd, J_{1,2} 3,5; Hz J_{2,3} 10,8 Hz, H-2), 5,17 (1H, dd, J_{2,3} 10,8 Hz; J_{3,4} 3,5 Hz, H-3), 4,48 (1H, ddd, J_{4,5} 1,2 Hz; J_{5,6b} 6,3 Hz; J_{5,6a} 7,6 Hz, H-5), 4,11 (2H, dd, J_{5,6b} 6,0 Hz; J_{6a,6b} 10,8 Hz, H-6a, H-6b), 3,12 (1H, dd, J 1,2 Hz; J 3,5 Hz, OH), 2,15-2,00 (12H, 4s, 4 COCH₃).

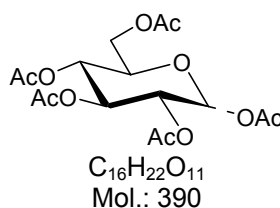
3.1.3.4. Preparação de tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila⁶⁴



Uma solução de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-galactopiranosose (**36**) (4,3 g; 12,3 mmol) em DCM (20,0 mL) destilado foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte (N_2). Tricloroacetoneitrila (CCl_3CN) (4,9 mL; 49,4 mmol) e 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,56 mL; 3,7 mmol) foram adicionados à solução, que foi agitada por 1 hora nas condições mencionadas acima. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**) foi cristalizado em Éter etílico (Et_2O): Hexano sendo obtido apenas o isômero α com rendimento de 80% (4,9 g; 9,9 mmol). RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H : 8,67 (1H, s, NH), 6,61 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,57 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,0 Hz; $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,43 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,8 Hz; $J_{3,4}$ 3,0 Hz, H-3), 5,37 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,8 Hz, H-2), 4,44 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 1,0 Hz; $J_{5,6b}$ 6,5 Hz; $J_{5,6a}$ 12,3 Hz, H-5), 4,17 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 6,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6b), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 11,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,3 Hz, H-6a), 2,17-2,02 (12H, 4s, 4 $COCH_3$), (**Anexo N**).

3.1.4. Preparação de doador de glicose

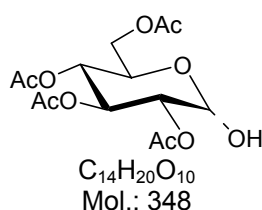
3.1.4.1. Preparação de 1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- α -D-glicopiranosose⁶⁵



A uma mistura de anidrido acético (15 mL; 0,16 mol) e 25 mL de ácido acético glacial, foi adicionado 5g de D-glucose (**39**) (0,028 mol). A esta mistura foi

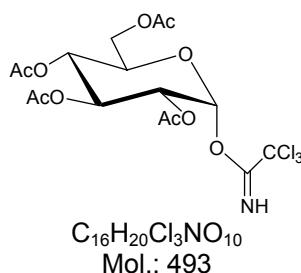
adicionado lentamente 1 mL de ácido perclórico de modo a não exceder 35 °C. A reação permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente e foi vertida numa mistura de água e gelo para cristalização do produto, o qual foi filtrado e concentrado em alto vácuo. Esta reação apresentou regioseletividade, rendendo apenas o produto peracetilado **40** com hidroxila em posição α no carbono anomérico (4,7 g; 12 mmol), com um rendimento de aproximadamente 44% , o qual foi confirmado em análise de RMN ^1H . (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 6,34 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1); 5,48 (1H, t, $J_{2,3}$ 9,8 Hz, H-3); 5,15 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,9 Hz, H-4); 5,1 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz; $J_{2,3}$ 10,2 Hz, H-2); 4,27 (1H, dd, $J_{6,6'}$ 12,5 Hz; $J_{5,6}$ 4,1 Hz, H-6); 4,08-4,14 (2H, m, H-5 e H-6'); 2,19 (3H, s, OMe); 2,1 (3H, s, OMe); 2,05 (3H, s, OMe); 2,03 (3H, s, OMe); 2,02 (3H, s, OMe).

3.1.4.2. Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicopiranosose^{63,64}



O reagente acetato de hidrazina (H_2NNHAc) (0,52 g; 5,6 mmol) foi adicionado à solução de 1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- α -D-glicopiranosose (**40**) (2,2 g; 5,6 mmol) em DMF (6,0 mL) e a reação foi deixada sob agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi diluído com AcOEt, lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água, seco com sulfato de magnésio (MgSO_4) e concentrado. A mistura obtida foi purificada por CCC [Hexano: AcOEt 6:4 (v:v)] e forneceu o composto 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicopiranosose (**41**) com rendimento de 74 % (1,45 g; 4,16 mmol) na proporção α/β de 3:1. Dados do composto α : RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 5,52 (1H, t, J 9,7, H-3); 5,45 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,3, H-1); 5,07 (1H, ddd, $J_{3,4}$ 9,6, $J_{4,5}$ 2,3, H-4); 4,89 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,6, $J_{2,3}$ 10,2, H-2); 4,20-4,28 (3H, m, H-5, H-6 e H-6'); 2,09 (3H, s, OMe); 2,08 (3H, s, OMe); 2,03 (3H, s, OMe); 2,01 (3H, s, OMe).

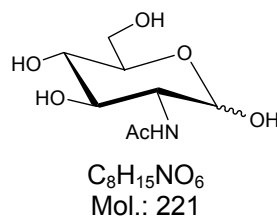
3.1.4.3. Preparação de tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila⁶⁴



Uma solução de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicopiranosose (**41**) (1,45 g; 4,16 mmol) em DCM (6,76 mL) destilado foi resfriada em banho de gelo e submetida à atmosfera inerte (N_2). Tricloroacetoneitrila (CCl_3CN) (1,65 mL; 16,75 mmol) e 1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,189 mL; 1,25 mmol) foram adicionados à solução, que foi agitada por 1 hora nas condições mencionadas acima. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila foi cristalizado em éter etílico (Et_2O): Hexano sendo obtido apenas o composto **42**, conformação α , com rendimento de 83,7 % (1,72 g; 3,5 mmol). RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 8,69 (1H, s, NH), 6,55 (1H, d, $J=3,6$ Hz, H-1), 5,55 (1H, tap, $J=9,8$, H-6'a), 5,2 (1H, tap, $J=9,8$ Hz, H-6'b), 5,1 (1H, dd, $J=3,6$ e 10,1, H-2), 4,27 (1H, dd, $J=4,1$ e 12,4, H-5), 4,2 (1H, $J=10,3$ e 1,8, H-3), 4,12 (1H, dd, $J=1,8$ e 12,3, H-4), 2,07 (3H, s, -OAc); 2,04 (3H, s, -OAc); 2,03 (3H, s, -OAc); 2,01 (3H, s, -OAc), (Anexo O).

3.1.5. Preparação de doador de glicosamina

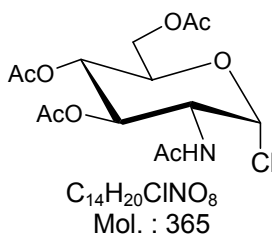
3.1.5.1. Preparação de 2-Acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosose⁶⁶



Sódio metálico (500 mg; 22,6 mmol) foi adicionado lentamente em CH_3OH (22,7 ml) em frasco, mantido em banho de gelo até a dissolução. O reagente

cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (**43**) (5 g; 23,2 mmol) foi adicionado à solução de metóxido de sódio; a mistura foi agitada por 5-10 minutos a temperatura ambiente e filtrada através de Funil de Büchner. O filtrado foi lavado duas vezes com porções de metanol. O filtrado combinado, o qual tornou-se uma solução supersaturada de base livre de aminoaçúcar, foi tratado com 2,75 ml (28,8 mmol) de anidrido acético e o frasco foi resfriado por alguns minutos para o início da reação. A solução foi mantida durante a noite a 25 °C e refrigerada por algumas horas próxima de 0 °C para completa cristalização. O produto foi filtrado através de funil de Büchner, lavado, inicialmente com metanol e a seguir com éter, e submetido à secagem em dessecador a vácuo. O produto **44** foi obtido na forma de sólido branco (3,88g, 17,5mmol, 77,6%), Rf 0,5 [AcOEt/ Hexano 1:1 (v:v)], PF 230-232 C° (lit., 203-205C°). RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 400 MHz) δ_{H} : 5.08 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1 equatorial), 4.59 (1H, d, $J_{1,2}$ axial 8,3 Hz, H-1 axial), 3.81-3.52 (4H, m, H-6, H-6', H-5, H-3), 3.40-3.32 (2H, m, H-2, H-4).

3.1.5.2. Preparação de Cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosila⁶⁶



HCl gasoso anidro foi borbulhado em cloreto de acetila (8 ml), em frasco equipado com condensador, durante 4 h até a saturação. O reagente 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosose (**44**) (3,88 g; 17,5 mmol) foi introduzido sobre o cloreto de acetila e a mistura foi agitada e refluxada a 38 °C por cerca de 14 horas, quando o sólido branco foi totalmente consumido, originando uma solução viscosa e âmbar. Após agitação e refluxo, a solução foi diluída em diclorometano e vertida em mistura de gelo e água. A mistura foi transferida para funil de separação e agitada. A camada orgânica foi rapidamente separada e adicionada sob uma mistura de gelo e solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura foi agitada violentamente para neutralização da mistura. A camada orgânica foi seca em MgSO_4 , filtrada e concentrada. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica em sílica-gel

3.1.6.2. Condensação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina com tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila^{67,68}

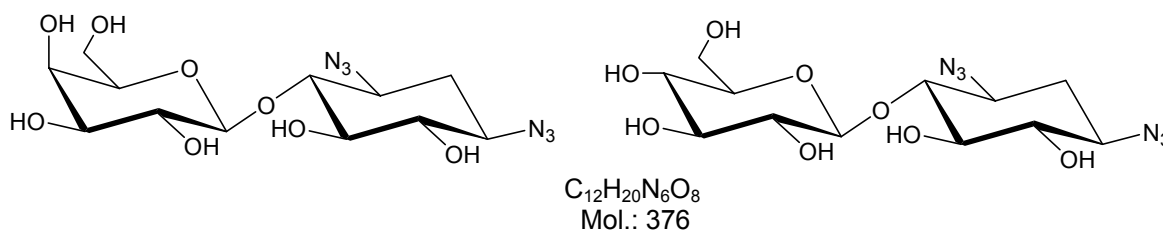
Os compostos 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) (48 mg; 0,16 mmol) e tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**) (150 mg; 0,3 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por 3 horas, a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente foram dissolvidos em DCM destilado (2 mL) e mantidos sob N₂ a 0° C para adição de 0,05 equivalentes do promotor Trimetilsilil triflato (TMSOTf) (1,78 mg; 1,5 μ mol), dissolvido em mais 1 mL de diclorometano. O sistema foi agitado por quarenta minutos nestas condições. A seguir a reação foi neutralizada com a adição de duas gotas de Et₃N, concentrada, e purificada por CCC [Hexano: Acetato 8:2 (v:v)], sendo obtido apenas o pseudo-dissacarídeo β (**46**) com rendimento de aproximadamente 86% (87 mg; 0,023 mmol). Dados do composto β : RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ _H: 5,36 (1H, d, J= 3,3, H-4'); 5,1 (1H, dd, J= 7,8 e 10,4, H-2'); 5,03-4,94 (3H, m, H-3',H-5 e H-6); 4,74 (1H, d, J= 7,8, H-1'); 4,16 (1H, dd, J= 6,6 e 11,4, H-6'a); 4,07 (1H, dd, J= 7,1 e 11,4, H-6'b); 3,9 (1H, dt, J= 6,6 e 7,1, H-5'); 3,59-3,47 (3H, m, H-1, H-3 e H-4); 2,37-2,31 (1H, dt, J= 4,3, 4,5 e 13,4, H-2eq); 2,14 (3H, s, -OAc); 2,09 (3H, s, -OAc); 2,08 (3H, s, -OAc); 2,07 (3H, s, -OAc); 2,04 (3H, s, -OAc); 1,97 (3H, s, -OAc); 1,51 (1H, q, J= 12,71, H-2ax), (**Anexo S**).

3.1.6.3. Condensação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina com tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila^{67,68}

Os compostos 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) (50 mg; 0,167 mmol) e tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**42**) (150 mg; 0,3 mmol) foram mantidos sob alto vácuo por 3 horas, a fim de manter o sistema seco, antes de iniciar a reação. Posteriormente foram dissolvidos em DCM destilado (2 mL) e mantidos sob N₂ a 0 °C para adição de 0,05 equivalentes do promotor Trimetilsilil triflato (TMSOTf) (1,78 mg; 1,56 μ mol), dissolvido em mais 1 mL de diclorometano. O sistema foi agitado por quarenta minutos nestas condições. A seguir a reação foi neutralizada com a adição de duas gotas de Et₃N, concentrada, e purificada por CCC [Hexano: Acetato 8:2 (v:v)], sendo obtido o composto **47** com rendimento de aproximadamente 89% (90 mg, 0,024 mmol). Dados do composto β : RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ _H: 5,22 (1H, tap, J= 9,5, H-3'); 5,08 (1H, tap, J= 9,7, H-

4'); 5,0-4,97 (2H, m, H-5 e H-6); 4,95 (1H, tap, J= 8,7, H-2'); 4,8 (1H, d, J= 8,04, H-1'); 4,4 (1H, dd, J= 12,4 e 4,6, H-6'b); 4,0 (1H, dd, J= 12,4 e 1,5, H-6'a); 3,73-3,68 (1H, m, H-5'); 3,6-3,5 (3H, m, H-1, H-3, H-4); 2,37 (1H, dt, J= 13,2 e 4,4, H-2eq); 2,1 (3H, s, -OAc); 2,09 (3H, s, -OAc); 2,08 (3H, s, -OAc); 2,04 (3H, s, -OAc); 2,03 (3H, s, -OAc); 2,0 (3H, s, -OAc); 1,54 (1H, q, J= 12,7, H-2ax), (**Anexo T**).

3.1.6.4. Desproteção dos grupos acetil dos pseudos-dissacarídeos β obtidos⁵²



Foram preparados 100 mL de metóxido de sódio 1 M através da adição de sódio metálico em metanol PA. O sódio metálico foi pesado em béquer contendo silicone e depois adicionado lentamente em um balão contendo 100 mL de metanol sob banho de gelo e agitação adaptado a um condensador. Antes de ser adicionado ao balão, o sódio metálico foi rapidamente lavado em um béquer contendo hexano e seco em papel toalha. Após total solubilização do sódio metálico em metanol, essa solução foi armazenada em frasco devidamente vedado, e usado argônio para melhor conservação.

O pseudo-dissacarídeo de 2-desoxi-estreptamina conjugado com galactose hexa-acetilado (**46**) (50 mg; 0,08 mmol), bem seco e em balão vedado, foi solubilizado em 2 mL de metanol PA via seringa. Adicionou-se 3 gotas da solução de metóxido de sódio preparada anteriormente verificando o pH com papel de tornassol para que este ficasse entre 9 e 10. Após meia hora de reação, foi realizada CCD (Hexano:Acetato de Etila, 1:1) e confirmou-se que não havia mais material de partida, observando apenas uma mancha na origem. Foi realizada outra CCD (diclorometano:metanol, 8:2) para verificar se houve formação de subproduto devido a desacetilação parcial, porem observou-se apenas uma mancha novamente com Rf de aproximadamente 0,4. A reação foi neutralizada com resina Dowex fortemente ácida e filtrada em filtro de placa sinterizada e lavado com metanol, seco em evaporador rotatório, concentrada em alto vácuo, dando uma massa de 28 mg do produto **48** (93,6% de rendimento). RMN 1H (D_2O , 500 MHz) δ_H : 4,55 (1H, d, J= 7,8,

H-1'); 3,83 (1H, d, J= 3,3, H-4'); 3,71 (1H, dd, J= 11,7 e 8,3, H-6'a), 3,65 (1H, dd, J= 3,6 e 11,9, H-6'b); 3,62-3,56 (3H, m, H-5', H-1, H-3); 3,5-3,3 (5H, m, H-2', H-3', H-4, H-5, H-6); 2,3 (1H, dt, J=12,7 e 4,4, H-2eq); 1,42 (1H, q, J= 12,4, H-2ax), **Anexo U**.

O mesmo procedimento foi realizado para desacetilação do pseudo-dissacarídeo de 2-desoxi-estreptamina conjugado com glicose hexa-acetilado (**47**) (84 mg; 0,13 mmol), dando uma massa de 49mg do produto **49** (97,4% de rendimento). RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ_H: 4,62 (1H, d, J= 7,8, H-1'); 3,82 (1H, d, J= 11,7, H-5'); 3,67-3,56 (2H, m, H-6'a e H-6'b), 3,5-3,3 (7H, m, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-3', H-4'); 3,25 (1H, tap, J= 8,7, H-2'); 2,3 (1H, dt, J= 12,7 e 4,4, H-2eq); 1,43 (1H, q, J= 12,4, H-2ax), **Anexo V**.

3.2. Testes de atividade biológica

3.2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras

Os testes foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) com colaboração do Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado.

Foi adotado o método de microdiluição em microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), procedimento descrito por Andrews (2001)⁶⁹. Para isso foram utilizadas microplacas de 96 orifícios.

3.2.1.1. Preparo das amostras

Soluções das amostras a serem testadas (**18**, **20**, **48** e **49**) foram preparadas contendo 1 mg da fração dissolvido em 100 µL de água destilada estéril. Transferiram-se esses 100 µL para tubos de ensaios estéreis contendo 1900 µL de caldo Mueller Hinton. Estas soluções foram utilizadas para a realização dos ensaios.

3.2.1.2. Microrganismos utilizados

Utilizaram-se as cepas padrões de *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

3.2.1.3. Preparo do inóculo

Com o auxílio de alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microorganismos indicadores, que encontravam-se em ágar Mueller Hinton inclinado, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9 % esterilizada, gerando uma suspensão que foi padronizada com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Transferiram-se 1 mL de cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9 %, da qual foram retirados 2 mL e transferidos para 10 mL de caldo Mueller Hinton. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo.

3.2.1.4. Preparo do antibiótico padrão

Os antibióticos utilizados como controle foram Penicilina G, Sulfato de estreptomicina e Sulfato de neomicina.

A solução controle do antibiótico Penicilina G foi preparada com 1 mg do antibiótico diluído em 10 mL de tampão Fosfato de potássio 0,07 mol/L, pH=6,0 (2,0 g de Fosfato de potássio dibásico + 8,0 g de Fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água destilada). Transferiram-se 1 mL desta solução para tubo de ensaio contendo 4 mL de Caldo Mueller Hinton. Desta última solução foi retirada uma alíquota de 59 µL e depositada no primeiro orifício da placa de 96 poços, a partir do qual realizou-se diluição seriada.

As soluções controle dos antibióticos Estreptomicina e de Neomicina foram preparadas de forma semelhante à relatada anteriormente para a Penicilina G, porém neste caso 1 mg do antibiótico foi diluído em 10 mL de tampão Fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH= 7,9 (16,73 g de Fosfato de potássio dibásico, 0,523 g de Fosfato de potássio monobásico, qsp 1000 mL).

3.2.1.5. Determinação da atividade antimicrobiana

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µL da mistura composta por caldo Mueller Hinton, solução da amostra avaliada e suspensão do microorganismo indicador. As amostras foram avaliadas nas seguintes concentrações: 90 µg/mL, 80 µg/mL, 70 µg/mL, 60 µg/mL, 50 µg/mL, 45 µg/mL, 40 µg/mL, 35 µg/mL, 30 µg/mL, 25 µg/mL, 20 µg/mL e 15 µg/mL de caldo

Mueller Hinton. Os padrões foram avaliados nas seguintes concentrações: 5,9 µg/mL, 2,95 µg/mL, 1,475 µg/mL, 0,7375 µg/mL, 0,3688 µg/mL, 0,1844 µg/mL, 0,0922 µg/mL, 0,0461 µg/mL, 0,023 µg/mL e 0,0115 µg/mL de caldo Mueller Hinton. Foi determinada a concentração inibitória mínima de cada amostra, ou seja, menor concentração onde a fração avaliada inibiu o crescimento do microrganismo.

Alguns orifícios da placa foram utilizados para controle do inóculo, esterilidade do caldo Mueller Hinton e esterilidade da amostra avaliada. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 40 µL de CTT preparado em solução aquosa a 0,7 %. As microplacas foram incubadas novamente por 30 minutos a 37 °C. Após esse período, a presença ou ausência de coloração avermelhada foi observada, a ausência de tal coloração foi interpretada como ausência de crescimento microbiano, ou seja, o microrganismo mostrou-se sensível a amostra avaliada.

3.2.2. Testes de ototoxicidade⁷⁰⁻⁷²

Os testes foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Audição do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) com colaboração do Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito.

As técnicas utilizadas foram: (1) Testes de Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD); (2) Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE); e (3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A amostra enviada para os testes foi preparada na concentração empiricamente escolhida de 0,222 N.

Para preparação da amostra hidrossolúvel (**48**) foi utilizado o seguinte protocolo: frascos de vidros com capacidade de 2,0 mL foram escolhidos para o acondicionamento da amostra, sendo que estes foram anteriormente esterilizados por calor seco em mufla, permanecendo por 2 horas a 180 °C. As tampas plásticas e o teflon, utilizados para a vedação dos frascos, foram tratados com álcool 70% por 2 horas. Após o processo de esterilização, todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar. O produto testado (**48**) foi solubilizado em água de

deionizada. Para garantir a esterilidade da amostra, depois de dissolvida, ela foi filtrada com filtro MILLEX – GS MILIPORE® de porosidade de 0,22 µm.

Os animais foram selecionados do biotério central da Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto, através da pesquisa do reflexo de Preyer. Foram escolhidos animais com peso variando entre 400 gramas e 600 gramas, pela facilidade de manipulação do meato acústico externo para a realização dos exames audiológicos de emissões otoacústicas e potenciais auditivos evocados de tronco encefálico, bem como por facilitar a inoculação dos derivados preparados pela via intratimpânica.

Todas as normas e cuidados para com animais experimentais foram seguidos e o Laboratório de Neurobiologia da Audição foi autorizado a proceder com os testes referentes a este trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), aprovado sob o protocolo nº 070/2005 na reunião de 03 de outubro de 2005.

Após repouso auditivo de 24 horas, os animais foram avaliados por otoscopia manual e os que apresentaram sinais de otite externa, ou média aguda, foram descartados do experimento. Os animais com cerume de difícil remoção, ou alterações inflamatórias do conduto auditivo externo, ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar adequadamente a sonda do equipamento de emissões otoacústicas, também foram descartados.

Escolhidas, as cobaias foram submetidas a uma triagem auditiva por EOAPD e avaliação eletrofisiológica auditiva através de PEATE, em cabine com isolamento acústico. Cloridrato de cetamina (65 mg/Kg) e xilazina (6,5 mg/Kg) foram utilizados para anestesia por não apresentarem alterações nos resultados dos testes. As cobaias que apresentaram EOAPD presentes nas duas orelhas e PEATE mostrando onda I presente com 5 dB de estímulo foram consideradas para o experimento.

Foram selecionados sete animais para a amostra testada sendo que a orelha direita foi utilizada como controle e a orelha esquerda foi tratada com a amostra em teste. O tratamento foi realizado imediatamente após os exames audiológicos, através de visão otomicroscópica. A amostra foi inoculada por seringa descartável graduada de 0.3 ml e agulha 12,7 mm/ 0,33 mm. O controle do volume inoculado foi dependente do refluxo da amostra pelo orifício de inoculação, variando entre 0,1 e 0,3 ml. Depois de tratados, os animais permaneceram 3 horas com a cabeça

inclinada 45° em decúbito dorsal, para minimizar o deslocamento da substância inoculada da fenda auditiva pela tuba auditiva.

Os exames de EOAPD e PEATE foram realizados no 11º dia após o tratamento e em seguida os animais foram sacrificados para a realização do estudo de microscopia eletrônica de superfície.

Para a avaliação funcional das células ciliadas externas cocleares foram utilizadas as Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EQUIPAMENTO: ILO 92 CAE System Otodynamics LTD).

O teste de EOAPD foi realizado pré-tratamento e repetido momentos antes dos animais serem sacrificados, seguindo a relação de freqüências 2F1 - F2 com relação F1:F2 = 1,22, resolução 2 pontos por oitava. Foram consideradas as emissões otoacústicas a partir de 1,5 kHz, pois as dimensões do conduto auditivo externo da cobaia fazem com que haja uma dificuldade de detecção das emissões otoacústicas abaixo desta freqüência, obtendo respostas que coincidem com as do ruído. Desta forma, ao analisar a freqüência de 2 kHz, é oferecido um tom puro um pouco acima e um pouco abaixo, de tal modo que a relação entre eles seja de 1,22, obtendo assim, automaticamente, uma resposta de freqüência resultante seguindo a relação 2F1-F2 (abaixo da freqüência avaliada) e 2F2-F1 (acima da freqüência resultante). Deve-se ainda levar em consideração que as intensidades de f2 e f1 podem ser iguais ou diferentes. Neste estudo foram utilizadas intensidades iguais, de 70 dB NPS. A intensidade do estímulo desencadeante pode variar em uma faixa de 0 a 70 dB NPS, e podem ser medidas na faixa de 500 a 8000 Hz.

As otoemissões resultantes costumam ser em torno de 55 dB NPS, menos intensas que o estímulo provocante. Neste caso, com um estímulo de 70 dB NPS, provavelmente seria obtida uma emissão otoacústica produto de distorsão de mais ou menos 10 ou 15 NPS, o que varia de indivíduo para indivíduo.

Deste modo foi observado o chamado "DPGRAM", o audiocócleograma, onde pode ser observado um estímulo que é o som e uma resposta que também é um som, e que fornece a função das células ciliadas externas cocleares responsáveis pelas freqüências analisadas.

Neste estudo, foi considerado como mais importante as emissões otoacústicas nas freqüências mais agudas, que avaliam o estado funcional das células ciliadas externas na espira basal da cóclea. No entanto, a avaliação é

qualitativa e as emissões otoacústicas por produtos de distorção foram avaliadas como presentes ou ausentes.

O programa Compass Meridiam 2000 – Nicolet, LTD foi utilizado para a avaliação do PEATE com os seguintes parâmetros:

- Estímulo em “Tone Burst”, 4.000 Hz, intensidades de 60, 40, 20, 10 e 5 dB, com fone de inserção auricular.
- Taxa de estímulo: 11 / seg.
- Amplificação; 5 μ V / 200 nV.
- Filtros passa alta e passa baixa: 150 e 3000 Hz.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para a avaliação anatômica de lesão celular às células ciliadas externas. As cobaias foram sacrificadas em tempo programado após serem anestesiadas com éter, sendo decapitadas e suas cócleas removidas da bula. As cócleas foram perfundidas com solução de fixação com glutaraldeído 3 % a 4 °C e mantidas na solução por 24 horas para a fixação. Os passos seguintes foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

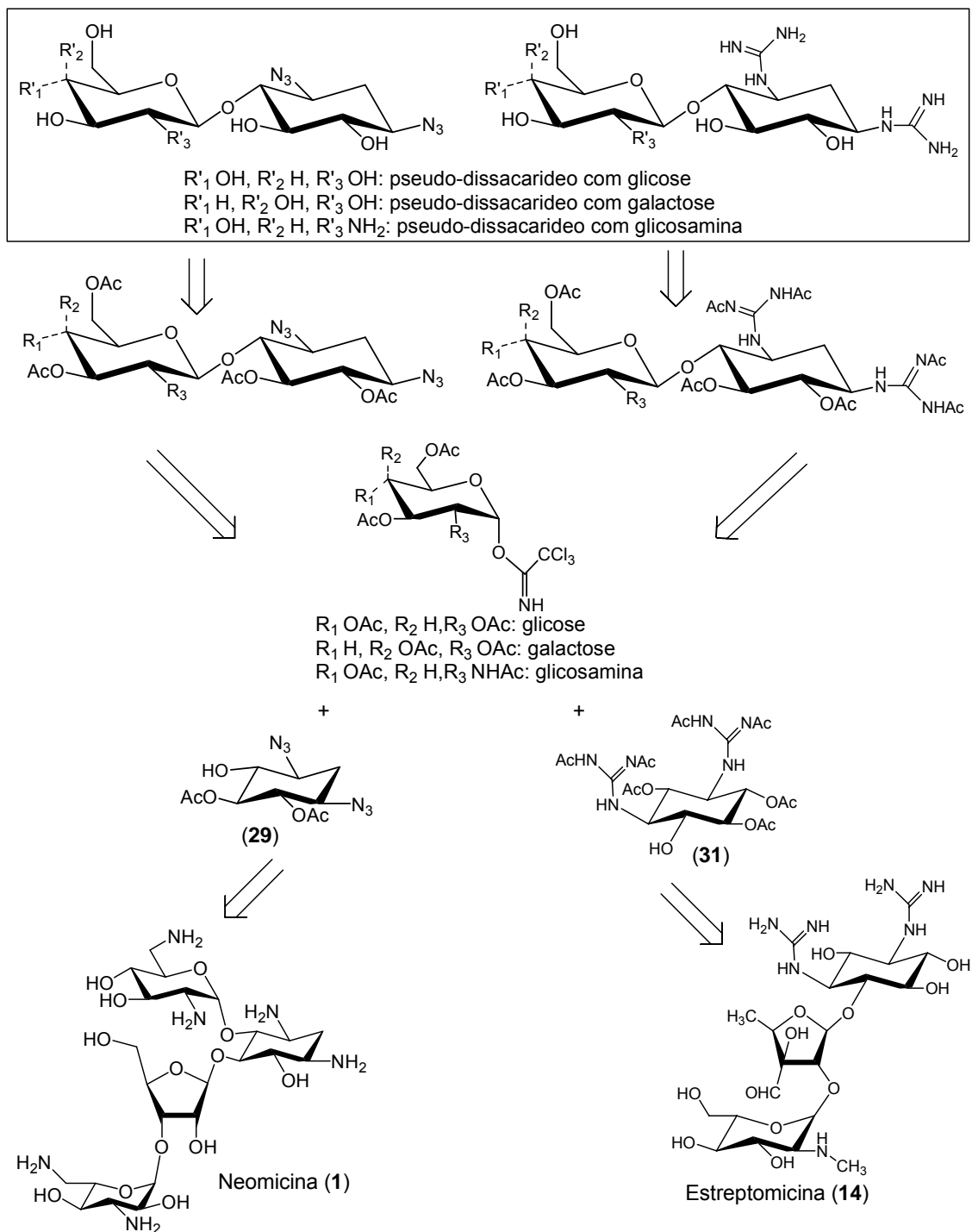
Solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4, por 4 horas a 4 °C) foi injetada através da janela redonda para fixação. Depois de lavadas 3 vezes durante 5 minutos com o mesmo tampão, as peças foram fixadas com tetróxido de ósmio 1% (2 horas a 4 °C), sendo, posteriormente, submetidas a desidratação em temperatura ambiente através de tratamento com bateria crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 95% - uma vez por 10 minutos em cada concentração), e com etanol absoluto (3 vezes, durante 15 minutos). Após a desidratação, o material foi submetido à secagem pelo método de ponto crítico em CO₂, permanecendo totalmente livre de água. O material foi fixado em porta espécime adequado e revestido em câmara de vácuo com vapores de ouro, sendo examinados por microscópio eletrônico de varredura. O microscópio eletrônico utilizado foi o do tipo JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 5200.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Planejamento sintético

Foram inicialmente proposto a preparação de seis pseudos-dissacarídeos derivados dos antibióticos aminoglicosídeos neomicina (**1**) e estreptomicina (**14**), dos quais seriam obtidos os respectivos anéis aminociclitolis, por fragmentação química e funcionalização dos grupos funcionais para geração dos respectivos aceptores glicosídicos **29** e **31**, os quais podem ser ligados aos açúcares glicose, galactose ou glicosamina, também devidamente funcionalizados, através de reações de glicosilação, gerando os respectivos pseudos-dissacarídeos protegidos, os quais por reações de desacetilação resultam nos produtos de interesse, como demonstrado no **esquema 5**.



Esquema 5: Retrossíntese dos pseudos-dissacarídeos objetivados.

Até o momento foram preparados com êxito dois doadores glicosídicos derivados da galactose, brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**) e tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**), um doador relacionado a glicose, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**42**), um acceptor derivado de neomicina, 5,6-di-*O*-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**), além de dois β -pseudos-dissacarídeos, **48** e **49**, resultantes da

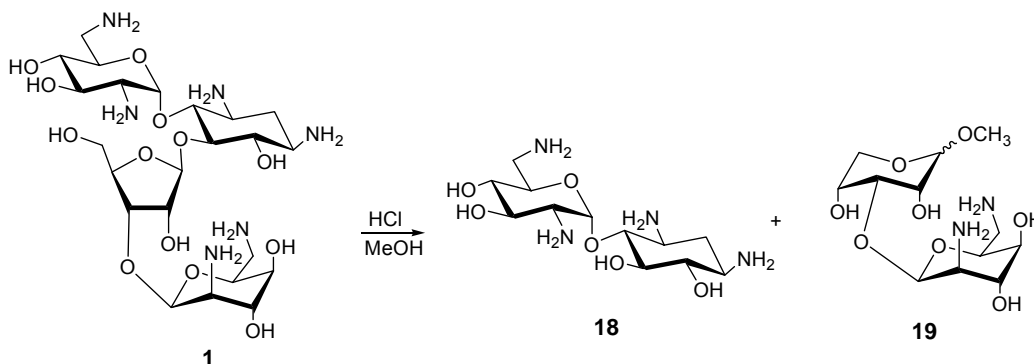
reação de glicosilação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**), com os doadores de galactose (**38**) e de glicose (**42**), respectivamente.

Foi também utilizado um doador glicosídico derivado de glicosamina, cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosila, o qual já havia sido preparado em nosso laboratório. Este composto foi testado em reação de glicosilação com o acceptor 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina, derivado da neomicina.

O planejamento de síntese de um acceptor glicosídico (**31**), derivado da estreptomicina, foi inicialmente objetivado, em apenas duas etapas, envolvendo reação de peracetilação de sulfato de estreptomicina comercial (**14**) e reação de fragmentação de estreptomicina peracetilada (**30**), porém não foi obtido sucesso em tais tentativas. Foi sintetizado estreptidina (**32**), por um método de fragmentação por hidrólise ácida, já descrita na literatura. Novas tentativas estão ainda em fase de teste e foram baseadas nos mesmos métodos de obtenção do acceptor derivado da neomicina (**29**), mais especificamente as reações de peracetilação e desproteção seletiva de apenas um grupo acetil, para assim liberar apenas um grupo hidroxila para que possa ocorrer o ataque nucleofílico deste no carbono anomérico dos doadores glicosídicos já sintetizados ou outro qualquer, contendo um bom grupo abandonador, formando o derivado pseudo-dissacarídeo correspondente.

4.2. Preparação de acceptor derivado de neomicina

4.2.1. Obtenção de cloridrato de neamina e neamina base livre



Esquema 6. Fragmentação química de **1** (neomicina).

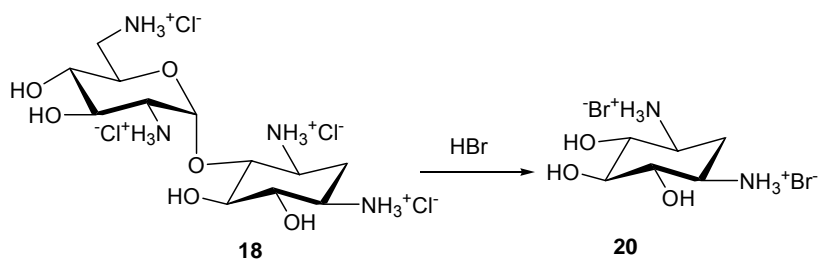
São citados na literatura diferentes métodos, porém bastante similares, para a fragmentação química do sulfato de neomicina (**1**) (**Anexo A**) com o objetivo de obter cloridrato de neamina (**18**)^{54,73-75}. O método escolhido foi o de Ford e col.⁵² por apresentar rendimentos satisfatórios, ser relativamente rápido e de fácil execução. A fragmentação química de **1** foi realizada através da metanólise ácida, como ilustrado no **Esquema 6**. A maior labilidade ácida da ligação α -glicosídica entre o anel de ribose e 2-desoxi-estreptamina é atribuída à ausência do efeito estabilizante assistido por ligações de hidrogênio dos grupos amino vizinhos; efeito esse presente nas outras ligações α -glicosídicas de neomicina (**1**)⁷⁶. Como resultado da fragmentação, há formação dos sais cloridrato de neamina (**18**) e cloridrato de neobiosaminida de metila (**19**).

A reprodução do método de Ford e col.⁵² possibilitou a obtenção de cloridrato de neamina com bom grau de pureza e rendimento satisfatório (72%). O sal do produto de metanólise ácida do sulfato de neomicina é bastante hidrofílico por se tratar de uma molécula polifuncionalizada com hidroxilas livres e aminas protonadas. Este sal foi convertido em sua base livre como descrito anteriormente pelo método descrito por Leach e Teeters^{54,55} e analisado em aparelho de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) a 500 MHz, em D₂O, com objetivo de confirmar a obtenção de neamina base livre. O espectro (**anexo B**) apresentou sinais característicos do hidrogênio anomérico em δ 5,16 (d, $J = 4$ Hz, 1H) e de C-2' metilênico do anel aminociclitol (δ 1,07 e 1,84, H_{ax} e H_{eq}). Sinais que poderiam ser atribuídos à região relativa ao anel de ribose (δ 4.30-4.70), presentes no espectro de RMN de ¹H de neomicina (**Anexo A**), estão ausentes no espectro de neamina. Os sinais no espectro obtido para neamina estão de acordo com os descritos pela literatura para este composto^{76,77}, evidenciando a formação do produto desejado.

Métodos para realização de cromatografia em camada delgada (CCD)⁷⁸ de derivados aminoglicosídeos na forma de base livre foram testados satisfatoriamente. O sistema de solventes n-propanol-trietilamina-água (8:1:4), em placa de sílica gel 60 foi o que apresentou melhores resultados para visualização dos produtos de fragmentação de **1**. A revelação se deu pelo uso de solução ácida reveladora (descrita em métodos) e aquecimento.

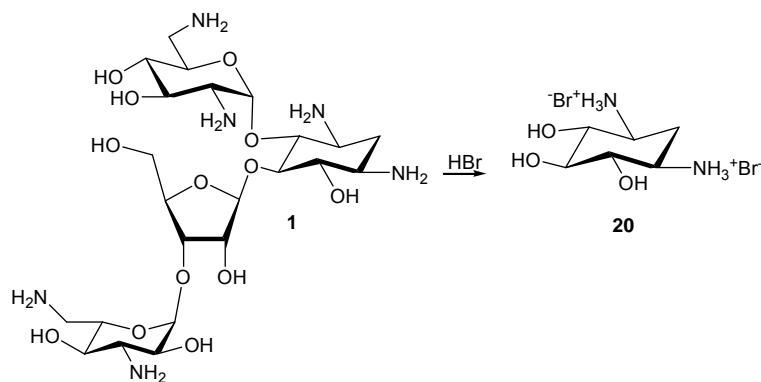
4.2.2. Obtenção de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina

- a partir do cloridrato de neamina^{54,55}



Esquema 7. Fragmentação química de cloridrato de neamina.

- a partir do sulfato de neomicina⁵⁶



Esquema 8. Fragmentação química de neomicina.

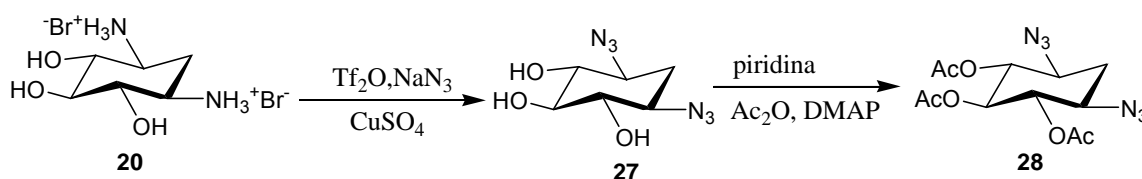
A fragmentação química de neamina (**18**) gera o bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**)^{54,55}. Apesar de possuir uma estrutura relativamente simples, o composto **20** apresenta rotas sintéticas complexas e com rendimentos pouco satisfatórios devido à sua estereoquímica e polifuncionalidade. A fragmentação química de **18** é apontada por Busscher e col.⁵ como a forma mais conveniente para obtenção de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**). O método de fragmentação consiste na hidrólise em meio fortemente ácido, utilizando HBr 48% e forte aquecimento, como demonstrado no **Esquema 7**. No caso de neamina (**18**) a ligação glicosídica possui grupos amino em sua vizinhança que a torna mais estável e difícil de ser hidrolisada. Por isso, as condições reacionais utilizadas na fragmentação de **18** são bem mais drásticas quando comparadas com a utilizada na fragmentação de **1**. Apesar dessas condições reacionais drásticas, o composto **20** foi obtido em bom rendimento (81%). A temperatura de refluxo deve ser

rigorosamente observada não ultrapassando 130°C, pois o material de partida pode se decompor em temperaturas mais elevadas e gerar produtos indesejados.

Bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**) foi obtido também diretamente por hidrólise ácida de sulfato de neomicina (**1**)⁵⁶, como demonstrado no **Esquema 8**, com rendimento de 59%, sendo este bem próximo ao rendimento global via cloridrato de neamina, que é de 58%. Portanto, como os rendimentos por ambas as rotas sintéticas são aproximadamente os mesmos, demonstrou ser mais interessante a síntese envolvendo apenas uma etapa (**Esquema 8**), pois além de menos trabalhosa, evita o gasto de maiores quantidades de materiais e a geração de resíduos.

O espectro de RMN de ¹H de **20**, demonstrado no **Anexo C**, está de acordo com o descrito na literatura⁷⁶ e evidencia a formação do produto desejado com sinais relativos aos hidrogênios da posição C-2 em δ 1,66 e 2,30. A ausência do sinal do hidrogênio anomérico δ 5,16 e C-6' metilênico em δ 2,89, por exemplo, relativos ao anel 2,6-diaminoglicosídico de **18** também são evidências da formação do produto desejado. O ponto de fusão experimental de **20** foi 282°C, próximo ao relatado na literatura (280°C)^{55,76}.

4.2.3. Preparação de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina



Esquema 9. Reação de conversão dos grupos amino em azido e acetilação das hidroxilas de **27**.

A transformação de grupo amino em azido é descrita na literatura com rendimento de 69%. A reprodução desta técnica conduziu a obtenção do produto 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**)⁵⁷. O método de síntese se mostrou de fácil execução, porém a purificação por coluna cromatográfica descrita na referência não foi reprodutível, visto resultar em uma massa bruta não condizente com rendimento possível (maior que 100%). Tal fato ocorreu provavelmente devido ao arraste dos sais utilizados no meio reacional, pelo solvente utilizado na cromatografia de coluna

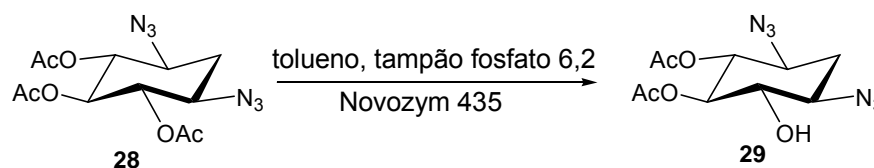
clássica [diclorometano/acetona (1:1)], já que na cromatografia de camada delgada observou-se apenas uma mancha, e na análise de RMN de ^1H não foi identificada presença de impurezas orgânicas.

O espectro de RMN de ^1H de **27** (**Anexo D**), confirmou a formação dos grupos azidos pelo aumento de deslocamento químico (desblindagem) dos hidrogênios de C-1 e C-3, que antes apresentavam sinais entre 3,22-3,14 ppm no intermediário **20** e os sinais referentes aos mesmos hidrogênios encontram-se entre 3,53-3,47 ppm no produto **27**.

O produto bruto foi submetido diretamente à reação de acetilação das hidroxilas com anidrido acético em piridina e DMAP, o qual pode ser purificado por coluna cromatográfica, fornecendo um rendimento global, para estas duas etapas, de 25% de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**28**), bem inferior ao rendimento de 69% do artigo citado para 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina, **27**, (primeira etapa mostrada no **Esquema 9**)⁵⁷.

O espectro de RMN de ^1H de **28** (**Anexo E**) também confirmou a obtenção do composto desejado pelo desblindamento dos hidrogênios C-4, C-5 e C-6 causado pela presença do grupo acetil, cujo multipletto foi deslocado de 3,41-3,35 ppm do intermediário **27** para 5,03-4,94 ppm no intermediário **28**.

4.2.4. Preparação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina



Esquema 10. Síntese de **29** por desacetilação seletiva de **28**.

A síntese do aceptor glicosídico 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) foi realizada após tentativas preliminares de síntese de outros aceptores glicosídicos, como 4,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (objetivo inicial) e 5,6-O-isopropilideno-2-desoxi-estreptamina.

A primeira tentativa de proteção seletiva das hidroxilas de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**) foi realizada pelo método de Ding e col. (2000)⁷⁹, no qual

foi utilizado piridina e anidrido acético (2,3 equivalentes), esta concentração de Ac_2O , menor que a usada em reações de peracetilação, além da temperatura mantida em aproximadamente $-15\text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas com gelo seco em etanol, faz com que esta reação de acetilação seja mais branda e assim nem todos os grupos hidroxilas são acetilados. Por este método o autor relata a obtenção de 4,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina com um rendimento de 25%, a partir de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**), sem relatar detalhes sobre a purificação deste produto. A reprodução desta técnica conduziu à formação de vários produtos (cinco) e manteve certa proporção de material de partida conforme visualizado em placa CCD (Hexano 1:1 Acetato de Etila). Devido à proximidade dos Rf dos produtos não foi possível a purificação, nem a identificação dos compostos formados. Separação cromatográfica por CLAE não foi realizada porque o rendimento seria muito baixo, visto que pela cromatografia de camada delgada, percebeu-se que as manchas formadas são de igual intensidade, o que provavelmente forneceria um rendimento significativamente inferior ao do artigo citado.

A segunda tentativa de proteção seletiva de apenas duas hidroxilas de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**) foi realizada pelo método de proteção de hidroxilas vizinhas com 2,2-dimetoxipropano⁵⁹. A reação foi rápida, com formação de apenas uma mancha em CCD, a qual apresentava Rf maior que o material de partida, conforme esperado. O composto formado, após purificação, foi analisado por RMN de ^1H (**Anexo F**), onde foi observada a presença de mistura. Esta mistura pode ser esperada como sendo os compostos 4,5- e 5,6-O-isopropilideno, como já havia sido relatada por Lemieux e col. (1972)⁸⁰.

A análise de RMN de ^{13}C (**Anexo G**) mostra que o composto sintetizado possui os sinais de carbono característicos, o qual pode ser comparado com a atribuição de Ding e cols. (2003)⁸¹, na qual os deslocamentos dos sinais de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) são visualizados em: δ_{H} 112.7, 79.5, 74.7, 74.0, 62.5, 57.2, 32.0, 26.7, 27.8.

Desta forma, síntese de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) foi realizada pela desacetilação enantioseletiva da hidroxila 4 de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina com Novozym 435 (lípase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica: Novo Nordisk), **esquema 10**. A reação foi de fácil execução, formando o produto com uma hidroxila livre, o qual possui um Rf menor que o material de partida. O rendimento foi de 63%, um pouco menor que o da

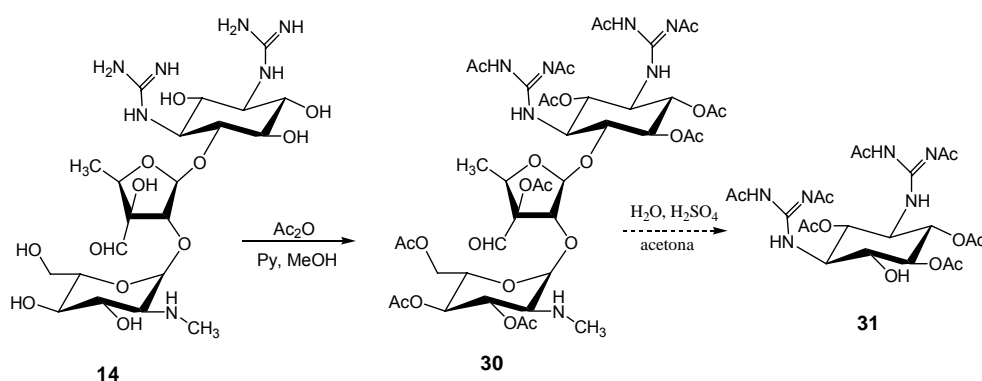
referência (71%), sendo o material de partida que não reagiu recuperado para nova reação⁵⁸.

O produto **29** purificado (5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina) foi analisado por RMN de ¹H, (**Anexo H**) e seus sinais confirmados com os dados da literatura⁵⁸. Cabe ressaltar que o intermediário **28**, assim como seus precursores, é um composto meso devido à existência de um plano de simetria na molécula. No entanto, após a reação de desacetilação seletiva com lipase, o produto formado **29** trata-se de apenas um estereoisômero.

4.3. Preparação de acceptor derivado de estreptomicina

4.3.1. Tentativa de peracetilação de estreptomicina e posterior fragmentação

Inicialmente, foi proposto a peracetilação de estreptomicina (**14**) objetivando a posterior fragmentação, para que fosse obtido em apenas duas etapas o derivado de estreptidina contendo apenas uma hidroxila livre (**31**), o qual seria o acceptor glicosídico na reação de glicosilação, para formação dos pseudos-dissacarídeos propostos.



Esquema 11. Peracetilação de estreptomicina (**14**) seguida de fragmentação do produto acetilado (**30**) para obtenção de **31** (acceptor).

Assim, a tentativa de síntese de acetil-estreptomicina (**30**) foi realizada pela metodologia de Wolfrom e col. (1954)⁶⁰. O espectro obtido a partir do sulfato de estreptomicina comercial **14**, **Anexo I**, mostra os sinais característicos do composto, como o do hidrogênio do grupo aldeído ligado ao anel de ribose em 9,8 ppm, a

metila, também ligada a ribose em 1,24 ppm, a metila ligada ao nitrogênio do anel amino-açúcar em 2,85 ppm, além do dubleto referente ao hidrogênio anomérico (1') em 5,57 ppm. O espectro do composto **30** (**anexo J**), referente ao composto isolado da reação de peracetilação de **14**, embora não seja possível sua total atribuição devido ao grau de pureza, foi possível visualizar alguns sinais correspondentes ao produto desejado, como os hidrogênios do grupo acetil, com sinal na região de 2 ppm integrando para 40, além dos sinais que antes estavam entre 3,3 a 4 ppm, no material de partida, terem sido deslocados para região de desblindagem entre 3,5 até 5,5 ppm, característico dos hidrogênios metínicos, quando ocorre a proteção das hidroxilas com o grupo acetil.

Desse modo, procedemos a tentativa de hidrólise deste composto (segunda etapa do **Esquema 11**), objetivando a obtenção do anel de estreptidina com apenas a hidroxila 4 livre. Dada a inexistência de método na literatura de hidrólise de acetil-estreptomicina, se optou pela adaptação da hidrólise de estreptomicina conforme descrito por Barba-Behrens e col. (1990)⁶¹. Entretanto, não houve sucesso nesta tentativa, pois não foi possível a purificação do produto no meio reacional.

4.3.2. Obtenção e peracetilação de estreptidina

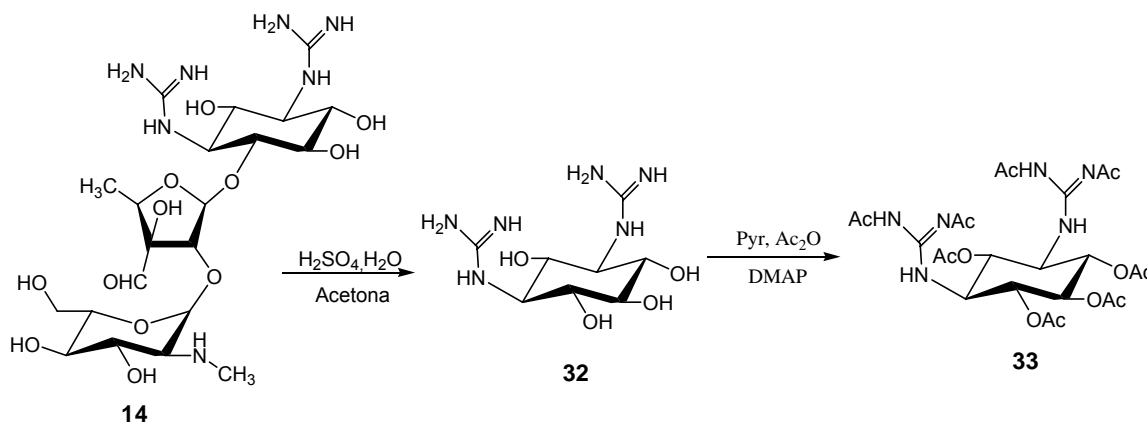
Foi idealizado novo planejamento para obtenção do acceptor derivado de estreptomicina, visto que tentativas pelo método proposto anteriormente não foram satisfatórias. Este método foi baseado no procedimento de obtenção de acceptor derivado de neomicina (**29**), no qual primeiro foi obtido o anel aminociclitol correspondente para posterior funcionalização e emprego na reação de glicosilação.

Deste modo, foi realizada a fragmentação química do sulfato de estreptomicina comercial (**14**) por um método de hidrólise ácida, já descrito na literatura⁵³, para obtenção de estreptidina (**32**), **Esquema 12**.

Pode-se analisar pelo espectro de massas a formação do composto através do sinal do íon molecular referente ao produto **32** (m/z 263). Foi também realizada análise por RMN de ¹H onde é possível observar dois sinais na faixa de deslocamento entre 3,6 e 3,3 ppm, com integrais de 4 e 2 respectivamente, os quais provavelmente se referem aos hidrogênios dos carbonos ligados a hidroxilas e os outros dois referentes aos hidrogênios dos carbonos ligados ao grupo guanidina (**anexo K**). Estes dados foram confirmados em literatura, onde há descrito a

presença de um multipletto entre 3,25 e 3,45 ppm referente aos 6 hidrogênios do anel de estreptidina⁸².

O composto obtido foi peracetilado, baseado no método de peracetilação do anel aminociclitol obtido de neomicina, bromidrato de 2 desoxi-estreptamina (**20**). Houve formação da mesma coloração roxa observada na reação análoga, após três dias de reação. Houve uma mistura de compostos, a qual a mancha majoritária (**33**) foi purificada e analisada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. O **anexo L** indica a formação do produto **33** com integrais próxima de 24, em torno de 2 ppm, referentes aos grupos protetores O-acetil. O composto será submetido a novas análises para confirmação de sua estrutura, para que as etapas seguintes sejam realizadas.



Esquema 12. Fragmentação química de estreptomicina (**14**) para obtenção de estreptidina desprotegida (**32**) e posterior peracetilação para formação do produto **33**.

4.4. Preparação de doadores glicosídicos

A síntese de oligossacarídeos requer a diferenciação dos grupos hidroxílicos (com reatividade similar) e a obtenção estereosseletiva de produtos, uma vez que a cada glicosilação é gerado um novo centro estereogênico. Por essa razão, não existe um sistema automatizado rápido para a síntese de carboidratos, como ocorre para proteínas e ácidos nucleicos⁸³.

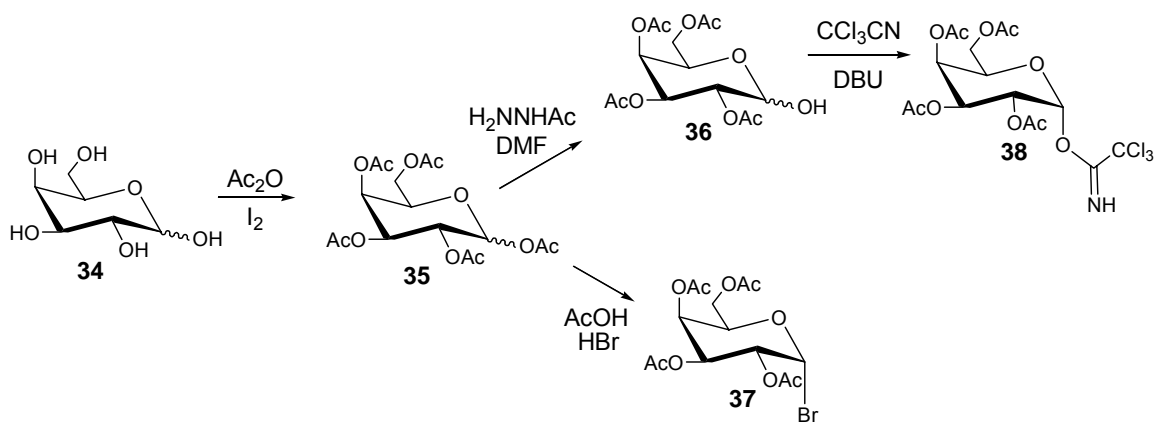
Adicionalmente, a síntese de carboidratos envolve o emprego de estratégias de proteção e desproteção das hidroxilas, de forma altamente seletivas, que conduzem a reações regioseletivas e ao aumento do número de etapas da rota sintética⁸⁴.

4.4.1 Preparação do doador de galactose

Doadores glicosídicos são açúcares (monossacarídeos, di, tri, tetra, etc) que apresentam grupos abandonadores ligados ao carbono anomérico (C-1), permitindo o ataque de um nucleófilo devidamente funcionalizado (aminoácido, açúcar, etc). Dentre os doadores glicosídicos mais comuns podem ser citados os haletos, acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos. Os haletos são os doadores mais empregados, seguidos pelos acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos^{85,86}.

Apesar dos haletos serem os mais empregados em reações de glicosilação, algumas desvantagens podem ser citadas: condições fortemente ácidas são necessárias para gerar os haletos, baixa estabilidade térmica, grande sensibilidade à hidrólise e o fato de a síntese de derivados glicosídicos a partir dos haletos ser realizada em presença de sais de metais pesados (ácidos de Lewis) como promotores (preferencialmente de mercúrio e prata). Além disso, esses sais de metais são caros e perigosos quanto ao manuseio (toxicidade do sal de mercúrio e perclorato de prata com potencial explosivo)⁸⁷.

Não obstante, nos últimos 5 anos o emprego do doador tricloroacetimidato cresceu cerca de cinco vezes e algumas vantagens podem ser citadas para justificar o interesse desse doador no trabalho: (i) alto rendimento em sua síntese (80 a 90 %), (ii) alto rendimento em reações de glicosilação, (iii) ativação por ácido de Lewis (como o promotor TMSOTf), mesmo em baixas temperaturas, fazendo com que esse doador seja uma boa escolha quando o acceptor glicosídico for instável em condições ácidas ou mesmo à temperatura ambiente^{85,87}.



Esquema 13. Síntese de 37 e 38, doadores glicosídicos derivados da galactose (34).

Foi primeiramente sintetizado o brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**), **Esquema 13**, o qual envolve apenas duas etapas sintéticas, a primeira de peracetilação para formação de 1,2,3,4,6-Penta-*O*-aceti-D-galactopiranosose (**35**), e a segunda para formação do brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**), com rendimento global de 55,5%, sendo o produto obtido com bom grau de pureza.

O espectro de RMN de ^1H do composto **37** (**Anexo M**) confirma a obtenção do produto, apresentando sinais característicos, como o de H-1 em 6,7 ppm, em região de desblindagem devido à ligação do bromo no mesmo carbono, com $J_{1,2}$ de 3,9 Hz, característico de hidrogênio β na posição anomérica acoplado com H-2 na posição axial.

Além do brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**), outro doador de galactose foi sintetizado, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**), o qual é preparado em uma etapa a mais, para formação do intermediário 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosose (**36**), utilizando o reagente acetato de hidrazina (H_2NNHAc), que promove desproteção regioseletiva do grupo acetil da posição anomérica do composto peracetilado. A etapa seguinte envolveu a ativação da posição anomérica também com um bom grupo abandonador (tricloroacetimidato). A reação do grupo hidroxila da posição anomérica (catalisada por base) com nitrilas elétron-deficientes, como tricloroacetônitrilas e trifluoroacetônitrilas, é um método muito conveniente para introduzir acetimidato como grupo abandonador.

Dependendo da força da base utilizada na reação de tricloroacetimidização é possível obter tanto anômero α quanto o β do tricloroacetimidato. Portanto, a formação preferencial de um dos isômeros durante a reação de formação do doador glicosídico pode ser conseguida através da seleção da base e temperatura mais adequada^{85,87}.

É importante ressaltar que a configuração anomérica do doador funcionalizado com tricloroacetimidato é crucial para o controle estereoquímico durante a formação da ligação glicosídica, isto é, a síntese do doador glicosídico com o grupo abandonador em posição α permitirá que a ligação glicosídica com o aceptor seja na posição β , pois o ataque do nucleófilo (hidroxila livre do aceptor

glicosídico) ocorre pelo lado oposto do grupo abandonador (tricloroacetimidato), invertendo a posição do hidrogênio anomérico.

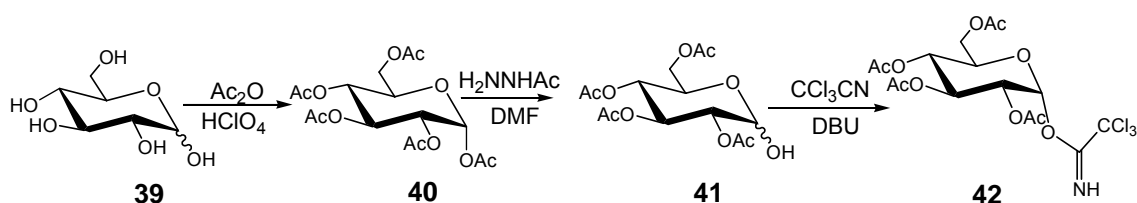
Sendo assim, o procedimento escolhido⁶⁴ levou à obtenção apenas do produto termodinamicamente mais estável tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**), com rendimento de 80 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **38** (**anexo N**) apresentou um singlete em 8,65 ppm que corresponde ao sinal do imidato (NH) e um dubleto em 6,61 ppm que corresponde ao H-1 ($J_{1,2}$ 3,5 Hz). Como não foi observado H-1 na posição axial e a estrutura foi confirmada como 100 % α .

4.4.2. Preparação de doador de glicose

A síntese do doador de glicose, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**42**), **esquema 14**, foi realizada da mesma maneira que tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila, excetuando-se sua primeira etapa, reação de peracetilação, a qual foi realizada por outro método⁶⁵. Este procedimento resultou em um rendimento menor, 44%, contra 99% obtido no método anterior envolvendo o derivado de galactose. Embora esta nova tentativa de peracetilação forme apenas o anômero α , composto **40**, este fato não é relevante já que é importante ter apenas o doador glicosídico final desta rota com grupo abandonador na posição α , para facilitar a reação de glicosilação na posição β .

Após síntese do composto **40** (1,2,3,4,6-Penta-O-acetil- α -D-glicopiranosose), foram efetuadas mais duas etapas para obtenção dos compostos 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicopiranosose (**41**) e tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**42**), **esquema 14**.

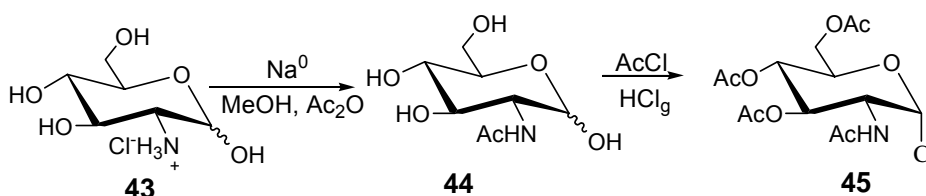


Esquema 14. Síntese de **42**, doador glicosídico preparado por funcionalização da glicose.

O espectro de RMN de ^1H do composto **42** (**Anexo O**) confirma a obtenção do produto, apresentando sinais característicos, como o de H-1, em 6,55 ppm, com constante de acoplamento $J_{1,2}$ de 3,6 Hz, referente ao hidrogênio anomérico na posição β , ou seja, o grupo abandonador tricloroacetimidato em posição α .

4.4.3 Preparação de doador de glicosamina

O doador glicosídico cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosídeo (**9**) foi preparado em duas etapas (Horton, 1972)⁶⁶, como mostra o **Esquema 15**.



Esquema 15. Preparação de **45** a partir de cloridrato de glicosamina **43**.

Na primeira etapa, 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosose (**44**) foi preparado pelo tratamento de cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glucose (**43**) com metóxido de sódio (gerado pela adição de sódio metálico em metanol anidro), base forte capaz de neutralizar o cloridrato, e originar o íon amideto (bom nucleófilo). Desta forma, o grupo amino do açúcar reagiu facilmente com anidrido acético adicionado posteriormente ao meio reacional, gerando o correspondente derivado *N*-acetil.

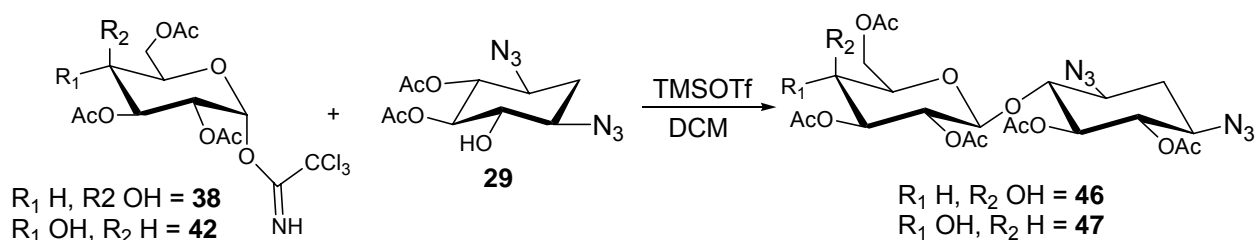
Esta etapa da reação é altamente regioseletiva, ocorrendo acetilação somente do grupo amino, já que este é um melhor nucleófilo se comparado com os oxigênios hidroxílicos. O tratamento de **43** com NaOMe e Ac_2O forneceu o produto **44** com 77% de rendimento.

Na segunda etapa, o reagente 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicopiranosose **44** foi empregado como precursor do cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosídeo (**45**). A mistura reacional, resultante do tratamento de **44** com cloreto de acetila, foi submetida a refluxo a 40°C e forneceu o produto **45** com rendimentos que não ultrapassaram 20%, com formação de grande quantidade do intermediário peracetilado (20%).

Como forma de melhorar o rendimento da reação, o meio reacional foi tratado com ácido clorídrico gasoso durante 4 horas, até saturação, conduzindo ao isolamento do composto **45** com 48% de rendimento.

No **anexo P** podemos observar sinais característicos do doador glicosídico, composto **45**, como do H-1, em 6,2 ppm, com constante de acoplamento de 3,6 Hz, característico do composto α , além dos sinais em torno de 2 ppm, integrando pra 12, confirmando que as três hidroxilas, assim como o grupamento amino da posição 2 foram protegidos.

4.5. Preparação dos pseudos-dissacarídeos derivados de neomicina



Esquema 16. Condensação de **38** e **42** com **29** para obtenção dos pseudos-dissacarídeos **46** e **47**.

A reação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) com brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**) foi realizada pelo método de Kartha e col. (1997)⁶², no qual foi utilizado como catalisador iodo em concentrações bem maiores que a catalítica. O iodo é um reagente barato, fácil de manusear e capaz de polarizar o grupo abandonador da posição anomérica do doador glicosídico, facilitando o ataque nucleofílico da hidroxila do composto aceptor (**29**). Pela cromatografia de camada delgada observou-se a formação de duas manchas bem próximas, ligeiramente abaixo do material de partida, as quais foram isoladas e analisadas por RMN de ¹H, porém o rendimento não foi possível de calcular devido ao produto estar impuro.

O espectro da mancha superior isolada parece indicar a formação do isômero α (**anexo Q**), devido ao acoplamento do hidrogênio anomérico (H-1') em 5,42 ppm com H-2', o qual apresentou deslocamento químico em 5,27 ppm, com J de 2,8 Hz, e não com um J de aproximadamente 8 Hz, característica de acoplamento diaxial

presente no isômero β . Além disso, o H-1' do isômero α esta mais desblindado que o isômero β , pois o hidrogênio fica na posição equatorial.

O espectro da mancha inferior (**anexo R**) demonstra a presença de impureza junto ao isômero β , provavelmente referente ao material de partida (5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina). Esta observação se baseia no fato de serem visualizados sete hidrogênios referentes ao anel ciclitol (**anexo H**), além dos já esperados para o isômero β , **anexo S**.

Outro método de condensação experimentado foi a reação de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) com tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**38**) (**Esquema 16**), adaptada dos trabalhos de Soliman e col. (2003)⁶⁷ e Liu e col. (2006)⁶⁸. Nesta metodologia além de utilizarmos outro catalisador (TMSTf), utilizamos também um doador de galactose com um melhor grupo abandonador. Por este método, houve apenas formação do isômero β (**46**). O rendimento foi de 86%, com a obtenção de um produto mais puro, além da reação ser mais rápida e de purificação simplificada, já que não há formação do isômero α .

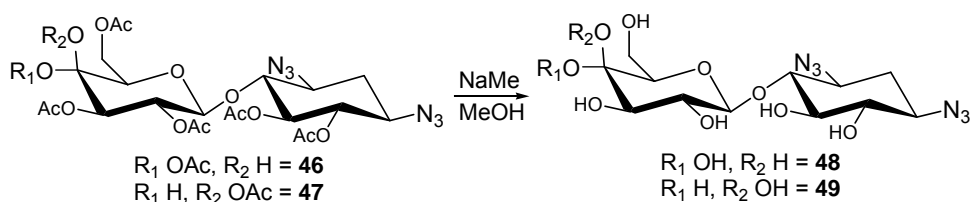
No espectro do composto **46** mostrado no **Anexo S**, observa-se que os deslocamentos do hidrogênio H-1 do doador glicosídico tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila que era observado em 6,61 ppm desaparece, o sinal do H-1' do pseudo-dissacarídeo β formado aparece mais blindado em 4,74 ppm ($J_{1,2'}$ 7,8 Hz), confirmando a formação da ligação glicosídica da galactose ao anel de 2-desoxi-estreptamina, cujos sinais característicos, como dos hidrogênios metilênicos em 1,5 ppm (axial) e 2,34 ppm (equatorial).

O outro pseudo-dissacarídeo obtido (**47**), foi preparado pelo mesmo método de condensação utilizado anteriormente, ou seja, descrito por Soliman e col. (2003)⁶⁷ e Liu e col. (2006)⁶⁸, **Esquema 16**, utilizando-se o mesmo acceptor glicosídico já padronizado, 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**), variando apenas o doador glicosídico, tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**42**). O rendimento foi de aproximadamente 89%, bem próximo do composto **46** (86%), obtido pelo mesmo método, houve também apenas a formação do isômero β . O espectro de RMN de ^1H do composto **47** purificado, **Anexo T**, mostrou a formação do produto desejado, mantendo as mesmas características dos sinais relativos ao anel aminociclitol. Pequena mudança pode ser observada nos sinais relativos ao anel glicosídico, destacando-se o hidrogênio do carbono 4, o qual diferencia os anéis da galactose e da glicose, o primeiro em posição axial, o qual desdobra em um

dubleto na região de 5,36 ppm, e o outro em posição equatorial, desdobrando em um tripleto aparente, na região de 5,08 ppm.

Foi também testada reação de glicosilação do cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**45**) com 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) em 1,2-dicloroetano utilizando-se como promotor da reação o brometo de mercúrio (HgBr_2), porém por este método⁸⁸, não foi evidenciada a formação do produto desejado.

Os pseudos-dissacarídeos formados, **46** e **47**, foram desprotegidos, **esquema 17**. Esta desproteção foi realizada em solução de metóxido de sódio em metanol, adicionando-se a solução de metóxido de sódio, previamente preparada (descrita em métodos), gota a gota e monitorando o pH do meio reacional em papel tornassol para que este permanecesse entre 9 e 10, já que soluções mais básicas mostrou degradar o material de partida. A análise de RMN de ^1H dos compostos desprotegidos, **48** e **49**, **anexo U** e **anexo V**, respectivamente, pertencente aos derivados contendo galactose e glicose, confirmaram a formação destes produtos, os quais apresentam os sinais relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos do anel contendo hidroxilas livres mais blindadas em relação aos compostos protegidos, já que o grupo acetil atrai elétrons e desprotege estes hidrogênios do anel.



Esquema 17. Desproteção de **46** e **47** para obtenção dos pseudo-dissacarídeos **48** e **49**.

4.6. Testes de atividade biológica

4.6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras

Um ponto importante na pesquisa e descoberta de novos antibióticos é o estabelecimento de técnicas para determinação da atividade antimicrobiana. Quando o teste é realizado através de microdiluição em caldo, podem ser realizadas leituras espectrofotométricas ou visuais. Se há indisponibilidade de

espectrofotômetro de microplacas e possibilidade de erro da leitura visual, utiliza-se Cloreto de trifeniltetrazólio (CTT), um reagente que detecta metabolismo em células. O CTT se reduz em presença de H^+ , íon proveniente do metabolismo de células microbianas viáveis, formando o Trifenil formazan, de cor vermelha. O aparecimento da cor vermelha indicará se houve ou não atividade celular bacteriana, indicando o poder inibitório das substâncias testadas⁸⁹.

Na faixa de concentração avaliada, entre 90 e 15 $\mu\text{g/mL}$, os compostos **48**, **49** e bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**) não apresentaram atividade inibitória em nenhuma das cepas testadas, ou seja, uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) maior que 90 $\mu\text{g/mL}$. A neamina (**18**) apresentou atividade apenas para *E. coli*, com uma Concentração Inibitória Mínima de 25 $\mu\text{g/mL}$. Os antibióticos neomicina (**1**), estreptomicina (**14**) e penicilina (controles positivo), foram testados nas concentrações entre 5,9 e 0,0115 $\mu\text{g/mL}$, **Tabela 1**.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana (CIM) de diferentes amostras derivadas de neomicina

<i>Amostras</i>	<i>CIM $\mu\text{g/mL}$ S. aureus</i>	<i>CIM $\mu\text{g/mL}$ K. rizophila</i>	<i>CIM $\mu\text{g/mL}$ E. coli</i>	<i>CIM $\mu\text{g/mL}$ P. aeruginosa</i>
48	> 90	> 90	> 90	> 90
49	> 90	> 90	> 90	> 90
20	> 90	> 90	> 90	> 90
18	> 90	> 90	25,0	> 90
Neomicina (1)	NT	NT	1,475	> 5,9
Estreptomicina (14)	NT	NT	2,950	2,950
Penicilina	0,1844	<0,011	NT	NT

Legenda: CIM = concentração inibitória mínima, NT = não testada

Os compostos testados podem ser avaliados com maior número de bactérias, de diferenças cepas nos mesmos intervalos de concentração.

4.6.2. Testes de Ototoxicidade

A técnica para a preparação da amostra para o teste de ototoxicidade foi desenvolvida em nosso laboratório e por isso foi necessário realizar testes com a intenção de validar o processo de esterilização dos frascos que acondicionou a amostra e o manuseio asséptico destes. A amostra **48** submetida à filtração em

membrana estéril com porosidade de 0,22 μm , foi considerada livre de contaminação microbiana. Assim, foi necessário a verificação das condições estéreis do material de acondicionamento desta amostra. Para tal, dois frascos vazios foram esterelizados seguindo o método descrito na **seção 3.2.2**. Depois de serem vedados, foram levados ao Laboratório de Microbiologia da FCFRP-USP, para testar se realmente estavam livres de contaminação microbiana. O teste de validação apontou ser eficiente a metodologia adotada, garantindo a preparação asséptica das amostras.

Os testes de toxicidade otológica avaliaram os danos morfofuncionais causados pela aplicação intratimpânica do composto **48** preparado aos tecidos coclear e vestibular de cobaias albinas fêmeas (*Cavia porcellus*). Os testes de emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e de Potencial Evocado de Tronco Encefálico (PEATE) avaliaram os danos funcionais causados à capacidade de audição das cobaias.

Quanto as análises das emissões otoacústicas por produtos de distorção, foi observado a presença das mesmas tanto nas orelhas em estudo como nas controle, no pré e pós tratamento. Os limiares auditivos pelo PEATE mostraram-se mantidos no pré e pós tratamento com variação entre 5 e 10 Db NA, mostrando a não ocorrência de lesão ao sistema auditivo dos animais pelas drogas em estudo, **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 2: Avaliação audiológica funcional por emissões otoacústicas por produtos de distorção. Exame pré aplicação do produto **48**.

	DIREITA	ESQUERDA	DIREITA	ESQUERDA
IDENTIFICAÇÃO PRÉ DROGA	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N
Animal 1	20	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 2	5	20	PRESENTE	PRESENTE
Animal 3	10	10	PRESENTE	PRESENTE
Animal 4	5	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 5	5	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 6	10	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 7	5	5	PRESENTE	PRESENTE

Tabela 3: Avaliação audiológica funcional por emissões otoacústicas por produtos de distorção. Exame pós aplicação do produto **48**.

	DIREITA	ESQUERDA	DIREITA	ESQUERDA
IDENTIFICAÇÃO PÓS 10 DIAS	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N
Animal 1	10	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 2	10	10	PRESENTE	PRESENTE
Animal 3	10	10	PRESENTE	PRESENTE
Animal 4	10	10	PRESENTE	PRESENTE
Animal 5	10	5	PRESENTE	PRESENTE
Animal 6	10	15	PRESENTE	PRESENTE
Animal 7	10	5	PRESENTE	PRESENTE

Quanto às análises da microscopia eletrônica de varredura todas as cócleas analisadas, tanto na orelha em experimento (ESQUERDA) quanto na orelha controle (DIREITA) houve normalidade do aspecto histopatológico, havendo presença de cílios das células ciliadas externas em todas as espiras da cóclea, com manutenção da citiarquitectura ciliar no padrão v/w esperado.

Quanto à avaliação estrutural do sistema vestibular, sáculo e utrículo, foi encontrada importante alteração na arquitetura ciliar e sinais de sofrimento celular das células ciliadas vestibulares com alterações importantes de redução no número de cílios, cílios encurtados, perda da configuração do kinocílio, o qual encontra-se muito encurtado, presença de substância globular em excesso e presença de otólitos porosos tipo uma esponja, principalmente no sáculo. **Tabela 4.**

Tabela 4: Avaliação por microscopia eletrônica dos danos causados pelo produto **48** aos sistemas coclear e vestibular, localizados na orelha interna.

	CÓCLEA		SISTEMA VESTIBULAR (SÁCULO E UTRÍCULO)	
	DIREITA	ESQUERDA	DIREITA	ESQUERDA
IDENTIFICAÇÃO PÓS 10 DIAS	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N	ÁGUA DESTILADA	48 0,222N
Animal 1	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 2	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 3	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 4	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 5	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 6	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO
Animal 7	CILIOS NORMAIS	CILIOS NORMAIS	NORMAL	ALTERADO

Conclusão

5. Conclusão

As sínteses dos aceptores glicosídicos parcialmente protegidos e funcionalizados foram mais complexas. Inicialmente, o trabalho foi concentrado na síntese do acceptor derivado de neomicina, a qual após otimização, foi repetida sua rota várias vezes para aumentar a quantidade do acceptor, visto que tentativa de aumento de escala, necessária para os ensaios *in vivo*, por vezes resultou em falhas nas reações já padronizadas anteriormente. A funcionalização do acceptor derivado de estreptomicina foi baseada no mesmo método descrito para o acceptor derivado de neomicina. A manipulação dos grupos funcionais do anel de estreptidina foi inicialmente mais difícil, provavelmente por apresentar dois grupos guanidinas. Os resultados obtidos poderão ser continuados para síntese dos pseudos-dissacarídeos inicialmente propostos.

A síntese dos doadores glicosídicos, apesar de trabalhosa, por envolver várias etapas de funcionalização, foi de fácil execução, visto que em nosso laboratório possui rotas estabelecidas para alguns destes doadores.

Usando as reações convencionais de glicosilação foi possível, até o momento, obter dois pseudos-dissacarídeos inéditos na literatura, produtos **46** e **47**, além dos seus correspondentes derivados desprotegidos.

Um dos pseudos-dissacarídeos sintetizados, composto **48**, foi submetido a ensaio de ototoxicidade, o qual apresentou atividade vestibular seletiva desejada. Quatro derivados de neomicina foram avaliados em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC). No entanto, na concentração usada não foi observada atividade antimicrobiana para os dois pseudos-dissacarídeos sintetizados, **48** e **49**. Poderão ser realizados futuramente estudos de modelagem molecular.

Dos seis compostos inicialmente propostos, foram preparados dois produtos finais, sendo que a preparação dos pseudo-dissacarídeos derivados do antibiótico comercial estreptomicina, esta sendo continuada em nosso laboratório.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Chambers, H. F.; Sande M. A.; Fármacos antimicrobianos (CONTINUAÇÃO): Os Aminoglicosídeos. In: GOODMAN & GILMAN, (eds.) **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9.ed, Rio de Janeiro - RJ, McGrawHill, cap. 46, p. 812-825, 1996.
2. Mitscher, L. A.; Antibiotics and antimicrobial agents. In: FOYE, W. O. et. all. (eds.) **Principles Of Medicinal Chemistry**, 5.ed, Baltimore, Willians & Wilkins, cap. 34, p. 788-791, 2002.
3. Trabulsi, L. R.; Soares, L. A. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: Penildon Silva (Ed.). **Farmacologia**. 6^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.103, p. 1040-1048.
4. Durante-Mangoni, E.; Grammatikos, A.; Utili, R.; Falagas, M. Do we still need the aminoglycosides?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 201–205, 2009.
5. Busscher, G. F.; Rutjes, F. P. J. T.; Van Delf F. L.; 2-Deoxystreptamine: Central Scaffold of Aminoglycoside Antibiotics, **Chemical Reviews**, 105, n. 3, p. 775-791, 2005.
6. Sande, M. A.; Manell, G. L. Fármacos antimicrobianos. In Goodman & Gilman (eds) **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 47, p. 728-740, 1991.
7. Gringauz, A.; Antimicrobial Drugs I. **Introduction to Medicinal Chemistry**, cap. 6, p. 247-255, 1997.
8. Schacht, J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. **Otolaryngologic clinics of North America** v. 26, p. 845–856, 1993.
9. Magnet, S.; Blanchard, J. S.; Molecular Insights into Aminoglycosides Action and Resistance. **Chemical Reviews**, v.105, p. 477-497, 2005.
10. Setny, P.; Trylska, J. Search for Novel Aminoglycosides by Combining Fragment-Based Virtual Screening and 3D-QSAR Scoring, **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 390–400, 2009.
11. da Silva, J. G.; Carvalho, I. New insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, 2007.

12. Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for the future. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.
13. Wright, G. D. Bacterial Resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1451-1470, 2005.
14. Mingeot-Leclercq M-P.; Glupczynski Y.; Tulkens P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 4, p. 727-737, 1999.
15. Taber, H. W.; Mueller, J. P.; Miller, P. F.; Arrow, A. S. Bacterial uptakes of aminoglycoside antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 51, p. 439-457, 1987.
16. Hancock, R. E. W. Alterations in outer membrane permeability **Annual Review of Microbiology**. v. 38, p. 237-264, 1984.
17. Bryan, L. E.; Kowand, S. K.; Van Del Elzen, H. M. Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 15, n. 1, p. 7-13, 1979.
18. Balwit, J. M.; Van Langevelde, P.; Vann, J. M.; Proctor, R. A. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within culture d endothelial cells. **Journal of Infectious Disease**. v. 170, p. 1033-1037, 1994.
19. Jana S.; Deb J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 70, p. 140-150, 2006.
20. Watanabe, A.; Nagai, J.; Adachi, Y.; Katsube, T.; Kitahara, Y.; Murakami, T.; Takanz, M. Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside binding receptor antagonists. **Journal of Controlled Release**. v. 95, p. 423-433, 2004.
21. Levings, R. S.; Partridge, S. R.; Lightfoot, D.; Hall, R. M.; Djordjevic, S. P. New integron-associated gene cassette encoding a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, p. 1238-1241, 2005.
22. Mckay, G. A.; Wriqth, G. D. Kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase type IIIa: evidence for a Theorell-Change mechanism. **Journal of Biological Chemistry**. v. 270. p. 24686-24692, 1995.

23. Martin, A. R. Antibacterial antibiotics. In: Delgado, J.N.; and Remers, W.A. (eds.) **Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, 5.ed, Philadelphia: Lippincott-Raven. cap.10, p. 291-299, 1998.
24. Owada, K.; Experimental studies on the toxicity of kanamycin, its hydrolyzed products and neomycin, **Chemotherapia**, v. 5, p. 277-293, 1962.
25. de Jager, P.; van Altena, R. Hearing loss and nephrotoxicity in long-term aminoglycoside treatment in patients with tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 6, p. 622-627, 2002.
26. Xie, Y.; Nishi, S.; Iguchi, S.; Imai, N.; Sakatsume, M.; Saito, A.; Ikegame, M.; Iino, N.; Shimada, H.; Ueno, M.; Kawashima, H.; Arakawa, M.; Gejyo, F.; Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. **Kidney International**, v. 59, p. 959-974, 2001.
27. Guthrie, O.W. Aminoglycoside induced ototoxicity, **Toxicology**, v. 249, p. 91-96, 2008.
28. Kotecha, B. Richardson, G. P. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin. Dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. **Hering Research**. v. 73, n. 2, p. 173-174, 1994.
29. Kalkandelen, S. et all. Comparative cochlear toxicities os streptomycin, gentamicin, amikacin and netilmicin in guinea-pigs. **Jouranl of International Medical Research**. v. 30, n. 4, p. 406-412, 2002.
30. Selimoglu, E.; Kalkandelen, S.; Erdogan, F.; Comparative vestibulotoxicity of different aminoglycosides in the guinea pigs. **Yonsei Medical Journal**. v. 44, n. 3, p. 517-522, 2003.
31. Nakashima, T.; Teranishi, M.; Hibi, T.; Kobayashi, M. Umemura, M.; Vestibular and Cochlear Toxicity of Aminoglycosides - **A review**. **Acta Otolaryngologica**. v. 120, p. 904-911, 2000.
32. Song, B.-B.; Schacht, J. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. **Hearing Research**, v. 94, p. 87-93. 1996.
33. Conlon, B.J.; Smith, D.W.; Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity in vitro. **Hearing Research**, v. 115, p. 1-5, 1998.

34. Huizing, E.H.; de Groot, J.C.M.J. Human cochlear pathology in aminoglycoside ototoxicity. **Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl**, v. 436, p. 117–125, 1987.
35. Sone, M.; Schachern, P.A.; Paparella, M.M. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. **Hearing Research**, v. 115, p. 217–223, 1998.
36. Chen, L.; Hainrichson, M.; Bourdetsky D.; Mor A.; Yaron S., Baasov T. Structure–toxicity relationship of aminoglycosides: Correlation of 20-amine basicity with acute toxicity in pseudo-disaccharide scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 8940-8951, 2008.
37. Lima, A. L. C. M.; Marseillan, R. F.; Corrado, A. P. Aminoglycoside antibiotics: structure-toxicity relationship. **Symposia of the Giovanni Lorenzini Foundation**. 10 (New Trends Antibiot.: Re. Ther.), p. 274-276, 1981.
38. Moitessier, N.; Westhof, E.; Hanessian, S. **Journal of Medical Chemical**, v. 49, p. 1023–1033, 2006.
39. Knowles, D. J. C.; Foloppe, N.; Matassova, N. B.; Murchie, A. I. H. The bacterial ribosome, a promising focus for structure-based drug design. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 5, p. 501-506, 2002.
40. Zhou, J.; Wang, G.; Zhang, L.; Ye, X. Modifications of Aminoglycoside Antibiotics Targeting RNA, **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 3, p. 279-316, 2007.
41. Vicens, Quentin; Westhof, Eric. Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site. **Structure**, v. 9, p. 647-658, 2001.
42. Douglas, C. R. **Tratado de Fisiologia Aplicada à Fonoaudiologia**, São Paulo - SP: ROBE Editorial, 2002, cap. 11 e cap. 13, p. 169-179 e 193-205.
43. Kurk, M.; Amatuzzi M. G. Anatomia e fisiologia da orelha interna. In: Campos, C. A. H.; Costa, H. O. O. (Eds.). **Tratado de Otorrinolaringologia, Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo: Roca, 1ªed., Vol. 1 Fundamentos, 2003. cap. 30. p. 382-400.
44. http://www.marcobueno.net/administracao/img/galeria_imagem/1735.jpg
Acesso em 17/02/2010.

45. Paparella, M. M.; Costa, S. S.; Cruz, O. L. M. Doença de Ménière e outras vestibulopatias periféricas. In: COSTA, S. S. et al. (Eds.) **Otorrinolaringologia Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 1ª ed, 1994. cap. 25, p. 238-248.
46. Minor, L. B.; Schessel, D. A.; Carey, J. P. Meniere's disease. **Current opinion in neurology**. v. 17, n. 1, p. 9-16, 2004.
47. Stokroos, R.; Kingma, H. Selective Vestibular Abalation by Intratympanic Gentamicin in Patients with Unilateral Active Ménière's Disease: A Prospective, Double-blind, Placebo-controlled, Randomized Clinical Trial. **Acta Otolaringologica**. v. 124, p. 172-175, 2004.
48. Van De Heyning, P. H.; WUYTS, F.; BOUDEWYNS, A. Surgical treatment of Meniere's disease. **Current opinion in neurology**. v. 18, n. 1, p. 23-28, 2005.
49. Flanagan, S.; Mukherjee, P.; Tonkin, J. Outcomes in the use of intra-tympanic gentamicin in treatment of Meniere's disease. **The Journal of laryngology ond otology**. v. 120, n. 2, p. 98-102, 2006.
50. da Silva, J. G.; Hyppolito, M. A.; de 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**. v. 15, p. 3624-3634, 2007.
51. Armarego, W. L. E.; Chai, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. 5ª ed. USA: Butterworth-Heinemann, 2003.
52. 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 the American Chemical Society**. v. 77, p. 5311-5314, 1955.
53. Botto, R. E.; Coxon, B.; Nitrogen- 15 Nuclear Resonance Spectroscopy of Neomicin B and Related Aminoglycosides. **Journal of the American Chemical Society**, v.105, p. 1021-1028, 1983.
54. Leach, B. E.; Teeters, C. M. Neamine, an Antibacterial Degradation Product of Neomycin. **Journal of the American Chemical Society**. v. 73, n. 6, p. 2794-2797, 1951.
55. Leach, B. E.; Teeters, C. M. The Identy of Neamine and Neomycin A. **Journal of the American Chemical Society**. v. 74, n. 12, p. 3187-3188, 1952.

56. Yoshizawa S.; Fourmy, D.; Eason R. G.; Puglisi J. D. Sequence-Specific Recognition of the Major Groove of RNA by Deoxystreptamine. **Biochemistry**, v. 41, p. 6263-6270, 2002.
57. Alper, P. B.; Hung, S. C.; Wong, C.H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides From Amines. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6029-6032, 1996.
58. Greenberg,W. A.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung , S. C.; Wong ,C. H. Design and Synthesis of New Aminoglycoside Antibiotics Containing Neamine as an Optimal Core Structure: Correlation of Antibiotic Activity with in Vitro Inhibition of Translation. **Journaul of the American Chemical Society**, v. 121, p. 6527-6541, 1999.
59. Wu, B.; Yang, J.; Robinson, D.; Hofstadler, S.; Griffey, R.; Swayze, E. E.; He, Y. Synthesis of Linked Carbohydrates and Evaluation of Their Binding for 16S RNA by Mass Spectrometry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p. 3915-3918, 2003.
60. Wolfrom, M. L.; Cron, M. J.; DeWalt, C. W.; Husband, R. M. Cofiguration of the Glycosidic Unions in Streptomycin, **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 3675-3577, 1954.
61. Barba-Behrens, N.; Bautista, J. L.; Ruiz, M. E.; Joseph-Nathan, P.; Flores-Parra, A.; Contreras, R. Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper, and calcium salts characterized by ¹³C NMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of the streptidine fraction, **Journaul of inorganic biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 201-215, 1990.
62. Kartha, K. P. R.; Field, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v. 53, n. 34, p. 11753-11766, 1997.
63. Ren, T.; Zhang, G.; Liu, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 1007–1010, 2001.
64. Cheng, H.; Cao, X.; Xian, M.; Fang, L.; Cai, T. B.; Ji, J. J.; Tunac, J. B.; Sun, D.; Wang, P.G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate-Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 645-652, 2005.
65. Vogel. Química Analítica quantitativa, experimento 5.106, método B.

66. Horton, D. Methods in Carbohydrate Chemistry. **Academic Press**, eds. Whistler, R. L.; BeMiller, New York, v. 6, p. 282, 1972.
67. Soliman, S. E.; Bassily R. W.; El-Sokkary R. I.; Nashed M. A. Acetylated methyl glucopyranuronate trichloroacetimidate as a glycosyl donor for efficient synthesis of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2337-2340, 2003.
68. Liu, X.; Stocker, B. L.; Seeberger, P. S. Total Synthesis of Phosphatidylinositol Mannosides of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 3638-3648, 2006.
69. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, supply. S1, p 5-16, 2001.
70. Kemp, D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **Journal of the Acoustical Society of America**. V. 64(5), 1978. p. 1386-1391.
71. Harel, N.; Kakigi, A.; Hirakawa, H.; Mont, R. J.; Harrison, R. V. The effects of anesthesia on otoacoustic emissions. **Hearing Research**, V. 110, 1997. p. 25-33.
72. Sockalingam, R.; Freeman, S.; Cherny, L.; Sohmer, H. Effect of High-Dose Cisplatin on Auditory Brainstem Responses and Otoacoustic Emissions in Laboratory Animals. **The American Journal of Otology**, V. 21, 2000. p. 521-527.
73. Dutcher, J. D.; Donin, M. N. The Identity of Neomycin A, Neamine and the Methanolysis Product of Neomycin B and C. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 13, p. 3420-3422, 1952.
74. Nitz, M.; BUNDLE, D. R. Efficient synthesis of 3,6-dideoxy-beta-D-arabino-hexopyranosyl-terminated LacdiNac glycan chains of the Trichinella spiralis parasite. **Journal of the Organic Chemistry**, v.65, p.3064-3073, 2000.
75. Carter, H. E.; Dyer, J. R.; Shaw, P. D.; Jr., K. L. R.; Hichens, M. The Structure of Neamine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 17, p. 3723-3724, 1961.
76. Busscher, G. F.; Groothuys, S.; Gelder, R.; Rutjes, P. J. T.; Van Delft, F. L. Efficient Preparation of a 1,3-Diazidocyclitol as a Versatile 2-Deoxystyptamine Precursor. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 4477-4481, 2004.

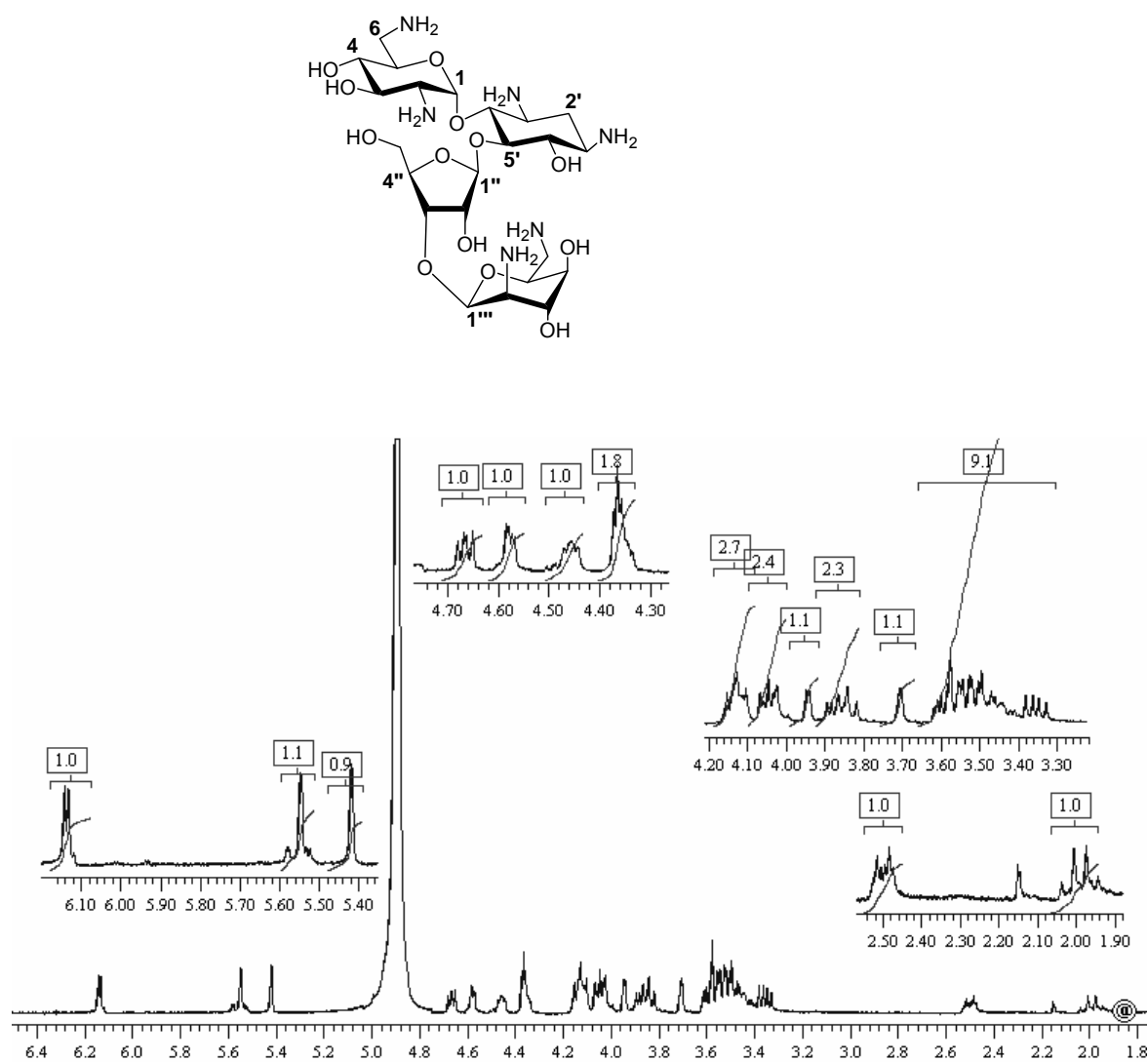
77. Grapsas, I.; Massova, I.; Mobashery, S. ^1H -RMN Analysis of Copper-Aminoglycoside Complexes in Solution and Its Implication for Regioselective Modification of Multifunctional Aminoglycoside Antibiotics. **Tetrahedron**, v. 54, p. 7705-7720, 1998.
78. Molyneux, R. J.; Gardner, D. R.; James, L. F.; Colegate, S. M. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 57-74, 2002.
79. Ding, Y.; Swayze, E. E.; Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. Efficient synthesis of neomycin B related aminoglycosides. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 4049-4052, 2000.
80. Lemieux R. U.; Nagabhushan, T. L.; Clemetson, k. J.; Tucker, L. C. N. The Synthesis of Kanamycin Analogs I. α -D-Glucopyranosyl Derivatives of Deoxystreptamine. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 51, p. 53-66, 1972.
81. Ding, Y.; Hofstadler, S. A.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H. Efficient Synthesis of Heterocyclic 2-Deoxysteptamine Derivatives as RNA Binding Ligands. **Chemistry Letters**, v. 32, n.10, 2003.
82. Latorre, M.; Peñalver, P.; Revuelta, J.; Asensio, J. L.; García-Junceda, E.; Bastida, A. Rescue of the streptomycin antibiotic activity by using streptidine as a "decoy acceptor" for the aminoglycoside inactivating enzyme adenylyl transferase, **Chemical Communications**, p. 27, p. 2829-2831, 2007.
83. Seeberger, P. H.; Haase, W. C. Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 4349-4394, 2000.
84. 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**, v. 58, p. 1387-1398, 2002.
85. Jacobsson, M.; Malmberg, J.; Ellervik, U. Aromatic O-glycosylation. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1266-1281, 2006.
86. Well, R. M. V.; Karkkainen, T. S.; Kartha, K. P. R.; Field, R. A Contrasting reactivity of thioglucoside and selenoglucoside donors towards promoters: implications for glycosylation stereocontrol. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1391-1397, 2006.

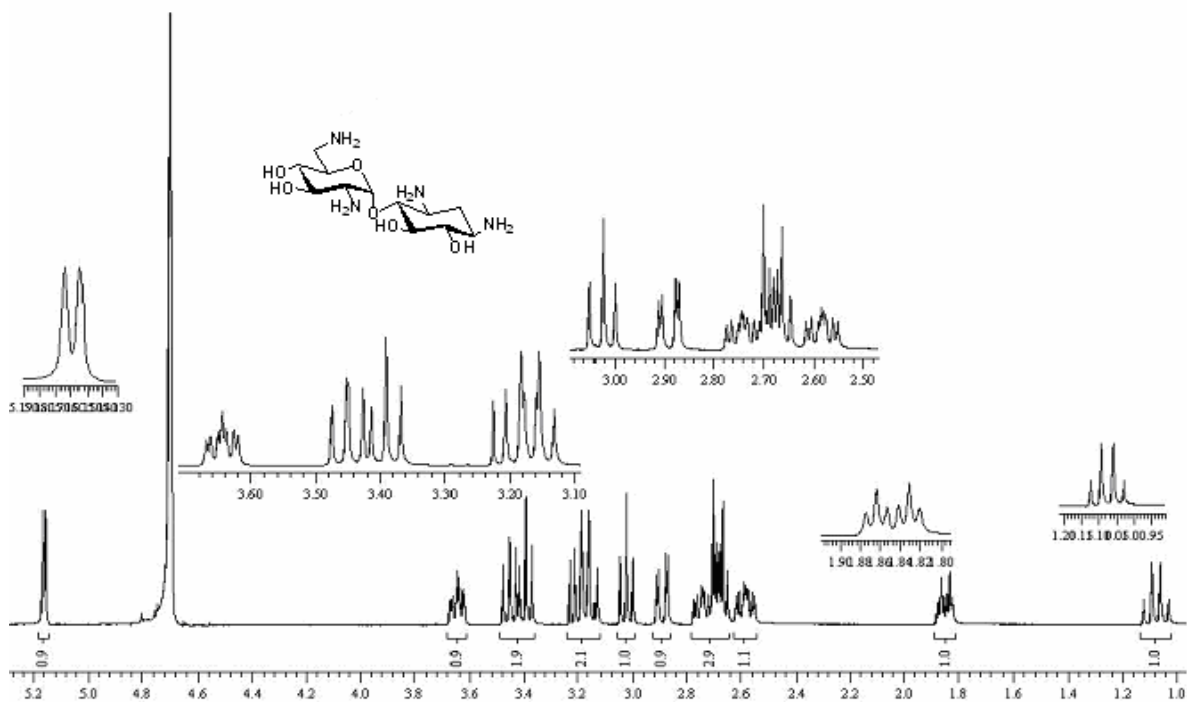
87. Osborn, H. M. I. **Synthetic Methods of Carbohydrates**; 1^o ed.; The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, UK, Academic Press, 2003.
88. Banoub, J. **Am. Chem. Society**, v. 92, p. 1167, 1992.
89. Venzke, D.; Serpa, R.; Lima, M. C.; Ribeiro, G. A.; Freitag, R. A.; Bretanha, L. C.; Gouvêa, D. P. Eficiência do Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio em teste de atividade antibacteriana "in vitro". **16^o Encontro de Química da Região Sul**. 2008.

Anexos

7. Anexos

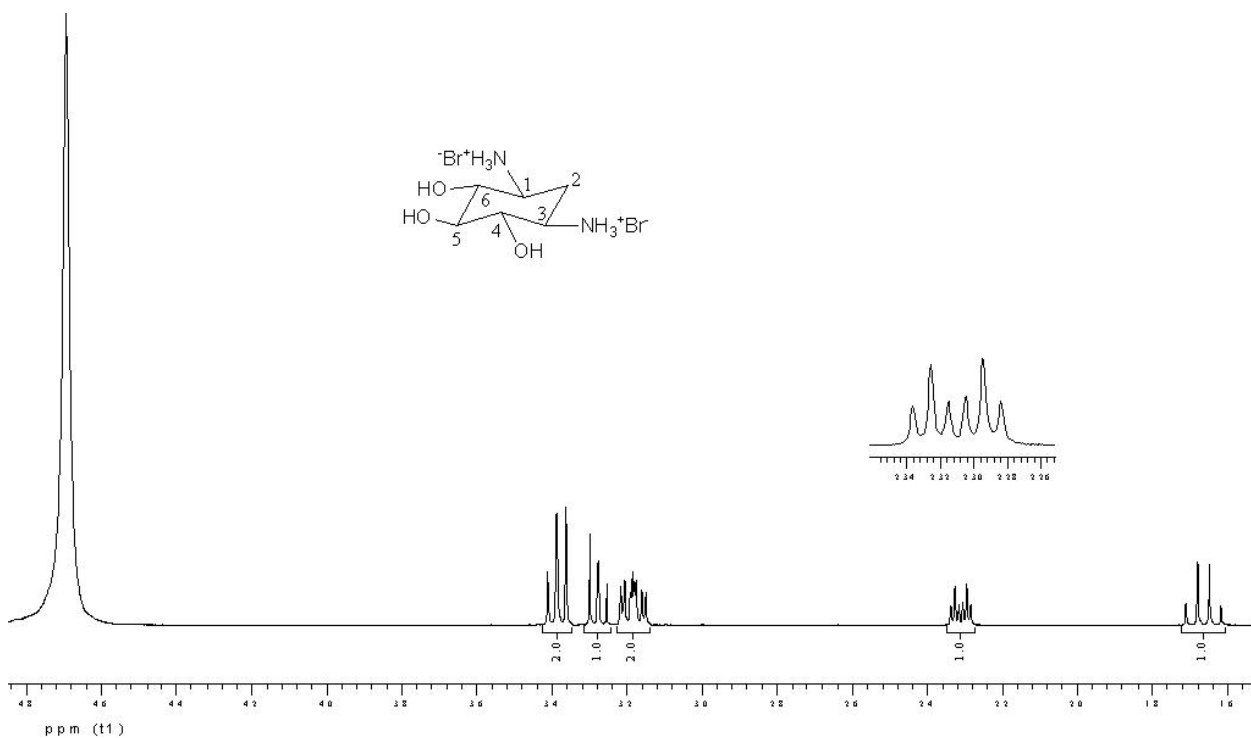
Anexo A – Espectro de RMN ^1H de sulfato de neomicina (1) a 400 MHz em D_2O .



Anexo B – Espectro de RMN ^1H de neamina base livre (18) a 500 MHz em D_2O .


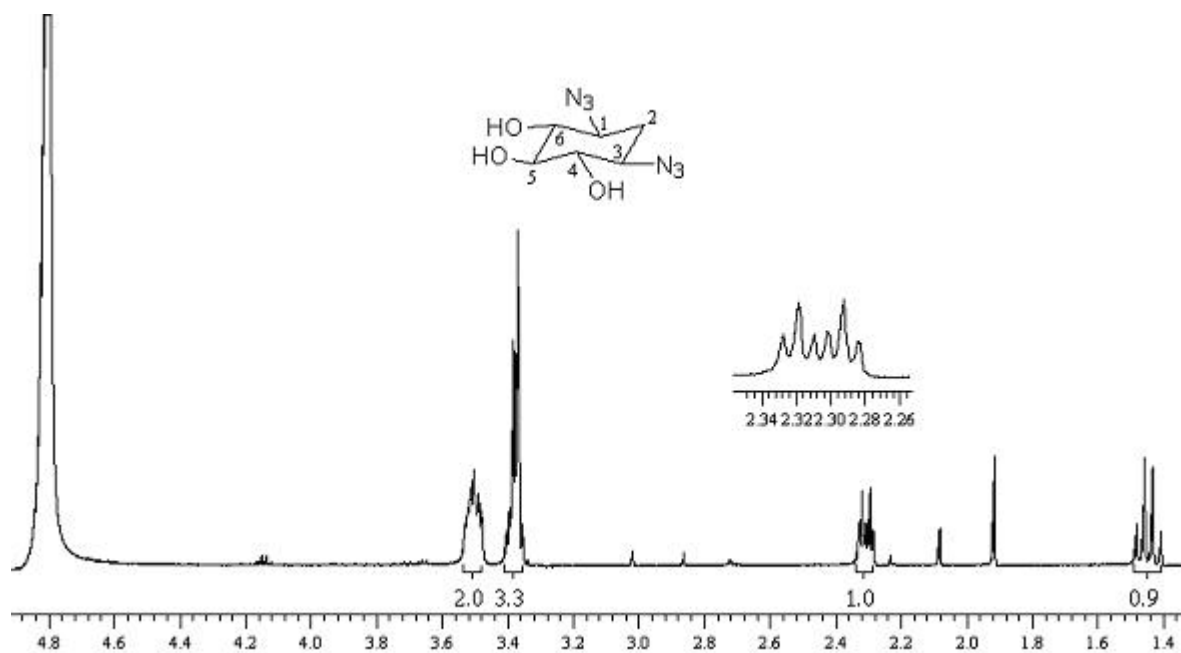
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,16	1	d	$J_{1,2}$ 4,0	H-1
3,64	1	dt	$J_{5,6}$ 2,8, $J_{4,5}$ 7,6	H-5
3,48-3,36	2	m	-	H-1', H-3'
3,23-3,12	2	m	-	H-4, H-4'
3,02	1	t	$J_{5',6'}$ 9,6	H-5'
2,89	1	dd	$J_{5,6}$ 2,8, $J_{6a,6b}$ 13,6	H-6b
2,78-2,64	3	m	-	H-3, H-6a, H-6'
2,62-2,54	1	m	-	H-2
1,84	1	dt	J 4,3, J 4,3 $J_{2'ax,2'eq}$ 13,1	H-2'eq
1,07	1	q	$J_{2'ax,2'eq}$ 12,4, J 25	H-2'ax

Anexo C – Espectro de RMN ^1H de bromidrato de 2-desoxi-estreptamina (**20**) a 400 MHz em D_2O .



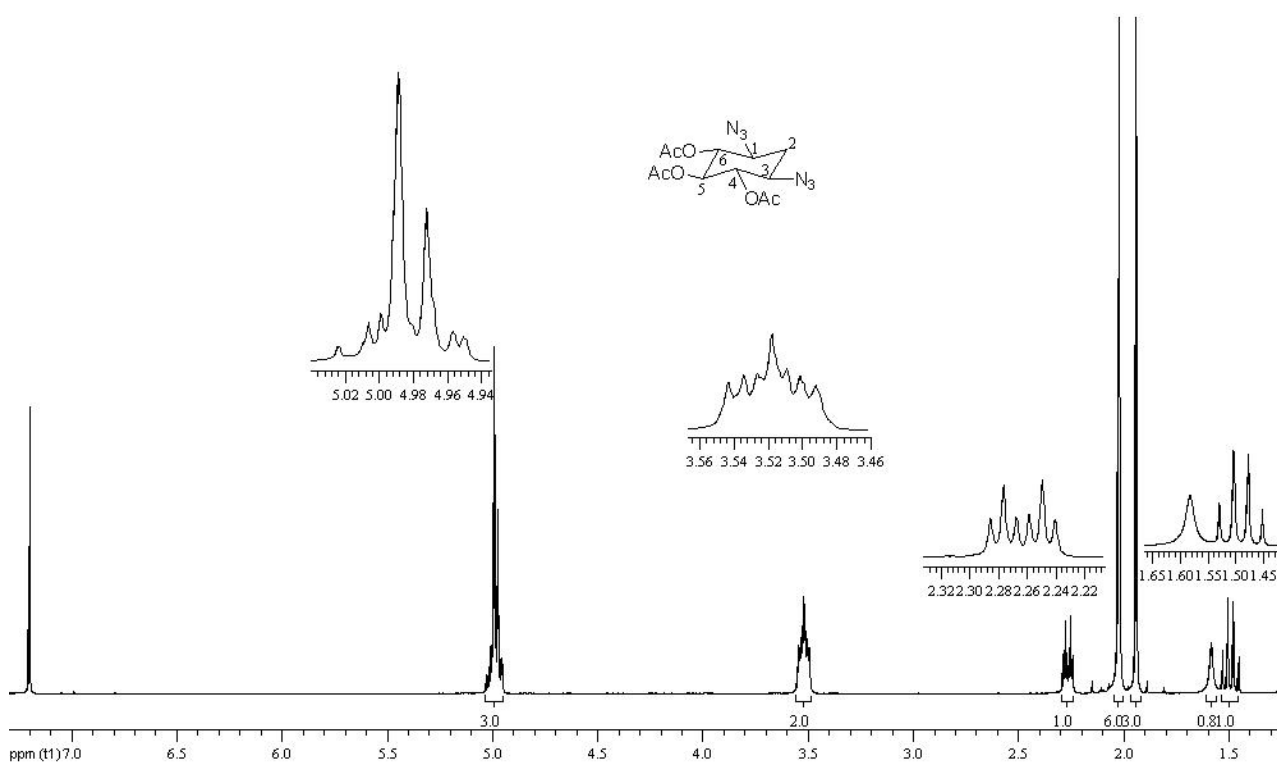
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
3,4	2	m	-	H-4,H6
3,3	1	dd	$J_{4,5}$ 10,1, $J_{5,6}$ 9,1	H5
3,22-3,14	2	m	-	H-1,H-3
2,3	1	dt	J 4,3; J 4,3; $J_{2ax,2eq}$ 12,4	H-2eq
1,66	1	q	$J_{2ax,2eq}$ 12,4	H-2ax

Anexo D – Espectro de RMN ^1H de 1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**27**) a 500 MHz em D_2O .



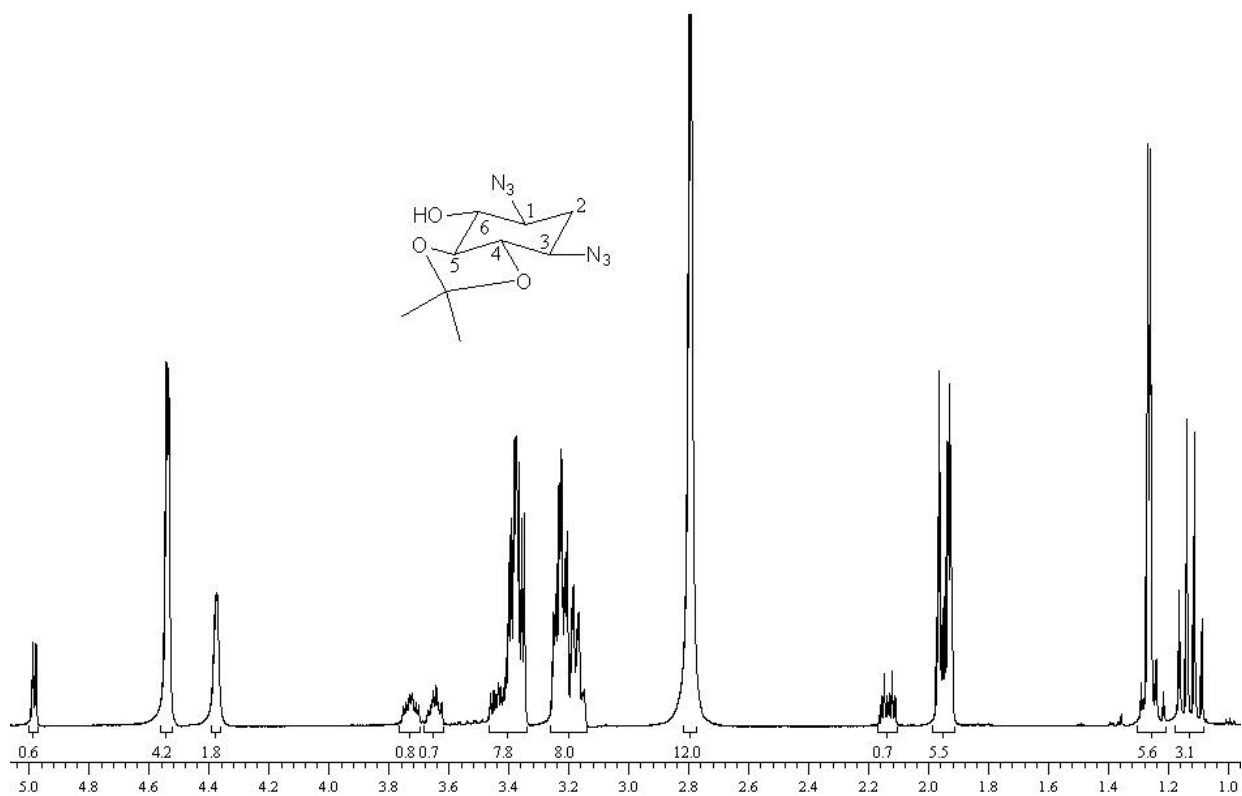
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
3,53-3,47	2	m	-	H-1,H-3
3,41-3,35	3	m	-	H-4,H-5,H-6
2,3	1	dt	J 4,5;4,5;12,7	H-2eq
1,44	1	q	J _{2ax,2eq} 12,5	H-2ax

Anexo E – Espectro de RMN ^1H de 4,5,6-tri-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**28**) a 500 MHz em CDCl_3 .

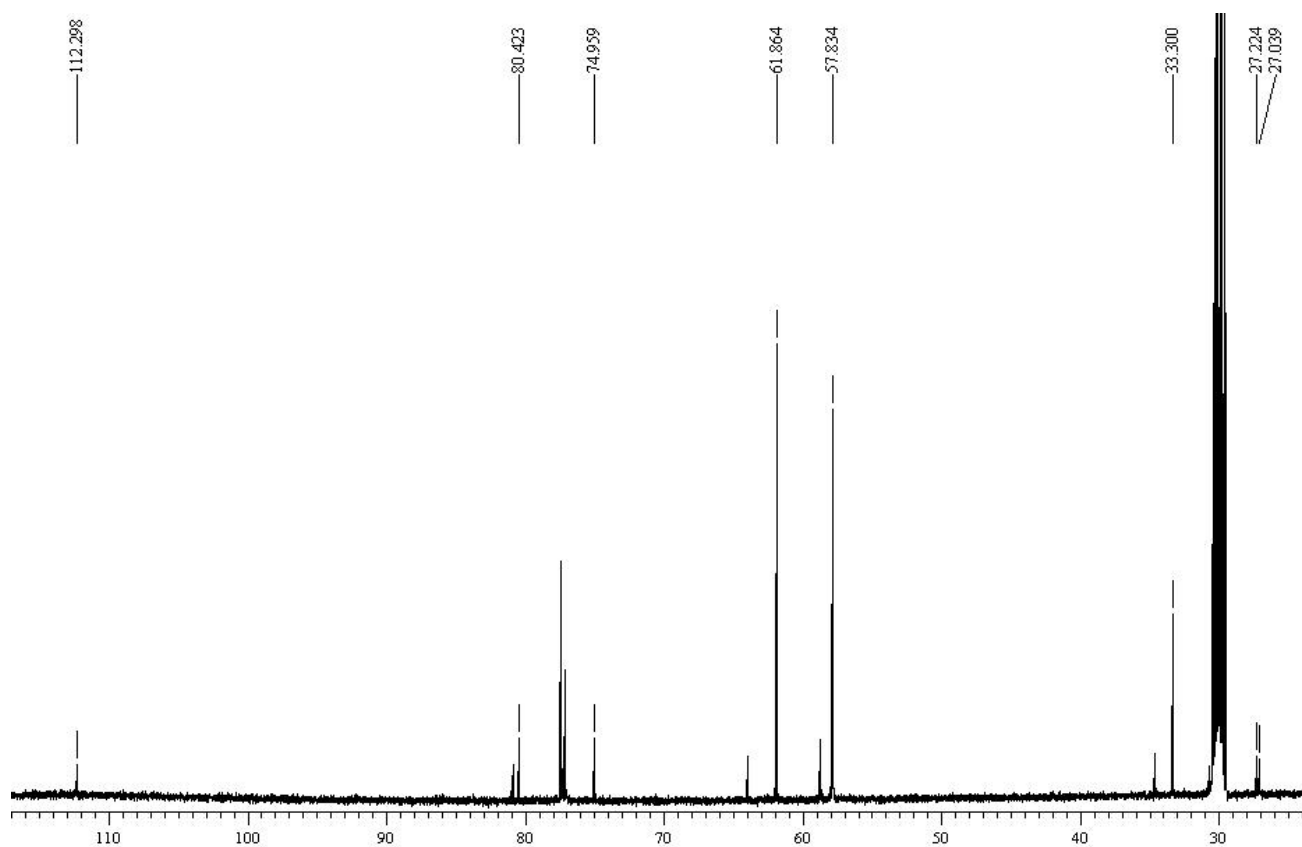


δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,03-4,94	3	m	-	H-4,H-5,H-6
3,55-3,47	2	m	-	H-1,H-3
2,26	1	dt	J 4,7; 4,7; 13,7	H-2eq
2,02	6	s	-	-OAc (C-4,C-6)
1,94	3	s	-	-OAc (C-5)
1,5	1	q	$J_{2ax,2eq}$ 12,6	H-2ax

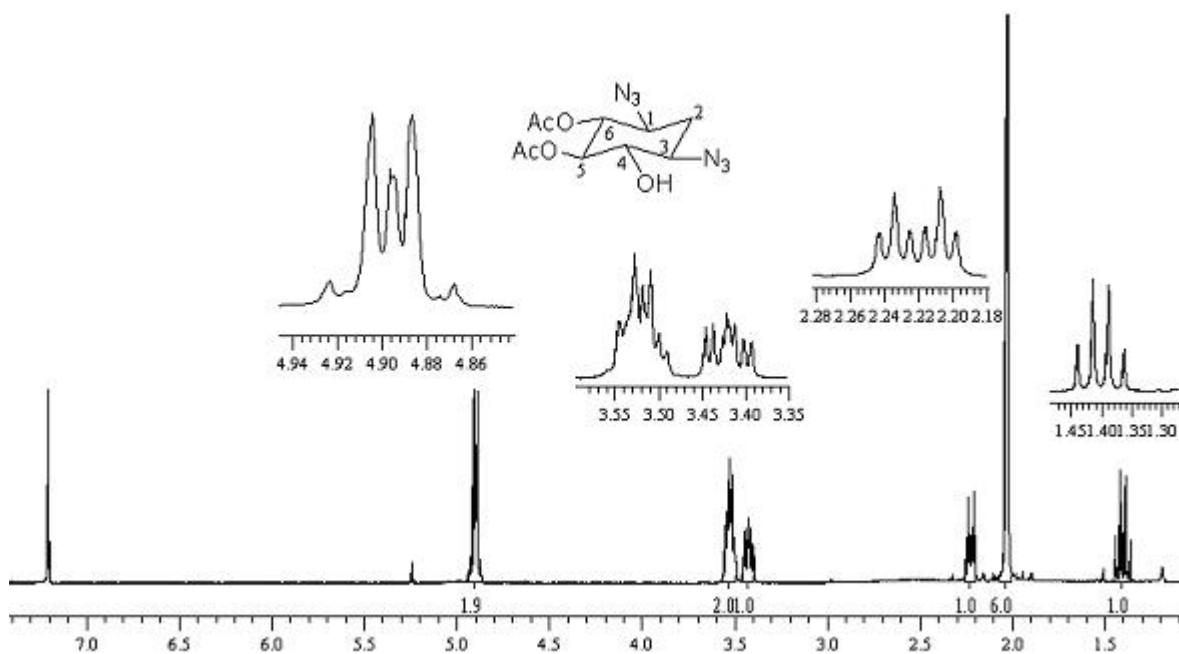
Anexo F – Espectro de RMN ^1H da mistura de 4,5- e 5,6-O-isopropilideno-2-desoxiestreptamina a 500 MHz em CD_3COCD_3 .



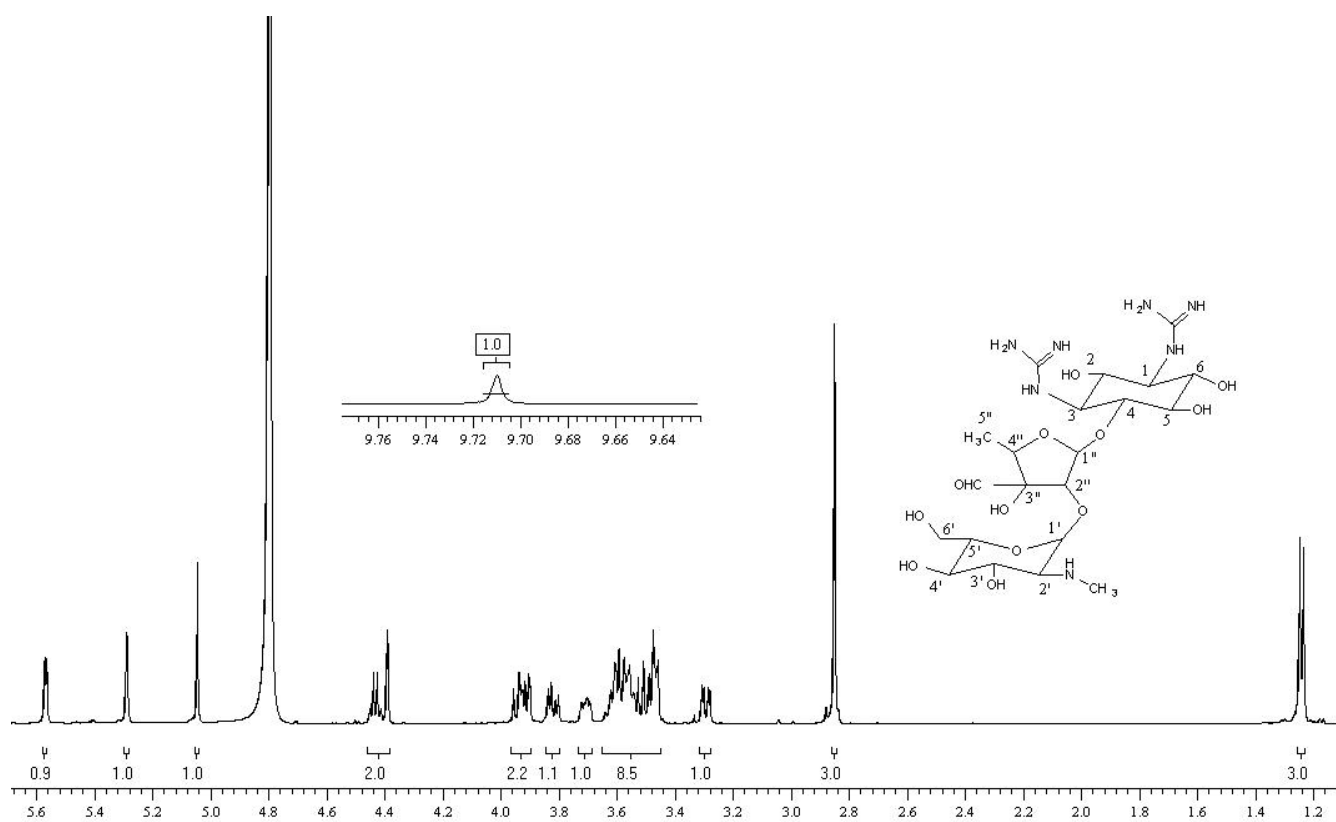
Anexo G – Espectro de RMN ^{13}C da mistura de 4,5- e 5,6-O-isopropilideno-2-desoxiestreptamina a 125 MHz em CD_3COCD_3 .



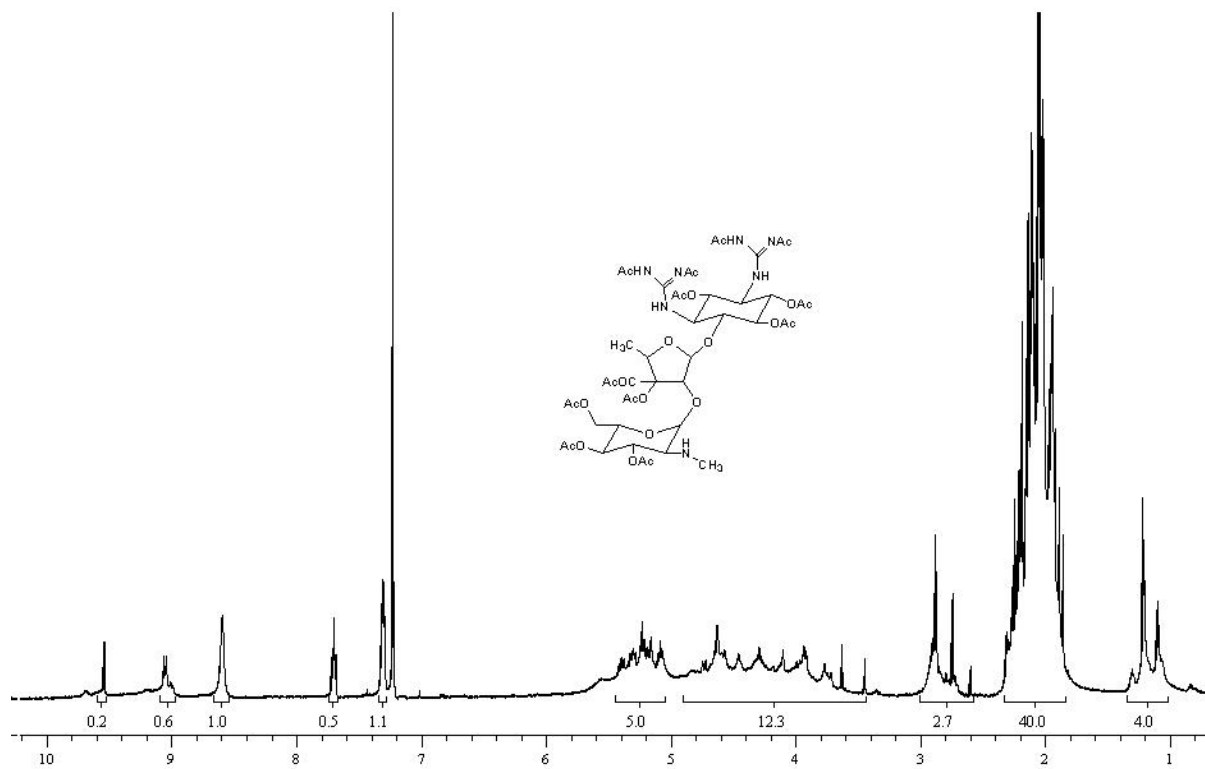
Anexo H– Espectro de RMN ^1H de 5,6-di-O-acetil-1,3-diazido-2-desoxi-estreptamina (**29**) a 500MHz em CDCl_3 .

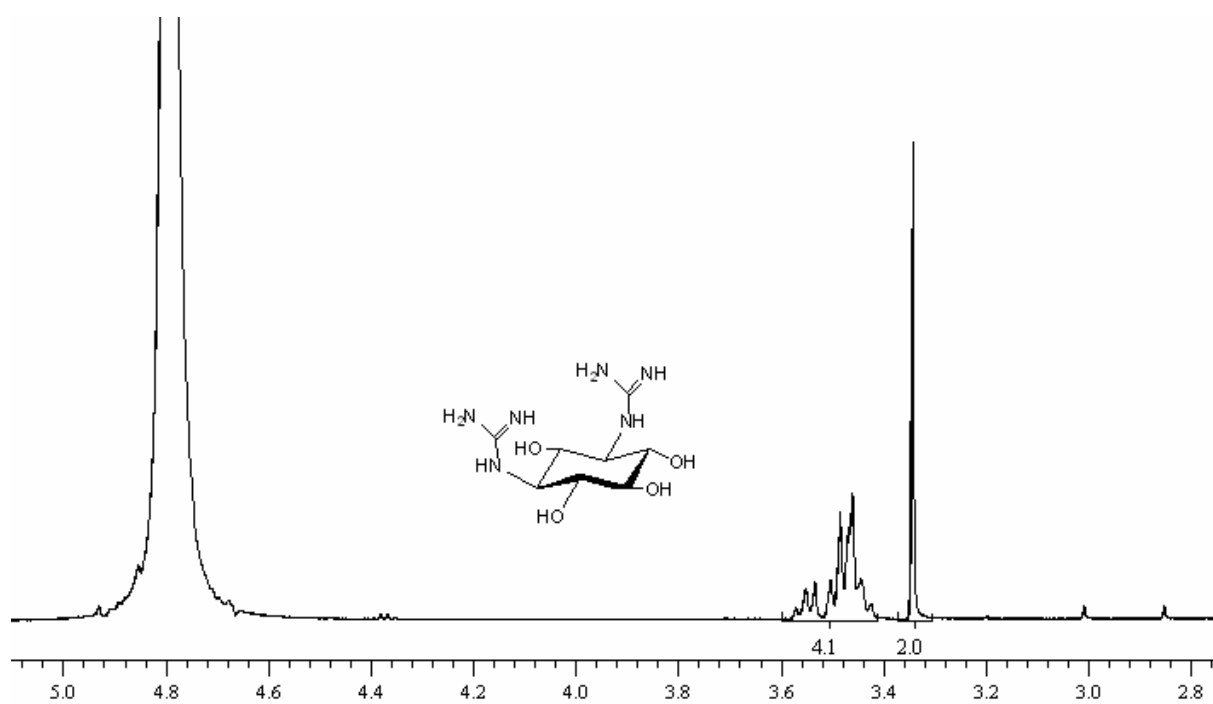
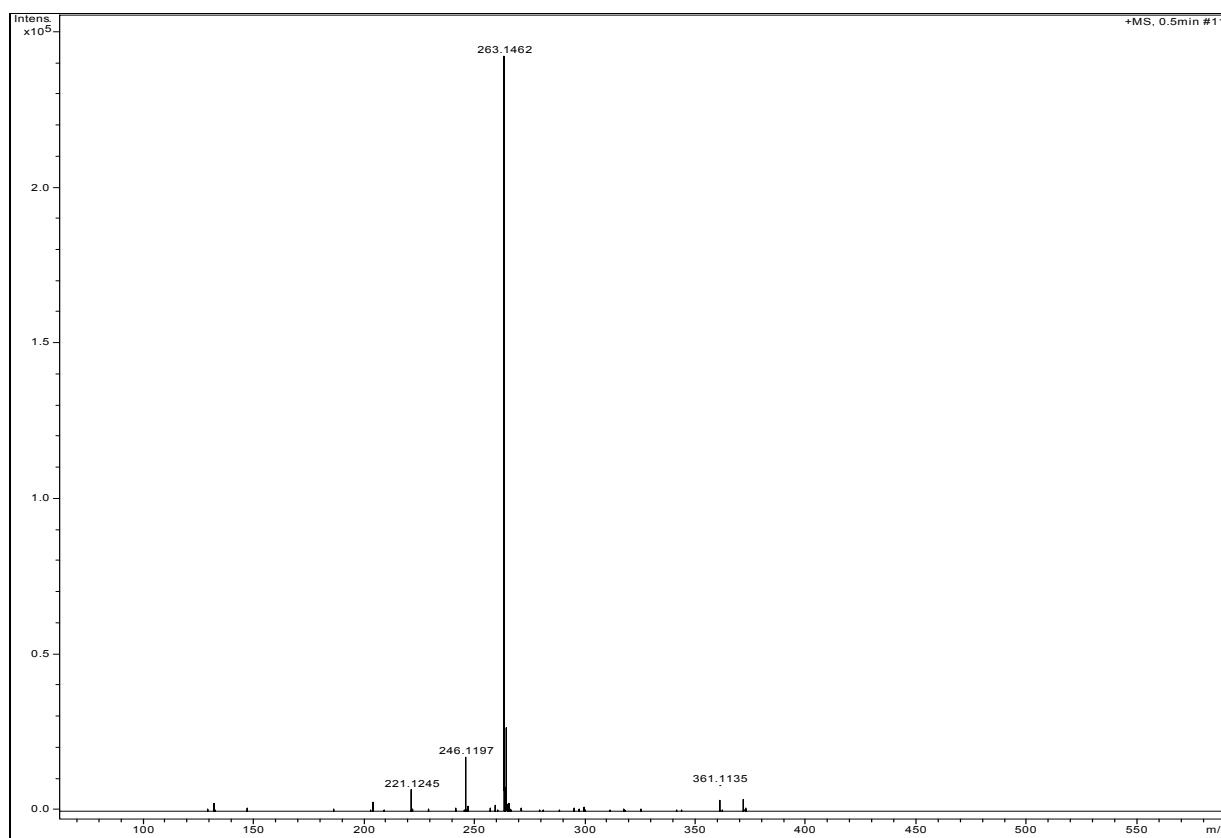


δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,93-4,86	2	m	-	H-5,H-6
3,56-3,48	2	m	-	H-1,H-3
3,45-3,38	1	m	-	H-4
2,22	1	dt	J 4,5;4,5;13.4	H-2eq
2,03	3	s	-	-OAc
2,02	3	s	-	-OAc
1,4	1	q	$J_{2ax,2eq}$ 12,5	H-2ax

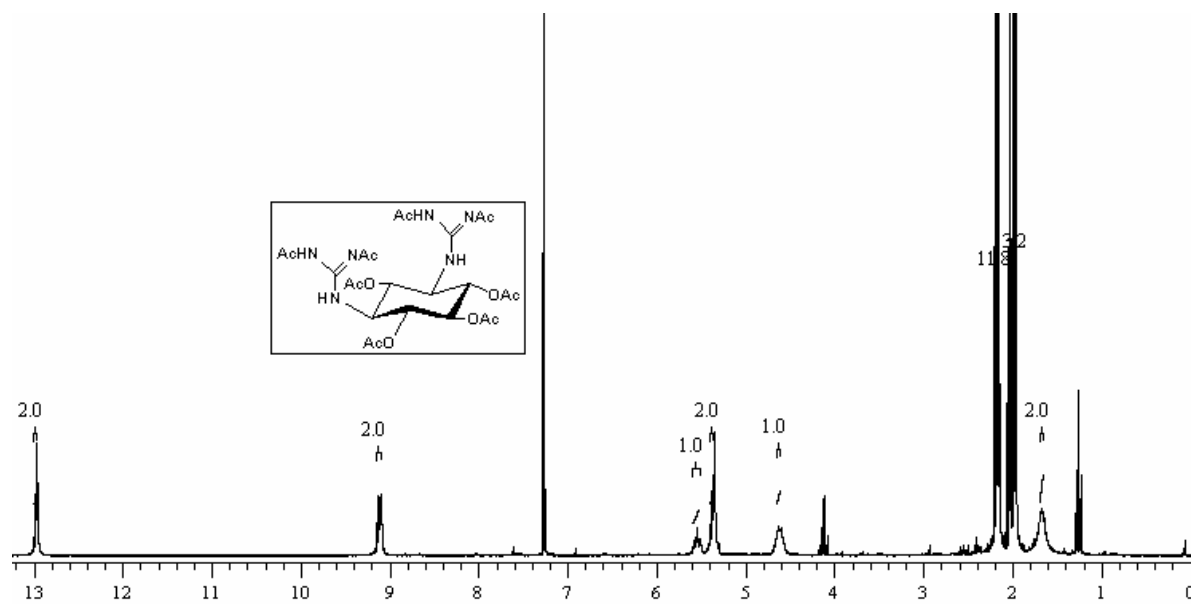
Anexo I – Espectro de RMN ^1H de sulfato de estreptomicina (**14**) a 500 MHz em D_2O .

Anexo J – Espectro de RMN ^1H de dodecaacetil-estreptomicina (**30**) a 500 MHz em CDCl_3 .

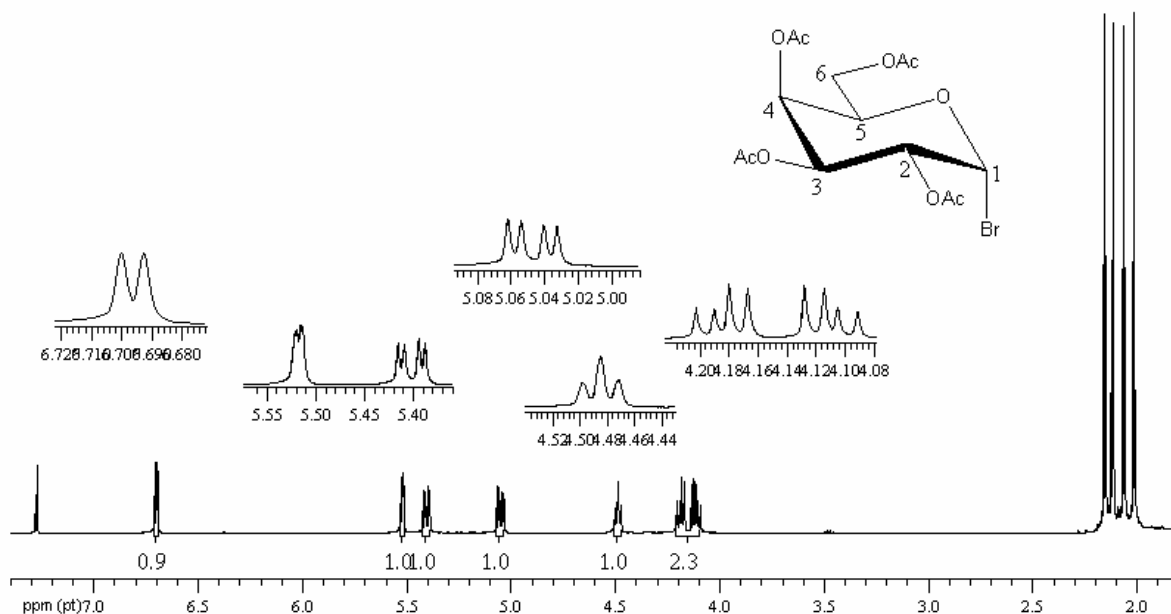


Anexo K – Espectros de massa e de RMN ^1H em D_2O de sulfato de estreptidina (32).

Anexo L – Espectro de RMN ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do produto de peracetilação de estreptidina (**33**).

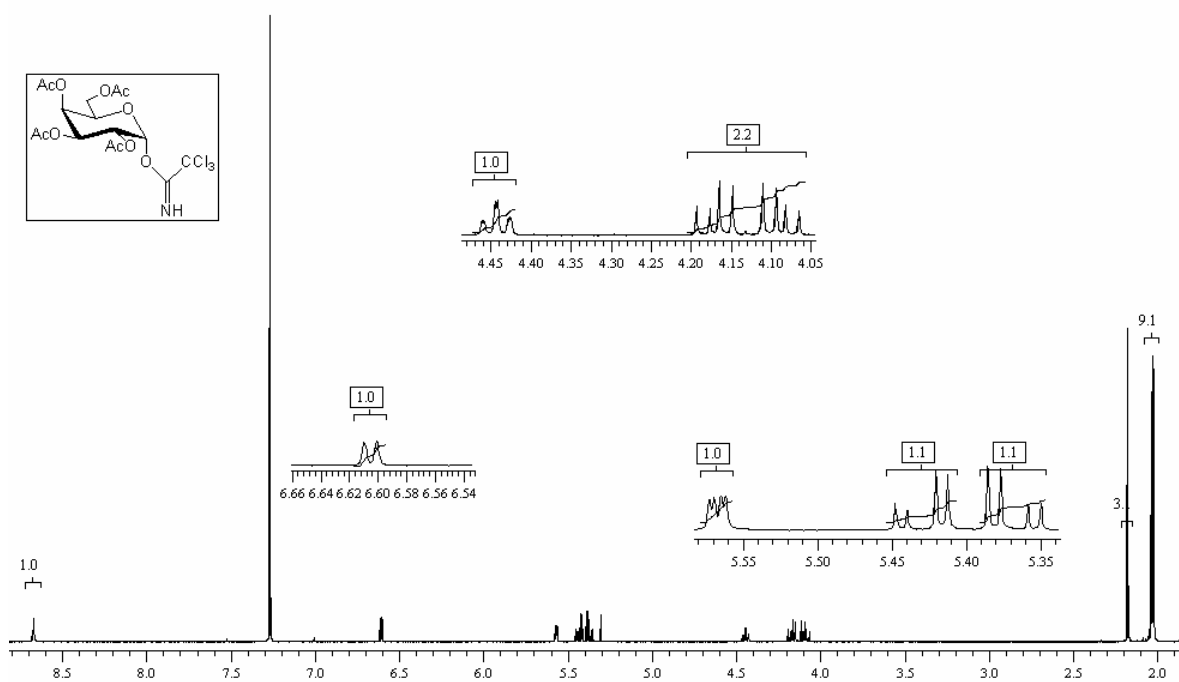


Anexo M – Espectro de RMN ^1H de Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (**37**) a 500 MHz em CDCl_3 .



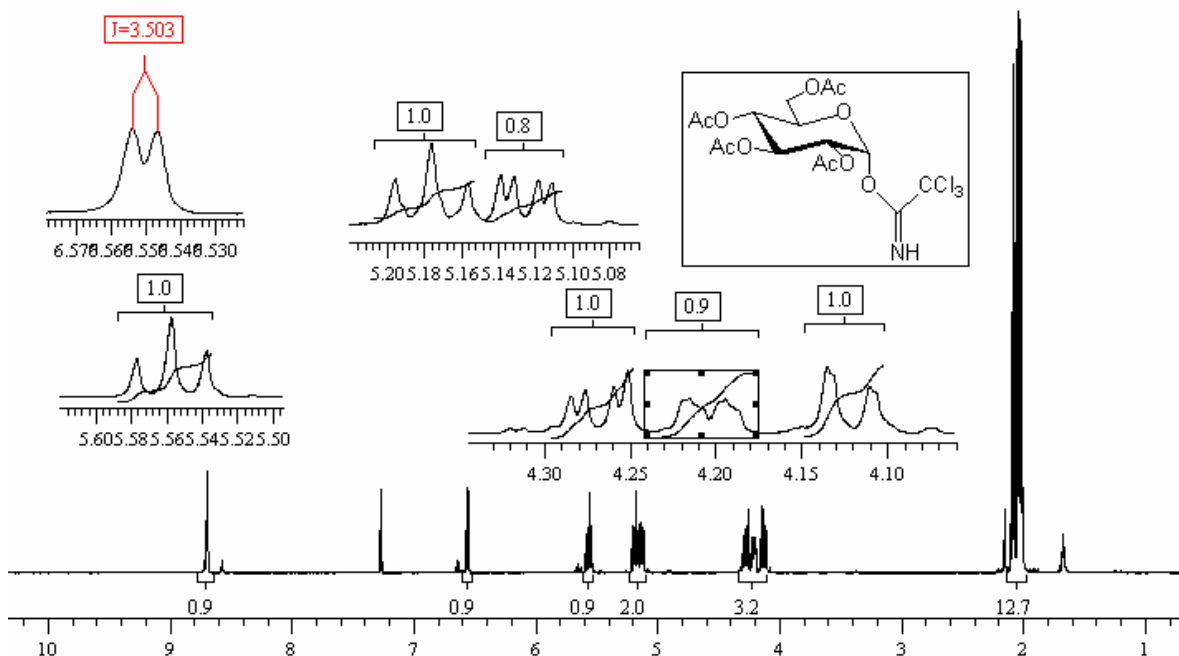
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
6,7	1	d	$J_{1,2}$ 3,9	H-1
5,52	1	dd	$J_{3,4}$ 3,2	H-4
5,4	1	dd	$J_{3,4}$ 3,2, $J_{2,3}$ 10,6	H-3
5,05	1	dd	$J_{1,2}$ 3,9, $J_{2,3}$ 10,6	H-2
4,5	1	dt	$J_{5,6}$ 6,5	H-5
4,18	1	dd	$J_{5,6a}$ 6,3 $J_{6a,6b}$ 11,4	H-6a
4,16	1	dd	$J_{5,6b}$ 6,8 $J_{6a,6b}$ 11,4	H-6b

Anexo N – Espectro de RMN ^1H de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (**38**) a 500 MHz em CDCl_3 .



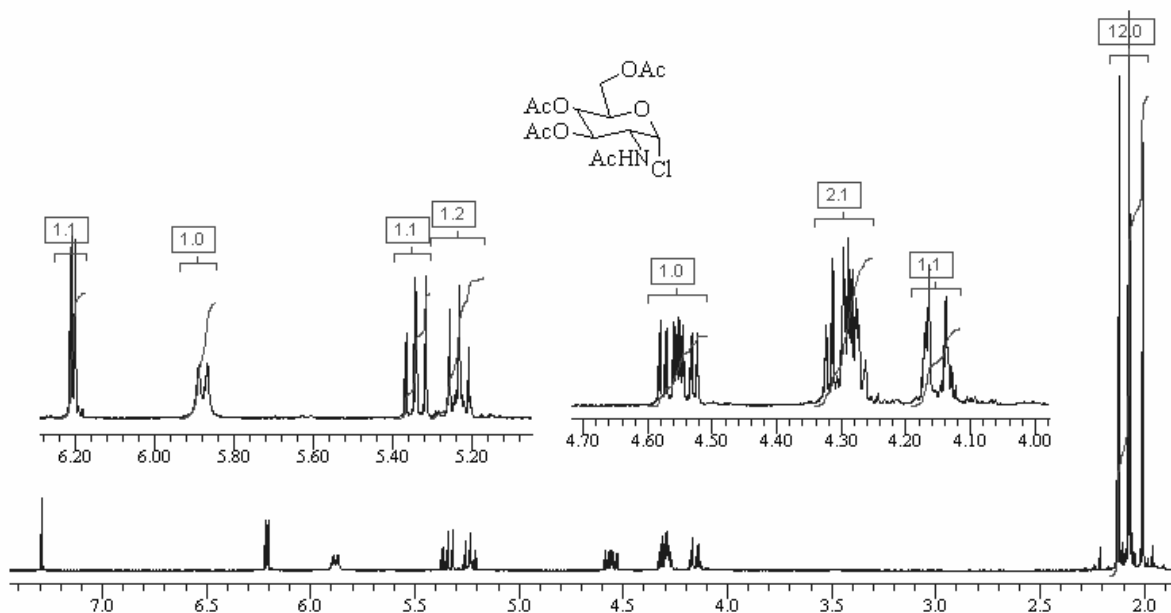
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
8,67	1	s	-	N-H
6,61	1	d	$J_{1,2}$ 3,5	H-1
5,57	1	dd	$J_{3,4}$ 3,0; $J_{4,5}$ 1,2	H-4
5,43	1	dd	$J_{2,3}$ 10,8; $J_{3,4}$ 3,0	H-3
5,37	1	dd	$J_{1,2}$ 3,5; $J_{2,3}$ 10,8	H-2
4,44	1	ddd	$J_{4,5}$ 1,0; $J_{5,6'}$ 6,5; $J_{5,6}$ 12,3	H-5
4,17	1	dd	$J_{5,6'}$ 6,5; $J_{6,6'}$ 11,3	H-6
4,09	1	dd	$J_{5,6}$ 6,5; $J_{6,6'}$ 11,3	H-6'
2,17	3	s	-	-OAc
2,04	3	s	-	-OAc
2,03	3	s	-	-OAc
2,02	3	s	-	-OAc

Anexo O – Espectro de RMN ^1H de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosil tricloroacetimidato (**42**) a 500 MHz em CDCl_3 .

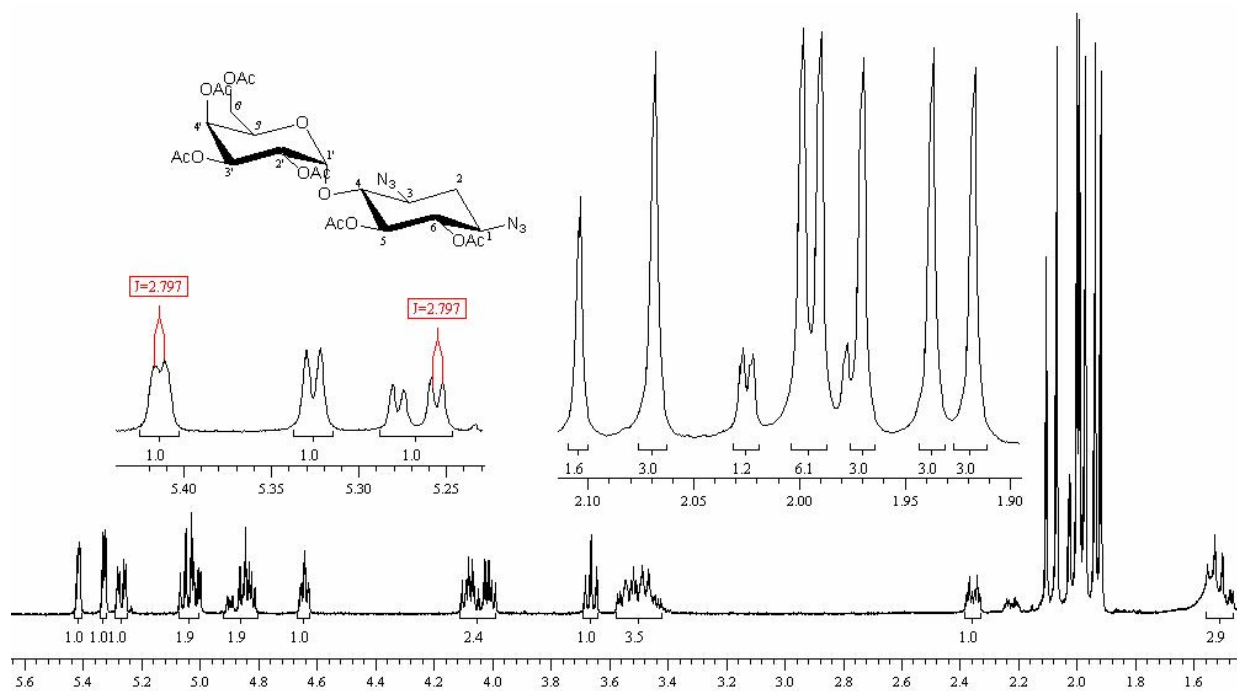


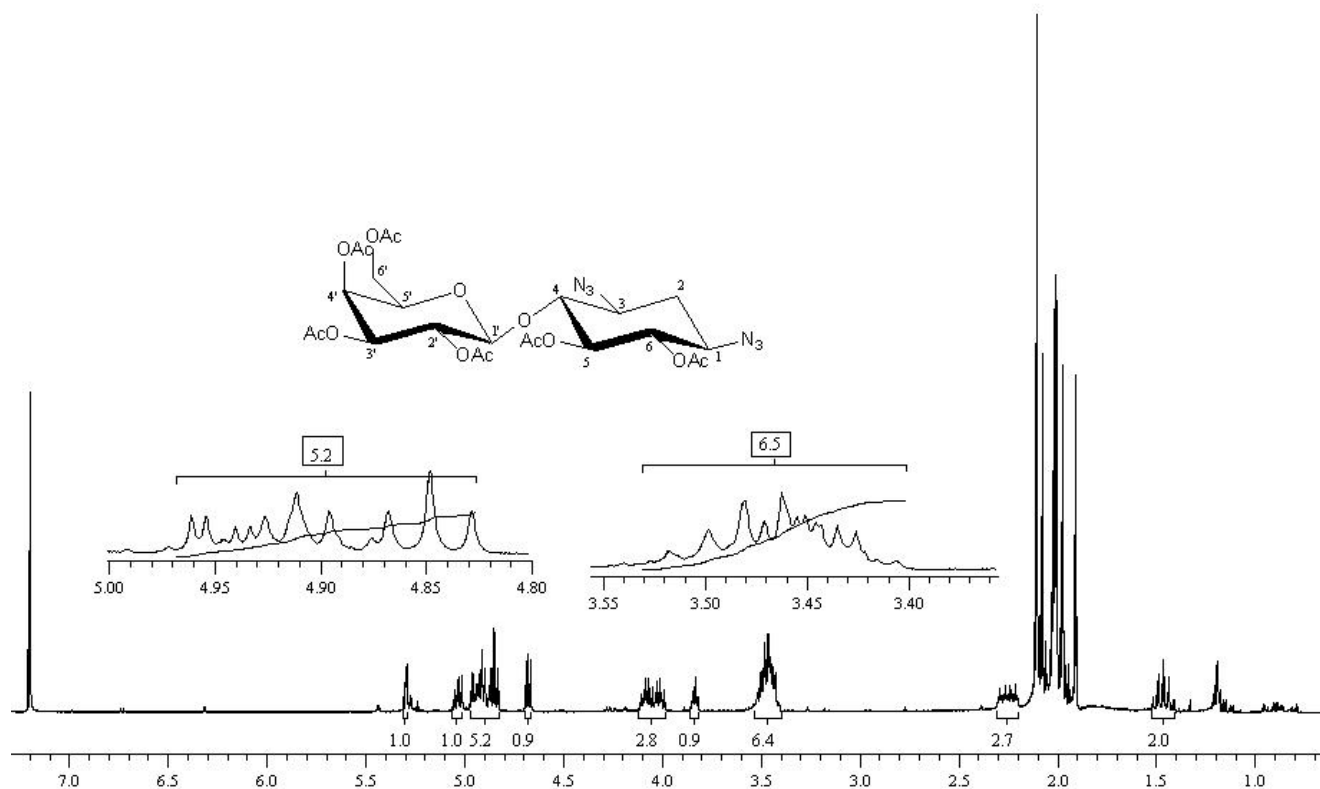
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
8,69	1	s	-	N-H
6,55	1H	d	$J=3,6$	H-1
5,55	1H	tap	$J= 9,8$	H-6'a
5,2	1H	tap	$J= 9,8$	H-6'b
5,1	1H	dd	$J= 3,6$ e $10,1$	H-2
4,27	1H	dd	$J= 41$ e $12,4$	H-5
4,2	1H		$J= 10,3$ e $1,8$	H-3
4,12	1H	dd	$J= 1,8$ e $12,3$	H-4
2,07	3	s	-	-OAc
2,04	3	s	-	-OAc
2,03	3	s	-	-OAc
2,01	3	s	-	-OAc

Anexo P — Espectro de RMN ^1H de Cloreto de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosila (**45**) a 400 MHz em CDCl_3 .

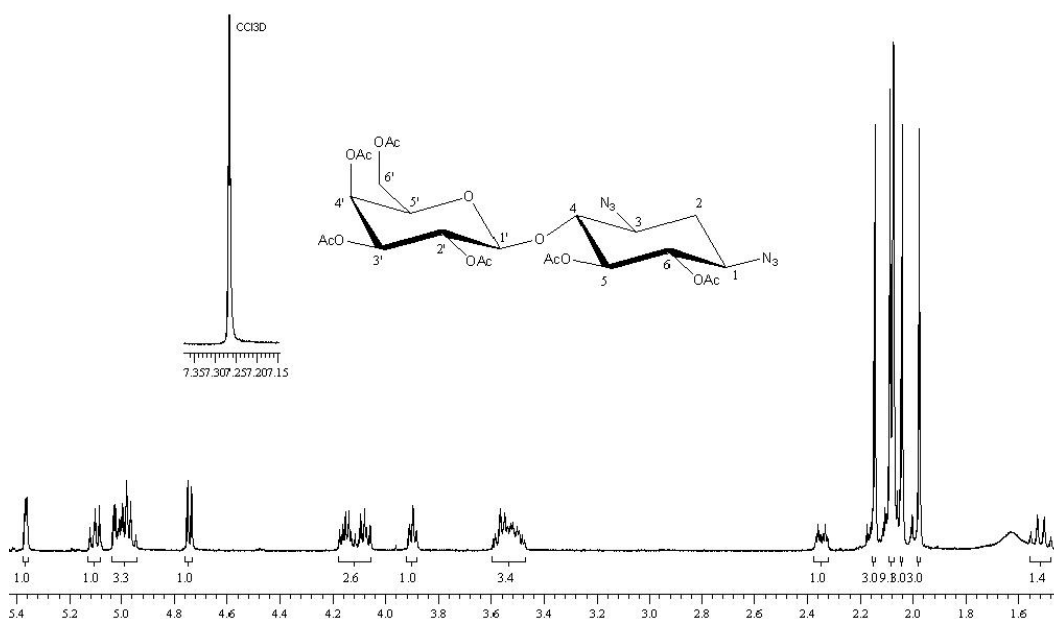


δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
6.21	1H	d	$J_{1,2}$ 3,6	H-1
5.88	1H	d	J 8,4	NH
5.35	1H	t	J 10,0	H-3 ou H-4
5.25	1H	t	J 10,0	H-3 ou H-4
4.55	1H	ddd	$J_{4,5}$ 10,0, $J_{5,6}$ 3,6, $J_{5,6'}$ 1,5	H-5
4.33-4.26	2H	m	-	H-6, H-6'
4.14	1H	dd	$J_{2,3}$ 10,0, $J_{1,2}$ 3,6	H-2
2.20-1.93	12H	m	-	4 x (-OAc)

Anexo Q – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarideo α a 500 MHz em CDCl_3 .

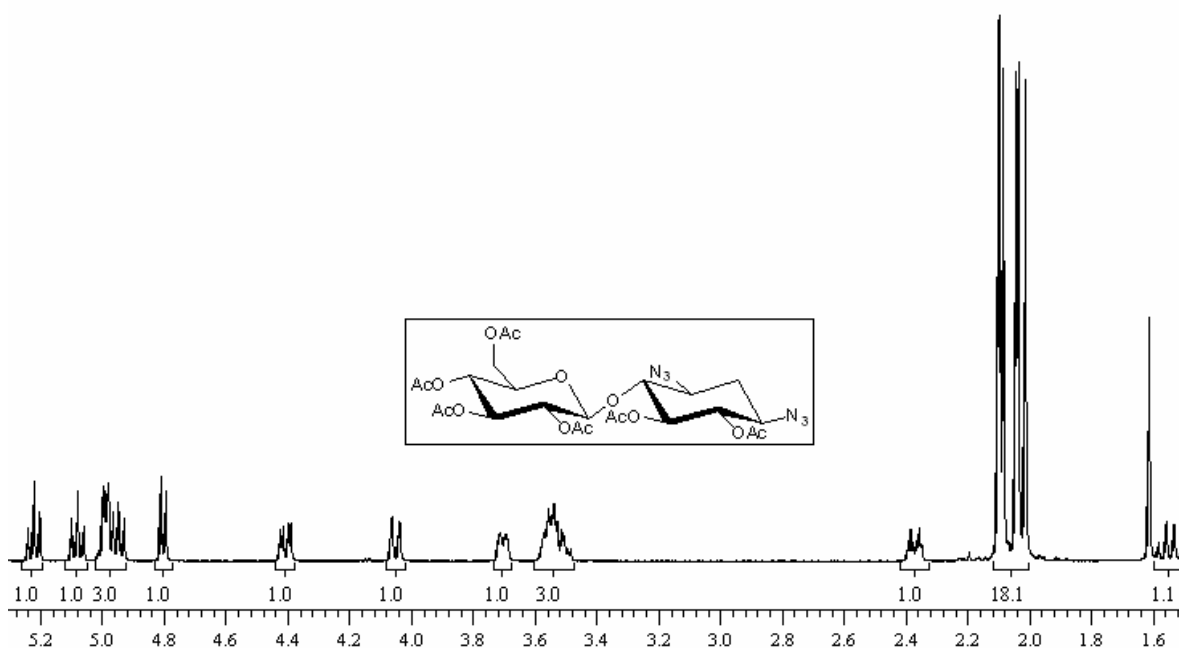
Anexo R – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarideo β impuro a 500 MHz em CDCl_3 .

Anexo S – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarídeo β derivado da neomicina, 2-desoxi-estreptamina ligada a galactose (**46**) a 500MHz em CDCl_3 .



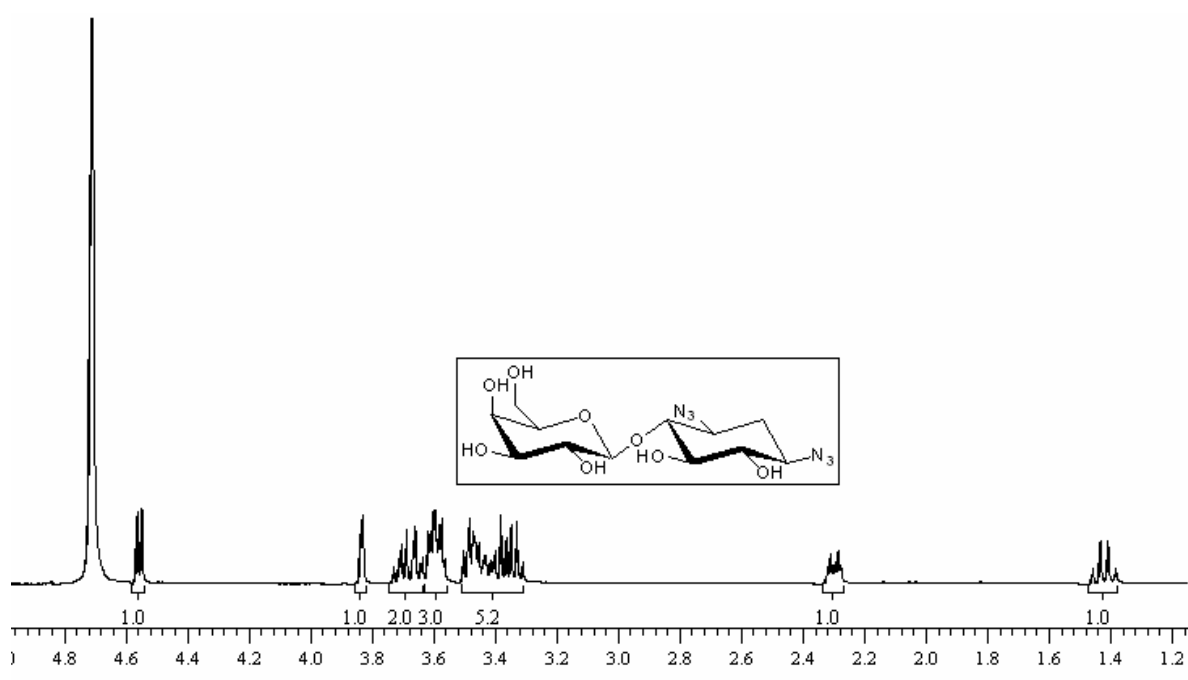
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,36	1	d	$J_{3',4'}$ 3,3	H-4'
5,1	1	dd	$J_{1',2'}$ 7,8; $J_{2',3'}$ 10,4	H-2'
4,94-5,03	3	m	-	H-3',H-5,H-6
4,74	1	d	$J_{1',2'}$ 7,8	H-1'
4,05-4,18	2	m	-	H-6'a,H-6'b
3,9	1	dt	$J_{5',6'}$ 6,6; $J_{5',6'}$ 7,1	H-5'
3,47-3,59	3	m	-	H-1,H-3,H-4
2,31-2,37	1	dt	J 4,3; J 4,5; $J_{2ax,2eq}$ 13,4	H-2eq
2,14	3	s	-	-OAc
2,09	3	s	-	-OAc
2,08	3	s	-	-OAc
2,07	3	s	-	-OAc
2,04	3	s	-	-OAc
1,97	3	s	-	-OAc
1,51	1	q	$J_{2ax,2eq}$ 12,7	H-2ax

Anexo T – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarídeo β derivado da neomicina, 2-desoxi-estreptamina ligada a glicose (**47**) a 500MHz em CDCl_3 .



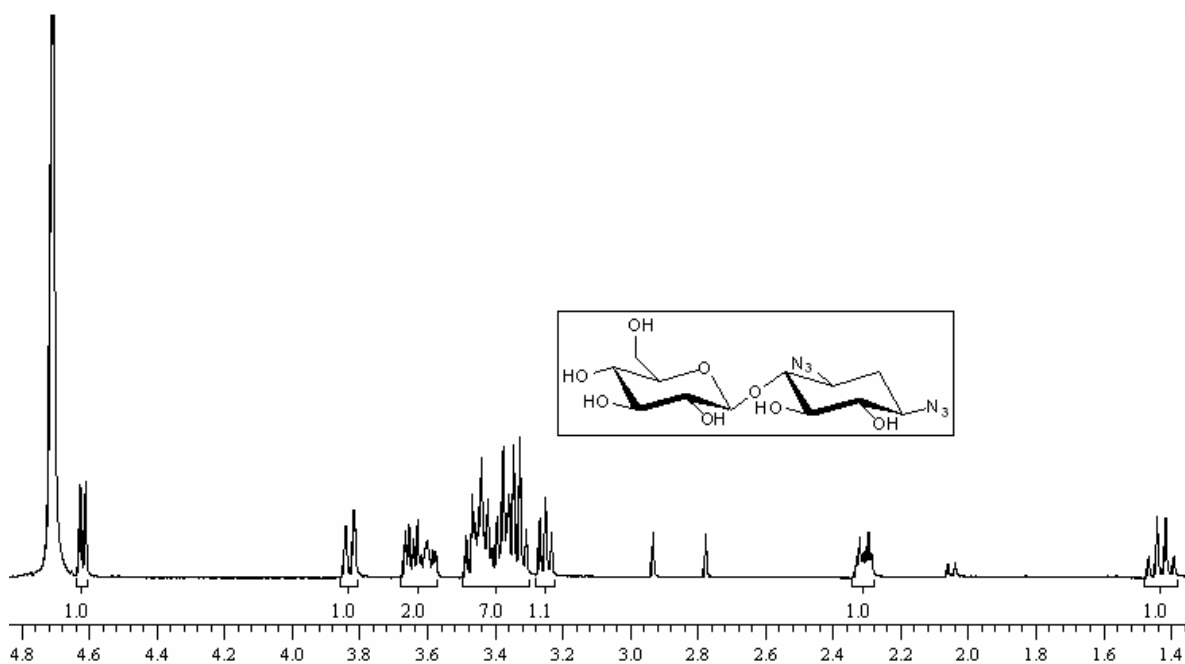
δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
5,22	1H	tap	J= 9,5	H-3'
5,08	1H	tap	J= 9,7	H-4'
5,0-4,97	2H,	m	-	H-5 e H-6
4,95	1H	tap	J= 8,7	H-2'
4,8	1H	d	J= 8,04	H-1'
4,4	1H	dd	J= 12,4 e 4,6	H-6'b
4,0	1H	dd	J= 12,4 e 1,5	H-6'a
3,73-3,68	1H	m	-	H-5'
3,6-3,5	3H	m	-	H-1, H-3 e H-4
2,37	1H	dt	J= 13,2 e 4,4	H-2eq
2,1-2,0	18H	m	-	6 x (-OAc)
1,54	1H	q	J= 12,7	H-2ax

Anexo U – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarídeo β derivado da neomicina, 2-desoxi-estreptamina ligada a galactose (**48**), desacetilado, a 500MHz em D_2O .



δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,55	1H	d	J= 7,8	H-1'
3,83	1H	d	J= 3,3	H-4'
3,71	1H	dd	J= 11,7 e 8,3	H-6'a
3,65	1H	dd	J= 3,6 e 11,9	H-6'b
3,62-3,56	3H	m	-	H-5', H-1 e H-3
3,5-3,3	5H	m	-	H-2', H-3', H-4, H-5, H-6
2,3	1H	dt	J=12,7 e 4,4	H-2eq
1,42	1H	q	J= 12,4	H-2ax

Anexo V – Espectro de RMN ^1H do pseudo-dissacarídeo β derivado da neomicina, 2-desoxi-estreptamina ligada a glicose (**49**), desacetilado, a 500MHz em D_2O .



δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
4,62	1H	d	J= 7,8	H-1'
3,82	1H	d	J= 11,7	H-5'
3,67-3,56	2H	m	-	H-6'a e H-6'b
3,5-3,3	7H	m	-	H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-3', H-4'
3,25	1H	tap	J= 8,7	H-2'
2,3	1H	dt	J= 12,7 e 4, 4	H-2eq
1,43	1H	q	J= 12,4	H-2ax