UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese de iminoaçúcares modificados e avaliação
da atividade biológica**

Luís Otávio Bunhotto Zamoner

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese de iminoaçúcares modificados e avaliação
da atividade biológica**

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: Luís Otávio Bunhotto Zamoner

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 08/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

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.

Zamoner, Luís Otávio Bunhotto.

Síntese de iminoaçúcares modificados e avaliação da atividade biológica. Ribeirão Preto, 2012.

81p. : il.; 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. Iminoaçúcar. 2. Glicosidase. 3. *Click chemistry*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luís Otávio Bunhotto Zamoner

Síntese de iminoaçúcares modificados e avaliação da atividade biológica

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.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Luiz Carlos e Vilma, e à minha vó,
Alcina, por me tornarem o que sou hoje.*

Agradecimentos

A Deus, por me guiar, por me fazer forte e por me amar.

À professora Ivone, por me prover oportunidades e por acreditar que eu era capaz.

*À minha família, por ser **minha** família.*

Ao Edgar por me mostrar a felicidade.

À minha amiga Cláudia, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração durante nosso cafezinho.

Aos meus colegas de laboratório Adriane, Daniel, Galo, Getúlio, Lillian, Marcelo, Milena, Pedro, Peterson, Valquíria e Vanessa, pelos dias de trabalho e pelos ensinamentos diários. Desculpem se, em momentos difíceis deixei minhas funções de lado.

À professora Mônica e seus alunos pelo apoio e também pela amizade.

Aos técnicos Vinícius, Tomaz e Áurea, pela ajuda.

A todos que indiretamente tornaram este trabalho possível.

*“O objetivo da ciência não é o de abrir portas para a
sabedoria infinita, mas o de estabelecer limites para
o erro infinito”*

Bertolt Brecht

ZAMONER, L. O. B. **Síntese de iminoaçúcares modificados e avaliação da atividade biológica**. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

RESUMO

Glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas liberando unidades monossacarídicas de um terminal não redutor de um oligossacarídeo ou glicoconjugado. Iminoaçúcares são alcalóides piperidínicos polihidroxilados isolados de plantas (gênero *Morus*) e microrganismos (*Bacillus*), como nojirimicina (NJ) (**1**) e 1-desoxinojirimicina (DNJ) (**2**), os quais são descritos como inibidores de glucosidase. O potencial uso destes inibidores no tratamento de infecções virais, crescimento tumoral, metástases, diabetes, doença de Gaucher e osteoartrite tem motivado a comunidade científica na busca por novos derivados iminoaçúcares. Desse modo, a síntese de pseudodissacarídeos, contendo ambos resíduos de iminoaçúcar e glicopirranose, constitui uma estratégia interessante de obtenção desses derivados, apesar dos desafios envolvidos na geração da ligação entre estes dois açúcares. Por esta razão, foi utilizada a estratégia de *click chemistry* como uma ferramenta para introduzir uma ponte de grupo 1,2,3-triazol entre os açúcares a partir do acoplamento de azido-glicosídeo com *N*-propargil-iminoaçúcar. Desta forma, a síntese do iminoaçúcar *N*-propargílico (**73**), com função acetileno terminal, foi realizada em cinco etapas e foi usado na reação de cicloadição 1,3-dipolar com três derivados glicosídicos contendo grupo azido nas posições anomérica (C-1), C-3 ou C-6. A partir desta reação CuAAC (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition), três novos pseudo-dissacarídeos (**77**, **81** e **85**) foram sintetizados em rendimentos moderados e foram, então, avaliados em ensaios de α -D-glucosidase isolada de *Sacharomyces cerevisiae*. Nestes testes preliminares, o composto **77** foi o mais ativo, o qual foi capaz de inibir a atividade da enzima em 40% a 1mM. Esses resultados encorajam a realização de novos experimentos, principalmente, a determinação de K_i e avaliação da atividade relativa à replicação do vírus HIV. Portanto, a obtenção destes pseudodissacarídeos trouxe uma contribuição importante no que diz respeito à química de carboidratos e também ao tratamento das doenças citadas.

Palavras-chave: inibidor de glucosidase, iminoaçúcar, pseudodissacarídeo, *click chemistry*, CuAAC, HIV, doença de Gaucher, diabetes mellitus.

ZAMONER, L. O. B.. 2012. 79f. **Synthesis of modified iminosugars and its biological evaluation.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ABSTRACT

Glucosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds releasing monosaccharide units from a non-reducing end of an oligosaccharide or glycoconjugate. Iminosugars are polihydroxylate piperidinic alkaloids isolated from plants (*Morus alba*) and microorganisms (*Bacillus*), such as nojirimycin (NJ) (**1**) and 1-deoxynojirimycin (**2**), which are described as glucosidase inhibitors. The potential use of these inhibitors in the treatment of viral infection, tumoral growing, metastasis, diabetes, Gaucher's disease and osteoarthritis has stimulated the scientific community on the search for novel iminosugar derivatives. Thereby, the synthesis of pseudodisaccharides, having both iminosugar and glycopyranose residues, represents an interesting strategy to obtain these derivatives, despite the challenges involved in generating the link between these two sugars. For this reason, we have used click chemistry as a tool to introduce a 1,2,3-triazole bridge between the sugars from the coupling of azide-glycosides with *N*-propargyl-iminosugar. Thus, the synthesis of *N*-propargyl-iminosugar (**73**), containing the terminal acetylene function, was performed in five steps, and was used in the 1,3-dipolar cycloaddition reaction with three glycosidic derivatives containing the azide group at anomeric (C-1), C-3 or C-6 positions. By applying this CuAAC (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition), three novel pseudo-disaccharides (**77**, **81** and **85**) were synthesized in moderate yields and then, evaluated in α -D-glucosidase assays isolated from *Sacharomyces cerevisiae*. In these preliminary test, compound **77** was the most active from the series, which was able to inhibit 40% of the enzyme activity at 1 mM. These results encourage us to perform new experiments, notably the determination of K_i and evaluation towards HIV replication. Thus, a contribution regarding carbohydrate chemistry and treatment of the supracited diseases was achieved by the synthesis of these pseudodisaccharides.

Keywords: glucosidase inhibitor, iminosugar, pseudo-disaccharide, click chemistry, CuAAC, HIV, Gaucher's disease, diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1. Reação de N-glicosilação de proteínas, catalisada pela enzima oligossacarídeo-transferase (OT). Adaptado de Ito e Matsuo (2003) ..	03
Esquema 2. Processamento inicial da região oligossacarídica [Glc3Man $\rightarrow$ 9 (GlcNAc)2] de N-glicoproteína imatura pela ação das enzimas α -D-glicosidases I e II.	04
Esquema 3. Biossíntese de glicosfingolípídeos (GSL). A inibição de D-glucosiltransferase N-acil-esfingosina diminuirá a produção de GSL, constituindo a terapia de inibição do substrato	06
Figura 1. Estrutura de alguns iminoaçúcares inibidores de glucosidase.....	07
Figura 2. Glicovir (8), acarbose (9) e voglibose (10) – inibidores de glucosidase.....	08
Figura 3. Exemplos de alguns iminoaçúcares naturais.....	09
Esquema 4. Mecanismo de protonação da 1-desoxi-nojirimicina (3) e o substrato da glicose (oxocarbênio B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glucosidases.....	10
Esquema 5. Reagentes e condições: (i) EtSH, HCl, dioxano; (ii) TPAP, NMO, CH ₂ Cl ₂ ; (iii) HgO, HgCl ₂ , MeOH; (iv) NH ₂ OH.HCl, py, EtOH; (v) LiAlH ₄ , Et ₂ O; (vi) (Boc) ₂ O, Et ₃ N, MeCN; (vii) Pd(OH) ₂ , H ₂ , EtOH; (viii) SO ₂ , H ₂ O; (ix) DOWEX® 1X2 (HO ⁻), H ₂ O	12
Esquema 6. Reagentes e condições: (i) NH ₂ OMe.HCl, py, 80° C, 3h; (ii) CrO ₃ , py, CH ₂ Cl ₂ , ta, 2h; (iii) Bu ₃ SnH, AIBN, C ₆ H ₆ , refluxo, 5h; (iv) LiAlH ₄ , THF, refluxo, 4h; (v) (a) Pd/C (10%), H ₂ , EtOH, RT, 1-3d, (b) DOWEX® 1x8 ..	13
Esquema 7. Reagentes e condições: (i) NaH, H ₂ C=CHCH ₂ Br, 0°C; (ii) aq AcOH, 60°C; (iii) BzCl, MsCl, py/CH ₂ Cl ₂ , -15°C até 0°C; (iv) NaOMe, MeOH, ta; (v) <i>t</i> -BuOK, THF/DMF, 0°C até ta; (vi) NaN ₃ , NH ₄ Cl, aq DMF, 80°C; (vii) BnBr, NaH, <i>n</i> -Bu ₄ NI, DMF, 0°C; (viii) 3% HCl em MeOH, ta; (ix) Tf ₂ O, py, CH ₂ Cl ₂ , -60°C; (x) Ph ₃ P, CH ₂ Cl ₂ , ta até 45°C; (xi) K ₂ CO ₃ , H ₂ O, dioxano, MeOH, THF, ta, CbzCl, 0°C; (xii) TFA, H ₂ O/dioxano, ta; (xiii) NaBH ₄ , EtOH, 0°C; (xiv) TBDPSCI, imidazol, DMF, ta; (xv) PdCl ₂ , NaOAc, aq AcOH, 50°C; (xvi) TBAF, AcOH, THF, ta; (xvii) Pd/C (10%), H ₂ , AcOH/EtOH/H ₂ O, ta.....	14

Esquema 8. Reagentes e condições: (i) LiAlH_4 , THF; (ii) DMSO, $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; (iii) $\text{RNH}_3^+\text{HCO}_2^-$, NaBH_4CN , MeOH, peneira molecular 3Å; (iv) Li, NH_3 15

Esquema 9. Reagentes e condições: (i) BnBr , NaH, Bu_4NI , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 96%; (ii) MeOH, HCl, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 98%; (iii) TBDMSCl, imidazol, DMF, 0°C ; (iv) MsCl, Et_3N , 0°C ; (v) (a) MeOH, HCl, $0^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$ (b) KOH, $0^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 52% à partir de 43; (vi) BnNH_2 , CHCl_3 , refluxo, 16 h, 43% de 46 e 37% de 47 16

Esquema 10. Reagentes e condições: (i) OsO_4 , NMO, acetona/ H_2O , 60°C , 3h; (ii) concd H_2SO_4 , acetona, 25°C , 3h; (iii) (1S,2S)-(-)-1,2-difeniletano-1,2-diamina 45, Et_2O , 25°C , 10h; (iv) Et_2O , 1M H_2SO_4 , 25°C , 30 min; (v) NaBH_4 , MeOH, 5°C ; (vi) TFA/ H_2O , 4°C , 15h; (vii) Pd/C (10%), H_2 , MeOH, 25°C , 15h..... 18

Esquema 11. Reagentes e condições: (i) (a) R^*OCOCl , (b) $\text{BnOCH}_2[2\text{-(Th)Cu(CN)]Li}_2$, (c) aq HCl; (ii) NaOMe, aq HCl; (iii) *n*-BuLi, CbzCl; (iv) Pb(OAc)_4 , tolueno, refluxo; (v) aq HCl/EtOH; (vi) $\text{Me}_4\text{NBH(OAc)}_3$, acetona/AcOH; (vii) OsO_4 , NMO; (viii) Pd(OH)_2 , H_2 , 10% aq HCl..... 19

Esquema 12. Reagentes e condições: (i) $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{DHQ})_2\text{PHAL}$, *t*-BuOH, H_2O ; (ii) $(\text{MeO})_2\text{CMe}_2$, DMF; (iii) DIBAL, CH_2Cl_2 , -78°C ; (iv) (+)-DIPT, $\text{Ti(O-}i\text{-Pr)}_4$, TBHP, CH_2Cl_2 , -20°C ; (v) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et_3N , CH_2Cl_2 , -78°C ; (vi) $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, KHMDS, THF, tolueno; (vii) DDQ, CH_2Cl_2 , H_2O ; (viii) MsCl, *i*-Pr₂Net, CH_2Cl_2 , 0°C ; (ix) BnNH_2 , TsOH, DMSO, 120°C ; (x) (a) OsO_4 , NMO, *t*-BuOH, THF, H_2O , (b) NaIO_4 , THF, H_2O ; (xi) LiAlH_4 , THF, 0°C ; (xii) TODA, MeOH; (xiii) H_2 , Pd/C, EtOH..... 20

Esquema 13. (A) Geração de regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos utilizando alta temperatura. (B) Representação esquemática da reação de *click* com catálise por Cu(I)..... 21

Figura 4. Comparação entre amidas e 1,2,3-triazóis 22

Figura 5. Relação da concentração de substrato e velocidade inicial em reações enzimáticas 23

Figura 6. Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk..... 25

Figura 7. Estruturas dos pseudo-dissacarídeos propostos 27

Esquema 14. Rota sintética proposta para preparação do intermediário 73 em cinco ou seis etapas, bem como a formação dos produtos de interesse 74, 78 e 82 pela reação de CuACC. Reagentes e condições: (i) NaH, DMF, TBAI, BnBr; (ii) HCl 6N, AcOH; (iii) LiAlH₄, THF; (iv) DMSO, (CF₃CO)₂O, CH₂Cl₂, Et₃N; (v) propargilamina, NaBH₄CN, MeOH, peneira molecular 3Å; (vi) NH₄HCO₂, NaBH₄CN, MeOH, peneira molecular 3Å; (vii) Cs₂CO₃, acetona, brometo de propargila 44

Esquema 15. Proteção das hidroxilas do composto 86 no seu correspondente derivado tetra-*O*-benzílico (72) 46

Esquema 16. Mecanismo da reação de *O*-benzilação de 86..... 46

Esquema 17. Reação de conversão do composto 72 ao composto 15 47

Esquema 18. Mecanismo da reação de conversão do composto 72 no composto 15 47

Esquema 19. Reação de redução do anel piranosídico 15 para formar o composto 38 48

Esquema 20. Oxidação de 38 pelo método de Pftizner-Moffat 48

Esquema 21. Esquema da reação do DMSO com anidrido trifluoroacético 49

Esquema 22. Conversão do composto 1,5-dicarbonílico 39 no produto 40..... 49

Esquema 23. Mecanismo proposto para a dupla aminação redutiva do composto 39 50

Figura 7. Glicosídeos contendo grupo azido nas posições anomérica (C-1), C-3 e C-6, utilizados na condensação com 1,2,3,6-tetra-*O*-benzil-*N*-propargil-1-deoxinojirimicina (73)..... 51

Esquema 24. Reações de *click chemistry* realizadas a partir do alcino terminal sintetizado 73 com os compostos azido 75, 79 e 83..... 51

Esquema 25. Mecanismo da reação bimolecular CuACC proposto por Maarseveen et al 52

Esquema 26. Reações de desproteção dos compostos obtidos a partir da reação de *click chemistry* 54

Figura 8. Cromatogramas das amostras dos compostos 38, 73, 74, 78 e 82.. 55

Figura 9. Cromatogramas das separações realizadas em coluna semi-analítica 56

Figura 10. Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando a hidrólise de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo pela enzima α -D-glucosidase em pH 6,8 58

Figura 11. Gráficos ilustrando a atividade dos compostos **77** (inibição de 40%), **81** (inibição de 20%) e **85** (inibição de 2,3 %) na concentração de 1 mM sobre a α -D-glucosidase. No eixo vertical estão os valores das velocidades da reação de hidrólise do substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : Deslocamento químico

AIDS: *Acquired immune deficiency syndrom*; Síndrome da imunodeficiência adquirida

Cbz: benziloxycarbonila

CCDC: cromatografia de camada delgada comparativa

CD4: *cluster of differentiation 4 cell*; célula do grupo de diferenciação 4

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY: *correlation spectroscopy*; espectroscopia de correlação

CuAAC: Copper-catalysed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction

DNJ: 1-desoxinojirimicina

ES: enzima-substrato

ESI: enzima-substrato-inibidor

GlcNAc: N-Acetilglicosamina

GP120: glicoproteína 120

GP41: glicoproteína 41

GSL: glicosfingolipídeo

HIV: *Human immunodeficiency virus*; Vírus da Imunodeficiência Humana

HMQC: *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*; correlação heteronuclear de quantum múltiplo

K_m : constante de Michaelis-Menten

NJ: nojirimicina

OT: oligossacarídeo-transferase

PIPES (tampão): Piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico)

RE: retículo endoplasmático

Rf: retention factor; fator de retenção

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA: *Ribonucleic acid*; ácido ribonucleico

TBDS: terc-butil-dimetilsilila

$V_{\max}$: Velocidade máxima

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Glucosidases, glicoconjugados e importância biológica.....	01
1.2. Inibidores de glucosidase	06
1.3. Iminoaçúcares: estrutura química	09
1.4. Síntese de iminoaçúcares	11
1.4.1. Rotas sintéticas baseadas em precursores relacionados a carboidratos.....	11
1.4.2. Rotas sintéticas baseadas em precursores alternativos não relacionados a carboidratos	17
1.5 <i>Click Chemistry</i>	20
1.6 Cinética enzimática	22
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Materiais.....	28
3.1.1 Aparelhagem analítica.....	28
3.1.2 Aparelhagem laboratorial	28
3.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais	28
3.2. Métodos.....	30
3.2.1 Síntese	30
3.2.2 Cinética enzimática	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Síntese do intermediário dicarbonílico 39	44
4.2. Síntese dos produtos 74 , 78 e 82 e suas correspondentes desproteções.....	51
4.3. Análise e purificação em CLAE	54
4.3.1. Análise de compostos em coluna analítica.....	55
4.3.2. Separação em coluna semi-preparativa	56
4.4. Cinética enzimática	57
4.4.1. Determinação do K_M de α -D-glucosidase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
4.4.2. Ensaio de inibição enzimática empregando a substância padrão 1-desoxinojirimicina (2) e os compostos sintetizados 77 , 81 e 85	58
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

Iminoaçúcares são estruturas conhecidas por sua atividade inibidora de glucosidases, enzimas responsáveis pelo metabolismo dos glicoconjugados. Inibidores de glucosidases são agentes de grande interesse terapêutico, uma vez que apresentam atividade contra vírus, crescimento tumoral, metástases, diabetes, doença de Gaucher e outras síndromes associadas ao armazenamento lisossomal de glicoesfingolípídeos e osteoartrite. São também descritos como inibidores da rejeição de órgãos transplantados, agentes agroquímicos e no tratamento de cárie dentária.

1.1 Glucosidases, glicoconjugados e importância biológica

Oligossacarídeos e glicoproteínas são constituintes celulares responsáveis pelo processo de comunicação (GARCÍA-MORENO e cols, 2004; VOGEL, 2001), adesão e reconhecimento entre diversos tipos de células e microrganismos (SHARON; LIS, 1993). Os carboidratos presentes nos glicoconjugados (glicoproteínas e glicolípídios) apresentam alto grau de complexidade e diversidade estrutural (HELENIUS; AEBI, 2001; SHRIVER e cols, 2004), desempenhando um importante papel em diversos processos biológicos, incluindo: reconhecimento intercelular (fertilização), proliferação e diferenciação celular (progressão tumoral), infecção, interação com toxinas e hormônios, adesão celular, resposta imune, envelhecimento, funções cerebrais; ainda, são fundamentais nos processos de enovelamento, estabilidade e solubilidade de proteínas (GARCÍA-MORENO e cols, 2004; HELENIUS; AEBI, 2004; SHRIVER e cols, 2004; WEERAPANA; IMPERIALI, 2006).

As reações de glicosilação em múltiplos sítios das proteínas geram enorme diversidade estrutural de glicoproteínas contendo uma ou até quarenta unidades monossacarídicas, conectadas entre si em diferentes posições do anel glicopiranosídeo. Sua estrutura varia de acordo com a espécie, órgão e célula, apresentando-se em diversas isoformas com unidades de açúcares que diferem

quanto à natureza do resíduo, comprimento, ramificação e número de sítios de glicosilação da proteína (MELO e cols, 2006).

Nos processos de biossíntese desses glicoconjugados, grupos glicosídicos são clivados e transferidos pelas enzimas conhecidas, respectivamente, como glucosidases e glucosiltransferases que são vitais para o crescimento normal de desenvolvimento das células e estão amplamente distribuídas em mamíferos, plantas e microrganismos (HELENIUS; AEBI, 2001; KRASIKOV e cols, 2001). As glucosidases pertencem ao grande grupo das glicosidases e são responsáveis especificamente pela clivagem de ligações *O*-glicosídicas, envolvendo unidades de glicose. Estas enzimas participam de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como: processamento de oligossacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades monossacarídicas de glicose para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, biossíntese e modificação de glicoproteínas e glicoesfingolipídeos, controle de qualidade dos mecanismos de processamento de glicoproteínas *N*-ligadas; catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados (ASANO, 2003; HELENIUS, AEBI, 2001).

Os glicoconjugados são classificados em três categorias gerais: *N*-glicoproteína, representando uma unidade de açúcar ligada ao átomo de nitrogênio do aminoácido de asparagina; *O*-glicoproteína, ligado ao átomo de oxigênio dos aminoácidos de serina ou treonina, e glicofosfatidilinositol, envolvendo a derivatização do grupo carboxílico C-terminal. A reação mais comum em eucariotes está relacionada à *N*-glicosilação de asparagina ligada a proteínas (MELO e cols, 2006).

A biossíntese de *N*-glicoproteínas é realizada em diversas etapas e tem início a partir da transferência co-translacional completa de uma porção oligossacarídica [$\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$] presente no doador dolicol pirofosfato para a cadeia lateral de asparagina (Asn) de uma proteína nascente. Esta reação é catalisada pela enzima oligossacarídeo-transferase (OT), presente no retículo endoplasmático (RE) (esquema 1) (ASANO, 2003; HELENIUS, AEBI, 2001).

Esquema 1. Reação de *N*-glicosilação de proteínas, catalisada pela enzima oligossacarídeo-transferase (OT). Adaptado de Ito e Matsuo (2003).

A diversificação subsequente do glicoconjugado, gerado pela ação da OT no retículo endoplasmático (RE), ocorre a partir de uma série de reações de processamento pela ação conjunta de glucosidases e glicosiltransferases, presentes no RE e Complexo de Golgi. As α -D-glucosidases I e II agem nas etapas iniciais do processamento do tetradeca-oligossacarídeo imaturo $[\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2]$, hidrolisando as ligações *O*-glicosídicas 1-2 e 1-3, respectivamente, liberando os três resíduos de glicose mais expostos da glicoproteína (Esquema 2) (SCWEDEN e cols, 1986; CARVALHO e cols, 1999). O restante da cadeia sofre ação de α -manosidases, seguido de alongamento por processos catalisados por glicosiltransferases e sulfotransferases, introduzindo resíduos de fucose, galactose, *N*-acetil-glicosamina, ácidos siálicos e sulfato (ASANO 2003).

Esquema 2. Processamento inicial da região oligossacarídica $[Glc_3Man_9(GlcNAc)_2]$ de *N*-glicoproteína imatura pela ação das enzimas α -D-glucosidases I e II.

A ação das glucosidases está presente no processo de maturação do vírus HIV. A estrutura morfológica dos vírus HIV inclui proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA protegidos por uma capa externa, o envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma proteína complexa conhecida como *env*, que consiste das glicoproteínas gp41, transmembrana, e gp120, exposta à camada externa do envelope e ancorada à gp41 (CHALLAND, 1997). As glucosidases I e II participam da formação de gp120, responsável pela interação do vírus com os receptores CD4 dos linfócitos T4, etapa inicial fundamental no processo de infecção do vírus. O bloqueio do processo de clivagem da gp120 leva à formação de glicoproteínas imperfeitas, que seriam incapazes de infectar as células do hospedeiro (GRUTTERS e cols, 1987).

Na diabetes mellitus tipo II (não dependente de insulina), mais comum em adultos, a secreção de insulina pelo pâncreas pode ser normal, mas a entrada de glicose nas células é comprometida devido ao reduzido número de receptores para insulina, elevando os níveis de glicose sanguíneos. O uso de inibidores de glucosidases diminui os níveis sanguíneos de glicose, pois inibem α -glucosidases (sacarase, maltase e glucoamilase) presentes no trato gastrointestinal, retardando a digestão de carboidratos. Considerando que oligossacarídeos provenientes da dieta necessitam ser quebrados em unidades monossacarídicas para serem absorvidos, o

uso de inibidores de glucosidase promove melhor controle nas concentrações de glicose pós-prandial (CHENG; JOSSE, 2004).

Ademais, estudos realizados por Satoh e colaboradores demonstraram que carboidratos são importantes precursores lipogênicos, e que a alteração da digestão destes açúcares pelos inibidores de α -glucosidases afeta diretamente o metabolismo de lipídios, reduzindo a hiperlipidemia e a hiperglicemia pós-prandial, retardando, assim, o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (SATO e cols, 2006).

As glicosíngolipidoses são um grupo de doenças hereditárias causadas por mutações em genes que codificam enzimas ou outros cofatores que reduzem a eficiência de hidrólise do substrato glicosíngolípídeo (GSL), resultando no acúmulo deste em lisossomos. A doença de Gaucher tipo I está relacionada ao distúrbio genético no metabolismo de lipídios, mais especificamente envolvendo mutações em genes que codificam glicosil-hidrolases, como β -glucocerebrosidase, responsáveis pelo catabolismo de GSL, e promove o acúmulo de GSL, principalmente em macrófagos. Grandes proporções de GSL resultam na disfunção celular e aumento do volume do fígado, baço, anemia e anormalidades na medula espinhal e nos ossos, causando neurodegeneração progressiva e morte ainda na infância. Um tratamento eficaz para esta doença é a terapia de substituição enzimática, a qual consiste na administração intravenosa de glucocerebrosidase recombinante (Cerezyme[®]), entretanto, o alto custo e as dificuldades de atravessar a barreira hematoencefálica, tornam ineficiente o tratamento da forma neuropática da doença (WANG e cols, 2009; DIOT e cols, 2011). Outro tratamento disponível é a privação de substratos essenciais para produção de GSL. Neste sentido, a inibição de D-glucosiltransferase diminui a formação do substrato glucosilceramida, diminuindo o acúmulo deste nos lisossomos, esquema 3 (WENNEKES e cols, 2005). A maior vantagem dessa terapia é que ela é feita por administração oral, diferente da reposição enzimática, endovenosa.

Esquema 3. Biossíntese de glicosfingolipídeos (GSL). A inibição de D-glucosiltransferase *N*-acil-esfingosina diminuirá a produção de GSL, constituindo a terapia de inibição do substrato.

β -glucuronidase está relacionada com o potencial de invasividade e de metástase e está em níveis aumentados em tumores, possibilitando, assim, o estudo da inibição deste alvo na terapia anti-câncer (CHEN, 2003). Dessa maneira, iminoaçúcares bicíclicos sintetizados demonstraram atividade de inibição da β -glucuronidase (CIPOLLA e cols, 2007).

1.2 Inibidores de glucosidase

Diversos inibidores de glucosidases, tanto de origem natural quanto sintética, têm sido descritos na literatura. Tais inibidores podem ser agrupados em diferentes classes, como: glicosídeos, iminoaçúcares, carbaaçúcares, tioaçúcares e inibidores não-glicosídicos. A compreensão do mecanismo molecular das glucosidases e de seus respectivos inibidores é de extrema relevância para a inserção de novos fármacos no arsenal terapêutico ou para o planejamento de análogos mais específicos.

Nojirimicina (**1**) e 1-desoxinojirimicina (DNJ) (**2**) são inibidores iminoaçúcares de α -glucosidases bastante descritos, e parecem interagir com os receptores da enzima em sua forma protonada. Baseando-se em experimentos envolvendo cultura de células, o composto **2** inibiu a formação de oligossacarídeos complexos, resultando no acúmulo de $[\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2]$, entretanto, a atividade *in vivo* é apenas moderada, além de causar efeitos adversos (JUNGE e cols, 1996). D-Isofagomina (**3**) é um iminoaçúcar que demonstra potente atividade sobre β -glucosidase ($0,11 \mu\text{M}$), entretanto, a inibição é fraca sobre α -glucosidase ($86 \mu\text{M}$) (LILLELUND e cols, 2001; BULOW, 2000). A fraca inibição de **3** sobre α -

glucosidases parece ser devido à ausência de alguns grupos hidroxilas em sua estrutura, essenciais para interagir no sítio ativo da enzima. Castanospermina (**4**) e swainsonina (**5**) (figura 1) são iminoaçúcares bicíclicos com alta constante de inibição sobre glucosidases. De fato, castanospermina **4** é um potente inibidor específico de α - e β -glucosidases de mamíferos e plantas *in vivo* e *in vitro*, com porcentagem de inibição de 100% (K_i 0,1 μ M) contra a α -glucosidase lisossomal, e 96% (K_i 7 μ M) contra β -glucosidase lisossomal. Swainsonina (**5**) é um potente inibidor de α -manosidase (K_i 155nm) (BURLAND e cols, 2011).

Figura 1. Estrutura de alguns iminoaçúcares inibidores de glucosidase.

Os efeitos imunossupressores dos iminoaçúcares também têm sido estudados e atualmente, apenas a castanospermina (**4**) demonstrou atividade depressora sobre o sistema imune (ZHANG e cols, 2010).

Entre iminoaçúcares inibidores de glucosidases, existem dois fármacos desenvolvidos e aprovados para o tratamento da diabetes tipo II e Doença de Gaucher. O primeiro foi a *N*-hidroxietyl-desoxynojirimicina **6**, Miglitol (figura 1), desenvolvida pela Bayer e usada no tratamento da diabetes melitus tipo II, devido a sua forte atividade inibitória contra α -glucosidase, a qual bloqueia a digestão de oligossacarídeos da dieta. A administração oral de **6**, após as refeições, inibe α -glucosidases presentes no trato gastrointestinal, retardando a digestão de carboidratos e, conseqüentemente, promovendo melhor controle nas concentrações de glicose após as refeições. Outro fármaco também inserido no mercado farmacêutico é a *N*-butildesoxynojirimicina (**7**, Zavesca) (figura 1), comercializada pela Acetlion, o qual atua na privação de substrato, necessário para o controle da doença de Gaucher (ver item 1.1) (ZHANG e cols, 2011).

A atividade anti-HIV (EC_{50}) *in vivo* dos compostos **4** e **7** (29 e 56 μ M) é reduzida em relação à azidovudina-AZT (0,1 μ M), primeiro medicamento antiretroviral aprovado para o tratamento da AIDS. *N*-butil-desoxinijirimicina (**7**) e castanospermina **4** possuem a capacidade de bloquear a atividade do vírus HIV *in vitro*, provavelmente por induzir a produção de gp120 imperfeitas, que seriam incapazes de efetuar a sua interação ou fusão com a membrana celular do linfócito T4 do hospedeiro nos primeiros estágios da infecção (GRUTERS e cols, 1987). Entretanto, existem ainda alguns problemas para encontrar a concentração plasmática necessária desses compostos para inibição adequada de α -glucosidase I sem ocasionar um dos seus efeitos colaterais relacionados a diarreia. Para contornar este problema, o fármaco Glicovir **8** (figura 2) foi desenvolvido a partir de **7** como fármaco anti-HIV, no entanto, promoveu, paralelamente, o desequilíbrio no processamento de glicoproteínas das células do hospedeiro (ASANO e cols, 2003).

Além dos inibidores de glucosidase baseados em iminoaçúcares, existem os compostos acarbose **9** (Glucobay[®]) e voglibose **10** (Basen[®]), os quais são, respectivamente, inibidor pseudoaminoaçúcar e um carbaçúcar. Ambos são indicados para o tratamento de diabetes melitus tipo II. O composto **9** tem sido clinicamente utilizado para reduzir os níveis de glicose sanguíneos, pois apresenta atividade inibidora sobre dissacaridases intestinais e α -amilase pancreática, responsáveis pela quebra de carboidratos complexos provenientes da dieta. Adicionalmente, o composto **10** é utilizado no Japão e na China como fármaco antidiabético e inibidor competitivo de α -glucosidases intestinais, sendo cerca de 20-30 vezes mais potente que **9** e, semelhante ao miglitol (**6**), apresenta efeitos colaterais reduzidos (Figura 2) (CHENG e cols, 2003; MAHMUD e cols, 2003; YASUDA e cols, 2003; ZHANG e cols, 2004).

Figura 2. Glicovir (**8**), acarbose (**9**) e voglibose (**10**) – inibidores de glucosidase.

Como demonstrado, as glucosidases estão frequentemente envolvidas em processos biológicos essenciais e, por esse motivo, os iminoaçúcares possuem grande potencial como agentes terapêuticos em muitas doenças, como câncer, diabetes, distúrbios relacionados ao armazenamento lisossomal e infecções virais e bacterianas (ZHANG e cols, 2010; KALAMKAR e cols, 2010; CSUK e cols, 2010). Por esta razão, vários outros iminoaçúcares já foram isolados ou sintetizados e o interesse pela busca de inibidores de glucosidases permitiu à comunidade científica o planejamento de diversas rotas sintéticas para a obtenção desses compostos.

1.3 Iminoaçúcares: estrutura química

Iminoaçúcares, também conhecidos por azaçúcares (BAXTER; REITZ, 1994; BARILI e cols, 1997) ou iminociclitois (KALAMKAR e cols, 2010), são análogos estruturais dos “verdadeiros” açúcares, nos quais o átomo de oxigênio é substituído pelo átomo de nitrogênio (AFARINKIA; BAHAR, 2005). Os iminoaçúcares ocorrem naturalmente em plantas, e em 1966, Inouye e colaboradores, a partir do filtrado de *Streptomyces*, descobriram o primeiro alcalóide poliidroxilado, a nojirimicina (**1**), com reconhecida atividade inibidora de α - e β -glucosidases sendo, portanto, o primeiro análogo iminoaçúcar da glicose a ser descrito (AFARINKIA; BAHAR, 2005). Na figura 3 estão ilustradas as estruturas de alguns iminoaçúcares conhecidos.

Figura 3. Exemplos de alguns iminoaçúcares naturais.

A DNJ **2**, em particular, foi sintetizada pela primeira vez por Inouye e colaboradores pela redução do grupo hidroxílico na posição anomérica e,

posteriormente, foi isolada de amoreira (LIU e cols, 1987) e também de culturas de *Streptomyces* (ASANO, 2001). Além dessas estruturas, são encontrados naturalmente derivados *N*-substituídos, como a *N*-metil-DNJ 6, o qual foi extraída de raízes de amoreira (*Morus alba*).

A substituição bioisostérica do heteroátomo de oxigênio da glicose por nitrogênio mimetiza a conformação e carga do íon intermediário oxocarbênio **B**, mas não do carbocátion **A**, durante a quebra da ligação glicosídica pela glucosidase, como mostrado no esquema 4 (MELO e cols, 2006).

Esquema 4. Mecanismo de protonação da 1-desoxi-nojirimicina (**3**) e o substrato da glicose (oxocarbênio **B**) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glucosidases.

Considerando que a quebra parcial da ligação glicosídica intensifica o caráter positivo gerado no oxigênio ou no carbono anomérico do glicosídeo natural, a substituição de um dos dois átomos por um nitrogênio protonado irá mimetizar a carga nesses centros durante o estado de transição. Na verdade, as principais características dos iminoaçúcares estão relacionadas à estabilização da carga positiva do átomo de nitrogênio, geometria trigonal no centro anomérico,

conformação de meia-cadeira, e configuração específica dos íons hidroxila, fatores essenciais para a atividade desses alcalóides (MELO e cols, 2006).

Tendo em vista a importância dos iminoaçúcares como inibidores de glucosidases, diversas estratégias sintéticas são adotadas para obtenção desses compostos, bem como seus derivados. A síntese da NJ (**1**) e DNJ (**2**) pode ser dividida em duas seções: as que utilizam carboidratos como material de partida e as que utilizam reagentes alternativos (AFARINKIA e BAHAR, 2005).

1.4. Síntese de iminoaçúcares

1.4.1. Rotas sintéticas baseadas em precursores relacionados a carboidratos

Carboidratos são muito utilizados como precursores na rota sintética para produção de iminoaçúcares devido à semelhança da configuração dos grupos hidroxílicos presentes no anel. Shipman e Moutel demonstraram a síntese de nojirimicina (**1**) partindo do monossacarídeo protegido 1,2,4,6-tetra-*O*-benzil-D-glicopiranosose **15**, esquema 5. O álcool **16**, resultante da abertura do anel e proteção do aldeído, foi oxidado à cetona **17** usando tetra-*N*-propilamônio perrutenato (TPAP) (LEY e cols, 1994). Transacetilação do grupo tioacetal ao dimetilacetal foi realizada com sais de mercúrio(II) e metanol. A cetona **17** foi então convertida à oxima **18** (mistura de isômeros em proporção 1:1) utilizando cloridrato de hidroxilamina e piridina. Redução com hidreto de lítio e alumínio seguida de reação da amina com di-*terc*-butil dicarbonato deu origem aos uretanos **19** e **20** com rendimento de 65% e 15%, respectivamente. A desproteção do composto majoritário **19** foi realizada pela reação de desbenzilação, utilizando catalisador de Pearlman, e a hidrólise do dimetilacetal ocorreu na presença de ácido sulfuroso, gerado *in situ* por dióxido de enxofre gasoso em condições ácidas. Nessas condições, o composto ciclizado, ácido 1-desoxinojirimicin-1-sulfônico **21**, foi obtido, e o tratamento do mesmo com resina DOWEX® 1X2 (HO⁻) forneceu nojirimicina **1**.

Esquema 5. Reagentes e condições: (i) EtSH, HCl, dioxano; (ii) TPAP, NMO, CH₂Cl₂; (iii) HgO, HgCl₂, MeOH; (iv) NH₂OH.HCl, py, EtOH; (v) LiAlH₄, Et₂O; (vi) (Boc)₂O, Et₃N, MeCN; (vii) Pd(OH)₂, H₂, EtOH; (viii) SO₂, H₂O; (ix) DOWEX® 1X2 (HO⁻), H₂O.

Naito e colaboradores desenvolveram uma rota para 1-desoxinojirimicina (**2**) via ciclização radicalar de éter oxima derivado de açúcar, conforme mostrado no esquema 6 (KIGUCHI e cols, 2000). A partir do reagente comercial 1,2,4,6-tetra-*O*-benzil-D-glicopirranose **15**, o éter oxima **23**, contendo a função cetona, foi obtido a partir do álcool correspondente **22**. O composto **23** foi obtido como uma mistura de isômeros *E*- e *Z*- na proporção de 5:1, respectivamente. Entretanto, a geometria do grupo éter oxima não interferiu na seletividade do produto na ciclização radicalar e a mistura de isômeros foi utilizada sem isolamento (BARLETT e cols, 1988). A ciclização forneceu os produtos **24** e **25** em rendimento de 28% e 40%, respectivamente. Os isômeros foram separados por coluna cromatográfica de média pressão e o tratamento da 1,5-*trans*-metoxiamina **24** com hidreto de lítio e alumínio forneceu a mistura dos compostos **26** e **27** em proporção de cerca de 1:2. O composto **26** foi então convertido em 1-desoxinojirimicina (**2**) através do método de desproteção clássico (o composto **27** foi utilizado na preparação de aminociclopentitóis de 5 membros) (AFARINKIA e BAHAR, 2005).

Esquema 6. Reagentes e condições: (i) $\text{NH}_2\text{OMe} \cdot \text{HCl}$, py, 80°C , 3h; (ii) CrO_3 , py, CH_2Cl_2 , ta, 2h; (iii) Bu_3SnH , AIBN, C_6H_6 , refluxo, 5h; (iv) LiAlH_4 , THF, refluxo, 4h; (v) (a) Pd/C (10%), H_2 , EtOH, RT, 1-3d, (b) DOWEX[®] 1x8.

Com o objetivo de sintetizar um aza-dissacarídeo inibidor de heparanase (enzima que realiza a quebra de heparan sulfato polimérico em oligossacarídeos de menor comprimento), Takahashi e colaboradores propuseram a síntese da 1-desoxinojirimicina (**2**), esquema 7 (TAKAHASHI e cols, 2001). 1,2:5,6-Di-*O*-isopropilideno- α -D-glicofuranose **28** foi convertido no derivado 6-*O*-benzoil-5-*O*-mesil **29** em 3 etapas. A primeira etapa foi a *O*-alilação com hidreto de sódio e brometo de alila. Os grupos benzoila e mesila foram introduzidos por meio de hidrólise seletiva do grupo 5,6-*O*-isopropilideno em solução de ácido acético 90%. A adição de cloreto de benzoila, seguida de cloreto de metanossulfonila, forneceu **29** com 70% de rendimento total. O intermediário **29** foi tratado com metóxido de sódio em metanol e *tert*-butóxido de potássio para gerar o epóxido **30** (78%). A ação de azida de sódio na presença de NH_4Cl , seguida de benzilação forneceu o éter benzílico **31**, o qual foi tratado com solução de HCl 3% em metanol para gerar a mistura anomérica de **32** e **33**, os quais foram purificados em cromatografia em sílica gel e isolados em rendimentos de 50% e 47%, respectivamente. O isômero β **33** entrou, novamente, em equilíbrio com seu anômero nas mesmas condições reacionais e gerar **32** com 52% de rendimento. Repetindo este procedimento, 80% de **33** foi convertido em **32**. O tratamento de **32** com anidrido trifílico forneceu o derivado instável 2-*O*-triflato. A

redução do grupo azido com trifenilfosfina seguida da ciclização intramolecular (pelo deslocamento do grupo trifluorometanossulfonila) e proteção com grupo benziloxycarbonila (Cbz), forneceu **34**. A conversão do isômero β **33** ao composto **34** não ocorreu com rendimento satisfatório, pois o intermediário triflato apresentou alta taxa de decomposição nas condições da reação. A hidrólise ácida seguida de redução com boroidreto de sódio forneceu o diol **35** em rendimento 71%. O álcool primário de **35** foi protegido com éter *tert*-butildifenilsilila e o grupo hidroxílico secundário foi benzilado fornecendo o intermediário chave **36**. A clivagem do grupo alílico com cloreto de paládio(II) forneceu **37** em 72% de rendimento e DNJ (**2**) foi obtida após algumas etapas de desproteção clássicas.

Esquema 7. Reagentes e condições: (i) NaH, H₂C=CHCH₂Br, 0°C; (ii) aq AcOH, 60°C; (iii) BzCl, MsCl, py/CH₂Cl₂, -15°C até 0°C; (iv) NaOMe, MeOH, ta; (v) *t*-BuOK, THF/DMF, 0°C até ta; (vi) NaN₃, NH₄Cl, aq DMF, 80°C; (vii) BnBr, NaH, *n*-Bu₄NI, DMF, 0°C; (viii) 3% HCl em MeOH, ta; (ix) Tf₂O, py, CH₂Cl₂, -60°C; (x) Ph₃P, CH₂Cl₂, ta até 45°C; (xi) K₂CO₃, H₂O, dioxano, MeOH, THF, ta, CbzCl, 0°C; (xii) TFA, H₂O/dioxano, ta; (xiii) NaBH₄, EtOH, 0°C; (xiv) TBDPSCI, imidazol, DMF, ta; (xv) PdCl₂, NaOAc, aq AcOH, 50°C; (xvi) TBAF, AcOH, THF, ta; (xvii) Pd/C (10%), H₂, AcOH/EtOH/H₂O, ta.

A etapa de fechamento do anel para formar alcalóides piperidínicos, desenvolvida por alguns grupos, emprega o uso de aminação redutiva de açúcares dicarbonílicos para fornecer o estereoisômero desejado com alta estereosseletividade (MATOS e cols, 1999). O mecanismo se inicia através do ataque do hidreto do agente redutor na face inferior do intermediário dicarbonílico, resultando na formação da ligação entre C-4 e C-5 na configuração *trans*, mais favorável, esquema 8. A síntese de DNJ **2** e *N*-butil-DNJ **7** teve início a partir do reagente comercial 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -glicopirranose **15** que foi convertido ao diol **38**, na forma de um óleo incolor, em rendimento quantitativo, pela redução do grupo hemiacetal com hidreto de lítio e alumínio em THF. A dupla oxidação de Pfitzner-Moffat do diol **38** foi feita utilizando o agente oxidante DMSO previamente ativado pela adição de anidrido trifluoroacético. O produto 1,5-dicarbonílico instável **39** foi seco e utilizado na próxima etapa sem purificação. A ciclização de **39** foi feita utilizando formiato de amônio, para formação de 1,2,4,6-tetra-*O*-benzil-DNJ **40** (73%) e formiato de *N*-butila para obtenção de 1,2,4,6-tetra-*O*-benzil-*N*-butil-DNJ **41** (77%). Os produtos desejados **2** e **7** foram obtidos após desproteção dos grupos benzila. Seguindo essa abordagem, é possível inserir grupo ligado ao átomo de nitrogênio.

Esquema 8. Reagentes e condições: (i) LiAlH_4 , THF; (ii) DMSO, $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; (iii) $\text{RNH}_3^+\text{HCO}_2^-$, NaBH_4CN , MeOH, peneira molecular 3Å; (iv) Li, NH_3 .

Na tentativa de desenvolver uma nova estratégia de síntese de iminoaçúcares enantiomericamente puros, Le Merrer e colaboradores examinaram a abertura de bis-epóxidos C₂ simétricos, esquema 9 (LE MERRER e cols, 1997). Esta abordagem, que envolve a abertura regioespecífica de uma função epóxido seguida de aminociclização, leva à formação do anel piperidina **46** (via processo 6-*exo-tet*) e do anel azepano **47** (via processo 7-*endo-tet*) (BALDWIN e McIVER, 1987). O composto **43** foi obtido após a proteção dos grupos hidroxilas e clivagem dos grupos isopropilidenos do composto obtido comercialmente 1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno-D-manitol **42**. O composto **43** foi seletivamente protegido nas posições 1,6 (hidroxilas primárias) com grupo TBDS e mesilado nas posições secundárias 2,5 para obtenção do composto **44**. A remoção ácida dos grupos silil seguida pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) intramolecular promovida por base forneceu **45** em 67% de rendimento. O tratamento de **45** com excesso de benzilamina em diclorometano em refluxo por 16 horas forneceu a mistura dos compostos **46** (43 %) e **47** (37 %), facilmente separados por cromatografia líquida.

Esquema 9. Reagentes e condições: (i) BnBr, NaH, Bu₄NI, THF, 0°C→rt, 96%; (ii) MeOH, HCl, 0°C→rt, 98%; (iii) TBDMSCl, imidazol, DMF, 0°C; (iv) MsCl, Et₃N, 0°C; (v) (a) MeOH, HCl, 0°C→20°C (b) KOH, 0°C→20°C, 52% à partir de **43**; (vi) BnNH₂, CHCl₃, refluxo, 16 h, 43% de **46** e 37% de **47**.

1.4.2. Rotas sintéticas baseadas em precursores alternativos não relacionados a carboidratos

Vogel e colaboradores descreveram uma síntese assimétrica de DNJ **2** utilizando uma resolução enantiomérica, esquema 10 (SHALLER e cols, 1998). Isoxazolina ($\pm$)-**48** foi obtida a partir do 2-nitroetanal dietil acetal e furano, pelo emprego de uma cicloadição dipolar [2+3], em 75% de rendimento (MÜLLER e cols, 1982). Utilizando tetróxido de ósmio e *N*-metilmorfolia *N*-óxido, a bis-hidroxilação de ($\pm$)-**48** foi obtida e forneceu uma mistura de 6-exo isômeros ($\pm$)-**49** em proporção 3:1. A proteção do diol de ($\pm$)-**50** foi obtida via transacetilação com H₂SO₄ concentrado e acetona para fornecer o aldeído racêmico ($\pm$)-**50** (92%). A reação de ($\pm$)-**50** com (-)-(1*S*, 2*S*)-1,2-difeniletano-1,2-diamina **51** resultou na mistura de imidazolidinas (-)-**52** (40%) e (+)-**53** (45%). Hidrólise seletiva, utilizando H₂SO₄ 1M forneceu os aldeídos (-)-**50** e (+)-**50** (95%) com recuperação de **51**. A redução da isoxazolina-3-carbaldeído (+)-**50** com boroidreto de sódio forneceu o álcool (+)-**54** (90%). A desproteção de (+)-**54** foi realizada com ácido trifluoroacético aquoso para fornecer uma mistura de anômeros de (+)-**55** (100%), em proporção 3,4:1. A hidrogenação com Pd/C gerou o produto DNJ **2** em 65% de rendimento.

Esquema 10. Reagentes e condições: (i) OsO₄, NMO, acetona/H₂O, 60°C, 3h; (ii) concd H₂SO₄, acetona, 25°C, 3h; (iii) (1S,2S)-(-)-1,2-difeniletano-1,2-diamina **45**, Et₂O, 25°C, 10h; (iv) Et₂O, 1M H₂SO₄, 25°C, 30 min; (v) NaBH₄, MeOH, 5°C; (vi) TFA/H₂O, 4°C, 15h; (vii) Pd/C (10%), H₂, MeOH, 25°C, 15h.

Comins e Fulp realizaram síntese de DNJ (**2**) partindo da reação entre 4-metoxi-3-(triisopropilsilil)piridina **56** e acil-cloroéster de (1*R*,1*S*)-2-(1-metil-1-feniletil)cicloexanol [(-)-TCC], gerando o sal 1-acilpiridínio *in situ*, esquema 11 (COMINS e cols, 2001). A este sal, o (benziloxi)metilcuprato foi adicionado para fornecer a diidropiridinona **57**. O reagente (benziloxi)metilcuprato foi preparado a partir de benzil clorometil éter e o correspondente tributil estanano. A troca lítio-estanho com *n*-BuLi, seguida da adição de lítio 2-trienilciano cuprato, forneceu o correspondente cuprato. A remoção em *one pot* do auxiliar quiral e o grupo C-5 TIPS gerou o derivado enantiopuro **58** (74%). O tratamento com *n*-BuLi e cloroformiato de benzila forneceu o carbamato **59**. A acetoxilação seletiva foi realizada utilizando Pb(OAc)₄ para fornecer a diidropiridona **60** em 74%. O grupo acetato foi removido utilizando 10% de HCl e etanol e a redução da carbonila foi obtida com triacetoxiboridreto de tetrametilamônio para fornecer **61** estereoseletivamente. O

tratamento de **61** com tetróxido de ósmio e *N*-metilmorfolina *N*-óxido forneceu as piperidinas tetraidroxiladas **62**. A hidrogenação com Pd(OH)₂ catalítico e 10% de HCl aquoso resultou na DNJ **2** em 55% de rendimento, e o epímero DMJ **13** também foi isolado como aduto em 21% de rendimento.

Esquema 11. Reagentes e condições: (i) (a) R*OCOCl, (b) BnOCH₂[2-(Th)Cu(CN)]Li₂, (c) aq HCl; (ii) NaOMe, aq HCl; (iii) *n*-BuLi, CbzCl; (iv) Pb(OAc)₄, tolueno, refluxo; (v) aq HCl/EtOH; (vi) Me₄NBH(OAc)₃, acetona/AcOH; (vii) OsO₄, NMO; (viii) Pd(OH)₂, H₂, 10% aq HCl.

Em 1998, Somfai e Lindström publicaram a síntese assimétrica de DNJ (esquema 12) (SOMFAI e cols, 1998; SOMFAI e cols, 2003), levando em consideração que o intermediário relacionado ao epóxido vinílico **63**, é conhecido por sofrer ataque nucleofílico por amina com régio- e estereosseletividade na posição alílica. Desta forma, foi considerada a possibilidade de ocorrer a abertura de **63** e posterior fechamento do anel para fornecer o iminoaçúcar desejado. A síntese do epóxido vinílico **63** inicia-se com o dieno protegido por grupo *p*-metoxibenzil éter (PMB) **64**. Tratamento de **64** com o reagente [K₂OsO₄.2H₂O+(DHQ)₂PHAL] forneceu o diol **65** em 62% de rendimento e enantiosseletividade de 97%. A proteção do diol e redução do éster forneceram o álcool alílico **66**, o qual foi convertido ao epóxido **67**. A oxidação de Swern e olefinação de Wittig do correspondente aldeído forneceu o epóxido vinílico **68**. A desproteção forneceu o intermediário **63**, o qual foi mesilado,

forneendo **69**. Utilizando benzilamina e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico em DMSO e 120°C, foi realizada a abertura do epóxido. O deslocamento intramolecular do mesilato forneceu **70** em 76% de rendimento. A piperidina vinílica **70** foi tratada com OsO₄ e o diol resultante foi clivado com NaIO₄ para fornecer o correspondente aldeído. Redução com LiAlH₄ forneceu o iminoaçúcar protegido **71** o qual foi desprotegido fornecendo a DNJ **2**.

Esquema 12. Reagentes e condições: (i) K₂OsO₄·2H₂O, (DHQ)₂PHAL, *t*-BuOH, H₂O; (ii) (MeO)₂CMe₂, DMF; (iii) DIBAL, CH₂Cl₂, -78°C; (iv) (+)-DIPT, Ti(*Oi*-Pr)₄, TBHP, CH₂Cl₂, -20°C; (v) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -78°C, (vi) Ph₃PCH₃Br, KHMDS, THF, tolueno; (vii) DDQ, CH₂Cl₂, H₂O; (viii) MsCl, *i*-Pr₂Net, CH₂Cl₂, 0°C; (ix) BnNH₂, TsOH, DMSO, 120°C; (x) (a) OsO₄, NMO, *t*-BuOH, THF, H₂O, (b) NaIO₄, THF, H₂O; (xi) LiAlH₄, THF, 0°C; (xii) TODA, MeOH; (xiii) H₂, Pd/C, EtOH.

1.5 Click Chemistry

Um dos maiores desafios no tocante à síntese de dissacarídeos consiste na junção das duas unidades glicosídicas, já que a ligação glicosídica é sensível e pode ser hidroliticamente clivada (KUIJPERS e cols, 2004). Uma maneira de mimetizar a ligação glicosídica é a introdução de grupo triazólico pelo emprego de *click chemistry*, uma técnica que utiliza dois reagentes ou blocos de construção para formar produtos seletivamente em altos rendimentos.

As reações de *click* podem ser divididas em quatro categorias diferentes: (i) cicloadição de espécies insaturadas, como reações de cicloadição dipolar e

transformações Diels-Alder; (ii) reações de substituição nucleofílica, envolvendo abertura de anel de heterociclos rígidos, como epóxidos, aziridinas e íons episulfônio; (iii) reações envolvendo grupo carbonila não-aldólico, como formação de uréias, tiouréias, éteres de oxima, hidrazonas; (iv) reações de adição a múltiplas ligações carbono-carbono, como epoxidação, dihidroxilação, aziridinação, adição de sulfenil haleto e adições de Michael a reagentes Nu-H, como reações de tiol-eno (mediada por radical ou nucleófilo), muito útil para síntese de polímeros sob condições brandas (KOLB e SHARPLESS, 2003; LUNDBERG e cols, 2008; HEIN e cols, 2008; SUMMERLIN e VOGT, 2010; KOLB e cols, 2001).

Reações de *click chemistry* são fáceis e rápidas de ser realizadas, apresentam alta seletividade e são insensíveis ao oxigênio e água. Adicionalmente, dispensam o uso de solventes tóxicos mesmo no *workup* da reação e também não necessitam de purificações cromatográficas complexas. Dentre estas reações, particularmente a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por Cu(I) envolvendo a formação de ligação entre carbono-heteroátomo, é bastante utilizada (HUISGEN e cols, 1967; HUISGEN e cols, 1984).

A reação pericíclica clássica de Huisgen, apesar de termicamente permitida, ocorre somente em altas temperaturas na ausência de catalisadores, formando uma mistura de regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos, esquema 13A (HUISGEN e cols, 1967). Contudo, Meldal e Sharpless (ROSTOVTSEV e cols, 2002, HIMO e cols, 2005, KRASINSKI e cols, 2005, LEE e cols, 2003) desenvolveram sistemas catalíticos a partir de sais de Cu(II) na presença de agentes redutores, gerando espécies de Cu(I) *in situ*, sendo esta reação regioseletiva, com a formação exclusiva de 1,4-regioisômeros, esquema 13B (HUISGEN e cols, 1967; HUISGEN e cols, 1984).

Esquema 13. (A) Geração de regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos utilizando alta temperatura. (B) Representação esquemática da reação de *click* com catálise por Cu(I).

Esta reação ficou caracterizada como cicloadição catalisada por cobre entre azido e alcino e apresenta a sigla CuAAC do inglês “copper-catalysed azide/alkyne cycloaddition”. Os grupos azido e alcino são relativamente fáceis de serem introduzidos em moléculas orgânicas e também são grupos funcionais pouco reativos (ROSTOVTSEV, 2002). Em química medicinal, o 1,2,3-triazol tem sido comparado a grupamentos amidas devido a suas características físicoquímicas. Assim como o oxigênio da carbonila das amidas, os nitrogênios N-2 e N-3 também atuam como aceptores de ligações de hidrogênio, porém de maneira menos eficaz (**figura 4**). Adicionalmente, os triazóis são mais resistentes à hidrólise e reações de oxirredução (KUIJPERS e cols, 2004) e a distância entre os grupos R^1 e R^2 em amidas e triazóis é parecida (3,8Å para amidas e 5,0Å para triazóis) (KOLB; SHARPLESS, 2003).

Figura 4. Comparação entre amidas e 1,2,3-triazóis

Reações de CuAAC têm aplicação extensiva no preparo de derivados de carboidratos e vários exemplos são encontrados na literatura (ARAGÃO-LEONETTI e cols, 2010), inclusive a geração de *N*-glicosil triazóis a partir de acetilenos simples ou derivados contendo a função acetileno ligada a açúcares ou aminoácidos. Adicionalmente, o preparo de derivados de iminoaçúcares *N*-substituídos também tem sido explorado utilizando a estratégia de *click chemistry*, com diversos grupos substituintes na cadeia ligada ao heteroátomo de nitrogênio (DIOT, 2011). Portanto, é possível afirmar que o uso CuAAC constitui um novo horizonte na síntese de carboidratos e seus derivados, levando à construção de estruturas inéditas que, possivelmente, apresentem atividade biológica relevante.

1.6 Cinética enzimática

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas.

O estudo da função de enzimas envolve vários fatores, como: a determinação da estrutura, usando técnicas espectroscópicas como a difração de raios-X ou a ressonância magnética nuclear (RMN), determinação de fatores cinéticos, tais como: a velocidade da reação catalisada, o efeito de inibidores sobre a velocidade e a quantidade de moléculas que a enzima consegue catalisar por segundo. Assim, a cinética enzimática depende da concentração da enzima, concentração de cofatores e substrato, concentração e tipo de inibidores, pH, temperatura e força iônica (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995).

Em sistemas catalisados por enzimas, a energia livre de ativação necessária para a conversão do substrato no produto é razoavelmente menor do que em reações não catalisadas. A velocidade inicial observada (V_0), em reações enzimaticamente catalisadas, aumenta com o aumento da concentração do substrato até atingir um nível, onde posteriores adições de substrato não aumentam a velocidade inicial (LEHNINGER e cols, 1995). Estes fatores são mostrados na figura 5.

Figura 5. Relação da concentração de substrato e velocidade inicial em reações enzimáticas.

A reação abaixo mostra a ordem com que estes fatores ocorrem:

(E – Enzima; S – Substrato; P – Produto; K – Constante de velocidade)

Michaelis e Mentem usaram este esquema para propor uma expressão matemática que descreve a relação entre a velocidade inicial (V_0) e concentração de substrato ($[S]$) (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995), equação 1.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Na expressão, $V_{\max}$ e V_0 são velocidades como definidas anteriormente, $[S]$ é a concentração do substrato e K_M é a constante de Michaelis, ou seja, $K_M = [S]$ quando $V_{\max}$ é igual a $V_{\max}/2$, ou $(K_2 + K_3)/K_1$, onde K são constantes de velocidade específicas da reação (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995).

A equação de Michaelis-Menten é válida quando três requisitos são preenchidos: (i) a velocidade da reação reversa é desprezível durante o período de análise; (ii) a medida é feita no período em que a concentração do complexo enzima-substrato (ES) é constante, e (iii) a formação do complexo enzima-substrato não altera a concentração de substrato livre. De acordo com os dois primeiro itens, a medida inicial da velocidade deveria ser linear com o tempo, pelo menos durante o experimento. Adicionalmente, a velocidade da reação poderia ser linearmente proporcional à concentração enzimática. Entretanto, em alguns casos, são observados desvios da linearidade requerida para a equação Michaelis-Menten e as razões destes desvios podem estar relacionadas a (i) presença de inibidores irreversíveis na reação; (ii) concentração de substrato se torna rapidamente muito baixa; (iii) os produtos da reação catalisada pela enzima são, por si só, inibidores competitivos e (iv) o tempo necessário para a formação do complexo enzima-inibidor a um nível constante é lento (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995).

Lineweaver e Burk, em 1934, postularam a equação 2, obtida pela inversão da equação de Michaelis-Menten (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

As velocidades observadas em diferentes concentrações de substratos podem ser traçadas como recíprocas de V_0 e $[S]$; os valores de K_M e $V_{\max}$ podem ser obtidos pela extrapolação da reta apresentada no gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk (figura 6) (STRYER e cols, 1995; LEHNINGER e cols, 1995).

Figura 6. Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk.

O estudo da inibição da atividade enzimática tem papel fundamental no controle dos mecanismos de sistemas biológicos e diversas substâncias químicas interagem com enzimas e diminuem sua atividade. O mecanismo de ação destes inibidores enzimáticos pode, frequentemente, ser obtido pela análise cinética do seu efeito junto à enzima (STRYER e cols, 1995). A inibição enzimática pode ocorrer de forma reversível ou irreversível, destacando-se a classe dos inibidores reversíveis. Estes inibidores formam complexos dinâmicos com a enzima, resultando em diferentes propriedades catalíticas quando comparada às propriedades observadas para a enzima livre (CORNISH-BOWDEN, 2004).

Os inibidores reversíveis classificam-se, no geral, em três tipos: competitivos, não-competitivos e incompetitivos, de acordo com o efeito que produzem nas constantes cinéticas K_M e V_{max} . Este efeito dependerá da união do inibidor à enzima, ao complexo enzima-substrato ou ambos. Na inibição competitiva é observado um aumento no valor de K_M . Diversos inibidores competitivos se assemelham ao substrato e se ligam preferencialmente no sítio ativo da enzima, impedindo a ligação com o substrato, por esse motivo a enzima pode se ligar ao substrato ou ao inibidor, mas não em ambos.

Para a inibição não competitiva o valor de V_{max} é reduzido. Neste caso, substrato e inibidor se ligam simultaneamente a uma mesma molécula de enzima, ligando-se em sítios diferentes. Inibidor não competitivo age, preferencialmente, diminuindo o número de moléculas de substrato convertidas em produto quando a enzima se encontra saturada com o substrato, do que diminuindo a proporção de moléculas de enzimas ligadas ao substrato.

Já inibição incompetitiva é caracterizada pela redução, em uma razão constante, dos valores de K_M e V_{max} (CORNISH-BOWDEN, 2004). Neste caso, o inibidor combina-se somente com a forma ES da enzima e o complexo ESI resultando é cataliticamente inativo.

Outro aspecto importante na investigação de cinética enzimática é o pH do meio usado durante os experimento de inibição. A atividade da maioria das enzimas mostra uma grande dependência do pH e, por esta razão, as análises enzimáticas devem ser conduzidas em sistemas tamponados.

O substrato, o inibidor, ou outros componentes utilizados no experimento, possuem grupos ionizáveis que são influenciados pelo pH do meio. Além disso, o sítio ativo da enzima deve estar numa forma iônica adequada para ligação do substrato e catálise da reação. Em alguns casos, onde substrato ou inibidos contém grupos ionizáveis, é possível que apenas uma forma iônica se ligue a enzima e a catálise ocorra. No caso de glucosidases, parece que a formação de ligação iônica é uma etapa fundamental durante a inibição enzimática (LEHNINGHER e cols, 1995).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Síntese dos pseudo-dissacarídeos **77**, **81** e **85**, figura 7, contendo uma unidade do iminoaçúcar 1-DNJ (**2**) e uma unidade de glicose, ligadas por um grupo triazol gerado pela reação de grupo acetileno terminal com grupo azido através da reação CuAAC - *Click chemistry*;
- Síntese do intermediário iminoaçúcar **73** contendo a função acetileno terminal (grupo *N*-propargílico), derivado de desoxinojirimicina-DNJ, para acoplamento nas reações CuAAC;

Figura 7. Estruturas dos pseudo-dissacarídeos propostos.

- Avaliação da atividade anti-glucosidase dos compostos **77**, **81** e **85** frente ao modelo enzimático de α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Aparelhagem analítica

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DPX-300 e DRX-500 operando na frequência de hidrogênio-1 a 300 MHz e a 500 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa. Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, modelo Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, empregando ionização por *electrospray* (ESI) e analisadores quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF). As análises em CLAE foram realizadas em aparelho CLAE Shimadzu SCL-10AVP, e o software utilizado foi o Class-VP 5.0.

3.1.2. Aparelhagem laboratorial

- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Banho termostaticado: Tecnal TE-184
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Cromatógrafo Flash Biotage®
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Reator para irradiação de micro-ondas CEM® Discover

3.1.3. Solventes, reagentes e outros materiais

- Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, conforme métodos usuais descritos (ARMAREGO; CHAI, 2003).
- As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK® 0,25 mm preparadas a partir suspensão de sílica em água destilada. Revelação das placas foi efetuada empregando irradiações de UV de 245 e 366nm e também vapores de sublimação de iodo.
- As cromatografias em coluna clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel 60 “Flash” (40-63 µm) ou “Comum” (63-200 µm), ambas Merck®.
- Acetato de etila, grau HPLC (AcOEt) - Mallinckrodt
- Acetona, grau HPLC – Mallinckrodt
- Ácido acético glacial – Mallinckrodt
- Ácido Clorídrico 37% – F. Maia
- Água deionizada
- Água deuterada (D₂O) – Mallinckrodt
- Anidrido trifluoroacético, >99% - Sigma-Aldrich
- Brometo de benzila, 98% - Sigma-Aldrich
- Brometo de propargila – Sigma
- Carbonato de cério, 99,5% - Acros Organics
- Cianoboroidreto de sódio, puro, >95% - Fluka Analytical
- Cloreto de benzila, 99% - Sigma-Aldrich
- Clorofórmio (CHCl₃) - Mallinckrodt
- Clorofórmio deuterado, 99,8% (CDCl₃) - Acrós Organics
- Diclorometano (DCM) – Mallinckrodt

- *N,N*-dimetilformamida, 99,9% (DMF) - Alfa Aesar
- Dimetil sulfóxido 99,5% – Aldrich
- Dowex Monosphere 550A (OH⁻) – Dow
- Formiato de Amônio – Fluka Analytical
- Hexano, grau HPLC – Mallinckrodt
- Hidreto de lítio e alumínio pó, 95% – Aldrich
- Hidreto de sódio, dispersão em óleo mineral, 60% - Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sódio, 99% - Merck
- Iodeto de tetrabutilamônio, 98% - Sigma-Aldrich
- Metanol, p.a. (MeOH) - Mallinckrodt
- Metanol deuterado, 99,8% (CD₃OD) - Acrós Organics
- Peneira Molecular 3Å, pó - Aldrich
- Propargilamina, 98% - Aldrich
- Tetraidrofurano grau HPLC – Fisher Scientifics
- Tolueno - Mallinckrodt

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese

2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-glicopiranosídeo de metila (72)

Sob atmosfera de nitrogênio, em um balão de fundo redondo de duas saídas, 2,00 g (10,3 mmol) de α -D-glicopiranosídeo de metila foi dissolvido em 30 mL de dimetilformamida anidra sob banho de gelo e então hidreto de sódio (1,56 g, 65,0 mmol) foi adicionado em porções. O banho de gelo foi retirado e quando a solução

atingiu a temperatura ambiente a mesma foi deixada sob agitação por 2 horas. Paralelamente 0,20 g (0,54 mmol) de iodeto de tetrabutilamônio foi dissolvido em 11,10 g (64,9 mmol) de brometo de benzila, e essa mistura foi então adicionada lentamente à mistura anterior através de um funil de adição. A mistura reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente até o dia seguinte.

O *workup* foi realizado com 8,0 mL de metanol sob banho de gelo. A mistura foi levada à secura em evaporador rotatório e então extraída com água e acetato de etila. A fase aquosa foi então lavada com acetato de etila e depois a fase orgânica, com solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de magnésio. O material bruto foi seco e submetido a separação em coluna *flash* com eluente hexano e acetato de etila (8:2 v/v), resultando num produto viscoso amarelado com massa de 3,70 g, 64% de rendimento.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): δ : 3,38 (3H, s, OCH_3); 3,56 (1H, dd, J 3,6 Hz, J 9,7 Hz, H-2); 3,59-3,64 (1H, m, H-4), 3,65-3,72 (2H, m, CH_2 -6); 3,73-3,77 (1H, m, H-5); 3,98 (1H, t, J 9,4 Hz, H-3); 3,64 (1H, m, H-1); 3,44-5,00- (8H, m, $4 \times \text{CH}_2\text{OPh}$); 7,27-7,39 (20H, m, Ar).

2,3,4,6-tetra-*O*-benzil- α -D-glicopiranosídeo (15)

Método 1: O composto **72** (0,10 g, 0,181 mmol) foi solubilizado em 2,13 mL de ácido acético glacial e 0,32 mL de ácido clorídrico 6N. A mistura foi submetida a aquecimento convencional a 60 °C por 24 horas, então foi diluída em água e extraída com diclorometano e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio e água, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O sólido final com massa de 14 mg, rendimento de 15%.

Método 2: O composto **72** (0,50 g, 0,902 mmol) foi solubilizado em 2,0 mL de ácido acético glacial e à solução foi adicionado 0,3 mL ácido clorídrico 6N. A mistura foi levada ao aparelho de micro-ondas em tubo selado por 10 minutos a 60 °C e 100W de potência. A reação foi acompanhada por CCDC, e após irradiar por um total de 30 minutos, constatou-se o consumo do material de partida.

A reação foi então diluída em água e extraída com diclorometano por três vezes. A fase orgânica foi então lavada com solução de bicarbonato de sódio saturada. Foi então seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto bruto obtido foi lavado com metanol, obtendo-se um sólido branco (mistura de isômeros), com massa de 0,27 g, rendimento de 57%.

RMN ^1H (300Mz, CCl_3D): δ : 3,48-4,10 (H-2-6), 4,80 (1H, d, J 7,8, H-1 anômero α), 5,15 (1H, d, J 3,6, H-1 anômero β), 7,26-7,38 (20H, m, Ar).

2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-sorbitol (38)

38

Em um balão contendo **15** (0,47 g, 0,865 mmol) em 5,8 mL de tetraidrofurano anidro sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado em porções 0,11 g (2,97 mmol) de hidreto de lítio e alumínio a 0 °C. A reação ficou sob temperatura ambiente *overnight* quando foi feita uma placa de CCDC, e constatou-se o consumo do material de partida. Acetato de etila foi então adicionado cuidadosamente sobre banho de gelo, então a fase orgânica foi lavada com solução de ácido clorídrico 2N, e então lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio, e seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um produto viscoso e transparente. A massa final de **38** foi de 0,56 g, rendimento quantitativo.

RMN ^1H (300MHz, CCl_3D): δ : 3,54-3,84 (6H, m, H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-6a, H-6b); 3,85 (1H, dd, J 3,6 Hz, J 6,4 Hz, H-3); 4,00-4,08 (1H, m, H-5); 4,50-4,76 (8H, m CH_2OPh); 7,26-7,40 (20H, m, Ar).

Derivado 1,5-dicarbonílico (39)

39

Método 1: Em um balão de três bocas contendo anidrido trifluoroacético (0,17 g, 0,79 mmol) em 0,2 mL de diclorometano, sob atmosfera de nitrogênio a aproximadamente $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, DMSO (0,11 g, 1,11 mmol) anidro em 0,8 mL de diclorometano foi adicionado lentamente. Após 30 minutos, ainda a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado lentamente **38** (0,10 g, 0,18 mmol) em 0,8 mL de diclorometano. A mistura foi então deixada sob agitação por 2 horas, e após este período foi adicionada trietilamina (0,21 mL) em 0,8 mL de diclorometano. Permitiu-se que a reação atingisse a temperatura ambiente, e então a mistura foi seca sob vácuo obtendo-se o produto bruto contendo derivado dicarbonílico **39** que foi utilizado na próxima etapa sem purificação.

Método 2: Em um balão de três bocas contendo DMSO (25 mg, 0,265 mmol) anidro em 0,3 mL de diclorometano, sob atmosfera de nitrogênio a aproximadamente $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado lentamente cloreto de oxalila (15 mg, 0,121 mmol) em 0,3 mL de diclorometano. Após 30 minutos, ainda a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado lentamente **38** (0,03 g, 0,05 mmol) em 0,3 mL de diclorometano. A mistura foi então deixada sob agitação por 2 horas, e após este período foi adicionada trietilamina (0,008 mL) em 0,3 mL de diclorometano. Permitiu-se que a reação aquecesse a temperatura ambiente, e então a mistura foi seca sob vácuo.

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzil-1-desoxinojirimicina (**40**)

Em um balão contendo o produto bruto da etapa anterior (**39**) foi adicionado 0,4 mL de metanol e uma espátula de peneira molecular pulverizada (3Å), foi então adicionada a formiato de amônio (3 mg, 0,021 mmol) e cianoboroidreto de sódio (8 mg, 0,12 mmol). A reação ficou sob agitação *overnight*. A mistura foi então filtrada com celite e seca em evaporador rotatório. O sólido foi então solubilizado em acetato de etila e lavado com solução de bicarbonato de sódio saturada, solução de cloreto de sódio saturada e água destilada e seca com sulfato de magnésio. Foi então purificada em coluna flash com eluente hexano e acetato de etila (8:2, v/v). O

composto 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-1-desoxinojirimicina (**40**) foi obtido com massa de 0,02 g, rendimento das duas etapas de 21 %.

RMN ^1H (300MHz, CCl_3D): 2,52 (1H, dd, J 10,1; 12,3 Hz, H-1ax), 2,73-2,78 (1H, ddd, J 2,3; 5,7; 8,6, H-5), 3,27 (1H, dd, J 4,9; 12,3 Hz, H-1eq), 3,38 (1H, t, J 9,0 Hz, H-3), 3,50-3,58 (3H, m, H-2, H-4, H-6a), 3,68 (1H, dd, J 2,3; 8,8 Hz, H-6b), 4,43 (1H, d, J 11,7, CH_2OPh), 4,48 (1H, d, J 11,9, CH_2OPh), 4,49 (1H, d, J 10,9, CH_2OPh), 4,71 (1H, d, J 11,7, CH_2OPh), 4,84 (1H, d, J 11,2, CH_2OPh), 4,86 (1H, d, J 11,9, CH_2OPh), 4,98 (1H, d, J 10,9, CH_2OPh), 7,27-7,38 (20H, m, Ar).

2,3,4,6- Tetra-*O*-benzil *N*-propargil-1-desoxinojirimicina (**73**)

Método 1: À uma mistura de carbonato de cézio (0,006 mg, 0,02 mmol) e 0,05 mL de acetona e 0,01 g de tetra-*O*-butil-1-desoxinojirimicina (**40**), foi adicionado lentamente 2,2 μL de brometo de propargila. A mistura foi deixada em temperatura ambiente *overnight*, foi então filtrada e seca. O sólido foi então particionado com acetato de etila e solução de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi então seca fornecendo o produto **73** em rendimento quantitativo.

RMN ^1H (300MHz, CCl_3D): δ : 2,24 (1H, t, J 2,2 Hz, H-8), 2,47 (1H, dt, J 1,9; 9,7 Hz, H-5), 2,57 (1H, t, J 10,7 Hz, H-1ax), 3,00 (1H, dd, J 5,0; 11,1 Hz, H-1eq), 3,42 (1H, dd, J 2,3; 17,8 Hz, H-7a), 3,52 (1H, t, J 9,0 Hz, H-3), 3,61 (1H, dd, J 2,5; 10,6 Hz, H-6a), 3,67 (1H, t, J 9,4 Hz, H-4), 3,72-3,82 (3H, m, H-2, H-6b, H-7b), 4,38 (1H, d, J 10,7 Hz, CH_2OPh), 4,46 (1H, d, J 12,1 Hz, CH_2OPh), 4,58 (1H, d, J 12,2 Hz, CH_2OPh), 4,70 (2H, s, CH_2OPh), 4,86 (1H, d, J 10,9 Hz, CH_2OPh), 4,90 (1H, d, J 10,6 Hz, CH_2OPh), 5,00 (1H, d, J 10,9 Hz, CH_2OPh), 7,30-7,40 (20H, m, Ar)

Método 2: Em um balão contendo o produto bruto da etapa anterior (**39**) foi adicionado 6,6 mL de metanol e uma espátula de peneira molecular pulverizada, foi então adicionada a propargilamina (95 mg, 1,72 mmol) e cianoborodreto de sódio (0,12 g, 1,98 mmol). A reação ficou sob agitação *overnight*. A mistura foi então filtrada com celite e seca em evaporador rotatório. O sólido foi então solubilizado em acetato de etila e lavado com solução de bicarbonato de sódio saturada, solução de

5,53 (t, J 10,3, H-2' anômero α), 5,54 (dd, J 3,6; 11,4, H-2' anômero β), 5,80 (1H, d, J 5,8 Hz, H-1' anômero β), 6,40 (1H, d, J 6,4 Hz, H-1' anômero α), 7,48 (0,4H, s, H-8 anômero α), 7,55 (0,2H, s, H-8 anômero β), 7,46 (d, J 19,9 Hz, H-8).

[1-(3-desoxi-D-glucopiran-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-N-(2,3,4,6-tetra-O-benzil-1-desoxinojirimicil)-metano (76)

O composto **76** (9,4 mg, 0,01mM) foi solubilizado em 0,5mL de metanol e à esta solução foi adicionada gota-a-gota uma solução de metóxido de sódio 1M até o pH atingir 9,0. Depois de meia hora de reação, após análise por CCDC, constatou-se o consumo completo do material de partida. Foi adicionada uma pequena espátula de resina de troca iônica ácida DOWEX® 50WX4-50 até atingir pH neutro. A mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo massa de 8,1 mg, em rendimento quantitativo.

[1-(3-desoxi-D-glucopiran-3-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-N-(1-desoxinojirimicil)-metano (77)

76 (8,1 mg, 0,0014mM) foi solubilizado em uma mistura de metanol e ácido acético (10:1, v/v) e à esta solução foi adicionada uma espátula de catalisador paládio-carvão. O frasco foi levado ao hidrogenador sob pressão de hidrogênio de 3,5 atm por 24 horas. Após este período, a mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo **77**, com massa de 5,5 mg, em rendimento de 96 %.

[1-(metil 2,3,4-tri-*O*-acetil 6-desoxi- β -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-*N*-(2,3,4,6- tetra-*O*-benzil-1-desoxinojirimicil)-metano (78)

O composto **73** (12,0 mg, 0,021 mmol) foi solubilizado em 0,2 mL de dimetilformamida e à essa solução foi adicionado 7,8 mg (0,021 mmol) de metil- β -2,3,4-tri-*O*-acetil-6-azido glicopiranosídeo **79**, 0,1 mg (0,00178 mmol) de ascorbato de sódio e 10 μ L de uma solução de sulfato de cobre 0,1 M. A reação foi então levada em tubo selado ao micro-ondas por 10 minutos a 150 W de potência e 70 °C. O produto foi então extraído com acetato de etila e bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e evaporada até a secura. O produto bruto foi então submetido à purificação em CLAE empregando coluna semi-preparativa de fase reversa (C18), com fase móvel acetonitrila e água (80:20, v/v). O produto **78** foi obtido com massa 9,1 mg, em rendimento de 48 %.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3): δ : 1,94 (3H, s, OAc), 1,97 (3H, s, OAc), 2,04 (3H, s, OAc), 2,06 (1H, t, J 10,9 Hz, H-1ax), 2,14 (1H, d, J 9,2 Hz, H-5), 3,08 (1H, dd, J 5,0; 11,0 Hz, H-1eq), 3,22 (1H, t, J 9,1 Hz, H-3), 3,23 (3H, s, OCH_3), 3,44 (1H, t, J 9,4 Hz, H-4), 3,57 (1H, dd, J 4,3; 9,5 Hz, H-2), 3,60-3,66 (1H, m, H-6b), 3,78 (1H, dd, J 2,2; 9,5 Hz, H-5'), 3,83 (1H, dd, J 2,7; 10,9 Hz, H6a), 3,88 (1H, d, J 15,3 Hz, H-7b), 4,10 (1H, d, J 15,1 Hz, H-7a), 4,14-4,24 (2H, m, H-1', H-6'b), 4,38 (1H, d, J 11,9 Hz, CH_2OPh), 4,48 (1H, d, J 12,0 Hz, CH_2OPh), 4,50 (1H, dd, J 2,2; 14,5 Hz, H-6'a), 4,56 (2H, s, CH_2OPh), 4,66 (1H, d, J 10,9 Hz, CH_2OPh), 4,78 (1H, d, J 10,9 Hz, CH_2OPh), 4,81 (1H, t, J 9,7 Hz, H-4'), 4,83 (1H, d, J 11,1 Hz, CH_2OPh), 4,88 (1H, dd, J 8,1; 9,7 Hz, H-2'), 5,14 (1H, t, J 9,4 Hz, H-3'), 7,20-7,30 (20H, m, H-Ar), 7,40 (1H, s, H-8).

[1-(metil 6-desoxi- β -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-*N*-(2,3,4,6- tetra-*O*-benzil-1-desoxinojirimicil)-metano (80)

O composto **78** (10,0 g, 0,011mM) foi solubilizado em 0,5mL de metanol e à esta solução foi adicionada gota-a-gota uma solução de metóxido de sódio 1M até o pH atingir 9,0. Depois de meia hora de reação, após análise por CCDC, constatou-se o consumo completo do material de partida. Foi adicionada uma pequena espátula de resina de troca iônica ácida DOWEX® 50WX4-50 até atingir pH neutro. A mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo **80**, com massa de 8,5 g, em rendimento quantitativo.

[1-(metil 6-desoxi-β-D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-N-(1-desoxinojirimicil)-metano (81)

80 (8,5 mg, 0,011mM) foi solubilizado em uma mistura de metanol e ácido acético (10:1, v/v) e à esta solução foi adicionada uma espátula de catalisador paládio-carvão. O frasco foi levado ao hidrogenador sob pressão de hidrogênio de 3,5 atm por 24 horas. Após este período, a mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo **81**, com massa de 4,4 mg, em rendimento 76 %.

[1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-N-(2,3,4,6-tetra-O-benzil-1-desoxinojirimicil)-metano (82)

O composto **73** (7,0 mg, 0,013 mmol) foi solubilizado em 0,2 mL de dimetilformamida e à essa solução foi adicionado 5,1 mg (0,013 mmol) de 1-azido-2,3,4,6-tetra-O-acetil β-D-glicopiranosídeo **83**, 0,1 mg (0,00178 mmol) de ascorbato de sódio e 10 µL de uma solução de sulfato de cobre 0,1 M. A reação foi então levada em tubo selado ao micro-ondas por 10 minutos a 150 W de potência e 70 °C.

O produto foi então extraído com acetato de etila e bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e evaporada até a secura. O produto bruto foi então submetido à purificação em CLAE empregando coluna semi-preparativa de fase reversa (C18), com fase móvel acetonitrila e água (80:20, v/v). O produto **82** foi obtido com massa 4,7 mg, rendimento de 49 %.

RMN H¹ (300MHz, CCl₃D): δ: 1,77 (3H, s, OAc), 1,97 (3H, s, OAc), 2,01 (3H, s, OAc), 2,01 (3H, s, OAc), 2,08 (1H, t, J 11,0 Hz, H-1ax), 2,16 (1H, dt, J 2,0; 9,8 Hz, H-5), 3,06 (1H, dd, J 4,7; 11,0 Hz, H-1eq), 3,30 (1H, t, J 9,1 Hz, H-3), 3,48 (1H, t, J 9,1 Hz, H-4), 3,60 (1H, ddd, J 4,7; 9,8 Hz, H-2), 3,68 (1H, dd, J 2,0; 10,6 Hz, H-6a), 3,84-3,95 (3H, m, H-5', H-6b, H-7a), 4,08 (1H, dd, J 1,9; 12,4 Hz, H-6'a), 4,14 (1H, d, J 15,6 Hz, H-7b), 4,24 (1H, dd, J 4,9; 12,4 Hz, H-6'b), 4,28 (1H, d, J 10,9 Hz, OCH₂Ph), 4,41 (1H, s, J 11,9 Hz, OCH₂Ph), 4,54 (1H, d, J 11,9 Hz, OCH₂Ph), 4,58 (2H, s, OCH₂Ph), 4,68 (1H, d, J 11,1 Hz, OCH₂Ph), 4,78 (1H, d, J 10,9 Hz, OCH₂Ph), 4,84 (1H, d, J 11,1 Hz, OCH₂Ph), 5,14 (1H, t, J 9,6 Hz, H-4'), 5,28 (1H, t, J 9,3 Hz, H-2'), 5,34 (1H, t, J 9,3 Hz, H-3'), 7,18-7,34 (20H, m, Ar), 7,53 (1H, s, H-8).

[1-(β-D-glucopiranosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]- N-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzil-1-desoxinojirimicil)-metano (84)

84

O composto **82** (33,2 mg, 0,035mM) foi solubilizado em 1,0mL de metanol e à esta solução foi adicionada gota-a-gota uma solução de metóxido de sódio 1M até o pH atingir 9,0. Depois de meia hora de reação, após análise por CCDC, constatou-se o consumo completo do material de partida. Foi adicionada uma pequena espátula de resina de troca iônica ácida DOWEX® 50WX4-50 até atingir pH neutro. A mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo **84** com massa de 2,7 mg, em rendimento quantitativo.

[1-(β-D-glucopiranosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-N-(1-desoxinojirimicil)-metano (85)

85

84 (27,0 mg, 0,035mM) foi solubilizado em uma mistura de metanol e ácido acético (10:1, v/v) e à esta solução foi adicionada uma espátula de catalisador paládio-carvão. O frasco foi levado ao hidrogenador sob pressão de hidrogênio de 3,5 atm por 24 horas. Após este período, a mistura foi filtrada em funil com placa porosa e Celite®, e o filtrado foi seco em evaporador rotatório fornecendo **85**, com massa de 11,3 mg, em rendimento 80 %.

3.2.2 Cinética enzimática

Os ensaios enzimáticos, com α -D-glucosidase, foram realizados a 30 °C empregando o substrato 4-nitrofenol- α -D-glucopiranosídeo, em concentrações de 0,8 a 0,1 mM. A liberação de 4-nitrofenol, produto da reação enzimática, foi medida pelo monitoramento de absorção do íon nitrofenóxido em aparelho espectrofotômetro UV/Vis, termostatizado, utilizando comprimento de onda 400 nm, durante 5 minutos.

A solução tampão foi preparada pela dissolução de piperazina-*N,N'*-bis-(2-ácido etanosulfônico) (PIPES) (3,0 g), acetato de sódio (1,6 g) e ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) (0,03 g) em água grau analítico (milli-Q) (1000 mL); o pH foi ajustado para 6,8 em pHmetro pela adição cuidadosa de solução de NaOH 50%.

A solução enzimática foi preparada pela dissolução de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (1,5 mg) em solução tampão PIPES (10,0 mL), pH 6,8, e foi mantida a 4 °C durante todo o experimento.

O substrato artificial, 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (0,036 g) foi, por sua vez, diluído em tampão PIPES (50,0 mL), pH 6,8, fornecendo uma solução com concentração final de 2,4 mM.

O composto inibidor de α -D-glucosidase usado como padrão para determinação da inibição foi a 1-desoxinojirimicina (**2**), 60 μ M (4,896mg/mL de

tampão PIPES, 20 mL desta solução/100mL de tampão PIPES pH 6,8, fornecendo uma solução de concentração final 12 μ M.

Os experimentos foram realizados de acordo com o seguinte procedimento geral: a uma cubeta de quartzo (0,6 mL) com comprimento óptico de 1,0 cm foi adicionado (i) tampão PIPES-NaOAc, (ii) solução de 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo e finalmente, após agitação, (iii) solução enzimática de α -D-glucosidase para dar início à reação. A partir deste ponto o tempo começou a análise a 400 nm por 5 minutos. Os valores de absorbância foram registrados a intervalos de 5 segundos.

A determinação do valor de K_M da enzima, com base nos resultados dos experimentos, foi feita empregando os seguintes volumes de substrato, tampão e enzima (volume final de 0,6 mL):

Concentração de substrato (mM)	0,80	0,40	0,20	0,15	0,10
Substrato (mL)	0,20	0,10	0,05	0,04	0,03
Tampão (mL)	0,38	0,48	0,53	0,54	0,55
Enzima (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Os experimentos que utilizaram 1-desoxinojirimicina (**2**) como inibidor padrão foram realizados utilizando os volumes das soluções segundo a tabela seguinte:

Inibidor														
0,05 (1 μ M)			0,10 (2 μ M)			0,15 (3 μ M)			0,20 (4 μ M)			0,30 (6 μ M)		
S	T	E	S	T	E	S	T	E	S	T	E	S	T	E
0,20	0,33	0,02	0,20	0,28	0,02	0,20	0,23	0,02	0,20	0,18	0,02	0,20	0,08	0,02
0,10	0,43	0,02	0,10	0,38	0,02	0,10	0,33	0,02	0,10	0,28	0,02	0,10	0,18	0,02
0,05	0,48	0,02	0,05	0,43	0,02	0,05	0,38	0,02	0,05	0,33	0,02	0,05	0,23	0,02
0,03	0,50	0,02	0,03	0,45	0,02	0,03	0,40	0,02	0,03	0,35	0,02	0,03	0,25	0,02

S – Substrato; T – Tampão; E – Enzima (valores em mL)

Os ensaios preliminares de inibição utilizando os pseudo-dissacarídeos sintetizados **77**, **81** e **85** foram realizados na concentração de 1,0 mM. Para isso, foi preparada uma solução de 3,0 mM e adicionada à cubeta o volume de 0,2 mL.

Nesta concentração fixa de inibidor, foi variada a concentração do substrato de acordo com a tabela:

0,20 (1 mM)		
S	T	E
0,20	0,18	0,02
0,10	0,28	0,02
0,05	0,33	0,02
0,03	0,35	0,02

S – Substrato; T – Tampão; E – Enzima (valores em mL)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão estrutural dos produtos pseudo-dissacarídeos **77**, **81** e **85** propostos foi planejado com o intuito de mimetizar unidades de glicose presentes no oligossacarídeo imaturo $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ da via dolicol fosfato, envolvida na biossíntese de glicoproteínas essenciais. Desta forma, as estruturas propostas foram constituídas de unidades de iminoaçúcar ligado a resíduos de glicose nas posições anomérica (C-1), C-3 e C-6 através de um grupo triazol, em substituição à ligação glicosídica original, com características distintas relativas à estabilidade e rigidez. Adicionalmente, a inclusão da unidade iminoaçúcar, já descrita como primordial em inibidores clássicos de glucosidases (1-desoxinojirimicina **2**), foi explorada para manter a complementaridade no sítio de ligação da enzima, como um inibidor do estado de transição e hidroxilas do anel com as mesmas configurações da molécula de glicose.

Desta forma, os produtos de interesse **77**, **81** e **85**, potencialmente ativos em ensaios de inibição da enzima glucosidase, foram sintetizados de acordo com o esquema 14.

A principal estratégia sintética envolveu o uso de *click chemistry*, ou CuAAC “Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition”, para ligar as unidades de açúcares protegidos e funcionalizados com grupo acetilênico (iminoaçúcar **73**) e azido (glicosídeos **75**, **79** e **83**). Por outro lado, a síntese do intermediário iminoaçúcar **73** foi realizada empregando dupla reação de aminação redutiva a partir do derivado dicarbonílico **39**, esquema 8, seguido de substituição nucleofílica para incorporação da função acetileno terminal (MATOS e cols, 1999).

Esquema 14. Rota sintética proposta para preparação do intermediário **73** em cinco ou seis etapas, bem como a formação dos produtos de interesse **74**, **78** e **82** pela reação de CuAAC. Reagentes e condições: (i) NaH, DMF, TBAI, BnBr; (ii) HCl 6N, AcOH; (iii) LiAlH_4 , THF; (iv) DMSO, $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; (v) propargilamina, NaBH_4CN , MeOH, peneira molecular 3Å; (vi) NH_4HCO_2 , NaBH_4CN , MeOH, peneira molecular 3Å; (vii) Cs_2CO_3 , acetona, brometo de propargila.

4.1 Síntese do intermediário dicarbonílico **39**

A primeira etapa envolveu a conversão do reagente comercial α-D-glicopiranosídeo de metila (**86**) em seu derivado tetra-O-benzílico **72**. A proteção das hidroxilas com grupo benzílico foi conveniente por duas razões: para aumento de solubilidade dos açúcares intermediários em solvente orgânico, facilitando a reação deste com reagentes orgânicos de interesse, e para proteção em reações

regiosseletivas. A proteção das hidroxilas poderia ser realizada pela reação de acetilação clássica, no entanto, uma das etapas necessárias para a síntese de **39** envolve o tratamento com hidreto de lítio e alumínio, o qual poderia conduzir à redução do correspondente éster.

Inicialmente, foi testado o método clássico de formação de éter, utilizando cloreto de benzila e hidróxido de potássio como base, com aquecimento convencional e também por irradiação de micro-ondas. Entretanto, houve a formação de mistura complexa, devido à presença de adutos mono, di e tri-*O*-benzilados, caracterizados pelas integrais relativas do espectro de RMN ^1H , nas regiões de aromáticos (δ 7,3) e dos hidrogênios metilênicos (δ 4,6). A dificuldade de realizar a benzilação de todas as posições pode estar relacionada à formação de diversos grupos alcóxidos, com menor solubilidade no meio reacional. Adicionalmente, a benzilação da hidroxila em C-4, por exemplo, poderia exercer impedimento estérico sobre a posição vizinha C-3 e dificultar a formação do alcóxido correspondente e/ou aproximação do reagente cloreto de benzila.

Dessa maneira, o método anterior foi substituído pelo descrito por Vallinayagam e colaboradores, o qual utiliza brometo de benzila, iodeto de tetrabutilamônio (TBAI) e hidreto de sódio para benzilação de um precursor distinto, relacionado a derivado galactosídeo. A adição do hidreto de sódio ao reagente **86**, solubilizado em dimetilformamida, para formação do alcóxido conduziu à formação de sólido branco insolúvel e pastoso de difícil agitação. Por outro lado, brometo de benzila e TBAI foram adicionados separadamente em um balão para formação do intermediário mais reativo, iodeto de benzila. A adição desta solução à suspensão do alcóxido foi realizada gota-a-gota, mas a mistura final permaneceu insolúvel durante o tempo de reação (24 horas), esquema 15. O rendimento de 64%, abaixo do descrito por Vallinayagam e col. de 89%, pode estar relacionado ao maior impedimento estérico exercido pelo grupo protetor em C-4, em posição equatorial, sobre a hidroxila em C-3, quando comparado à molécula de galactose, ou a possível exposição do meio reacional anidro ao ambiente, durante a adição em etapas de hidreto de sódio (VALLINAYAGAM e cols, 2008).

Esquema 15. Proteção das hidroxilas do composto **86** no seu correspondente derivado tetra-*O*-benzílico (**72**).

O mecanismo da reação envolve o deslocamento do halogênio do reagente iodeto de benzila pelos grupos alcóxidos **A**, gerados pelo tratamento de **86** com hidreto de sódio, esquema 16. Neste caso, é formado um intermediário do estado de transição tetraédrico **B**, típico de reações de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), levando à formação do produto **72**.

Esquema 16. Mecanismo da reação de *O*-benzilação de **86**.

A etapa seguinte envolveu a hidrólise ácida do grupo metoxílico presente na posição anomérica, mais reativa do anel (esquema 17). A conversão do composto **72** no intermediário **15** foi testada sob aquecimento convencional, conforme descrito por Vallinayagam e cols., entretanto, o rendimento obtido foi de 15 %, ao invés de 46 %, citado na literatura para o correspondente galactosídeo (VALLINAYAGAM e cols, 2008). Tentativas de aumento de rendimento, pelo prolongamento do tempo de reação, conduziram à degradação do precursor **72**. Para melhorar o rendimento desta etapa, foi investigada a irradiação por micro-ondas em tubo selado, o qual permitiu a obtenção de **15** em rendimento mais satisfatório, 57 %, esquema 17. Este método permitiu a diminuição dos volumes de ácido acético e solução de ácido clorídrico, além da redução do tempo reacional de 24 horas, com aquecimento convencional, para 30 minutos. O método de purificação também foi otimizado nesta etapa, empregando a lavagem do produto bruto com metanol e filtração para obtenção de um sólido branco, ao invés da purificação em coluna cromatográfica de sílica gel (VALLINAYAGAM e cols, 2008). Além dos sinais de RMN H^1 esperados para o produto, a ausência do sinal correspondente a OCH_3 em δ 3,38 comprovou a formação de **15**.

Esquema 17. Reação de conversão do composto **72** ao composto **15**.

Como ilustrado no esquema 18, o mecanismo da reação de formação da piranose **15**, em meio ácido, envolve a abstração de um próton do íon hidroxônio pelo grupo metoxila de **72**, gerando uma carga positiva, A. O compartilhamento de um par de elétrons do oxigênio do anel piranose com C-1 conduz à perda de uma molécula de metanol e geração do íon oxocarbênio, estado de transição B. Posteriormente, uma molécula de água ataca a face axial ou equatorial de C-1, resultando na formação de **15** como mistura de anômeros.

Esquema 18. Mecanismo da reação de conversão do composto **72** no composto **15**.

O tratamento da glicopiranose **15** com hidreto de lítio e alumínio em THF anidro forneceu o composto 1,5-diol **38** em rendimento quantitativo, conforme descrito na literatura por Matos e cols. O composto **38** foi obtido como um óleo viscoso incolor após a extração da reação, e segundo a análise do espectro de RMN ^1H , o produto foi obtido de forma pura, possibilitando assim, dar continuidade na rota sintética sem purificação. O rendimento desta etapa foi quantitativo, como descrito por Matos e cols (MATOS e cols 1999).

A partir do fenômeno de mutarotação, no qual o anel de glicopiranose está em equilíbrio com seu isômero de cadeia aberta, relacionado à aldohexose **A**, é possível realizar a redução da função aldeído ao álcool primário pela adição de hidreto ao grupo carbonílico, formando o composto alditol **38**, conforme mostrado no esquema 19.

Esquema 19. Reação de redução do anel piranosídico **15** para formar o composto **38**.

A obtenção do produto 1,5-dicarbonílico **39** (esquema 20), em condições brandas, foi realizada empregando a reação de oxidação de Pfitzner-Moffat a -78°C . Essa reação envolve, a princípio, a formação de um complexo de DMSO com anidrido trifluoroacético, em diclorometano (esquema 20).

Esquema 20. Oxidação de **38** pelo método de Pfitzner-Moffat.

Esse método foi modificado da literatura (Matos e cols, 1999), uma vez que é descrita a adição do anidrido trifluoroacético ao DMSO. Considerando a volatilidade deste anidrido, houve dificuldade no seu manuseio durante a transferência do frasco para a reação, por essa razão, essa adição foi invertida, sendo o DMSO gotejado lentamente à solução de anidrido em diclorometano. Houve certa dificuldade de acompanhar a reação por placas CCDC, uma vez que o composto oxidado só é formado após a adição de trietilamina. No entanto, uma alíquota do produto bruto desta reação foi extraída e submetida à análise de IV e RMN ^1H , a qual apresentou banda característica de carbonila em 1750 cm^{-1} e sinal evidente de aldeído em δ 9,66, respectivamente. O produto dicarbonílico **39** é instável (FUKASE; HORII, 1992; GANDY, M. N. et al, 2010) e foi usado na próxima etapa sem prévia purificação.

DMSO reage explosivamente com anidrido trifluoroacético em temperatura ambiente, mas é possível moderar essa reação trabalhando em baixas temperaturas

(< -30 °C) em um solvente inerte como diclorometano e tolueno. A -60 °C em diclorometano é produzido um precipitado relativo à dimetiltrifluoroacetoxissulfônio trifluoroacetato **A**, e, após adição de um álcool primário ou secundário, R¹R²CHOH, há a formação de trifluoroacetato de alcoxidimetilsulfônio, [(CH₃)₂⁺SOCHR¹R²][CF₃COO⁻] (**B**). O cátion **B** é um intermediário importante na oxidação de álcoois com DMSO, e a adição de uma base orgânica, como trietilamina, tem a finalidade de neutralizar os sais formados, esquema 21.

Esquema 21. Esquema da reação do DMSO com anidrido trifluoroacético.

Considerando que tratamento de aldeído ou cetona com amônia ou uma amina secundária, na presença de hidrogênio e catalisador, conduz a alquilação redutiva da amônia ou da amina ou aminação redutiva do composto carbonílico, a síntese de **39** foi, finalmente, realizada pelo tratamento de **39** com formiato de amônio e cianoboroidreto de sódio, conforme esquema 22.

Esquema 22. Conversão do composto 1,5-dicarbonílico **39** no produto **40**.

A proposta de ciclização do produto 1,5-dicarbonílico para a formação de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzil 1-desoxinojirimicina (**40**) envolvia a utilização de propargilamina, entretanto, inicialmente, foi utilizado formiato de amônio, como modelo para padronização do método e comparação das análises do produto **40** com a literatura (Matos e cols, 1999). A formação do composto **40**, com 21,2 % de rendimento, foi comprovada após a análise do espectro de RMN H¹, evidenciada pela presença de um singlete largo em δ 1,6, referente ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio, e também de duplo dublete referentes ao H₁ axial e equatorial, respectivamente, em δ 2,2, com constantes de acoplamento de 10,1 Hz (H_{1ax}-H₂) e

12,4 Hz ($H_{1ax}-H_{1eq}$), e outro duplo dubleto em δ 3,2, com constantes de acoplamento de 4,9 Hz ($H_{1eq}-H_2$) e 12,4 Hz ($H_{1eq}-H_{1ax}$),

A alquilação da amina secundária **40** foi realizada com brometo de propargila, na presença de carbonato de cério em acetona e forneceu o produto *N*-propargil-iminoaçúcar **73** em rendimento quantitativo. O espectro de RMN H^1 apresentou os sinais do hidrogênio do grupo alcino terminal (triplete em δ 2,1, $J=2,3$ Hz) e de dois hidrogênios metilênicos do grupo propargílico (dd em δ 3,1, $J=2,3$ Hz e 10,9 Hz; e dd em δ 3,5, $J=2,3$ Hz e 10,9 Hz).

Desta forma, a partir da caracterização do produto **73**, foi testada a reação de aminação redutiva, em apenas uma etapa, envolvendo o intermediário dicarbonílico **39** e propargilamina e cianoboroidreto de sódio para obtenção de **73**. O iminoaçúcar contendo grupo *N*-propargílico **73** foi obtido após a purificação em cromatografia líquida em coluna flash com 34 % de rendimento total das duas etapas (oxidação e aaminação). Este rendimento foi maior do que o das duas etapas de aaminação redutiva de **39** com o formiato de amônio e *N*-alquilação com brometo de propargila (21 %).

O mecanismo da reação de aaminação envolve o ataque do nitrogênio da propargilamina ao carbono carbonílico do aldeído e formação de grupo imina pela eliminação de uma molécula de água. Após a redução do grupo imina pelo hidreto, ocorre novo ataque intramolecular do nitrogênio da amina secundária à carbonila da cetona na posição 5 do intermediário reacional. A nova ligação imina formada é também reduzida pelo hidreto para fornecer o iminoaçúcar **73** (esquema 23).

Esquema 23. Mecanismo proposto para a dupla aaminação redutiva do composto **39**.

4.2 Síntese dos produtos 74, 78 e 82 e suas correspondentes desproteções

O composto **73** foi utilizado na condensação com outros três glicosídeos (**75**, **79** e **83**) contendo o grupo azido, figura 7. O composto **83** foi adquirido comercialmente no mercado internacional, e os compostos **75** e **79** foram cedidos pelo grupo de pesquisa, pois são utilizados como intermediários em outras rotas sintéticas.

Figura 7. Glicosídeos contendo grupo azido nas posições anomérica (C-1), C-3 e C-6, utilizados na condensação com 1,2,3,6-tetra-*O*-benzil-*N*-propargil-1-desoxinojirimicina (**73**).

Essas reações foram realizadas com catalisador cobre(I) para a formação apenas do regioisômero 1,4-substituído. A fonte de sais de Cu(I) envolveu a redução de sulfato de cobre(II) por ascorbato de sódio, embora são descritas outras condições, como sais de cobre(I), complexos de Cu(I), derivados estabilizados de cobre(I) e também fio de cobre (ARAGÃO-LEONETI e cols, 2010).

As reações de *click chemistry* foram realizadas de acordo com o esquema 24 e as condições empregadas foram basicamente as mesmas, ou seja, temperatura de 60 °C, sob potência pré-programada de 150 W por 10 minutos.

Esquema 24. Reações de *click chemistry* realizadas a partir do alcino terminal sintetizado **73** com os compostos azido **75**, **79** e **83**.

A reação de *click chemistry* foi assistida por irradiação em micro-ondas que acelerou consideravelmente a reação CuAAC e o consumo dos materiais de partida foi atingido em minutos, ao invés de horas em temperatura ambiente. Além disso, o uso de dimetilformamida também foi eficiente nas reações envolvendo derivados de azida e de alcino (AGUT e cols, 2007; ARAGÃO-LEONETI e cols, 2010).

O mecanismo dessa reação foi revisado e inclui espécies bimoleculares como ilustrado no esquema 25. Nessa proposta, pelo menos dois átomos de cobre estão envolvidos na reação, e particularmente, é difícil prever a estrutura do Cu-acetilídeo **A**, devido ao grande número de interações possíveis e também das diversas estruturas conhecidas de Cu-acetilídeos. O metalociclo **B** é rapidamente formado a partir do complexo **A** pela entrada de um grupo azido dentro do ciclo, seguida pela contração do anel para formar um intermediário mais estável, o triazolídeo de cobre **C**. Finalmente, as espécies catalíticas são regeneradas e o produto 1,2,3-triazol é formado.

Esquema 25. Mecanismo da reação bimolecular CuAAC proposto por Maarseveen et al.

A obtenção dos compostos “dissacarídeos” através da condensação de um alcino terminal com um açúcar contendo a porção azido foi bem sucedida pelo

método de CuAAC e a análise dos espectros de RMN H^1 foi facilitada pela diferença dos grupos protetores em cada núcleo. O núcleo iminoaçúcar com as hidroxilas protegidas por grupos *O*-benzílicos deslocou os sinais de hidrogênio do iminoaçúcar para campo mais blindado (entre δ 3,10 e 3,90), além dos sinais dos hidrogênios H-5 e H-1 axial que, devido a vizinhança ao heteroátomo de nitrogênio, foram deslocados para campo mais blindado (entre δ 2,10 e 2,20). Já no núcleo glicosídico, as hidroxilas estavam protegidas por grupos *O*-acetil, que deslocaram os hidrogênios da piranose para campo mais desblindado, entre δ 4,20 e 5,30. Sem essa diferença dos grupos protetores, a análise e atribuição dos hidrogênios seria muito mais difícil, pois os sinais do espectro se sobreporiam. Mesmo assim, devido à complexidade das estruturas, foi necessário recorrer a técnicas de correlação entre hidrogênio-hidrogênio (COSY) e hidrogênio-carbono (HMQC) para fazer a atribuição de todos os protons.

Os compostos **75**, **79** e **83** foram submetidos à reação de desproteção, conforme o esquema 26. Inicialmente, a desacetilação foi feita a partir do tratamento dos compostos com solução de metóxido de sódio (pH = 9,0), durante 30 minutos. O acompanhamento da reação por CCDC mostrou a conversão dos intermediários nos produtos desejados devido ao menor R_f observado, usando acetato de etila como eluente. O pH do meio reacional foi neutralizado com resina de troca iônica ácida (DOWEX® 50WX4-50), filtrado e concentrado em evaporador rotatório. Os compostos **76**, **80** e **84**, parcialmente desprotegidos, foram obtidos em rendimento quantitativo e sem necessidade de purificação. O próximo passo foi a desproteção dos grupos benzila por meio de hidrogenação catalítica.

Inicialmente, em pressão normal de gás hidrogênio (1 atm), a desproteção não ocorreu totalmente. Foi necessário utilizar um hidrogenador que fornecesse uma pressão de 3,5 atm de gás hidrogênio, para que os grupos benzila fossem totalmente removidos, fornecendo os compostos desprotegidos **77**, **81** e **85**. A análise foi realizada por placa CCDC, com eluente diclorometano e metanol (9:1, v/v).

Esquema 26. Reações de desproteção dos compostos obtidos a partir da reação de *click chemistry*.

Os pseudo-dissacarídeos **77**, **81** e **85** foram submetidos à análise de RMN H^1 , entretanto, devido à complexidade da estrutura, os sinais dos dois heterociclos se sobrepuseram, tornando a atribuição de todos os sinais mais complexa. No entanto, como discutido anteriormente, esses sinais foram atribuídos para os compostos protegidos **74**, **78** e **82**. No momento, os espectros de massas e os cromatogramas em aparelho CLAE estão sendo realizados.

4.3 Análise e purificação em CLAE

Os pseudo-dissacarídeos protegidos obtidos a partir das reações de *click chemistry* (**74**, **78** e **82**) foram purificados em CLAE. A utilização de CLAE foi de extrema importância para realizar a separação dos compostos obtidos, pois, além de fornecer esses compostos com alta pureza, facilitou a purificação de baixa quantidade de amostra para análise dos espectros de RMN de H^1 .

Previamente à purificação em coluna semi-preparativa por CLAE, os compostos foram analisados em coluna analítica, que permite a detecção a partir de uma massa bastante reduzida. Essa estratégia foi utilizada para se traçar o perfil cromatográfico dos compostos, e elaborar uma separação para posterior aplicação em coluna semi-preparativa. Por esta razão, esta seção está subdividida em dois itens: (i) análise de compostos em coluna analítica e (ii) separação em coluna semi-preparativa.

4.3.1. Análise de compostos em coluna analítica

Análises em CLAE, utilizando uma coluna analítica, permitem a injeção de 20 μL de solução de amostra com concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Por esta razão, foram feitos testes utilizando este tipo de coluna para que fosse possível a realização de diversas injeções sem a perda do material. Foi utilizada fase reversa (coluna C18) nos experimentos e a fase móvel que apresentou melhor separação dos compostos foi a mistura de água em acetonitrila 20:80 (v/v), no fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

Após a extração dos produtos das reações de *click chemistry*, uma alíquota de 1,0 mg de cada produto bruto da rota sintética foi solubilizado em 1,0 mL de acetonitrila e 20 μL dessa solução foi injetada no aparelho de CLAE e, após eluição, a análise foi feita em detector UV em comprimento de onda 206 nm. Na figura 8 estão os perfis cromatográficos dos compostos **38**, **73**, **74**, **78** e **82**.

Figura 8. Cromatogramas das amostras dos compostos **38**, **73**, **74**, **78** e **82**.

Os compostos **38** e **73** foram utilizados nas análises para determinação dos correspondentes tempos de retenção e para descartar possível contaminação

destes precursores com nos produtos finais **74**, **78** e **82**. Nessas condições, os intermediários **38** e **73** apresentaram os tempos de retenção 6 minutos e 40 segundos e 20 minutos, respectivamente. O cromatograma traçado para o produto **74** apresentou tempo de retenção de 17 minutos, além da presença, provavelmente, do intermediário **73**, que não reagiu totalmente. Além disso, o sinal correspondente a **74** apresentou dois picos próximos, como era de se esperar por se tratar de uma mistura de anômeros.

Os produtos **78** e **82** apresentaram tempos de retenção, respectivamente, de 11 e 9 minutos.

4.3.2. Separação em coluna semi-preparativa

A coluna semi-preparativa utilizada permite a injeção de até 5,0 mg em cada análise. Nestas condições o fluxo utilizado deve ser obrigatoriamente maior, devido ao diâmetro da coluna, para evitar alargamento dos picos e também o aumento muito grande no tempo de eluição dos compostos. Neste caso, o fluxo utilizado foi de 3,0 mL.min⁻¹ mas, mesmo assim o tempo de retenção foi diferente da coluna analítica. Na figura 9 estão ilustrados os perfis cromatográficos da separação dos compostos **74**, **78** e **82**.

Figura 9. Cromatogramas das separações realizadas em coluna semi-analítica.

Nessas condições, o composto **74** apresentou tempo de retenção de 17,5 minutos, enquanto os compostos **78** e **82** foram visualizados com o mesmo tempo de retenção, 18 minutos.

4.4 Cinética enzimática

Os resultados acerca dos estudos de cinética enzimática realizados estão dispostos em três seções, a saber: (i) determinação do K_M de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*; (ii) inibição da enzima pela 1-desoxinojirimicina (**2**); (iii) estudo preliminar de inibição dos compostos sintetizados **77**, **81** e **85**.

O fundamento do método consiste no monitoramento da concentração de D-glicose formada após a quebra do substrato α -D-glicosídeo pela enzima α -D-glucosidase. Devido às dificuldades experimentais de detecção de D-glicose, o substrato normal foi substituído pelo substrato artificial 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo. A hidrólise enzimática deste substrato conduz à formação simultânea de D-glicose e *p*-nitrofenol. Em pH 6,8, *p*-nitrofenol é parcialmente ionizado e transforma-se no íon 4-nitrofenóxido, detectado facilmente em espectrofotômetro a 400 nm.

4.4.1 Determinação do K_M de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*

Em estudos de cinética enzimática, sob condições definidas de pH e temperatura, o K_M de uma enzima para um dado substrato é característico (LEHNINGER et al., 1995). Neste sentido, os ensaios de atividade enzimática foram iniciados pela determinação do valor de K_M para α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*.

As concentrações de substrato utilizadas foram determinadas a partir de ensaios anteriores, os quais demonstraram que, na maior concentração utilizada (0,8 mM) de substrato, a enzima atinge sua velocidade máxima (V_{max}). A velocidade máxima de enzimas é atingida quando a velocidade é a mesma quando se aumenta a quantidade de substrato presente no meio, e pode ser observada traçando o gráfico de Michaelis e Menten (LEHNINGER e cols, 1995).

A curva de Lineweaver-Burk para esta enzima foi traçada com base nos resultados dos experimentos envolvendo enzima, tampão PIPES (pH 6,8) e diferentes concentrações de substrato (de 0,1 a 0,8 mM), a 30 °C. A reação enzimática foi acompanhada durante 5 minutos e os valores crescentes de absorbâncias foram registrados em intervalos de 5 segundos. A regressão linear dos

dados obtidos em cada experimento forneceu o valor de V_0 (velocidade de hidrólise), como sendo a inclinação (coeficiente angular) da curva de absorbância x tempo.

Os valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ foram usados para construção da curva de Lineweaver-Burk e determinação de K_M , figura 10.

Figura 10. Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando a hidrólise de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo pela enzima α -D-glucosidase em pH 6,8.

A regressão linear da curva $1/V_0 \times 1/[S]$, ou seja, onde a reta toca o eixo x ($y = 0$), corresponde ao inverso negativo do valor de K_M ($x = -1/K_M$). Esse valor pode ser calculado a partir da equação da reta, e o resultado foi 197 μM . O valor obtido descrito na literatura de K_M é de 280 μM para a enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces italicus*, empregando o mesmo substrato, em pH 6,8 (HALVORSON; ELLIAS, 1958).

4.4.2. Ensaios de inibição enzimática empregando a substância padrão 1-desoxinojirimicina (2) e os compostos sintetizados 77, 81 e 85

De acordo com a literatura (LIUM e cols, 1991; LEGLER e cols, 1987), 1-desoxinojirimicina **2** é um potente inibidor competitivo de α -D-glucosidase, por este motivo foi utilizado nestes experimentos para comparação do poder de inibição com os compostos sintetizados.

Os produtos **77**, **81** e **85** previamente purificados e secos foram diluídos em tampão PIPES pH 6,8 de forma a se obter uma solução de concentração 3,0 mM. Após a mistura dos componentes do experimento (substrato, tampão e enzima), a concentração final dos compostos na cubeta foi de 1,0 mM.

Na maior concentração de substrato, ou seja, onde a enzima encontra sua $V_{\max}$ ($[S] = 0,8 \text{ mM}$), a porcentagem de inibição da 1-desoxinojirimicina (**2**) foi de 23 %, na $[I] = 6,0 \text{ }\mu\text{M}$, figura 11. Esse valor pode ser usado como parâmetro para comparação com os compostos testados, entretanto, está claro que a concentração de 1-desoxinojirimicina (**2**) utilizada ($6,0 \text{ }\mu\text{M}$) é bem menor do que aquela utilizada para os compostos ensaiados (1,0 mM). O motivo desta diferença está no fato de **2** ser um potente inibidor da α -D-glucosidase, tendo um K_i descrito de $14,6 \text{ }\mu\text{M}$ (FOWLER e cols, 1994). No entanto, os ensaios realizados com os compostos sintetizados foram preliminares, como um screening usando concentração elevada de 1mM. Nestas circunstâncias, o produto que apresentou melhor inibição da enzima foi o composto **77**, que na concentração de substrato de 0,8 mM, inibiu 40% da enzima. Por outro lado, o produto **81** inibiu 20 % da enzima, enquanto o produto **85** foi basicamente inativo, com apenas 2,3 % de inibição. As atividades de inibição dos produtos finais estão ilustrados nos gráficos da figura 11.

Figura 11. Gráficos ilustrando a atividade dos compostos **77** (inibição de 40%), **81** (inibição de 20%) e **85** (inibição de 2,3 %) na concentração de 1 mM sobre a α -D-glucosidase. No eixo vertical estão os valores das velocidades da reação de hidrólise do substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo.

Frente ao exposto, conclui-se que o composto **77** possui uma atividade de inibição da enzima α -D-glucosidase promissora, e deverá ser utilizado em testes de inibição em menores concentrações.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho envolveu a preparação do intermediário iminoaçúcar **73** contendo grupo *N*-propargílico, derivado da DNJ (**2**), em cinco etapas e rendimentos moderados e foi utilizado na síntese dos pseudo-dissacarídeos **77**, **81** e **85**, inéditos, propostos nos objetivos iniciais do projeto com sucesso utilizando o método de CuAAC. As reações empregadas para a síntese de **73** foram otimizadas, empregando irradiação de micro-ondas, permitindo o preparo do mesmo em menor tempo e rendimentos semelhantes ao descrito na literatura. O intermediário **73** foi utilizado em reações de condensação CuAAC, *click chemistry*, com três azido-açúcares derivados de glicose (**75**, **79** e **83**) em aparelho micro-ondas para aceleração das reações. Os rendimentos obtidos dos pseudo-dissacarídeos protegidos (**74**, **78** e **82**) foram em torno de 40% e a interpretação dos espectros de RMN H^1 foi facilitada pela diferença de deslocamento químico dos hidrogênios presentes nos anéis pirano e piperidina, os quais continham grupos protetores distintos, relacionados a grupos acetil e benzil, respectivamente. Por outro lado, os pseudo-dissacarídeos desprotegidos, compostos **77**, **81** e **85** apresentaram vários sinais sobrepostos, tornando necessária a utilização de outras técnicas de elucidação como espectroscopia de massas.

A avaliação da atividade inibidora de glucosidase de *Sacharomyces cerevisiae* mostrou que o composto **77** inibiu 40 % da enzima na concentração de 1 mM, sendo um resultado promissor que encoraja o uso deste pseudo-dissacarídeo em experimentos futuros, como o de inibição do vírus HIV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFARINKIA, K.; BAHAR, A. A. Recent advances in the chemistry of azapyranose sugars. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 16, n. 7, p. 1239-1287, 2005.

AGUT, W.; TATON, D.; LECOMMANDOUX, S. A Versatile Synthetic Approach to Polypeptide Based Rod-Coil Block Copolymers by Click Chemistry. **Macromolecules**, v. 40, n. 16, p. 5653-5661, 2007.

ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, v. 66, n. 49, p. 9475-9492, 2010.

ASANO, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. **Glycobiology**, v. 13, n. 10, p. 93R-104R, 2003.

ASANO, N. Homonojirimycin analogues and their glucosides from *Lobelia sessilifolia* and *Adenophora* spp. (Campanulaceae). **Carbohydrate Research**, v. 323, n. 1-4, p. 73- 80, 2000.

ASANO, N.; KATO, A.; OSEKI, K.; KIZY, H.; MATSUI, K. Calystegins of *Physalis-Alkekengi Var Francheti* (Solanaceae): structure determination and their glycosidase inhibitory activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 229, n. 2, p. 369-376, 1995.

ASANO, N.; KATO, A.; WATSON, A. A. Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 145-154, 2001.

ASANO, N.; KIZU, H.; OSEKI, K.; TOMIOKA, E.; MATSUI, K.; OKAMOTO, M.; BABA, M. *N*-alkylated nitrogen-in-the-ring sugars: conformational basis of inhibition of glycosidases and HIV-1 replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 13, p. 2349-2356, 1995.

ASANO, N.; YOKAYNMA, K.; SAKURAI, M.; IKEDA, K.; KISY, H.; KATO, A.; ARISAWA, M.; HÖKE, D.; DRÄGER, B.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 721-726, 2001.

ASANO, N.; OSEKI, K.; KIZU, H.; MATSUAI, K. Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3701-3706, 1994.

BARILI, P. L.; BERTI, G.; DÁNDREA, F.; DE RENSIS, F.; PUCCIONI, L. Double reductive amination of *L-arabino*-hexos-5-uloses: a diastereoselective approach to 1-deoxy-*D*-galactostatin derivatives. **Tetrahedron**, v. 9, n. 9, p. 3407-3416, 1997.

BALDWIN, S. W.; McIVER, J. M. Stereoselective synthesis of ($\pm$) methyl nonactate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 320-322, 1987.

BARTLETT, P. A.; MCLAREN, K. L.; TING, P. C. Radical cyclization of oxime ethers. **Journal American Chemical Society**, v. 110, n. 9, p. 1633-1634, 1988.

BAXTER, E. W.; REITZ, A. B. Expeditious synthesis of azasugars by the Double reductive amination of dicarbonyl sugars. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 3175-3185, 1994.

BOCK, V. D.; PERCIACCANTE, R.; JANSEN, T. P.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. Click chemistry as a route to cyclic tetrapeptide analogs: Synthesis of cyclo-[Pro-Val- ψ (triazole)-Pro-Tyr]. **Organic Letters**, v. 8, n. 5, p. 919-922, 2006.

BORGES DE MELO, E.; CARVALHO, I. α - and β -glucosidases as molecular targets for drug development. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006.

BORGES DE MELO, E.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006.

BULOW, A. PLESNER, I. W. BOLS, M. A Large. Difference in the Thermodynamics of Binding of Isofagomine and 1-Deoxynojirimycin to β -Glucosidase. **Journal American Chemical Society**, v. 122, n. 35, p. 8567-8568, 2000.

BURLAND, P. A. OSBORN, H. M. I. TURKSON, A. Synthesis and glycosidase inhibitory profiles of functionalised morpholines and oxazepanes **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5679-5692, 2011.

CARVALHO, I.; HAINES, H. A. *N*-linked carba-disaccharides as potential inhibitors of glucosidases I and II. **Journal of Chemical Society Perkin Trans 1**, v. 19, n. 13, p. 1795- 1800, 1999.

CHALLAND, R.; YOUNG, R. J. **Antiviral Chemotherapy**. 1^a ed. Oxford: Spextrum,. 68 p., 1997.

CHENG, A. Y. Y.; JOSSE, R. G. Intestinal absorption inhibitors for type *diabetes mellitus*: prevention and treatment. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 2, p. 201-206, 2004.

COMINS, D. L.; FULP, A. B. Enantiopure 2,3-dihydro-4-pyridones as synthetic intermediates: asymmetric synthesis of 1-deoxynojirimycin. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 39, p. 6839-6841, 2001.

CORNISH-BOWDEN, A. **Principles of Enzyme Kinetics**. 3^a ed. London: Portland Press, p. 36-39, 2004.

CSUK, R.; PRELL, E. Difluorotetrahydropyridothiazinone: a Selective β -Galactosidase Inhibitor. **Archiv der Pharmazie**, v. 343, n. 10, p. 577-582, 2010.

DIOT, J. D. MORENO, I. G. TWIGG, G. MELLER, C. O. HAUPT, K. BUTTERS, T. D. KOVENSKY, J. GOUIN, S. G. Amphiphilic 1-Deoxynojirimycin Derivatives through Click Strategies for Chemical Chaperon in N370S Gaucher Cells. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 7757-7768, 2011.

FOWLER, P. A.; HAINES, A. H.; TAYLOR, R. J. K.; CHYSTAL, E. J. T.; GRAVESTOCK, M. B. J. Synthesis and biological activity of acyclic analog of nojirimycin. **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions**, n. 16, p. 2229-2235, 1994.

FUKASE, H.; HORII, S. Synthesis of a branched-chain inosose derivative, a versatile synthon of N-substituted valiolamine derivatives from D-glucose. **Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 3642-3650, 1992.

GANDY, M. N.; PIGGOT, M. J.; STUBBS, K. A. An expeditious synthesis of iminosugars. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1409-1412, 2010.

GARCÍA-MORENO, M. I.; DÍAZ-PÉREZ, P.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Synthesis and evaluation of isourea-type glycomimetics related to the indolizidine and trehazolin glycosidase inhibitor families. **Journal Organic Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 8890-8901, 2003.

GARCIA-MORENO, M. I.; RODRIGUEZ-LUCENA, D.; MELLET, C.; GARCIA, F. J. M. Pseudoamide-Type Pyrrolidine and Pyrrolizidine Glycomimetics and Their Inhibitory Activities against Glycosidases. **The Journal of organic chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3578-3581, 2004.

GRUTERS, R. A.; NEEFJES, J. J.; TERSMETTE, M.; DE FOEDE, R. E. Y.; TULP, A.; HUISMAN, H. G.; MIEDEMA, F.; PLOEGH, H. L. Interface with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. **Nature**, v. 330, n. 6143, p. 74-76, 1987.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2364-2369, 2001.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 1019-1049, 2004.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles: DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210-216, 2005.

HUISGEN, R. In 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry; **Padwa, A., Ed.**; Wiley: New York, NY, v. 1, p. 1-176, 1984.

HUISGEN, R.; SZEMIES, G.; MOEBIUS, L. 1,3-Dipolar cycloadditions. XXXII. Kinetics of the addition of organic azides to carbon-carbon multiple bonds. **Chemische Berichte**, v.100, n. 8, p.2494-2499, 1967.

JUNGE, B.; HEEIKER, F. R.; KURZ, J.; MÜLLER, L.; SCHMIDT D. D.; WUNSCH, C. Structure of an α -D-glucosidase inhibitor acarbose. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 2, p. 235-268, 1984.

JUNGE, B.; MATZKE, M.; STLTEFUSS, J. Chemistry and structure-activity relationships of glucosidase inhibitors. In: KUHLMANN, J.; PULS, W. **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag, v. 119, p. 411-482, 1996.

KALAMKAR, N. B.; KASTURE, V. M.; CHAVAN, S. T.; SABHARWAL, S. G.; DHAVAL, D. D. Concise and practical route to tri- and tetra-hydroxy seven-membered iminocyclitols as glycosidase inhibitors from *D*-(+)-glucurono- γ -lactone. **Tetrahedron**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 2010.

KIGUCHI, T.; TAJIRI, K.; NINOMIYA, I.; NAITO, T. Radical Cyclization in Heterocycle Synthesis. Part 9: A Novel Synthesis of Amino Cyclitols and Related Compounds via Stannyl Radical Cyclization of Oxime Ethers Derived from Sugars. **Tetrahedron**, v. 56, n. 32, p. 5819-5833, 2000.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1128-1137, 2003.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. α -Glucosidases. **Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.

LE MERRER, Y.; POITOUT, L.; DEPEZAY, J.; DOSBAA, I.; GEOFFROY, S.; FOGLIETTI, M. Synthesis of azasugars as potent inhibitors of glycosidases. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 519-533, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2a. ed. New York: Worth Publishers, cap. 8, p. 273-291, 1995.

LILLELUND, V.H.; JENSEN, H.H.; LIANG, X.; BOLS, M. Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 515-553, 2002.

LIU, P. S. Total synthesis of 2,6-dideoxy-2,6-imino-7-O-(β -D-glucopyranosyl)-D-glycero-L-gulo-heptitol hydrochloride. A potent inhibitor of α -glucosidases. **Journal Organic Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 4717-4721, 1987.

LUNDBERG, P.; HAWKER, C. J.; HULT, A.; MALKOCH, M. MACROMOL. Click assisted one-pot multi-step reactions in polymer science: accelerated synthetic protocols. **Rapid Communications**, v. 29, n. 12-13, p. 998-1015, 2008.

MAHMUD, T. The C7N aminocyclitol family of natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 1, p. 137-166, 2003.

MATOS, C. R. R.; LOPES, R. S. C.; LOPES, C. C. Synthesis of 1-deoxynojirimycin and *n*-butyl-1-deoxynojirimycin. **Synthesis**, v. n. 4, p. 571-573, 1999.

MELO, E. B. **Ceto-conduritóis**: síntese e emprego na preparação de pseudo-dissacarídeos potencialmente anti-HIV. Ribeirão Preto, 2001. 123p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP)

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -Glucosidases como alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006.

MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006.

MÜLLER, I.; JÄGER, V. Syntheses via isoxazoles. 11. Synthesis of amino sugars via isoxazoles. The concept and one application: nitrile oxide/furan adducts. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 46, p. 4777-4780, 1982.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002.

SATOH, N. SHIMATSU, A. YAMADA, K. AIZAWA-ABE, M. SUGANAMI, T. KUZUYA, H. YOSHIHIRO, O. An α -Glucosidase inhibitor, voglibose, reduces oxidative stress markers and soluble intercellular adhesion molecule 1 in obese type 2 diabetic patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 55, n. 6, p. 786-793, 2006.

SCHALLER, C.; VOGEL, P.; JÄGER, V. Total syntheses of (+)- and (-)-1-deoxynojirimycin (1,5-dideoxy-1,5-imino-D- and L-glucitol) and of (+)- and (-)-1-deoxyidonojirimycin (1,5-dideoxy-1,5-imino-D- and L-iditol) via furoisoxazoline-3-aldehydes. **Carbohydrate Research**, v. 314, n. 1-2, p. 25-35, 1998.

SCHWEDEN, J., BORGMANN, C., LEGLER, G.; BAUSE, E. Characterization of calf liver glucosidase I and its inhibition by basic sugar analogs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 248, n. 1, p. 335-340, 1986.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. 268, n. 3, p. 12-12, 1993.

SHRIVER, Z.; RAGURAM, S.; SASISEKHARAN, R. Glycomics: a pathway to a class of New and Improved Therapeutics. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.3, n.10, p.863-873, 2004.

SOMFAI, P.; LINDSTROM, U. M. Asymmetric synthesis of (+)-1-deoxynojirimycin. **Tetrahedron Letters** v. 39, n. 39, p. 7173-7176, 1998.

SOMFAI, P.; MARCHAND, P.; TORSELL, S.; LINDSTROM, U. L. Asymmetric synthesis of (+)-1-deoxynojirimycin and (+)-castanospermine. **Tetrahedron**, v. 59, n. 8, p. 1293-1299, 2003.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4^a. Ed New York: Freeman,. p. 236-322, 1995.

SUMERLIN, B. S.; VOGT, A. P. Macromolecular Engineering through Click Chemistry and Other Efficient Transformations. **Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 1-13, 2010.

TAKAHASHI, S.; KUZUHARA, H.; NAKAJIMA, M. Design and synthesis of a heparanase inhibitor with pseudo-disaccharide structure. **Tetrahedron**, v. 57, n. 32, p. 6915-6926, 2001.

VALLINAYAGAM, R.; SCHMITT, F.; BARGE, J.; WAGNIERES, G.; WENGER,V.; NEIER, R.; JEANNERET, L. J. Glycoside Esters of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy of Cancer. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 4, 821-839, 2008.

VOGEL, P. Monosaccharide and disaccharide mimics: new molecular tools for biology and medicine. **Chimia**, v. 55, n. 4, p. 359-365, 2001.

WANG, G; REINKERSMEIER, G. ZHANG, S. ZHOU, J. ZHANG, L. ZHANG, L. BUTTERS, T. D. YE, X. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3146-3149, 2009.

WEERAPANA, E.; IMPERIALI, B. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. **Glycobiology**, v. 16, n. 6, p. 91R-101R, 2006.

WENNEKES, T.; VAN DEN BERG, R. J. B. H. N.; DONKER, W.; VAN DER MAREL,G. A.; STRIJLAND, A.; AERTS, J. M. F. G.; OVERKLEEF, H. S. Development of adamantan-1-yl-methoxy-functionalized 1-deoxynojirimycin derivatives as selective inhibitors of glucosylceramide metabolism in man. **Journal Organic Chemistry**, v. 72, n. 4, p.1088-1097, 2007.

ZHANG, G.-L.; CHEN, C.; XIONG, Y.; ZHANG, L.-H.; YE, J.; YE, X.-S. Synthesis of N-substituted iminosugar derivatives and their immunosuppressive activities. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 6, p. 780-786, 2010.

ZHANG, Z. WU, B. WANG, B. LI, T. ZHANG, P. GUO, L. WANG, W. Z. WANG, P. G. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 29, p. 3802-3804, 2011.

ANEXOS

A seguir estão alguns espectros seleccionados dos compostos sintetizados neste trabalho. A numeração dos átomos foi apenas sugerida para facilitar a atribuição.

Espectro de RMN ^1H (CCl_3D , 300 MHz) do composto **40**.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz)

Deslocamento químico (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
2,52	1	dd	10,1; 12,3	H1ax
2,73-2,78	1	ddd	2,3; 5,7; 8,6	H5
3,27	1	dd	4,9; 12,3	H1eq
3,38	1	t	9,0	H3
3,50-3,58	3	m	-	H2, H4, H6a
3,68	1	dd	2,3; 8,8	H6b
4,43	1	d	11,7	OCH_2Ph
4,48	1	d	11,9	OCH_2Ph
4,49	1	d	10,9	OCH_2Ph
4,71	1	d	11,7	OCH_2Ph
4,84	1	d	11,2	OCH_2Ph
4,86	1	d	11,9	OCH_2Ph
4,98	1	d	10,9	OCH_2Ph
7,27-7,38	20	m	-	Ar

Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **73**.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz)

Deslocamento químico (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
2,24	1	t	2,2	H8
2,47	1	dt	1,9; 9,7	H5
2,57	1	t	10,7	H1ax
3,00	1	dd	5,0; 11,1	H1eq
3,42	1	dd	2,3; 17,8	H7a
3,52	1	t	9,0	H3
3,61	1	dd	2,5; 10,6	H6
3,67	1	t	9,4	H4
3,72-3,82	3	m	-	H7b, H6, H2
4,38	1	d	10,7	OCH_2Ph
4,46	1	d	12,1	OCH_2Ph
4,58	1	d	12,1	OCH_2Ph
4,70	2	s	-	OCH_2Ph
4,86	1	d	10,9	OCH_2Ph
4,90	1	d	10,7	OCH_2Ph
5,00	1	d	10,9	OCH_2Ph
7,30-7,40	20	m	-	Ar

Espectro de RMN ^1H (CCl_3D , 300 MHz) do composto **74**.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz)

Deslocamento químico (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
2,24	3	s	-	OAc
2,11	6	s	-	OAc
1,97	1	t	11,2	H-1ax
2,12	1	t	9,4	H-5
3,10	1	dd	5,3; 11,2	H-1eq
3,53	1	m	-	H-2
4,06-4,40	3	m	-	H-6a, H-6b, H-3
4,40	1	d	11,9	H-7a
5,54		dd	3,6; 11,4	H-2' anômero β
5,53		t	10,3	H-2' anômero α
5,80	0,2	d	8,1	H-1' anômero β
6,40	0,4	d	3,4	H-1' anômero α
7,48	0,4	s	-	H-8 anômero α
7,55	0,2	s	-	H-8 anômero β
7,20-7,80	20	m	-	Ar

Espectro de masas do composto **74**

(ESI-TOF calculado para $C_{51}H_{58}N_4O_{13}$ $[M + H^+]$ 935,4034; encontrado 935,3988).

Espectro bidimensional COSY (CCl_3D , 300 MHz) do composto **74**.

Espectro de RMN ^1H (CCl_3D , 300 MHz) do composto **78**.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz)

Deslocamento químico (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
1,94	3	s	-	OAc
1,97	3	s	-	OAc
2,04	3	s	-	OAc
2,06	1	t	10,9	H1ax
2,14	1	d	9,2	H5
3,08	1	dd	5,0; 11,0	H1eq
3,22	1	t	9,1	H3
3,23	3	s	-	OCH_3
3,44	1	t	9,4	H4
3,57	1	dd	4,3; 9,5	H2
3,60-3,66	1	m	-	H6b
3,78	1	dd	2,2; 9,5	H5'
3,83	1	dd	2,7; 10,9	H6a
3,88	1	d	15,3	H7b
4,10	1	d	15,1	H7a
4,14-4,24	2	m	-	H1', H6'b
4,38	1	d	11,9	OCH_2Ph
4,48	1	d	12,0	OCH_2Ph
4,50	1	dd	2,2; 14,5	H6'a
4,56	2	s	-	OCH_2Ph
4,66	1	d	10,9	OCH_2Ph
4,78	1	d	10,9	OCH_2Ph
4,81	1	t	9,7	H4'
4,83	1	d	11,1	OCH_2Ph
4,88	1	dd	8,1; 9,7	H2'
5,14	1	t	9,4	H3'
7,20-7,30	20	m	-	Ar
7,40	1	s	-	H8

Espectro de masas do composto **78**

(ESI-TOF calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 907,4129; encontrado 907,4032).

Espectro bidimensional COSY (CCl_3D , 300 MHz) do composto **78**.

Espectro de RMN ^1H (CCl_3D , 300 MHz) do composto **82**.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz)

Deslocamento químico (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
1,77	3	s	-	OAc
1,97	3	s	-	OAc
2,01	3	s	-	OAc
2,01	3	s	-	OAc
2,08	1	t	11,0	H1ax
2,16	1	dt	2,0; 9,8	H5
3,06	1	dd	4,7; 11,0	H1eq
3,30	1	t	9,1	H3
3,48	1	t	9,1	H4
3,60	1	ddd	4,7; 9,8	H2
3,68	1	dd	2,0; 10,6	H6a
3,84-3,95	3	m	-	H5';H6b; H7a
4,08	1	dd	1,9; 12,4	H6'a
4,14	1	d	15,6	H7b
4,24	1	dd	12,4; 4,9	H6'b
4,28	1	d	10,9	OCH ₂ Ph
4,41	1	d	11,9	OCH ₂ Ph
4,54	1	d	11,9	OCH ₂ Ph
4,58	2	s	-	OCH ₂ Ph
4,68	1	d	11,1	OCH ₂ Ph
4,78	1	d	10,9	OCH ₂ Ph
4,84	1	d	11,1	OCH ₂ Ph
5,14	1	t	9,6	H4'
5,28	1	t	9,3	H2'
5,34	1	t	9,3	H3'
5,58	1	d	8,9	H1'
7,18-7,34	20	m	-	Ar
7,53	1	s	-	H8

Espectro de masas do composto **82**

(ESI-TOF calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{13}$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 952,4344; encontrado 951,4304).

Espectro bidimensional COSY (CCl_3D , 300 MHz) do composto **82**.

Espectro de RMN H^1 (CD_3OD), 300 MHz) do composto **77**.

Espectro de RMN H^1 (CD_3OD), 300 MHz) do composto **81**.

Espectro de RMN H^1 (CD_3OD), 300 MHz do composto **85**.

85