UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método de preparação de biomarcadores moleculares
relacionados a *N*-acetilglicosaminas para estudos de sinalização celular**

Paulo Sérgio Gonçalves Nunes

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método de preparação de biomarcadores moleculares
relacionados a *N*-acetilglicosaminas para estudos de sinalização celular**

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: Paulo Sérgio Gonçalves Nunes.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 28/03/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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.

Paulo Sérgio Gonçalves Nunes.

Desenvolvimento de método de preparação de biomarcadores relacionados a *N*-acetilglicosaminas para estudos de sinalização celular. Ribeirão Preto, 2014.

104p. : il.; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. O-GlcNAcilação
2. *N*-acetilglicosamina
3. O-GlcNAcase
4. Síntese de carboidratos
5. PET

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paulo Sérgio Gonçalves Nunes

Desenvolvimento de método de preparação de biomarcadores relacionados a *N*-acetilglicosaminas para estudos de sinalização celular

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: Prof. Dra. Ivone Carvalho.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais José Donizete
e Creusa por sempre terem me dado apoio e me
acompanhado em minhas escolhas;

à minha querida namorada Ana Luísa que dividiu
comigo angústias e alegrias;

à minha irmã Célia Márcia e meu irmão Wilhan

e a todos meus amigos que estiveram comigo na
realização do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação e dedicação para realização do trabalho.

Agradeço à minha família porque me ensinou a lutar e ir em busca dos meus sonhos.

Agradeço aos técnicos: Luís Otávio Zamoner, Marcelo Rodrigues de Carvalho, Vinícius Palaretti, José Carlos Tomaz e à técnica Cláudia Castania por todo apoio e disposição em ajudar-me ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica Ana Hartaman, Daniel, Evandro, Flávio, Getúlio, João, Jonathan, Leonardo, Maristela, Milena, Oswaldo, Pedro, Peterson, Ricardo, Susimair, Vanessa, Valquíria, pelos momentos de alegria e de frustração que compartilhamos ao longo dos últimos anos, bem como a convivência extremamente agradável e muito divertida, dentro e fora do laboratório.

Agradeço a CAPES e a FAPESP o financiamento, sem o qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

RESUMO

NUNES, P. S. G. **Desenvolvimento de método de preparação de biomarcadores moleculares relacionados a *N*-acetilglicosaminas para estudos de sinalização celular.** 2014. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Os carboidratos apresentam-se envolvidos em diversos eventos celulares, tais como geração de energia, sustentação celular, reconhecimento celular, processos de sinalização, etc. A *O*-GlcNAcilação, uma das alterações proteicas pós-traducionais relacionada à adição de *N*-acetilglicosamina a resíduos de serina ou treonina em proteínas citoplasmáticas ou nucleares, vem demonstrando ser uma das alterações recíproca a *O*-fosforilação de proteínas e pode estar envolvida no desencadeamento de patologias como câncer, diabetes tipo II, e doenças neurodegenerativas. Tendo em vista a relevância da *O*-GlcNAcilação e a necessidade de ferramentas para seu estudo, temos como objetivo, desenvolver uma rota sintética para a obtenção de moléculas modificadas derivadas de *N*-acetilglicosamina, contendo o átomo de flúor ligado ao grupo *N*-acetil. As moléculas correspondem aos derivados glicopiranosídeo de metila **1** e glicoaminoácidos de serina **2** e treonina **3**. Uma vez padronizada, os intermediários finais da rota serão utilizados para futura marcação com o ^{18}F , o qual poderá ser empregado em estudos do processo de sinalização celular por *O*-GlcNAcilação, e no diagnóstico de câncer por PET. Assim, foram propostas, inicialmente, duas rotas sintéticas, uma para a síntese do derivado glicopiranosídeo de metila **1** e outra para os glicoaminoácidos **2** e **3**, ambas utilizando o reagente cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**) como precursor. A síntese do derivado **1** foi conduzida por meio da proteção do grupo amino do composto **4** pela formação de carbamato **5**, e sequencial reação de glicosilação de Fischer (**6** e **7**), per-*O*-acetilação **8** e remoção do grupo protetor do amino **9**. As etapas sequenciais relacionadas à condensação com o ácido bromoacético **10**, e finalmente halogenação e desproteção do carboidrato **11** estão em andamento. A rota sintética proposta para a obtenção dos glicoaminoácidos **2** e **3** foi fundamentada na obtenção de um doador glicosídico contendo o grupo tricloroacetimidato e as hidroxilas protegidas com grupos benzílicos **16**, e na utilização do acceptor glicosídico serina **17** e treonina **18**, contendo os grupos amino e carboxila protegidos com 9-fluorenilmetóxicarbonil (Fmoc) e benzil (Bn), respectivamente. Até o momento não foi possível a síntese dos glicoaminoácidos **2** e **3** empregando o doador glicosídico inicialmente proposto (tricloroacetimidato), e mesmo após a variação do doador glicosídico, empregando tioaçucares per-*O*-benzilado **28**, ou per-*O*-acetilado **26**, não foi possível a obtenção do produto desejado. As dificuldades observadas na obtenção dos compostos, conduziram a elaboração de novas estratégias sintéticas que possuem o átomo de cloro como grupo abandonador na posição anomérica e a) uma amida {[(4-metilfenil)sulfonil]oxi}acético (**33**) em C-2, a qual exerce assistência anquimérica em C-1, e permite a funcionalização com o flúor e b) um azido em C-2, preparado a partir de glicais per-*O*-acetilados, desprovido de participação em C-1. Ambas as rotas sintéticas estão em andamento.

Palavras-Chave: 1. *O*-GlcNAcilação 2. Carboidratos fluorados 3. Glicoaminoácidos fluorados 4. Sinalização celular.

ABSTRACT

NUNES, P. S. G. **Development of preparation method of molecular biomarkers related N-acetylglucosamines for studies of cell signaling**. 2014. 104s. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Carbohydrates are involved in many cellular events, such as energy source, sustenance, recognition, signaling processes, etc. *O*-GlcNAcylation is a post-translational proteins' alteration related to the addition of *N*-acetylglucosamine to residues of serine or threonine in cytoplasmic or nuclear protein which has proven to be one of the reciprocal changes to *O*-phosphorylation of proteins and may be involved in the onset of pathologies such as cancer, type II diabetes, and neurodegenerative diseases. Given the relevance of *O*-GlcNAcylation and the importance of tools required for the study of this event, we aim to develop a synthetic route to obtain modified molecules derived from *N*-acetylglucosamine containing fluorine atom attached to the *N*-acetyl group. The molecules correspond to methyl glucopyranoside derivatives **1** and gluco-amino acids derived from serine **2** and threonine **3**. Once the synthetic route is established, the final intermediates of the route will be used for further labeling with ^{18}F , which may be employed in studies of cell signaling processes, involving *O*-GlcNAcylation, and cancer diagnosis by PET. Thus, two synthetic routes were initially proposed: one for the preparation of the methyl glucopyranoside derivative **1** and another one for the gluco-amino acids **2** and **3**, both using glucosamine hydrochloride (**4**) as a precursor. The synthesis of derivative **1** was conducted by protecting the amine group of compound **4** to form the carbamate **5**, and sequential Fischer glycosylation (**6**, **7**), per-*O*-acetylation (**8**) and removal of the protecting group from the amine (**9**). The sequential steps related to condensation with bromoacetic acid (**10**), halogenation and deprotection of the carbohydrate **11** are in progress. The proposed synthetic route for the preparation of **2** and **3** was based on a glycosidic donor containing trichloroacetimidate group, the protection of the hydroxyl groups with benzyl group (**16**) and glycoside acceptors serine **17** and threonine **18** containing amine and carboxyl groups protected with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) and benzyl (Bn), respectively. Hitherto, the synthesis of gluco-amino acids **2** and **3** was not achieved using the glycosidic donor initially proposed (trichloroacetimidate), even after the change of the glycosidic donor using per-*O*-benzylated (**28**) or per-*O*-acetylated (**26**) thiosugars. The difficulties encountered for the synthesis of the target compounds led the design of new synthetic strategies which comprise a chlorine atom as leaving group in the anomeric position and either: a) an amide {[(4-methylphenyl) sulfonyl]oxy} acetic acid (**33**) at C-2, which exerts anchimeric assistance at C-1, and allows functionalization with fluorine and b) an azide group at C-2, prepared from per-*O*-acetylated glucal, with no participation at C-1. Both synthetic routes are in progress.

Keywords: 1. *O*-GlcNAcylation 2. Fluorinated carbohydrates 3. Fluorinated gluco-amino-acids 4. Cell signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Porcentagem dos monossacarídeos mais frequentes em mamíferos (WERZ et al, 2007, CAMPO, V. L. et al., 2010).	2
Figura 1.2 – Estruturas dos compostos utilizados para o estudo da OGA. A: Novo composto fluorogênico análogo do FDGlcNAc; B: Inibidores seletivos de OGA.	9
Figura 1.3 – Alguns agentes de imagem molecular usados em PET.....	11
Figura 1.4 – Grupos prostéticos utilizados para síntese de radiofármacos. [¹⁸ F]FB-CHO = 4-[¹⁸ F]fluorobenzaldeído, [¹⁸ F]FPyME = 1-[3-(2-[¹⁸ F]fluoropiridin-3-iloxi)propil]pirrol-2,5-diona; [¹⁸ F]FBEM = [¹⁸ F]fluorobenzamido)etil]maleimida.	14
Figura 2.1 – Estruturas das moléculas propostas.....	22
Figura 4.1 – Espectros de RMN ¹ H dos compostos 8 e 9 demonstrando deslocamento do sinal referente ao H-2 do carboidrato. A - Espectro de RMN ¹ H do produto desejado 9; B – Espectro de RMN ¹ H do material de partida 8.	46
Figura 4.2 – Espectro de RMN ¹ H do composto 34 com sinais referentes ao carboidrato e ácido {[(4-metilfenil)sulfonil]oxi} acético.....	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 – Competição entre duas modificações pós-traducionais: fosforilação e O-GlcNAcilação	4
Esquema 1.2 – Processo de O-GlcNAcilação. UDP-GlcNAc: uridina 5'-difosfato- <i>N</i> -acetilglicosamina; OGA: β -D- <i>N</i> -acetilglicosaminidase; OGT: uridina difosfo- <i>N</i> -acetilglicosamina; polipeptídeo β - <i>N</i> -acetilglicosaminil transferase.....	5
Esquema 1.3 – Ensaio de atividade da OGA usando um substrato cromogênico PNP-GlcNAc (I) e dois substratos fluorogênicos, MUGlcNAc e FDGlcNAc (II).	7
Esquema 1.4 – Mecanismo da hidrolase OGA, proposto por Macauley et al (2005).	8
Esquema 1.5 – Síntese dos radiofármacos, [^{18}F]LBT-999, ligante do transportador de dopamina; FDG e FAZA.	12
Esquema 1.6 – Formação de um radiofármaco empregando grupos prostéticos (GLASER e ARSTAD, 2007).	13
Esquema 1.7 – Representação de um carboidrato, na forma linear e cíclica.	14
Esquema 1.8 – Representação da reação de glicosilação.	15
Esquema 1.9 – Mecanismo proposto para a reação glicosídica. Adaptado de Mydock e Demchenko (2010).	16
Esquema 1.10 – Efeito anomérico. (I) alinhamento de dipolos; (II) hiperconjugação.....	17
Esquema 1.11 – Mecanismo da reação de glicosilação com a participação do grupo vizinho em C-2.	18
Esquema 1.12 – Efeito do solvente sobre a estereosseletividade de formação da ligação glicosídica.	18
Esquema 1.13 – Rotas possíveis para a obtenção de derivados de 2-amino açúcares (DEMCHENKO, 2008).	19
Esquema 1.14 - Rotas sintéticas para obtenção de derivados de <i>N</i> -acetilglicosamina marcados com ^{18}F , no grupo <i>N</i> -acetil. A- Rota sintética <i>one-pot</i> proposta por Tada et al (1989); B- Rota sintética proposta por Martínez et al (2011).	20
Esquema 4.1 – Rota sintética planejada para obtenção do glicopiranosídeo de metila 1.....	42
Esquema 4.2 – Reação de formação do glicopiranosídeo a partir do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose.	42
Esquema 4.3 – Demonstração do mecanismo necessário para formação do composto 11 a partir do cloridrato de glicosamina.	43

Esquema 4.4 – Proteção do grupo amino em C-2, formação do carbamato 5.....	43
Esquema 4.5 – Glicosilação de Fischer empregada para obtenção do glicopiranosídeo 7.	44
Esquema 4.6 – Etapas sintéticas para otimizar a obtenção do glicopiranosídeo de metila 8. ...	45
Esquema 4.7 – Rota sintética utilizada para obtenção do glicoaminoácidos 2 e 3.....	48
Esquema 4.8 – Mecanismo provável da reação de diazotransferência. Conversão do grupo amino do composto 4 ao grupo azido composto 13	49
Esquema 4.9 – Métodos explorados para obtenção do derivado aminoaçúcar 14 a partir do intermediário 13.....	50
Esquema 4.10 – Nova rota sintética, descrita para a obtenção do doador glicosídeo 28.	51
Esquema 4.11 – Mecanismo proposto para síntese tioaçúcar 26.	52
Esquema 4.12 – Obtenção do doador tricloroacetimidato 16, a partir do composto 28.....	52
Esquema 4.13 – Mecanismo da reação para a formação de do intermediário 15.....	53
Esquema 4.14 – Mecanismo de tricloroacetimização do composto 15.....	54
Esquema 4.15 – Reação de obtenção dos aceptores glicosídicos 17 e 18.....	54
Esquema 4.16 – Participação do solvente para obtenção do glicosídeo (MONG et al, 2012).	55
Esquema 4.17 – Reação glicosídica entre o doador glicosídico 16 e o acceptor glicosídico 17.	56
Esquema 4.18 – Rota para obtenção do doador glicosídico 31, e etapas sequenciais para obtenção dos glicoaminoácido 2 e 3.....	57
Esquema 4.19 – Nova rota sintética para a obtenção dos compostos 1, 2 e 3 empregando doador glicosídico com a função amida em C-2.	58
Esquema 4.20 – Reações realizadas com o ácido benziloxiacético (41).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac ₂ O	Anidrido acético
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
BnBr	Brometo de Benzila
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCP	Cromatografia em Camada Preparativa
CFAE	Cromatografia Flash de Alta Eficiência
d	Dupleto
DBU	1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCU	Dicicloexilureia
dd	Duplo Dupleto
ddd	Duplo Duplo Dupleto
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
dt	Duplo Tripleto
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-glicosamina
I.V.	Infravermelho
<i>J</i>	constante acoplamento
K2.2.2	Kriptofix
m	Multipleto
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida
OGA	β-D- <i>N</i> -acetilglicosaminidase
OGT	<i>O</i> -β- <i>N</i> -acetil-glicosaminiltransferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
Py	Piridina
s	Simpleto

Ser	Serina
t	Tripleto
TfN ₃	Triflil azida
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
Thr	Treonina
TMSOTf	trimetilsililoxitriflato
Troc	tricloroetoxycarbonila
v:v	Volume/Volume
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de esquemas	iv
Lista de abreviaturas e símbolos	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sinalização celular e <i>N</i> -acetilglicosamina	3
1.2 OGA: Ensaio da atividade e mecanismos	6
1.3 O-GlcNAcilação e Câncer	9
1.4 Diagnóstico do Câncer por PET	10
1.4.1 Marcação com ^{18}F	11
1.5 Propriedades e atividade de <i>N</i> -acetilglicosamina	14
1.5.1 Estratégias para síntese de derivados 2-amino-2-desoxi-glicosídeos	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Materiais	24
3.1.1 Aparelhagem analítica	24
3.1.2 Aparelhagem laboratorial	24
3.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais	25
3.2 Métodos	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Obtenção do derivado glicopiranosídeo de metila 1	41
4.2 Obtenção do glicoaminoácidos 2 e 3	47
4.2.1 Síntese do doador glicosídico tricloroacetimidato	48
4.2.2 Obtenção dos aceptores glicosídicos	54

4.2.3 Reações de glicosilação para formação do glicoaminoácido	55
4.3 Métodos alternativos para obtenção dos compostos 1, 2 e 3	56
5 CONCLUSÕES.....	61
6 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	72
APÊNDICE A – RMN ¹ H (300MHz, CD ₃ OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-D-glicopirranose (5).....	73
APÊNDICE B – RMN ¹ H (300MHz, CD ₃ OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- α -D-glicopiranosídeo de metila (6)	75
APÊNDICE C – RMN ¹ H (300MHz, CD ₃ OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- β -D-glicopiranosídeo de metila (7)	77
APÊNDICE D – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-2-desoxi- 2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-β - D glicopiranosídeo de metila (8)	79
APÊNDICE E – IV-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (13).....	81
APÊNDICE F – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (14)	82
APÊNDICE G – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (25)	85
APÊNDICE H – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (26).....	88
APÊNDICE I - RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 3,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (28).....	91
APÊNDICE J – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 3,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (15)	94
APÊNDICE K – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 2-Azido-3,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-2-desoxi-1- <i>O</i> -(2,2,2-tricloroacetimidol)-α-D-glicopirranose (16).....	97
APÊNDICE L – RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) Éster <i>N</i> -(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico (17)	99
APÊNDICE M – RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) Éster <i>N</i> -(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina benzílico (18)	101
APÊNDICE N – RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) 3,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-D-glicol (30).....	103

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Além do conhecido papel energético e estrutural exercido pelos carboidratos, eles desempenham diversas outras funções fundamentais para a manutenção da vida, incluindo regulação do crescimento e mobilidade celular, respostas imunes e inflamatórias, bem como a promoção de interações entre as diferentes células de nosso organismo e as células com agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias e protozoários.

A diversidade funcional dos carboidratos está correlacionada com sua abundância estrutural, observada tanto nas estruturas monoméricas (Figura 1.1) (WERZ et al, 2007), monossacarídeos, quanto nas estruturas poliméricas, oligossacarídeos e alguns gliconjugados. A vasta diversidade estrutural dos carboidratos se deve à capacidade deles formarem cadeias lineares ou ramificadas, as quais conferem diferentes arranjos de acordo com o padrão de substituição e combinação de unidades de monossacarídeos. A complexidade estrutural é alta visto que monossacarídeos podem variar em número de carbonos, estereoquímica de cada centro quiral, tamanho de anel, tipo de ligação glicosídica, configuração anomérica e substituintes.

Figura 1.1 – Porcentagem dos monossacarídeos mais frequentes em mamíferos (WERZ et al, 2007, CAMPO, V. L. et al., 2010).

1.1 Sinalização celular e *N*-acetilglicosamina

Até meados da década de 80 acreditavam-se que os derivados de carboidratos, oligossacarídeos e gliconjugados, eram produzidos por meio de glicosilações, promovidas pelas enzimas glicosiltransferases e glicosidases, na via secretória da célula envolvendo o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Essas glicosilações ocorriam em proteínas ou lipídeos de membrana e eram apresentadas na face extracelular formando glicoconjugados, ou liberadas na forma de estruturas de polissacarídeos. No entanto, em 1984, o grupo de pesquisa de Torres e Hart, estudando glicopeptídeos de membrana de linfócitos, quebrou o paradigma do envolvimento apenas da via secretória da célula com a descoberta de *O*-glicosídeos de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), em outras localizações celulares. Diferente das glicosilações conhecidas, até o momento, essa modificação pós-traducional de proteínas, denominada *O*-GlcNAcilação, possui localização intracelular, ocorrendo em proteínas citoplasmáticas ou nucleares, uma modificação dinâmica com formação de ciclos de adição e remoção de resíduos de GlcNAc aos aminoácidos serina ou treonina de sítios proteicos, não formando estruturas poliméricas, como as demais.

Em proteínas, as glicosilações englobam *N*-glicanas, *O*-glicanas e glicosaminoglicanos (OHTSUBO e MARTH, 2006). *N*-glicanas ocorrem via ligação de carboidratos a resíduos de asparagina de proteínas, especificamente, em um subconjunto que residem no motivo Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina, enquanto que *O*-glicanas e glicosaminoglicanos são conectados a um subconjunto de serinas e treoninas (SCHACHTER, 2000; YAN e LENNARZ, 2005). As glicosaminoglicanas se diferem das *O*-glicanas por formarem cadeias lineares, serem produzidas por vias biossintéticas diferentes e, geralmente, apresentarem-se altamente sulfatadas (ESKO e SELLECK, 2002). A glicosilação de lipídios promove a formação de glicolipídios (glicoesfingolipídios) os quais incluem gangliosídeos transportadores de ácido siálico (MACCIONI, GIRAUDO e DANIOTTI, 2002).

A natureza dinâmica da *O*-GlcNAcilação tem sido comparada com o mecanismo de sinalização celular de fosforilação protéica, devido a *O*-GlcNAcilação ocorrer em resposta a diferentes estímulos fisiológicos, tais como nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e *stress*, além de apresentar seu ciclo de adição e remoção de forma mais rápida que o *turnover* protéico e competir com a fosforilação por sítios proteicos de diversas proteínas regulatórias (KIM, 2011). A competição entre essas duas modificações pós-traducionais apresenta-se em

variados tipos, como: a) competição pelo mesmo sítio na proteína alvo, conhecido como hipótese *yin-yang* (Esquema 1.1), b) concomitantemente fosforilação e *O*-GlcNAcilação em sítios distantes, c) interação entre sítios adjacentes, na qual uma modificação pode regular a ocorrência da outra e, finalmente, d) a regulação da atividade ou localização das enzimas após modificação por fosforilação ou *O*-GlcNAcilação.

Esquema 1.1 – Competição entre duas modificações pós-traducionais: fosforilação e *O*-GlcNAcilação

Por outro lado, diferente da fosforilação, regulada por mais de 500 cinases e 140 fosfatases, a glicosilação com o grupo *O*-GlcNAc é realizada por apenas duas enzimas: uma transferase, uridina difosfo-*N*-acetil glicosamina: polipeptídeo β -*N*-acetilglicosaminil transferase (OGT), que transfere moléculas de *N*-acetilglicosamina, via uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) por meio de uma ligação β aos resíduos de serina ou treonina da proteínas alvo; e uma hidrolase, β -D-*N*-acetilglicosaminidase (OGA), que promove a remoção destes grupos de forma dinâmica (Esquema 1.2) (KIM, 2011).

Esquema 1.2 – Processo de *O*-GlcNAcilação. UDP-GlcNAc: uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglicosamina; OGA: β-*D*-*N*-acetilglicosaminidase; OGT: uridina difosfo-*N*-acetil glicosamina; polipeptídeo β-*N*-acetilglicosaminil transferase

Desde seu primeiro relato em 1984, a *O*-GlcNAcilação vem sendo extensamente pesquisada a fim de elucidar quais as proteínas alvo dessa modificação e qual a relevância dessa modificação nos processos tanto fisiológicos quanto patológicos, envolvendo diferentes métodos, como: técnicas espectrométricas (espectrometria de massas) e inibidores específicos das enzimas OGA e OGT. Diversos avanços foram realizados, como a identificação de funções de sinalização celular à degradação proteica (KEARSE e HART, 1991), a relação com fatores de transcrição gênica (YANG et al, 2001), e a transdução de sinais em resposta ao metabolismo de glicose e progressão do ciclo celular (YANG et al, 2006; WALGREN et al, 2003; HOUSLEY et al, 2008; KANG et al, 2008). Atualmente, são conhecidas 1500 proteínas alvo dessa modificação pós-traducional (HART, HOUSLEY e SLAWSON, 2007; LIMA et al, 2011). No entanto, os mecanismos celulares que controlam a atividade dessas enzimas ainda não foram totalmente elucidados (KIM, 2011).

O maior desafio para a determinação do mecanismo molecular da *O*-GlcNAcilação em cascatas de sinalização específicas e regulação da transcrição compreende o mapeamento do(s) sítio(s) de modificação, devido a a) estequiometria de modificação de *O*-GlcNAc em cada sítio da proteína ser geralmente baixa, e b) a ligação glicosídica entre a porção GlcNAc e Ser/Tre ser quimicamente e enzimaticamente lábil.

As primeiras pesquisas para o estudo de sítios proteicos modificados por *O*-GlcNAcilação, as quais conduziram à identificação dessa modificação pós-traducional em proteínas como neurofilamento H (DONG, et al, 1996), L e M (DONG et al, 1993), receptor de estrogênio (JIANG e HART, 1997; CHENG e HART, 2000), e sinapsina I (COLE e HART, 1999), foram realizadas empregando técnicas dispendiosas e de alto custo, envolvendo a marcação de sítios *O*-GlcNAcilados por meio da formação de *O*-glicosídeos com galactose radiomarcadas e a enzima β -1,4-galactosiltransferase (GalT1), além de sequencial utilização de técnicas de degradação de Edman e espectroscopia de massas. Essa técnica apresentava desvantagens devido à necessidade de grandes quantidades de nucleotídeos do açúcar radioativo, e a necessidade de diversas etapas de degradação de Edman e purificação por HPLC para a identificação de locais de modificação.

A *O*-GlcNAcilação corresponde a um evento de pequena extensão na massa proteica celular, levando em consideração a grande quantidade de proteínas nas amostras celulares sem resíduos de *O*-GlcNAc, o que torna necessário o isolamento ou enriquecimento de proteínas contendo resíduos de *O*-GlcNAc, para a identificação de sítios glicosilados. Assim, atualmente, a abordagem geral para o estudo da proteômica de *O*-GlcNAc é realizada em três etapas: a) Detecção e enriquecimento de proteínas *O*-GlcNAciladas, b) Identificação de proteínas *O*-GlcNAc-modificadas; c) Identificação do(s) sítio(s) modificados (KIM, 2011).

1.2 OGA: Ensaio da atividade e mecanismos

A OGA é uma enzima da classe das hexosaminidases que, diferente das demais hexosaminidases, realiza a hidrólise seletiva de apenas ligações β glicosídicas de D-GlcNAc ligados a aminoácidos serina ou treonina. Estruturalmente, a OGA é composta por um domínio de glicosidase *N*-terminal e um domínio de histonas acetiltransferase C-terminal (TOLEMAN et al, 2004), e apresenta duas isoformas distintas, uma variante de 130 kDa, e uma de 75 kDa, sendo que ambas variantes de OGA, diferem-se pela composição da região C-terminal. Conhecida como “OGA longa”, a variante de 130 kDa, possui o domínio de glicosidase *N*-terminal e o domínio de histonas acetiltransferase C-terminal bem distintos, por outro lado, a variante de 75-kDa ou “OGA curta” não possui o domínio C-terminal.

A determinação da atividade enzimática da OGA é conduzida por meio de técnicas espectrofotométricas. Nessa técnica, são utilizados substratos, os quais após serem enzimaticamente hidrolisados pela enzima OGA, geram íons com absorbância característica, a qual é correlacionada com a atividade catalítica da OGA. Inicialmente os ensaios utilizavam o

substrato cromogênico, *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo (PNP-GlcNAc) (DONG e HART, 1994), também usado como substrato para hexosaminidases lisossomais que são funcionalmente relacionadas com OGA. No entanto, os experimentos demonstraram que a atividade enzimática da OGA curta não era identificada quando empregado o substrato *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo e o íon *p*-nitrofenolato, produzido após clivagem exercida pela enzima OGA, promovia somente uma modesta mudança na absorvância após clivagem, o que conduzia a uma baixa sensibilidade nas medidas de atividade enzimática (Esquema 1.3).

Atualmente dois substratos fluorogênicos são empregados em estudos de atividade enzimática da OGA. O composto 2-desoxi-2-*N*-acetil- β -D-glucopiranosídeo de 4-metilumbeliferila (GlcNAc-MU) (MACAULEY et al, 2005) e fluoresceína di-(*N*-acetil- β -D-glicosaminida) (FDGlcNAc) (KIM et al, 2006a) (Esquema 1.3).

Esquema 1.3 – Ensaio de atividade da OGA usando um substrato cromogênico PNP-GlcNAc (I) e dois substratos fluorogênicos, MUGlcNAc e FDGlcNAc (II).

O emprego do substrato GlcNAc-MU e derivados sintéticos de *N*-acetilglicosamina permitiram a realização dos primeiros estudos mecanísticos da enzima OGA. Neste estudo, foi identificada a influência de substituintes eletronegativos no grupo metila do grupo *N*-acetila de derivados *N*-acetilglicosamina sobre a atividade catalítica da enzima OGA. A observação da diminuição da atividade catalítica de OGA, de acordo com o aumento do número de substituições por flúor no grupo metil da função *N*-acetila, juntamente com o fato da redução da basicidade do oxigênio do grupo carbonila, após essa substituição, conduziram à proposta de que a enzima OGA utiliza um mecanismo envolvendo a participação do grupo *N*-acetil do substrato, conforme o Esquema 1.4 (MACAULEY et al, 2005).

Esquema 1.4 – Mecanismo da hidrolase OGA, proposto por Macauley et al (2005).

Os experimentos também foram realizados com as hexosaminidases lisossomais, porém, demonstraram que essas enzimas perdem a atividade catalítica de acordo com a adição de grupos volumosos no grupo *N*-acetil, demonstrando diferenças importantes entre o sítio catalítico das enzimas OGA e as hexosaminidases lisossomais. A partir destes resultados foi desenvolvido o composto fluorogênico derivado FDGlcNAc (Figura 1.2A) específico para a OGA (KIM et al, 2006b) com base nas diferenças estruturais entre centros catalíticos de ambas as enzimas. Avanços posteriores ocorreram com a aplicação dessa modificação estrutural no desenvolvimento de compostos inibidores da OGA mais seletivos, para aplicação em estudos *in vivo* (Figura 1.2B).

Figura 1.2 – Estruturas dos compostos utilizados para o estudo da OGA. A: Novo composto fluorogênico análogo do FDGlcNAc; B: Inibidores seletivos de OGA.

A observação da ocorrência da *O*-GlcNacilação de forma atípica em doenças crônicas tais como doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer, tem demonstrado o potencial terapêutico da identificação ou modulação da *O*-GlcNacilação.

1.3 *O*-GlcNacilação e Câncer

O câncer, uma das doenças crônicas que demonstra estar correlacionada a *O*-GlcNacilação atípica, corresponde a uma patologia caracterizada pela proliferação descontrolada de células que sofreram transformação neoplásica, as quais desencadeia uma série de problemas oriundos de processos inflamatórios e obstrução da circulação sanguínea.

Correspondendo a um processo que promove diversas mudanças morfológicas e metabólicas na célula, o câncer desencadeia resistência à inibição do crescimento, resistência à morte celular (apoptose), invasão descontrolada e metástase; formação de novos vasos sanguíneos para extração de nutrientes (angiogênese), e outros eventos como: alteração do metabolismo energético (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que 8,2 milhões de pessoas morreram em 2012 por causa de câncer, e estima-se que ocorrerá 27 milhões de casos incidentes de câncer, no mundo, no ano 2030. Este aumento na incidência de doenças crônicas degenerativas tais como câncer, tem sido correlacionado com o estilo de vida, intenso processo de urbanização e ao aumento da expectativa de vida da população (WHO, 2014; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011).

A relação entre a *O*-GlcNacilação e o desencadeamento de processos cancerígenos tem sido proposta devido à observação de mudanças no padrão de *O*-GlcNacilação em

proteínas associadas a processos cancerígenos, tais como p53 (YANG et al, 2006), c-myc (CHOU, DANG e HART, 1995), IKK β (KAWAUCHI et al, 2009) e Snail (PARK et al, 2010).

A elevação de *O*-GlcNAcilação (hiper-*O*-GlcNAcilação) tem sido observada em neoplasias humanas, de mama (CALDWELL et al, 2010; GU et al, 2010), próstata (LYNCH et al, 2012), pulmão (MI et al, 2011), colo-retal (MI et al, 2011; YEHEZKEL et al, 2012), fígado (ZHU et al, 2012), de câncer pancreático (MA, VOSSELLER e VOCADLO, 2013), e câncer não-sólido, como leucemia linfocítica crônica (SHI et al, 2010; MA, VOCADLO e VOSSELLER, 2013). Esses indícios somados a trabalhos que demonstram que a redução de hiper-*O*-GlcNAcilação inibe fenótipos cancerosos e bloqueia o crescimento do tumor em uma variedade de modelos de câncer (MA et al, 2013; LYNCH et al, 2012; CALDWELL et al, 2010), colocam a hiper-*O*-GlcNAcilação como um fator relevante para transformação neoplásica (SLAWSON e HART, 2011).

Por outro lado, pesquisas realizadas pelo grupo do Prof. Dr. Gerard Hart vêm demonstrando que há uma maior atividade enzimática da OGA acompanhada de um decréscimo dos níveis de *O*-GlcNAcilação de proteínas, detectados em estudos de tecidos cancerígenos de tireoide e mama (SLAWSON, PIDALA e POTTER, 2001; DONG e HART, 1994; SLAWSON e HART, 2011), o que torna a identificação de modificações no padrão de *O*-GlcNAcilação um biomarcador¹ relevante para esses cânceres.

1.4 Diagnóstico do Câncer por PET

Dentre as ferramentas para diagnóstico de câncer, a Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET, acrônimo do inglês *Positron Emission Tomography*) representa uma modalidade diagnóstica não invasiva, que usa radiofármacos para obter informações da perfusão tecidual e medir processos bioquímicos que estão alterados em tecidos cancerígenos.

Radiofármacos são substâncias (fármacos, drogas ou produtos biológicos) marcadas com radionuclídeos, utilizados em Medicina Nuclear com finalidades terapêuticas e diagnósticas em diversas áreas, incluindo a oncologia. Os radiofármacos utilizados em PET são compostos que possui em suas estruturas um radionuclídeo que decai emitindo partículas de pósitrons (β^+), os quais, após encontrarem com um elétron próximo, sofrem uma reação de

¹Biomarcadores são definidos como “características que são objetivamente medidas e avaliadas como indicadores normais de processos biológicos, patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. 2001).

aniquilação e emitem radiação gama, a qual é captada por um detector PET e traduzida em imagem.

Dentre os vários radionuclídeos emissores de pósitrons, o carbono-11 (^{11}C -meia-vida de 20 minutos) e o flúor-18 (^{18}F - meia-vida de 110 minutos) são os mais utilizados. Entretanto, o radionuclídeo ^{18}F é o que possui as características físicas mais favoráveis para radiomarcagem de pequenas moléculas devido aos seguintes fatores: a) ^{18}F emite pósitrons de baixa energia o que permite a geração de imagens com maior resolução espacial (menor distância percorrida antes da aniquilação); b) Apesar de não ser comumente encontrado em biomoléculas, a substituição de um hidrogênio ou grupo hidroxila pelo ^{18}F acarreta, geralmente, apenas pequenas perturbações estéricas e; c) a meia-vida do ^{18}F , em comparação a do ^{11}C , permite maior flexibilidade tanto para a síntese do radiofármaco como para monitorar processos biológicos durante maior intervalo de tempo (SCHLYER, 2005; MACHADO, PLEITEZ e TIJERO, 2006).

Diversas abordagens vêm sendo estudadas e utilizadas na clínica para o diagnóstico e monitoramento do câncer por PET. Radiofármacos como 2-desoxi-2- ^{18}F fluoro-D-glicose (FDG), fluorcolina, fluoroestradiol (FES) (Figura 1.3) representam compostos bastante empregados, e exploram as modificações, respectivamente, no padrão de absorção de glicose, produção da membrana celular e expressão de receptores de alguns tipos de câncer (WEISSLEDER, R. et al, 2010).

Figura 1.3 – Alguns agentes de imagem molecular usados em PET.

1.4.1 Marcação com ^{18}F

A produção do radioisótopo ^{18}F , conduzida em aceleradores de partículas como o ciclotron, permite a obtenção do flúor eletrofílico ou nucleofílico, de acordo com o estado físico do material de partida utilizado como alvo no ciclotron, gasoso ou líquido, respectivamente. Entretanto, a obtenção do flúor eletrofílico é desvantajosa devido a sua alta

reatividade e necessidade de utilização de compostos carreadores, para captura-lo, tais como o gás F_2 , os quais diminuem drasticamente sua atividade específica. Por outro lado, para a produção do flúor nucleofílico são utilizados materiais de partida líquidos, tais como a água enriquecida com ^{18}O como alvo (H_2O^{18}), sendo necessário somente a realização de uma evaporação azeotrópica para remoção da água e aumento da nucleofilicidade do flúor.

A síntese de radiofármacos pode ser realizada por meio da introdução do radioisótopo em moléculas orgânicas de forma direta, utilizando a substituição eletrofílica ou substituição nucleofílica, ou indireta, empregando fluorinação via grupos prostéticos.

O método direto corresponde à formação da ligação C-F a partir de reações eletrofílicas ou nucleofílicas com o flúor oriundo das reações nucleares. Devido às desvantagens do emprego de reações eletrofílicas para a obtenção de compostos marcados com ^{18}F , a maioria dos radiofármacos é produzida empregando rotas que utilizam substituições nucleofílicas. Assim, moléculas precursoras são comercialmente disponíveis para permitir a síntese de radiofármacos por meio de reações de substituição em grupos de saída tais como haletos, ésteres de sulfonato e triflatos, como ilustrado no Esquema 1.5 envolvendo a síntese dos radiofármacos FDG, FAZA e $[^{18}F]$ LBT-999 (COENEN et al 2010; MILLER et al, 2008).

Esquema 1.5 – Síntese dos radiofármacos, $[^{18}F]$ LBT-999, ligante do transportador de dopamina; FDG e FAZA.

Métodos indiretos geralmente são necessários quando a molécula alvo da marcação com o ^{18}F é quimicamente instável nas condições reacionais para a formação da ligação flúor-carbono. Dessa forma, são utilizados grupos prostéticos ou síntons, os quais são produzidos a partir de moléculas mais simples que sofrem a marcação inicial com o ^{18}F , como realizado no método direto, e, posteriormente, permitem a marcação de outra molécula por meio de mais uma etapa reacional, geralmente mais branda que a empregada para a marcação com o flúor. Nessa abordagem são utilizadas duas ou mais etapas reacionais para a marcação da molécula desejada e ocorre a adição do flúor juntamente com cadeias alquílicas ou aromáticas oriundas do grupo prostético utilizado (Esquema 1.6).

Esquema 1.6 – Formação de um radiofármaco empregando grupos prostéticos (GLASER e ARSTAD, 2007).

Entre os grupos prostéticos conhecidos existem derivados de maleimidas, alcinos, azidos e aldeídos, entre outros, como demonstrado na Figura 1.4.

Figura 1.4 – Grupos prostéticos utilizados para síntese de radiofármacos. $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ = 4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzaldeído, $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ = 1-[3-(2- $[^{18}\text{F}]$ fluoropiridin-3-iloxi)propil]pirrol-2,5-diona; $[^{18}\text{F}]\text{FBEM}$ = $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzamidoetil]maleimida.

1.5 Propriedades e atividade de *N*-acetilglicosamina

N-acetilglicosamina preserva grande parte das propriedades apresentadas pela glicose, representando o carboidrato mais abundante encontrado na natureza (Esquema 1.7). De maneira geral, carboidratos são polidroxicetonas ou poliidroxi aldeídos que assumem preferencialmente a forma cíclica quando em solução (Esquema 1.7). Na natureza os carboidratos são encontrados, formando cadeias de duas ou mais unidades, ou ligados a outras moléculas, tais como lipídeos, proteínas, entre outras.

Esquema 1.7 – Representação de um carboidrato, na forma linear e cíclica.

A síntese de glicoconjugados ocorre via reação de glicosilação. Reações de glicosilação ocorrem por meio da substituição nucleofílica de um grupo abandonador (LG) ligado ao carbono anomérico (C-1) do carboidrato por uma espécie nucleofílica, geralmente álcoois ROH, aminas RNH₂ ou sulfidrilas RSH. De acordo com o grupo abandonador de escolha são empregados agentes promotores, ou catalisadores, que favorecem a saída do grupo abandonador. A unidade monossacarídica que sofre o ataque nucleofílico é denominada “doador glicosídico”, e o nucleófilo é denominado “aceptor glicosídico” (Esquema 1.8).

Esquema 1.8 – Representação da reação de glicosilação.

Atualmente é descrito que a reação de glicosilação ocorra preferencialmente via um mecanismo de substituição nucleofílica unimolecular (S_N1). Assim propõe-se que a reação ocorra em quatro etapas distintas (Esquema 1.9).

Inicialmente, há a ativação do doador glicosídico pela formação do complexo doador-promotor, que pode ser reversível ou irreversível, dependendo do sistema envolvido (1); em seguida ocorre a ionização (2) do doador glicosídico, por meio da eliminação do grupo de saída presente na posição anomérica, essa é a etapa mais lenta da reação, tipicamente irreversível, na qual é fornecida duas espécies reativas relacionadas ao cátion glicosídico e íon oxocarbênio; na sequência, ocorre o ataque nucleofílico pelo aceptor glicosídico (3), resultando na formação de produtos na configuração α (a) e/ou β (b), para finalmente ocorrer a transferência de prótons para originar um glicosídeo neutro (4) (MYDOCK e DEMCHENKO, 2010).

Esquema 1.9 – Mecanismo proposto para a reação glicosídica. Adaptado de Mydock e Demchenko (2010).

Vários fatores influenciam tanto na estereosseletividade quanto no desempenho da reação de glicosilação, tais como: temperatura, grupos protetores, conformação, solvente, promotor, impedimento estérico ou grupos de saída do doador glicosídico.

A obtenção de carboidratos na configuração α é facilitada pelo fenômeno denominado efeito anomérico, descrito inicialmente por Edward (1955). O efeito anomérico descreve a tendência do grupo substituinte no carbono anomérico (C-1) ter preferência pela orientação axial, ao invés da equatorial, a qual possui menor impedimento estérico, e explica a maior formação dos produtos da reação de glicosilação na configuração α . Esse fenômeno tem sido explicado por características estereoeletrônicas como o alinhamento de dipolos (I) e hiperconjugação (II) que estabilizam a ligação glicosídica na configuração α (Esquema 1.10).

Entre os átomos de oxigênio endocíclico e o grupo substituinte do carbono anomérico (C-1) do carboidrato, são formados dipolos que se alinham de diferentes formas, de acordo com a configuração do substituinte em C-1, axial ou equatorial. Neste sentido, melhor alinhamento ocorre quando são formados dipolos opostos, o que só é possível quando

o substituinte em C-1 encontra-se na configuração α . No que diz respeito à hiperconjugação, há melhor estabilização eletrônica entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio do anel pirano e o orbital sigma antiligante do carbono anomérico, quando este apresenta um substituinte na configuração α . Nesta configuração, o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) possui relação sinperiplanar com um dos orbitais n do oxigênio e, portanto, estão paralelamente dispostos.

Esquema 1.10 – Efeito anomérico. (I) alinhamento de dipolos; (II) hiperconjugação.

Por outro lado, o fenômeno denominado efeito do grupo vizinho, ou assistência anquimérica, permite a obtenção de uma proporção razoável de glicosídeos na configuração β , devido a estabilização do carbocátion ou íon oxocarbênio, via formação de uma espécie intermediária de oxazolina. Esse efeito ocorre quando o doador glicosídico contém um grupo acila na posição C-2, como por exemplo, derivados de éster e amida. Esses grupos podem estabilizar o carbocátion, gerado na posição anomérica, via formação de um intermediário oxazolina, resultante do ataque do oxigênio carbonílico ligado em C-2 ao carbono anomérico, permitindo a obtenção de uma maior proporção de produtos na configuração β de acordo com o mecanismo demonstrado no Esquema 1.11. Carboidratos contendo grupos que exerçam assistência anquimérica em C-2 podem assim gerar produtos após a) ataque nucleofílico do acceptor glicosídico ao íon oxocarbênio, por um mecanismo semelhante quando há ausência do efeito anquimérico, gerando o produto com configuração α e/ou β (a e b), ou b) após ataque nucleofílico à espécie de oxazolina, dando origem ao produto com configuração β (c) (Esquema 1.11).

Esquema 1.11 – Mecanismo da reação de glicosilação com a participação do grupo vizinho em C-2.

A proporção dos produtos na configuração α ou β também pode ser influenciada pelo solvente utilizado na reação. Em geral, a utilização de solventes polares, como acetonitrila, aumenta a taxa da formação de β -glicosídeo, e a utilização de solventes apolares, como éteres, leva a formação do produto α . Na reação realizada em acetonitrila, por exemplo, o cátion nitrílium formado *in situ*, adota exclusivamente a orientação axial, permitindo a formação estereosseletiva de glicosídeos substituídos em equatorial, diferentemente, quando é utilizado solvente, tais como dietil éter, tetraidrofurano ou dioxano, o intermediário equatorial é preferencialmente formado, levando a formação da ligação glicosídica axial (Esquema 1.12).

Esquema 1.12 – Efeito do solvente sobre a estereosseletividade de formação da ligação glicosídica.

A abordagem empregando acetonitrila permite a obtenção de β glicosídeos com boa estereosseletividade, mesmo com doadores glicosídeos que não realizam o efeito do grupo vizinho (assistência anquimérica em C-2) (DEMCHENKO, 2008).

1.5.1 Estratégias para síntese de derivados 2-amino-2-desoxi-glicosídeos

A síntese de derivados de 2-amino-2-desoxi glicosídeos tem sido desenvolvida por uma variedade de abordagens sintéticas que pode ser resumida em dois grandes métodos a) a partir da glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose), diretamente, ou b) por meio da introdução do nitrogênio a derivados de glicose, como ésteres sulfônicos, 2,3-epóxidos ou glicais. Desta forma, a síntese de derivados funcionalizados em C-2, pode ser feita por condensação com ácidos orgânicos, ou seus derivados ativados. Por outro lado, a utilização de ésteres sulfônicos permite a obtenção do derivado com 2-amino-2-desoxi-glicose via reação de substituição nucleofílica bimolecular S_N2 , com inversão da configuração de derivados de manose. Adicionalmente, a síntese a partir de glicais e epóxidos, exigem métodos para o controle da estereosseletividade e regioseletividade, respectivamente, para evitar a formação de produtos indesejáveis de 3-amino-3-desoxi glicose, após a funcionalização (Esquema 1.13).

Esquema 1.13 – Rotas possíveis para a obtenção de derivados de 2-amino açucars (DEMCHENKO, 2008).

Na literatura está disponível uma vasta quantidade de métodos para a obtenção de carboidratos contendo amidas na posição C-2, utilizando como precursor o cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose. Os métodos descritos empregam diferentes condições reacionais com a utilização de compostos como haletos de ácidos, derivados succinimidas e anidridos (CHIBBA et al, 2012; JIA et al, 2006; KISO e ANDERSON, 1985; LAUGHLIN et al, 2006; LUO e PRESTWICH, 2001; PAN et al, 2012; SAXON e BERTOZZI, 2000; WITTE et al, 2009). O emprego de ácidos carboxílicos também é frequentemente utilizado e, nestes casos, a reação é catalisada por agentes de condensação, tais como carbodiimidas, HOBt, *N*-

hidroxisuccinimida, PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi- tris-pirrolidino fosfônio), entre outros.

As estratégias utilizadas para a síntese de derivados contendo amidas em C-2 com finalidade de obtenção de radiofármacos de *N*-acetilglicosamina foi descrita por diferentes métodos (TADA et al, 1989; MARTÍNEZ et al., 2011). A rota proposta por TADA et al (1989) corresponde a uma síntese *one-pot* iniciada pela síntese do ácido [^{18}F] fluoroacético e sequencial condensação com o cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (Esquema 1.14A). Todavia, a rota sintética proposta por Martínez et al (2011) é composta por 6 etapas, as quais correspondem na proteção do grupo amino do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose com a formação de uma imina, per-*O*-acetilação do carboidrato, remoção da imina para formação da amina, condensação com ácido bromoacético, substituição com o flúor com auxílio de micro-ondas (MW) e finalmente remoção dos grupos acetilas protetores (Esquema 1.14B).

Esquema 1.14 - Rotas sintéticas para obtenção de derivados de *N*-acetilglicosamina marcados com ^{18}F , no grupo *N*-acetil. A- Rota sintética *one-pot* proposta por Tada et al (1989); B- Rota sintética proposta por Martínez et al (2011).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma rota sintética para obtenção de biomarcadores moleculares contendo o átomo de flúor não radioativo (^{19}F), adicionado nas últimas etapas sintéticas, a fim de possibilitar a introdução, posteriormente, do isótopo de flúor radioativo (^{18}F), o qual será útil para a realização de estudos de mecanismos de sinalização, por PET, relacionados ao processo de *O*-GlcNAcilação alterado no tecido cancerígeno.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar derivados de *N*-fluoroacetil-glicosamina com a posição anomérica substituída por um grupo *O*-metil e pelos aminoácidos serina e treonina (Figura 2.1).
- Otimizar o processo de adição do átomo de flúor nas últimas etapas da sequência sintética, a fim de viabilizar posterior introdução do radioisótopo ^{18}F pelo grupo de pesquisa do Dr. Emerson Soares Bernardes (Processo Fapesp nº 2010/18363-4), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).
- Avaliar a atividade inibitória desses derivados de amino açúcares sobre a enzima hidrolase OGA.

Figura 2.1 – Estruturas das moléculas propostas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A identificação da estrutura dos compostos foi realizada com auxílio de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), Correlação Homonuclear $^1\text{H}\times^1\text{H}$ (COSY), espectroscopia de infravermelho (IV) e dados da literatura. As constantes de acoplamento (J) foram calculadas, quando necessário, a partir da média dos valores encontrados.

3.1 Materiais

3.1.1 Aparelhagem analítica

- a) Espectrômetros Bruker ADVANCE DPX-300, DRX-400 e DRX-500 da Universidade de São Paulo foram empregados na obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os deslocamentos químicos (δ) estão descritos em parte por milhão em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.
- b) Espectrômetro de Infravermelho IVFT Nicollet Modelo protege 460.

3.1.2 Aparelhagem laboratorial

- a) Agitador magnético: IKA RCT Basic e Corning PC-320
- b) Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- c) Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- d) Cromatógrafo flash: Biotage HorizonTM
- e) Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- f) Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- g) Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- h) Reator para irradiação de microondas CEM[®] Discover

3.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais

- Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram convenientemente purificados, conforme métodos padronizados na literatura (PERRIN, 1980);
- As análises de cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK®;
- As cromatografias em coluna clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica gel 70-230 mesh (sílica comum), e sílica gel 230-400 µm (sílica flash) da MERCK®.

3.2 Métodos

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-D-glicopiranoose (5)

(CARVALHO e HAINES, 1999)

A uma solução de cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (**4**) (1,02 g, 4,65 mmol) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (1,01 g, 11,9 mmol) em água (14,7 mL), resfriada a 0 °C, foi adicionado, lentamente, cloroformiato de 2,2,2-tricloroetila (0,95 mL, 6,82 mmol). A mistura foi agitada em banho de gelo por 2 horas e mantida à temperatura ambiente durante 19 horas. O precipitado branco formado foi separado por filtração e lavado, sequencialmente, com água e éter etílico. O produto bruto foi recrystalizado em etanol, para a obtenção do produto **5** com rendimento de 64% (1,02 g, 2,99 mmol) R_f 0,6 [DCM: MeOH 8:2 (v:v)].

RMN ¹H (300MHz, CD₃OD) δ_H : 5,15 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, H-1), 4,86 (1 H, d, J 12,1 Hz, CH₂CCl₃ Troc) 4,73 (1 H, J 12,1 Hz, CH₂CCl₃ Troc); 3,86 – 3,77 (2 H, m, H-6a, H-6b), 3,76 – 3,66 (2 H, m, H-3, H-5), 3,59 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,4 Hz, $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 3,42 – 3,34 (1 H, m, H-4) (APÊNDICE A).

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- β -D-glicopiranosídeo de metila (7)

(GAO et al, 2006, CARVALHO e HAINES, 1999)

6 R' = OCH₃, R'' = H

7 R' = H, R'' = OCH₃

Método I: Uma solução de 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-D-glicopiranosose (100 mg, 0,28 mmol) em metanol (5 mL) e resina Amberlite IR 120 (H⁺) (100 mg) foi mantida em refluxo a 70°C por 48 horas. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada para a remoção da resina. O filtrado foi evaporado até secagem e purificado em cromatografia em coluna com *sílica flash* [DCM: MeOH 9:1 (v:v)]. Os produtos **6** e **7** foram obtidos na forma de mistura α/β (1:1) com rendimento de 35% (40 mg, 0,1 mmol), R_f 0,56 (composto **7**) [DCM: MeOH 8:2 (v:v)].

Método II: HCl gasoso anidro foi borbulhado em metanol (6 mL), em frasco equipado com condensador, até a obtenção de uma solução com pH 1. O composto **5** (216 mg, 0,61 mmol) foi introduzido na solução e a mistura foi agitada e refluxada por aproximadamente 14 horas, quando observado que houve paralização da conversão do material de partida ao produto, por CCD. A reação foi cessada por meio da neutralização com a adição de NaHCO₃. Logo após, a solução foi concentrada, diluída em diclorometano (DCM), transferida para funil de separação e extraída com água. A camada orgânica foi separada, seca em sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e concentrada. O produto bruto obtido foi purificado em coluna cromatográfica em *sílica flash* [DCM: MeOH 8:2 (v:v)] obtendo-se os compostos **6** e **7** como um sólido branco na proporção α/β (1:1) com rendimento de 52% (116 mg, 0,32 mmol).

Composto **6** RMN ¹H (300 MHz; CD₃OD) δ_H : 4,84 (1 H, *J* 12,1 Hz, CH₂CCl₃ Troc), 4,71 (1 H, *J* 12,1 Hz, CH₂CCl₃ Troc), 4,70 (1H, d, *J*_{1,2} 2,2 Hz, 1-H), 3,82 (1H, dd, *J*_{5,6b} 2,24 Hz, *J*_{6a,6b} 11,8 Hz, H-6b), 3,68 (1H, *J*_{5,6a} 5,61, *J*_{6a,6b} 11,8 Hz, H-6a), 3,64-3,60 (2H, m, H-2, H-3), 3,59-3,49 (1H, m, H-5), 3,38 (3H, s, OCH₃), 3,36-3,33 (1H, m, H-4) (APÊNDICE B).

Composto **7** RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) δ_{H} : 4,80 (1 H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,72 (1 H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,32 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,2 Hz, 1-H), 3,91 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 1,83 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,9 Hz, H-6b), 3,71 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,7 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,9 Hz, H-6a), 3,50 (3H, s, OCH_3), 3,48-3,36 (3 H, m, H-2, H-3, H-4), 3,30-3,25 (1H, m, H-5) (APÊNDICE C).

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D glicopiranosé(12)

12

Uma suspensão de 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glicopiranosídeo (**5**) (55 mg, 0,16 mmol) em anidrido acético (Ac_2O) (2,5 mL) foi tratada com iodo (25 mg). A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo acompanhada por CCD [EtOAc: Hexano 1:1 (v:v)]. O final da reação foi evidenciado pela formação de uma solução castanho clara. A mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano, tiosulfato de sódio 5% e gelo picado. A mistura foi agitada e a camada orgânica incolor foi transferida para outro funil de separação contendo solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3). A camada aquosa do primeiro funil foi extraída duas vezes com diclorometano e os extratos orgânicos foram reunidos e lavados com Na_2CO_3 até a neutralização. A secagem e concentração da mistura forneceram um óleo viscoso, amarelado, cristalizado durante a secagem em alto vácuo. O produto bruto obtido foi purificado em coluna cromatográfica sílica *flash* [AcOEt: Hexano 1:1 (v:v)] obtendo-se o composto **12** com rendimento de 92% (75 mg, 0,14 mmol), na proporção β/α 1/0,6, R_f 0,44 [AcOEt: Hexano 1:1 (v:v)].

Dados do anomêro β : RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) 6,12 (1 H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,23 (1 H, t, J 9,6 Hz, H-3), 5,13 (1 H, t, J 9,6 Hz, H-4), 4,77 (1 H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,55 (1 H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,21 (1 H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2), 4,15 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 9,6 Hz, $J_{5,6a}$ 3,7 Hz, $J_{5,6b}$ 1,3 Hz, H-5), 4,02-3,94 (2 H, m, H-6a, H-6b), 2,17-1,95 (12 H, m, 4x CH_3CO).

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi- 2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-β - D glicopiranosídeo de metila (8)

Uma suspensão do composto **7** (37 mg, 0,1 mmol) em anidrido acético (Ac_2O) (1,6 mL) foi tratada com iodo (24 mg). A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e acompanhada por CCD [EtOAc: Hexano 1:1 (v:v)]. Após consumo do material de partida, a mistura reacional foi vertida em funil de separação contendo diclorometano, tiosulfato de sódio 5% e gelo picado. A mistura foi agitada e a camada orgânica foi transferida para outro funil de separação contendo solução de Na_2CO_3 . A camada aquosa do primeiro funil foi extraída duas vezes com diclorometano e os extratos orgânicos foram reunidos e lavados com Na_2CO_3 até a neutralização, seguido da secagem e concentração. O produto bruto obtido foi purificado por CCCem sílica *flash* [Hexano: AcOEt 1:1 (v:v)] obtendo-se o composto **8** em 93% (49 mg, 0,09 mmol).

RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} : 5,26 – 5,20 (1H, m, H-4), 5,04 – 4,98 (1H, m, H-3), 4,74 (1H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,58 (1H, J 12,1 Hz, CH_2CCl_3 Troc), 4,48 (1H d, $J_{1,2}$ 8,3 Hz, H-1), 4,23 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 4,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6b), 4,08 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 2,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a), 3,67-3,61 (1H, m, H-5), 3,60-3,51 (1H, m; H-2), 3,45 (3H, s, OCH_3), 2,05-1,94 (9H, m, 3x CH_3CO) (APÊNDICE D).

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-β -D-glicopiranosídeo de metila (9)

(CARSON, 1981; CARVALHO e HAINES, 1999)

Método I: A uma solução 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-(2',2',2''-tricloro-etoxicarbonilamino)- β -D-glicopiranosideo de metila (**8**) (50 mg, 0,1 mmol) em THF (1 mL) e tampão fosfato KH_2PO_4 1 M (0,5 mL) foi introduzido zinco em pó (148 mg). A mistura resultante foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 9 horas e, então, foi filtrada em kieselghur com auxílio de THF e concentrada. O material bruto obtido foi rediluído em diclorometano e foi adicionada piridina (0,1 mL). A mistura foi agitada durante 2 horas. A fase orgânica foi lavada com H_2O , seca em sulfato de magnésio e, novamente, concentrada. O produto bruto foi purificado parcialmente, em coluna cromatográfica contendo sílica-gel 60 [Éter etílico: Trietilamina (5:1)], para obtenção de **9**.

Método II: A uma solução 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-(2',2',2''-tricloro-etoxicarbonilamino)- β -D-glicopiranosideo de metila (**8**) (43 mg, 0,09 mmol) em ácido acético glacial (AcOH) (1 mL) foi introduzido zinco em pó ativado (200 mg) [tratado com solução aquosa de HCl 2 mol.L⁻¹, e lavado em sequência com água, acetona, éter etílico e, em seguida, seco sobre vácuo, em porções. A mistura foi mantida sobre agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Logo após, o sólido foi filtrado, e ácido acético foi evaporado por pressão reduzida. O resíduo foi diluído em AcOEt e neutralizado com solução saturada de NaHCO_3 , a fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio (MgSO_4) e concentrada sobre pressão reduzida.

RMN ¹H (500 MHz; CD_3OD) δ_{H} : 4,33 – 4,84 (6H, m, H-1, H3-H6a, H6b), 3,41 (3H, s, OCH_3), 2,94-2,87 (1H, m, H-2) 2,15-1,83 (9 H, m, 3x CH_3CO).

2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (**13**)

(ALPER et al, 1996)

13

Uma solução do reagente trifil azida (TfN_3) foi preparada através da dissolução de azida de sódio (NaN_3) (6 g, 92,4 mmol) em água destilada (15,0 mL), seguida da adição de diclorometano (24 mL), resfriamento a 0°C e adição de anidrido trifílico (3 mL, 18 mmol) ao

longo de 10 minutos. Decorridas 2 horas de reação à temperatura de 0°C, a fase orgânica foi separada da aquosa em funil de separação e extraída com DCM (2 x 12,0 mL). As frações da fase orgânica foram combinadas e neutralizadas com solução saturada de Na₂CO₃, e usadas sem purificação adicional.

Uma solução de cloridrato 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (2,0 g; 9,3 mmol) em água (30,0 mL) foi tratada com carbonato de potássio (K₂CO₃) (2,3 g) e sulfato de cobre (CuSO₄) (14 mg). Posteriormente, foi adicionado metanol (60,0 mL) e a solução de TfN₃, preparada anteriormente, seguida da adição de, aproximadamente, 30 mL de metanol para a obtenção de um meio reacional homogêneo. A reação foi monitorada por CCD [DCM: Metanol 8:2 (v:v)]. O sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas. Após total conversão do material de partida, a reação foi cessada por meio da concentração em evaporador rotativo, purificada por filtração em sílica gel [DCM: Metanol 8:2 (v:v)] para a obtenção do composto **13** em rendimento quantitativo, R_f 0,40 [DCM: Metanol 8:2 (v:v)].

Dados do anômero β : RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ_H : 4,69 (1H, d, *J* 8,2 Hz, H-1), 3,91-3,80 (2H, m, H-6a, H-6b), 3,78-3,68 (1H, m, H-5), 3,53-3,40 (2H, m, H-2, H-3), 3,26 (1H, t, *J* 8,9 Hz, H-4). **IV** (KBr): banda característica do azido em: 2129 cm⁻¹, e hidroxila em 3387 cm⁻¹ (APÊNDICE E).

1,3,4,6-tetra-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (**14**)

(VALLINAYAGAM et al, 2008)

Método I: A uma solução do composto **13** (100 mg, 0,49 mmol) em DMF (2 mL), sob condições anidras, foi adicionado brometo de benzila (BnBr) (0,3 mL, 2,51 mmol). A mistura reacional foi resfriada, em sequência, a 0°C e adicionou-se hidreto de sódio (NaH) (67 mg, 2,94 mmol, 60% dispersão em óleo), em porções. A reação foi mantida à temperatura ambiente, e acompanhada por CCD [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada, com banho de gelo, e adicionado metanol (5 mL). A solução foi concentrada em evaporador rotatório e dissolvida em acetato de etila. A solução foi lavada

com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e seca com sulfato de magnésio (MgSO₄). O material bruto foi purificado por cromatografia em coluna *flash* [Hexano: AcOEt 0-30%, por gradiente], obtendo o produto **14** na forma de um óleo viscoso amarelado com rendimento de 14% (39 mg; 0,07 mmol) R_f 0,41[Hexano: AcOEt 7: 3 (v: v)].

Método II: Sob condições anidras, o composto **13** (100 mg g; 0,49 mmol) foi dissolvido em dimetilformamida anidra (1,5 mL). A solução foi resfriada a 0°C e, em seguida, adicionadas porções de hidreto de sódio (NaH 60% em óleo mineral) (120 mg, 3,08 mmol). A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, uma solução contendo iodeto de tetrabutilamônio (TBAI) (9 mg; 0,025 mmol) e brometo de benzila (BnBr) (0,365 mL; 3,08 mmol) foi adicionada, lentamente, à mistura reacional, permanecendo sob agitação por um período adicional de 24 horas. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada, com banho de gelo, e adicionado metanol (5 mL). A solução foi concentrada em evaporador rotatório e dissolvida em acetato de etila. A solução foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e seca com sulfato de magnésio (MgSO₄). O material bruto foi purificado por CCC em sílica *flash* [Hexano: AcOEt 0-30%, por gradiente], obtendo o produto **14** na forma de um óleo viscoso amarelado com rendimento de 15% (40 mg; 0,08 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,35 - 7,05 (20H, m, CH arom.), 4,90 – 4,44 (8H, m, 4x CH₂ arom.), 4,26 (1H, d, *J*_{1,2} 8,0 Hz, H-1), 3,71-3,61 (2H, m, H-6a, H-6b), 3,59-3,53 (1H, m, H-4), 3,47-3,40 (1H, m, H-2), 3,38-3,30 (2H, m, H-3, H-5) (APÊNDICE F).

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosose (**25**)

(ALPER et al, 1996)

25

Uma solução do reagente trifil azida (TfN₃) foi preparada através da dissolução de azida de sódio (NaN₃) (3 g, 46,2 mmol) em água destilada (7,0 mL), seguida da adição de diclorometano (12 mL), resfriamento a 0°C, e adição de anidrido trifílico (1,5 mL, 9 mmol) ao

longo de 10 minutos. Decorridas 2 horas de reação, à temperatura de 0°C, a fase orgânica foi separada da aquosa, em funil de separação, e extraída com DCM (2 x 6,0 mL). As frações da fase orgânica foram combinadas e neutralizadas com solução saturada de Na₂CO₃, e usadas sem purificação adicional.

Uma solução de cloridrato 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (1,0 g; 4,65 mmol) em água (15,0 mL) foi tratada com carbonato de potássio (K₂CO₃) (1,15 g) e sulfato de cobre (CuSO₄) (7 mg). Posteriormente, foi adicionado metanol (30,0 mL) e a solução de TfN₃, preparada anteriormente, seguida da adição de, aproximadamente, 15 mL de metanol para a obtenção de um meio reacional homogêneo. A reação foi monitorada por CCD [DCM: Metanol 8:2 (v:v)]. O sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas. Após total conversão do material de partida a reação foi cessada por meio da concentração em evaporador rotativo.

O produto bruto, sem purificação por filtragem, foi dissolvido em piridina (Py) (25,0 mL), tratado com anidrido acético (Ac₂O) (15,0 mL) e agitado à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, a mistura foi concentrada e extraída com acetato de etila, lavada com água e purificada por cromatografia em coluna *flash* [Hexano: AcOEt 0-30%, por gradiente (v:v)]. O composto **25** foi obtido com rendimento de 98% (1,79 g; 4,81 mmol), R_f 0,44 [Hexano: AcOEt. 1: 1 (v:v)].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 5,56 (1H, d, $J_{1,2}$ 8, 6 Hz, H-1), 5,13-5,02 (2H, m, H-3, H-4), 4,31 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 4,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,5 Hz, H-6a), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,5 Hz, H-6b), 3,81 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 9,7 Hz; $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{5,6a}$ 4,4 Hz, H-5) 3,71-3,65 (1H, m, H-2), 2,22-2,02 (12H, 4s, 4 COCH₃). **IV** (KBr): banda característica do azido em: 2117 cm⁻¹, e carbonila em 17493 cm⁻¹ (APÊNDICE G).

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (**26**)

(KALIKANDA e LI, 2011)

26

A uma solução do composto 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desóxi-D-glicopiranosose (**25**) (200 mg; 0,54 mmol) em DCM anidro (1 mL) mantida sob atmosfera inerte de N₂, foi adicionado *p*-toluenotiol (TolSH) (100 mg; 0,80 mmol) e trifluorboroeterato (BF₃.Et₂O) (0,135 mL; 1,07 mmol), a qual foi mantida sob agitação por 48 horas. A mistura reacional foi, então, neutralizada com a adição de Et₃N, concentrada e purificada por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **26** foi obtido com rendimento de 56 % (132 mg; 0,30 mmol;) na proporção α/β de 1:0,7, R_f 0,24 [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)].

Dados do anômero α : RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 7,2-7,1 (4H, m, CH arom.), 5,57 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,7 Hz, H-1), 5,34 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 9,3 Hz, H-3), 5,10-5,03 (1H, m, H-4), 4,29 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,1 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a), 4,09 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,2 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3, H-6b), 3,81 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 10,2 Hz; $J_{5,6b}$ 2,2 Hz; $J_{5,6a}$ 5,14 Hz, H-5) 3,71-3,65 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,6 Hz; $J_{2,3}$ 10,2 Hz, H-2), 2,31 (3H, s, CH₃Ph), 2,13-2,00 (9H, 3s, 3 COCH₃) (APÊNDICE H).

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (**28**)

(KALIKANDA e LI, 2011)

28

O composto **26** (207 mg; 0,47 mmol) foi diluído em metanol (5 mL), tratado com uma solução de NaOMe (1 mol.L⁻¹) até pH 10, e mantido sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, foi adicionado resina Dowex[®] 50WX8-200 (45 mg), previamente tratada com metanol, para neutralizar a reação. A resina foi filtrada, e a solução resultante foi concentrada e filtrada em sílica gel comum [DCM: MeOH 8:2] obtendo o composto **27** com rendimento de 71 % (105 mg; 0,34 mmol).

A uma solução do composto **27** (156 mg, 0,5 mmol) e brometo de benzila (BnBr) (0,357 mL, 3,00 mmol) em DMF anidro (3 mL) resfriada a 0°C, foi adicionado, lentamente, hidreto de sódio (NaH) (60% em óleo mineral) (120 mg, 3,00 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente e agitada durante 24 horas. Após esse período, foram adicionadas água (6 mL) e a solução extraída com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água (3 x 20 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (2 x 20 mL); e secada com

MgSO₄. A solução foi concentrada e purificada por CCC em sílica *flash* [Hexano: AcOEt 0-20%, por gradiente]. O composto **28** foi obtido na forma de uma mistura α/β 0,5/1 com rendimento de 84% (245 mg; 0,42 mmol), R_f 0,42 [Hexano: AcOEt 8:2 (v: v)].

Dados do anômero α : RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,52 – 7,01 (19H, m, CH arom.), 5,53 (1H, d, J 5,3 Hz, H-1) 4,41 – 4,36 (1H, m, H-5), 4,94-4,41 (6H, m, CH₂ arom.), 3,93 (1H, dd, $J_{1,2}$ 5,3 Hz; $J_{2,3}$ 10,1 Hz H-2), 3,86-3,78 (2H, m, H-3; H-4) 3,78 – 3,74 (1H, m, H-6b), 3,64 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 1,9 Hz; $J_{6a,6b}$ 10,8 Hz, H-6b), 2,31 (3H, s, CH₃Ph) (APÊNDICE I).

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopirranose (**15**)

(KALIKANDA e LI, 2011)

15

A uma solução do composto **28** (95 mg, 0,16 mmol), em acetona-água (9:1, 5 mL), foi adicionado *N*-iodosuccinimida (NIS) (113 mg, 0,49 mmol), e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente, por 6 horas. Em seguida, foi adicionado NaHCO₃ sólido, até neutralização da reação e concentrada a mistura reacional. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila e lavado com água. A fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄, concentrada, e purificada por cromatografia em coluna *flash* (Hexano: AcOEt 0-30%, por gradiente). O composto **15** foi obtido na forma de uma mistura α/β 1/0,5, com rendimento de 72% (56 mg; 0,12 mmol) R_f 0,2 [Hexano: AcOEt 7:3 (v: v)].

Dados do anômero α : RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,35-7,02 (15H, m, CH arom.), 5,24 (1H, d, $J_{1,2}$ 5,74 Hz, H-1), 4,89-4,37 (6H, m, CH₂ arom.), 4,07-3,98 (2H, m, H-3, H-5), 3,67-3,35 (4H, m, H-2, H-4, H-6ab) (APÊNDICE J).

2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzil-2-desoxi-1-*O*-(2,2,2-tricloroacetimidoil)- α -D-glicopiranosose

(16) (KALIKANDA e LI, 2011)

16

Uma solução de 3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desóxi-D-glicopiranosose (**15**) (100 mg; 0,21 mmol) em DCM anidro (5,0 mL) foi resfriada a 0°C, em banho de gelo, e submetida à atmosfera inerte (N₂). Tricloroacetoneitrila (CCl₃CN) (0,21 mL; 2,1 mmol) e 1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (9 µL; 0,06 mmol) foram adicionados à solução, que foi agitada por 2 horas, nas condições já mencionadas. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada e purificada por CCC em sílica *flash* [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. O composto **16** foi obtido com rendimento de 72% (94 mg; 0,15 mmol) R_f 0,4 [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 8,74 (1 H, s, NH); 6,47 (1 H, d, *J*_{1,2} 3,5 Hz, H-1), 5,00-4,47 (6H, m, CH₂ arom.), 4,10-3,88 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 3,84 (1H, dd, *J*_{5,6a} 3,00 Hz; *J*_{6a,6b} 11,0 Hz, H-6a), 3,75-3,67 (2H, m, H-2, H-6b) (APÊNDICE K).

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico (17)

(NGUYEN et al, 1985)

17

Uma solução de ácido *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina carboxílico (1,00 g; 3,06 mmol) em etanol (2 mL) foi resfriada a 0°C e, lentamente, neutralizada com solução aquosa de carbonato de cério (Cs₂CO₃) (0,50 g; 1,53 mmol). A mistura foi agitada por 1 hora e 30 minutos e concentrada em evaporador rotatório. A água foi removida por uma série de

co-evaporações com tolueno até secagem. O sal de cézio formado foi dissolvido em DMF (7 mL) e tratado com brometo de benzila (BnBr) (0,39 mL; 3,33 mmol). Após 4 horas sob agitação, o subproduto brometo de cézio (CsBr), precipitado, foi removido por filtração, e o filtrado resultante foi submetido à secagem em ar comprimido para remoção do solvente DMF. O produto foi extraído com DCM, lavado com solução saturada de NaHCO₃, seco com MgSO₄ e concentrado. O composto **17** foi cristalizado a partir de acetato de etila e hexano e o sólido branco foi obtido com rendimento de 83,6 % (1,09 g; 2,56 mmol) R_f 0,44 [Hexano: AcOEt 1: 1 (v: v)].

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ_H: 7,77 (2 H, d, *J* 7,49 Hz, CH Fmoc arom.), 7,60 (2 H, d, *J* 7,4 Hz, CH Fmoc arom.), 7,44-7,25 (9 H, m, CH benzil arom., CH Fmoc arom.), 5,73 (1 H, d, *J* 7,4 Hz, NH Ser), 5,23 (2 H, s, CH₂ benzil), 4,53-4,46 (1 H, m, CH Ser), 4,47-4,39 (2 H, m, CH₂ Fmoc), 4,21 (1 H, t, *J* 6,8 Hz, CH Fmoc), 4,09-3,89 (2 H, ddl, CH₂ Ser), 2,20-2,98 (1 H, sl, OH Ser) (APÊNDICE L).

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina benzílico (**18**)

(NGUYEN et al, 1985)

Uma solução de ácido *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina carboxílico (200 mg; 0,586 mmol) em etanol (0,6 mL) foi resfriada a 0°C e, lentamente, neutralizada com solução aquosa de carbonato de cézio (Cs₂CO₃) (95 mg; 0,293 mmol). A mistura foi agitada por 1 hora e 30 minutos, e concentrada em evaporador rotatório. A água foi removida por uma série de co-evaporações com tolueno até secagem. O sal de cézio formado foi dissolvido em DMF (0,6 mL) e tratado com brometo de benzila (BnBr) (83 µL; 0,70 mmol). Após 4 horas sob agitação, o subproduto brometo de cézio (CsBr), precipitado, foi removido por filtração, e o filtrado resultante foi submetido à secagem em ar comprimido para remoção do solvente DMF. O produto foi extraído com DCM, lavado com solução saturada de NaHCO₃, seco com MgSO₄ e concentrado. O composto **18** foi cristalizado a partir de acetato de etila e hexano e o

sólido branco foi obtido com rendimento de 70 % (177 mg; 0,41 mmol) Rf 0,55 [Hexano: AcOEt 1: 1 (v: v)].

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7,77 (2 H, d, J 7,50 Hz, CH Fmoc arom.), 7,60 (2 H, d, J 7,40 Hz, CH Fmoc arom.), 7,48-7,24 (9 H, m, CH benzil arom., CH Fmoc arom.), 5,60 (1 H, d, J 9,1 Hz, NH Thr), 5,22 (2 H, J_{AB} 12,3 Hz, CH_2 benzil), 4,50-4,31 (4 H, m, $\alpha\text{-CH}$ Thr, $\beta\text{-CH}$ Thr, CH_2 Fmoc), 4,23 (1 H, t, J 7,0 Hz, CH Fmoc), 1,91 (1 H, sl, OH Thr), 1,25 (3 H, t, J 7,7 Hz, CH_3 Thr) (APÊNDICE M).

3,4,6-tri-*O*-benzil-D-glicial (30)

(MADHUSUDAN et al, 2005)

30

Para uma solução de 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glicial (150 mg, 0,55 mmol) em THF (1 mL) foram adicionados NaOH (134 mg, 3,35 mmol), TBAI (5 mg, 0,013 mmol), e brometo de benzila (0,295 mL, 2,48 mmol), sucessivamente, e a mistura reacional foi agitada, energeticamente, por 3 horas, à temperatura ambiente. Depois de completa, por meio do monitoramento por CCD, a mistura reacional foi vertida em água e extraída com DCM. A fase orgânica foi lavada com água, seca (Na_2SO_4), e concentrada até secagem. O produto bruto da reação foi purificado por CCC com sílica *flash* [Hexano: AcOEt 7: 3 (v: v)]. Para obtenção de 2,4,6-tri-*O*-benzil-D-glicial (170 mg, 0,41 mmol 74%), Rf 0,51 [Hexano: AcOEt 7: 3 (v: v)].

RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7,31 – 7,16 (15H, m, CH arom.), 6,36 (1H, dd, $J_{1,2}$ 6,1 Hz, $J_{1,3}$ 1,2 Hz, H-1), 4,81 (1H, dd, $J_{1,2}$ 6,1 Hz, $J_{2,3}$ 2,68 Hz, H-2), 4,79-4,46 (6H, m, CH_2 arom.), 4,15 (1H, ddd, $J_{3,4}$ 5,8 Hz, $J_{3,2}$ 2,4 Hz, $J_{3,1}$ 1,4 Hz, H-3), 4,00 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 8,2 Hz, $J_{5,6b}$ 5,0 Hz, $J_{5,6a}$ 2,9 Hz, H-5), 3,80 (1H, dd, $J_{3,4}$ 6,2 Hz, $J_{4,5}$ 8,7 Hz, H-4), 3,75 (1H, dd, $J_{6a,6b}$ 10,7 Hz, $J_{5,6b}$ 5,0 Hz, H-6b), 3,70 (1H, dd, $J_{6a,6b}$ 10,7 Hz, $J_{5,6a}$ 2,9 Hz, H-6a) (APÊNDICE N).

2-desoxi-2-[[[(4-metilfenil)sulfonil]oxi]-acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopiranoose
(35) (BANERJEE, et al, 2006)

Uma solução do ácido {[[(4-metilfenil)sulfonil]oxi} acético (53,5 mg, 0,23 mmol), dicioexilcarbodiimida (DCC) (52,73 mg, 0,256 mmol) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (34,56 mg, 0,256 mmol) em DMF (1 mL) foi agitada por 1 hora, sob atmosfera de argônio. Uma solução de cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (**4**) (100 mg, 0,47 mmol) em DMF (1 mL) foi adicionada, seguida pela adição de uma solução de NaHCO₃ (39 mg, 0,47 mmol) em água (1 mL). Após agitação por 24 horas, em temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

O produto bruto, sem purificação por filtragem, foi dissolvido em piridina (Py) (2,5 mL), tratado com anidrido acético (Ac₂O) (1,5 mL) e agitado, à temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, a mistura foi concentrada, extraída com acetato de etila, lavada com água e purificada por CCC em sílica *flash* [Hexano: AcOEt 6: 4 (v:v)]. O composto **35** foi obtido na forma de uma mistura α/β 1/0,6 com rendimento de 8% (10 mg; 0,02 mmol), R_f 0,41 [Hexano: AcOEt 6: 4 (v:v)].

Dados do anômero α RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ_H : 7,67-7,39 (4H, m, CH arom), 6,29 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 5,25 (1H, t, J 9,7 Hz, H-3), 5,17 (1H, t, J 9,6 Hz, H-4), 4,95 (1H, d, J 15,9 Hz, CH₂OTs), 4,85 (1H, d, J 15,9 Hz, CH₂OTs), 4,65-4,55 (1H, m, H-2), 4,37 – 4,03 (3H, m, H-5, H-6a, H-6b) 2,33 (1H, s, H-1), 2,19 – 1,99 (12H, m, 4 s, 4 COCH₃).

2-desoxi-2-(2-benziloxi)-acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopiranoose (43)

(LAUGHLIN et al, 2006)

A uma solução de cloridrato de 2-amino-2-desoxi- α -D-glicose (25 mg, 0,12 mmol) e ácido benziloxiacético (23 μ L, 0,16 mmol) em THF (1 mL) foi adicionado trietilamina (25 μ L, 0,18 mmol), e a mistura reacional foi agitada por 5 minutos, à temperatura ambiente. A solução foi resfriada a 0°C e foi adicionado HOBt (10 mg, 0,07 mmol), seguido por DCC (31,5 mg, 0,15 mmol). A reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente, durante a noite, e acompanhada por CCD [DCM: MeOH 9: 1 (v: v)]. Concentrou-se a solução, e o produto bruto foi purificado por CCC em sílica *flash* [DCM: MeOH 9: 1 (v: v)]. O composto **42** foi obtido com rendimento de 8%, Rf 0,14 [DCM: MeOH 9: 1 (v:v)].

O composto **42** (3 mg; 0,01 mmol) foi dissolvido em anidrido acético (Ac₂O) (1,5 mL), tratado com iodo (I₂) (2 mL) e agitado à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, a mistura foi concentrada, extraída com acetato de etila, lavada com tiosulfato de sódio 5%, seca e concentrada para obtenção do composto **43**.

Dados do produto observado na mistura RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) δ_H : 7,62 - 7,22 (5H, m, CH arom.), 5,46 (1H, d, *J* 8,46 Hz, H-1), 4,65-4,47 (4H, m, CH₂Obenzil, CH₂ arom.), 4,39-3,80 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-6a, H-6b), 3,78 – 3,72 (1H, m, H-5), 2,19 – 1,87 (12H, m, 4 s, 4 COCH₃).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rota sintética para obtenção dos produtos de interesse foi planejada para a) permitir a inclusão do átomo de flúor, por meio de uma reação S_N2 em uma etapa final, ou próxima à etapa final, para a geração de intermediários que possam, posteriormente, sofrer a adição do átomo de flúor radioativo ^{18}F , empregando o método de marcação direta, e b) permitir a obtenção dos derivados glicopiranosídeos preferencialmente na configuração β .

A reação de halogenação será realizada empregando o reagente fluoreto de potássio e Kriptofix 2.2.2, em combinação com carbonato de potássio (K_2CO_3), de forma semelhante ao que ocorre quando utilizado o isótopo ^{18}F . Estas condições reacionais tornam o meio bastante básico, portanto, será necessária a proteção dos grupos lábeis, tais como álcoois e aminas, presentes nos intermediários sintéticos para evitar reações paralelas. Assim, de acordo com requisitos necessários, foram propostas, inicialmente, duas rotas sintéticas, uma para a síntese do derivado glicopiranosídeo de metila **1** e outra para os glicoaminoácidos **2** e **3**, ambas utilizando o reagente cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**) como precursor, comercialmente disponível por preço reduzido.

4.1 Obtenção do derivado glicopiranosídeo de metila **1**

Para a obtenção do composto **1**, foram propostas as etapas sintéticas demonstradas no Esquema 4.1.

Esquema 4.1 – Rota sintética planejada para obtenção do glicopiranosídeo de metila 1.

Uma etapa importante da rota sintética (Esquema 4.1) envolve a reação de glicosilação entre o composto **5** e o metanol. No entanto, a proteção inicial do grupo amino é de extrema importância, pois a formação de um glicosídeo a partir do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (Esquema 4.2), só ocorre em condições drásticas com o emprego de catálise ácida (HCl) em tubo selado a 150°C e fornece baixo rendimento do glicopiranosídeo **11** (30 %, da mistura de anômeros na proporção 1:1) (UMEZAWA, 1966).

Esquema 4.2 – Reação de formação do glicopiranosídeo a partir do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose.

Uma possível explicação proposta por Neuberger e Rivers (1939) para a baixa reatividade do carbono anomérico (C-1) de 2-amino-2-desoxi-D-glicose está relacionada à

presença do grupo NH_3^+ em C-2 próximo da posição α -anomérica, o qual provoca repulsão da aproximação do próton (I), necessário para a geração do íon oxônio ligado ao anel pirano (II) e, conseqüentemente, impede a formação do íon oxocarbênio e o ataque nucleofílico do metanol (III) (Esquema 4.3). Por outro lado a formação do carbocátion ou íon oxacarbênio poderia ocorrer por meio da doação do próton do grupo amino para a hidroxila na posição anomérica, seguido da eliminação de uma molécula de água, no entanto, como a reação não ocorre normalmente pode ser sugerido que o problema relativo a repulsão seja prioritário.

Esquema 4.3 – Demonstração do mecanismo necessário para formação do composto **11** a partir do cloridrato de glicosamina.

O grupo Troc (tricloroetoxicarbonila) foi escolhido para proteção da função amino do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**) por apresentar fácil formação com o emprego do cloreto de tricloroetoxicarbonila, remoção em condições brandas, por exemplo, Zn/AcOH , e também promover a ativação anquimérica e orientar a posterior glicosilação na conformação β . Portanto, usando estas condições o intermediário carbamato **5** foi obtido em 64% de rendimento, após recristalização a partir de etanol (Esquema 4.4).

Esquema 4.4 – Proteção do grupo amino em C-2, formação do carbamato **5**.

Para obtenção do glicopiranosídeo de metila **7** desejado, foi realizada a reação de glicosilação com o carbamato **5**, como doador glicosídico, empregando o método clássico de

Fischer, ou seja, catálise ácida e o metanol atuando como acceptor glicosídico e solvente. Inicialmente, a reação foi realizada com o emprego da resina ácida, Amberlite IR-120, como catalisador, e aquecimento convencional a 70 °C (GAO et al, 2006). Todavia, a glicosilação resultou em uma mistura de anomeros α/β (1:1) com 35% de rendimento, após purificação por CCC, relativo aos derivados glicopiranosídeos **6** e **7**. Algumas alternativas foram exploradas para obtenção majoritária do composto β **7**, como o emprego de reação em microondas (300 W, 70 °C de 2-10 minutos) (BORNAGHI e POULSEN, 2005) e a utilização de outra resina ácida (Dowex[®]), as quais conduziram a resultados semelhantes aos obtidos com o emprego da Amberlite IR-120. A substituição da resina por ácido clorídrico gasoso foi uma das alterações mais convenientes, permitindo a obtenção da mistura de anomeros em 52% de rendimento, na mesma proporção anterior (1:1) (Esquema 4.5).

Tanto a caracterização estrutural quanto a relação da proporção entre os anomêros foram realizadas por meio de RMN ¹H. Diferentemente da forma convencional, a proporção dos hidrogênios anoméricos foi realizada pelo valor da integral relativa dos hidrogênios do grupo metoxílico (3H) uma vez que o sinal do hidrogênio anomérico do produto α , composto **6**, apresentava-se sobreposto ao sinal dos hidrogênios metilênicos do grupo *NH*-Troc (4,71 ppm). Assim, o isolamento dos compostos (**6** e **7**), via purificação por cromatografia em coluna com *silica flash* [DCM: MeOH 9:1 (v:v), permitiu identificar os sinais dos correspondentes grupos metoxílicos em 3,38 ppm (produto α **6**) e 3,50 ppm (produto β **7**) e assim utilizá-los como padrão para cálculo da proporção obtida (1:1).

Esquema 4.5 – Glicosilação de Fischer empregada para obtenção do glicopiranosídeo **7**.

A investigação mais detalhada desta reação mostrou por cromatografia em camada delgada, fase móvel DCM: MeOH (9:1), a formação de alguns subprodutos, os quais podem ser oriundos de reações cruzadas com as demais hidroxilas livres do carboidrato, comum em

glicosilações de Fischer. Tentativas de proteção das hidroxilas com grupo acetila (anidrido acético e iodo), para também possibilitar o uso de condições reacionais mais brandas, forneceu o produto protegido per-*O*-acetilado **12** em alto rendimento (92 %). No entanto, a reação subsequente de glicosilação de **12** usando trifluorboroeterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) e metanol em diclorometano (LIN e WALSH, 2004) não foi satisfatória devido à recuperação em grande proporção do material de partida. Adicionalmente, a tentativa de conversão de **12** a **8**, empregando NIS e ácido trifílico (TfOH) como catalisador (SUBRAMANIAM et al, 2011), também conduziu à recuperação do material de partida (Esquema 4.6).

Esquema 4.6 – Etapas sintéticas para otimizar a obtenção do glicopiranosídeo de metila **8**.

Com base nos resultados anteriormente obtidos, os anômeros **6** e **7** foram separados e o correspondente derivado β foi selecionado para dar continuidade às reações mostradas no Esquema 14. A proteção das hidroxilas de **7** na presença de anidrido acético e iodo, conduziu à obtenção do intermediário **8** em 93% de rendimento. A obtenção do intermediário **9** foi explorada, inicialmente, utilizando as condições reacionais clássicas de desproteção do grupo carbamato Troc com zinco (Zn) em ácido acético glacial (AcOH) (WINDHOLZ et al, 1967). No entanto, não houve a formação do produto desejado, sendo recuperado o material de partida.

Em contrapartida, a utilização do método descrito por Carson (1981) e modificado por Carvalho e Haines (2000), empregando Zn /THF/tampão fosfato, demonstrou possível desproteção, indicada por CCD [Hexano: AcOEt 1:1 (v: v)] e revelação com solução de ninidrina, e pelo desaparecimento do sinal do grupo metileno de Troc em 4,78-4,54 ppm no espectro de RMN de ^1H , após purificação parcial da mistura. Porém, não houve conversão total do produto, não sendo possível a purificação completa do produto devido à formação de misturas complexas. No entanto a reação seguinte com ácido bromo-acético foi testada a partir de **9** na forma bruta, após filtração em celite para remoção do zinco. A reação foi realizada pelo tratamento de **9** com dicicloexilcarbodiimida (DCC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), e ácido bromoacético, porém, não foi observada a formação do produto desejado **10**.

Frente aos problemas encontrados, a reação foi novamente realizada empregando o método clássico (Zn, AcOH), mas utilizando zinco previamente tratado com solução aquosa de HCl 2 mol.L⁻¹, para remoção da possível camada de óxido da superfície do zinco que poderia diminuir seu potencial redutor (DE NISCO et al, 2012; PERRIN, 1980). Assim, após o tratamento do composto **8** com zinco ativado e ácido acético por 8 horas, foi verificada a conversão total do composto **8** a um produto majoritário, evidenciado por CCD [Hexano: AcOEt 1:1 (v: v)]. A permanência do produto no ponto de aplicação mesmo após eluição em CCD utilizando o eluente acetato de etila 100%, indicou possível formação do produto **9** na forma de sal acetato.

Desta forma, a reação foi filtrada em celite para remoção do zinco, e sequencialmente concentrada, diluída em acetato de etila e lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para neutralização do meio, porém, mesmo após esse tratamento, o produto manteve o mesmo comportamento demonstrado anteriormente. A amostra foi analisada por RMN ¹H e demonstrou os sinais esperados do produto **9** com o sinal dos hidrogênios do grupo metoxílico em 3,41 ppm, e blindagem do H-2 de 3,60-3,51 ppm, do material de partida **8**, para 2,94-2,87 ppm e desaparecimento do sinal referente aos hidrogênios metilênicos do grupo Troc em 4,78-4,54 ppm (Figura 4.1). O cálculo do rendimento foi dificultado pela possível presença de resíduos de zinco na amostra, o qual pode estar complexado com o produto **9**. Mesmo assim, o rendimento bruto foi de 21% após filtração em celite.

Figura 4.1 – Espectros de RMN ¹H dos compostos **8** e **9** demonstrando deslocamento do sinal referente ao H-2 do carboidrato. A - Espectro de RMN ¹H do produto desejado **9**; B – Espectro de RMN ¹H do material de partida **8**.

Novos experimentos estão em andamento para obtenção de maior rendimento e remoção do zinco residual pela sequencial extração do produto com solução de EDTA.

4.2 Obtenção do glicoaminoácidos 2 e 3

Para a obtenção dos derivados glicoaminoácidos **2** e **3** foi planejada, inicialmente, a rota sintética demonstrada no Esquema 4.7. A proposta foi fundamentada na obtenção de um doador glicosídico contendo o grupo tricloroacetimidato e as hidroxilas protegidas com grupos benzílicos, composto **16**, e na utilização do aceptor glicosídico serina **17** e treonina **18**, contendo os grupos amino e carboxila protegidos com 9-fluorenilmetóxicarbonil (Fmoc) e benzil (Bn), respectivamente.

Dentre os doadores glicosídicos mais comumente utilizados podem ser citados os haletos, acetatos, tricloroacetimidatos e tioglicosídeos. Embora a utilização de doadores contendo haletos seja a mais aplicada, existem algumas desvantagens, tais como baixa estabilidade térmica e grande sensibilidade à hidrólise, bem como a necessidade de agentes promotores tóxicos, como sais de metais pesados. O doador glicosídico contendo o grupo tricloroacetimidato foi escolhido devido a sua maior estabilidade química, obtenção em bom rendimento (JACOBSSON, MALMBERG e ELLERVIK, 2006; van WELL et al, 2006) e utilização de promotores orgânicos, tais como TMSOTf. Por outro lado, a proteção do doador com grupos benzílicos permitiria a remoção, em somente uma etapa, de ambos os grupos protetores do produto glicosilado (**2** ou **3**), *N*-Fmoc e *O*-Bn, empregando a reação de hidrogenólise, H₂, Pd/C. Assim, a abordagem de desproteção em somente uma etapa dos grupos protetores promoveria um menor número de etapas reacionais.

Como descrito para o produto **1** (Esquema 4.1), o grupo carbamato *N*-Troc em C-2 poderia ter sido utilizado na rota apresentada no Esquema 4.7, no entanto, as dificuldades de obtenção de doadores glicosídicos contendo simultaneamente os grupos Troc e tricloroacetimidato (CAMPO, 2007), conduziu ao emprego do grupo azido em C-2. Embora este não exerça ativação anquimérica, ele também permitiria a obtenção de mistura de anômeros por meio da exploração de condições reacionais, tais como temperatura e solvente. Adicionalmente, a conversão da função azido ao amino poderia ser realizada de forma branda e ortogonal.

Finalmente, a estratégia descrita no Esquema 4.7 permite que as duas últimas etapas possam ser alternativamente modificadas, caso haja problemas da degradação do

glicoaminoácido por meio de beta-eliminação, nas condições básicas [KF/Kriptofix 2.2.2/Carbonato de Potássio (K_2CO_3)], necessárias na etapa de introdução do átomo de flúor. Por exemplo, o flúor poderia ser adicionado como um grupo prostético, com a substituição do ácido bromoacético pelo ácido fluoracético (LI, DOMARKAS e O'HAGAN, 2010; TANG et al, 2008) na etapa de condensação, ou seja, conversão do produto **21** para o **23**.

Esquema 4.7 – Rota sintética utilizada para obtenção do glicoaminoácidos **2** e **3**.

4.2.1 Síntese do doador glicosídico tricloroacetimidato

A partir do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**), foi realizada a reação de diazotransferência, para obtenção do intermediário **13** com rendimento quantitativo, após

purificação por filtragem em sílica gel comum, eluente DCM: MeOH (8:2). A obtenção do produto foi confirmada por espectroscopia de infravermelho, com a identificação do estiramento da função azido em 2129 cm^{-1} . A reação de diazotransferência permite a conversão do grupo amino a azido, sem que ocorra a inversão da configuração do produto. Um possível mecanismo para essa reação foi proposto por Anselme e Fischer que discute a possibilidade de formação de uma espécie tetrazenica, como demonstrado no Esquema 4.8, adaptado de Nyffeler et al (2002).

Esquema 4.8 – Mecanismo provável da reação de diazotransferência. Conversão do grupo amino do composto **4** ao grupo azido composto **13**

Como pode ser observado no Esquema 4.8, a reação de diazotransferência é realizada em duas etapas. Inicialmente, é feita a síntese do reagente trifil azida (TfN_3), que ocorre por meio do tratamento do reagente anidrido trifílico com azida de sódio. A etapa seguinte corresponde no tratamento do cloridrato 2-amino-2-desxi-D-glicose (**4**), previamente neutralizado com carbonato de potássio e ligado ao catalisador sulfato de cobre (**A**), com a solução contendo o reagente trifil azida. Nessa etapa, um dos nitrogênios do trifil sofre ataque pelo nitrogênio do açúcar, formando um complexo (**B**), em seguida ocorre a ciclicação do complexo (**B**) gerando a espécie de tetrazeno (**C**) estabilizada pelo cobre, resultante de uma desprotonação. E, finalmente a ocorrência de uma cicloadição reversa que promove a quebra do tetrazeno (**C**) e a formação dos compostos cobre-trifil (**D**) e do intermediário azido desejado **13** (ANSELME e FISCHER, 1969; NYFFELER et al, 2002).

De acordo com o Esquema 4.7, a etapa de formação dos éteres benzílicos para a proteção das hidroxilas do composto **13** foi realizada empregando a reação de Williamson. No

entanto, o método clássico (utilizando hidreto de sódio (NaH) e brometo de benzila (BnBr) em DMF) não foi satisfatório, visto que o composto **14** desejado foi obtido com rendimento de apenas 14% (LI et al, 2011). Visando o aumento do rendimento, foram realizadas variações das condições reacionais, aumentando o número de equivalentes dos reagentes, tempo reacional, temperatura, emprego de irradiação por microondas. Em todas estas tentativas o intermediário **14** foi obtido em baixo rendimento com formação paralela de mistura complexa de difícil purificação. Um dos possíveis motivos para os problemas encontrados na obtenção do composto **14** pode ser devido à insolubilidade do intermediário tetralcóxido formado após o tratamento de **13** com a base, bem como o número de hidroxilas(quatro) que necessitam serem protegidas com grupos benzil.

Essas modificações podem promover mudanças conformacionais na molécula que desfavorecem a substituição. Por estas razões, foram realizadas novas tentativas utilizando a) iodeto de tetrabutilamônio (TBAI), NaH, BnBr e DMF (VALLINAYAGAM et al, 2008) e b) substituindo as condições básicas anteriores pelo uso de tricloroacetamido de benzila, o qual emprega condições ácidas (ácido trifílico), como catalisador (CARVALHO e HAINES, 1999). Neste caso, o produto **14** foi obtido com rendimento semelhante (15%) quando empregado o TBAI e quando empregada as condições ácidas não foi possível o isolamento devido ao grande número de sub-produtos formados (Esquema 4.9).

Esquema 4.9 – Métodos explorados para obtenção do derivado aminoaçúcar **14** a partir do intermediário **13**.

4.2.1.1 Nova abordagem sintética para obtenção do doador glicosídico

O baixo rendimento e dificuldades encontradas no isolamento do composto **14** não permitiu a preparação do doador glicosídico tricloroacetimidato **16**, como inicialmente planejado. Por esta razão, novo método foi proposto, modificando o grupo abandonador do doador glicosídico, por meio da geração do intermediário tioglicosídico **27**, o qual protege e ativa a posição anomérica, Esquema 4.10. Além disto, o menor número de hidroxilas livres de **27** melhora a solubilidade durante a reação de formação do produto protegido **28**. Embora ocorra o aumento de uma etapa sintética para a obtenção do doador glicosídico **28**, as reações são de fácil reprodução e os derivados tioaçucares obtidos, o composto **26** e **28**, podem ser empregados como doador glicosídicos, como será demonstrado a seguir.

Esquema 4.10 – Nova rota sintética, descrita para a obtenção do doador glicosídico **28**.

De forma similar ao empregado na rota inicial, foi realizada a reação de diazotransferência, porém, seguida da proteção das hidroxilas com a formação de ésteres acetila, pelo tratamento da mistura reacional com anidrido acético e piridina, para obtenção do intermediário **25** em 98% de rendimento, na proporção α/β 1:2, após purificação por cromatografia em coluna *flash* [Hexano: AcOEt 0-30%, por gradiente (v:v)]. A formação de **25** foi comprovada por RMN ^1H pelos sinais de 4 singletos na região 2,20-2,03 ppm com integral de 3H cada, característicos dos grupos acetila (12H , 4s, 4 COCH_3). Na sequência, o intermediário **25** foi tratado com trifluorboroeterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) e p -toluenotiol (TolSH) para a obtenção de **26**, com rendimento de 56%, após purificação por CCC [Hexano: AcOEt 7:3 (v:v)]. Essa reação ocorre via um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$ (Esquema 4.11), via formação do íon oxocarbênio, catalisado pelo ácido de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, o qual sofre um ataque nucleofílico pelo grupo tiol do p -toluenotiol, gerando uma mistura de anômeros, na proporção α/β de 1:0,7.

Esquema 4.11 – Mecanismo proposto para síntese tioaçúcar **26**.

A obtenção do composto **26** foi confirmada por RMN ^1H , com a observação dos hidrogênios do grupo toluil como um multiplete, integral relativa de 4 hidrogênios aromáticos, na região de 7,2-7,1 ppm e um singlete em 2,31 ppm, relativo aos hidrogênios metílicos (integral de 3 hidrogênios).

A etapa sequencial de desproteção das hidroxilas foi realizada com o emprego de metóxido de sódio (NaOMe 1 mol.L $^{-1}$) em condições catalíticas para obtenção de 2-azido-2-desóxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de toluila (**27**) com rendimento de 71%. Em seguida foi realizada a reação de Williamson empregando o método clássico, envolvendo o uso de NaH, BnBr em DMF (LI et al, 2011), o qual permitiu a obtenção do produto **28** em 84% rendimento. Neste caso, como planejado, a reação de Williamson foi mais satisfatória do que quando empregada com as quatro hidroxilas livres **14** (15%).

Considerando a maior facilidade de obtenção do doador tioglicosídico, o tioaçúcar **28** foi utilizado para conversão ao correspondente doador glicosídico tricloroacetimidato **16**, Esquema 4.12.

Esquema 4.12 – Obtenção do doador tricloroacetimidato **16**, a partir do composto **28**.

O composto **28** tratado com *N*-iodosuccinimida (NIS) em solução de acetona: água permitiu a obtenção do intermediário **15**, em 72% de rendimento, após purificação por cromatografia em coluna por gradiente empregando sílica *flash* eluente Hexano: AcOEt 0-30%. A caracterização por RMN ^1H , indicou a formação do intermediário **15**, por meio da observação da ausência dos sinais do singlete em 2,38 ppm, e dos 4 hidrogênios aromáticos, na região de 7,35-7,02 ppm, ambos devido a remoção do grupo toluenila. O tratamento do tioaçúcar **28** com NIS, ativa o tioglicosídeo, desencadeando a formação do íon oxocarbênio, o qual sofre ataque nucleofílico por moléculas de água para a formação do composto **15**, seguindo o mecanismo de acordo com o demonstrado no Esquema 4.13.

Esquema 4.13 – Mecanismo da reação para a formação de do intermediário **15**.

A última etapa para formação do doador glicosídeo tricloroacetimidato **16** foi realizada com o tratamento do composto **15** com tricloroacetonitrila, 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) em DCM. A reação ocorre de acordo com o mecanismo proposto no Esquema 4.14. A configuração do produto obtido segue um controle termodinâmico devido à presença da base forte DBU, e permite a obtenção do produto mais estável, na configuração α (SCHMIDT e MICHEL, 1984). A caracterização por análise de RMN ^1H levou a confirmação do produto **16**, o qual foi obtido em 72% de rendimento após purificação por CCC, com a identificação do singlete em 8,74 ppm característico do grupo NH de imidato, e a presença do duplete do hidrogênio anomérico em 6,47 ppm, com constante de acoplamento (J) de 3,48, correspondendo ao produto α .

Esquema 4.14 – Mecanismo de tricloroacetimização do composto **15**.

4.2.2 Obtenção dos aceptores glicosídicos

A obtenção do aceptor glicosídico foi realizada a partir dos aminoácidos serina e treonina contendo o grupo protetor *N*-Fmoc (*N*-Fluorenilmetoxicarbonílico), disponíveis comercialmente. A reação de proteção do grupo carboxila, via formação de um éster benzílico, permitiu a obtenção dos compostos **17** e **18** com rendimento de 83 % e 70 %, respectivamente, após cristalização em etanol. A proteção dos grupos amino e carboxilato, do aceptor glicosídico são realizadas para evitar a formação de *N*-glicosídeos e melhorar a solubilidade e o processo de purificação na reação glicosilação.

A proteção da carboxila foi realizada por meio da geração do íon carboxilato, utilizando carbonato de cério, que abstrai íons H^+ , seguido do tratamento com brometo de benzila (BnBr). A reação ocorre, por meio de uma substituição nucleofílica, conforme o mecanismo demonstrado no Esquema 4.15.

Esquema 4.15 – Reação de obtenção dos aceptores glicosídicos **17** e **18**.

A formação dos produtos **17** e **18** foi avaliada por meio de RMN ^1H , e confirmada pela presença do sinal relativo aos hidrogênios *O*-metilênicos do grupo benzílico, tipicamente posicionados na região de 5,2 ppm observado nos espectros dos dois produtos, e os sinais de hidrogênios aromáticos integrando em total de 13H, 8 do grupo Fmoc e 5 do grupo benzílico.

4.2.3 Reações de glicosilação para formação do glicoaminoácido

A reação de glicosilação entre o tioaçúcar **28**, doador glicosídico, e o composto **17**, acceptor glicosídico, foi inicialmente testada, empregando o método descrito por Mong et al (2012) o qual utiliza NIS e TMSOTf como agentes promotores e uma mistura dos solventes acetonitrila:diclorometano 5:1 a -45°C . Com o auxílio de acetonitrila seria obtido o glicosídeo na configuração β em maior proporção, devido à participação do solvente, formando uma espécie intermediária de glicosilnitrílio, preferencialmente na configuração α para subsequente ataque nucleofílico do acceptor **17** na face β do carboidrato, conforme demonstrado no Esquema 4.16.

Esquema 4.16 – Participação do solvente para obtenção do glicosídeo (MONG et al, 2012).

No entanto a reação não ocorreu como esperado e houve a recuperação do material de partida **28** após o tempo reacional. A reação de glicosilação empregando o doador contendo o grupo tricloroacetimidato em C-1 **16**, o acceptor glicosídico **17**, na presença apenas do promotor TMSOTf foi realizada, de acordo com o trabalho conduzido por Kalikanda e Li (2011). Neste trabalho, os autores descrevem a síntese de dissacarídeos, utilizando como doador glicosídico o derivado 3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desóxi-1-tio-D-galactopiranosil tricloroacetimidato para obtenção de β -glicosídeos na proporção esperada de 3:1 (β/α), quando a realizada a -78°C . No entanto, extrapolando estas condições para a reação entre o doador **16** e o acceptor **17**, não houve a formação do produto. Mesmo após a elevação da temperatura a 0°C e prolongamento do tempo reacional, não foi obtido o glicosídeo desejado **19**, ocorrendo somente a degradação do doador glicosídico **16** (Esquema 4.17).

Esquema 4.17 – Reação glicosídica entre o doador glicosídico **16** e o acceptor glicosídico **17**.

As dificuldades encontradas na síntese do glicosídeo a partir dos doadores tioglicosídico **28** e tricloroacetimidato **16**, contendo o grupo protetor *O*-benzil, conduziu a nova tentativa de glicosilação empregando o intermediário peracetilado, composto **26**, como doador nas condições reacionais descritas por XU et al (2013). Nessa estratégia sintética, o autor obtém glicosídeos na proporção α/β 1:1 empregando triflato de prata (AgOTf), NIS em diclorometano à temperatura ambiente. Porém, esta modificação também não conduziu à obtenção do glicosídeo **2**.

4.3 Métodos alternativos para obtenção dos compostos **1**, **2** e **3**

O método descrito para obtenção de glicoaminoácidos na configuração β pelo grupo de pesquisa, empregando doadores glicosídicos de *N*-acetilglicosaminas clorados e o catalisador brometo de mercúrio (HgBr₂) (CARVALHO et al, 2003), conduziu a duas estratégias de síntese alternativas para a obtenção dos glicoaminoácidos desejados **2** e **3** e o glicopiranosídeo de metila **1** (Esquema 4.18 e Esquema 4.19). Assim, ambas as rotas sintéticas foram planejadas usando doadores glicosídicos contendo cloro como grupo abandonador, mas diferindo em relação ao grupo em C-2, ou seja, azido (Esquema 4.18) e amida (Esquema 4.19).

A rota proposta para a obtenção do doador glicosídico clorado comum **31**, contendo azido em C-2, foi planejada em duas etapas, realizadas por métodos *one-pot* empregando o composto 3,4,6-tri-*O*-acetil glical (**29**) como precursor (Esquema 4.18). As etapas correspondem à formação do glical per-*O*-benzilado **30** (MADHUSUDAN et al, 2005) e uma azidoclorinação (PLATTNER, HOFENER e SEWALD, 2011), para posterior sequência das mesmas etapas descritas no Esquema 4.7, na qual o doador glicosídico tricloroacetimidato foi explorado (Esquema 4.18).

Esquema 4.18 – Rota para obtenção do doador glicosídico **31**, e etapas sequenciais para obtenção dos glicoaminoácido **2** e **3**.

Desta forma, o tratamento de 3,4,6-tri-*O*-acetil glicál (**29**) com hidróxido de sódio, brometo de benzila e TBAI conduziu à síntese do glucal per-*O*-benzilado **30**, em 74 % de rendimento, após purificação por CCC com sílica *flash* [Hexano: AcOEt 7: 3 (v: v)]. A estrutura foi confirmada por RMN ¹H, com a identificação dos sinais característicos dos 6 hidrogênios metilênicos dos grupos benzil, na faixa de 4,79-4,46 ppm. Atualmente, os estudos envolvendo a etapa de azidoclorinação estão em andamento.

Por outro lado, a rota proposta para a obtenção do doador glicosídico clorado comum **32** contendo a função amida em C-2 foi planejada de acordo com as etapas descritas no Esquema 4.19. Além do efeito anquimérico do grupo amida, que influencia a obtenção de glicosídicos na configuração β em maior proporção, esta rota sintética tem a vantagem de dispensar etapas de proteção e desproteção da função amina, as quais aumentam o número de etapas e apresentam problemas quanto à estabilidade e purificação dos intermediários com amina livre.

As etapas sintéticas dessa rota correspondem à formação inicial de uma amida na posição C-2 **33**, utilizando o ácido {[4-(metilfenil)sulfonyl]oxi} acético (**34**), per-*O*-acetilação **35**, e tratamento com cloreto de acetila em HCl gasoso para obtenção do doador glicosídico contendo o cloro em C-1 **32**, para, finalmente, realizar a reação glicosídica com os aceptores metanol, serina **17** ou treonina **18**. A utilização do grupo benzil como grupo protetor para obtenção dos glicoaminoácidos **2** e **3**, a qual é necessária de acordo como discutido anteriormente, ou seja, emprego de reação de hidrogenólise para remoção concomitante dos diversos grupos protetores, será alcançada utilizando as condições brandas com emprego de tricloroacetimidato de benzila e ácido trifílico (catalisador), após desproteção do intermediário glicoaminoácido, **36** e/ou **37**, per-*O*-acetilado empregando MeONa em metanol.

Esquema 4.19 – Nova rota sintética para a obtenção dos compostos **1**, **2** e **3** empregando doador glicosídico com a função amida em C-2.

A tentativa de funcionalização do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**), com o ácido {[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi} acético (**34**) foi realizada inicialmente com o emprego dos reagentes de acoplamento dicicloexilcarbodiimida (DCC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), H₂O e NaHCO₃, segundo método descrito por Banerjee, Babich e Zubietta (2006). Problemas como a elevada polaridade do carboidrato desprotegido e a produção de subprodutos como dicicloexilureia (DCU) dificultaram o acompanhamento da reação por CCD e a purificação, respectivamente. A reação, portanto, foi realizada com a sequencial proteção das hidroxilas, sem a prévia purificação do produto, empregando iodo em anidrido acético, para posterior isolamento. Essa abordagem permitiu a obtenção do produto **35** em pequena proporção com impurezas oriundas do agente de condensação DCC. A formação dos anômeros do intermediário **35** foi identificada por meio de análise de RMN ¹H com a observação dos sinais correspondentes ao grupo tosil, 3 hidrogênios do grupo metílico em 2,33 ppm, 4 H do anel aromático na faixa de 7,67-7,39 ppm, hidrogênios metilênicos do ácido {[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi} acético, além dos hidrogênios H1-H6 e *O*-acetil do carboidrato. (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Espectro de RMN ¹H do composto **34** com sinais referentes ao carboidrato e ácido {[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi} acético.

A dificuldade de remoção do subproduto dicicloexilureia oriundo da carbodiimida DCC e o baixo rendimento após purificação por CCC, estimularam a utilização de outras carbodiimidas, tais como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e EDC ligada a uma resina, com o intuito de melhorar o rendimento e obter o composto **35** puro, no entanto, essas estratégias não foram eficazes.

De acordo com os possíveis problemas citados, a reação foi realizada novamente utilizando os mesmos agentes de condensação DCC, HOBT, no entanto, empregando trietilamina como base e substituindo o ácido {[4-metilfenil]sulfonil}oxi} acético (**34**) pelo ácido benziloxiacético (**41**) (Esquema 4.20). Este ácido possui o grupo *O*-benzil ao invés do *O*-tosil, tornando a molécula mais estável, nas condições reacionais empregadas. Assim, após 24h de reação, foi observado por CCD [DCM: MeOH 9:1 (v:v)] o consumo total do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**4**), utilizado em menor proporção molar. A purificação da mistura por CCC [DCM: MeOH 9:1 (v:v)] conduziu à obtenção do intermediário **42**, porém, em apenas 8% de rendimento, cuja estrutura foi confirmada por RMN ^1H pelos sinais dos hidrogêneos metilênicos em 4,80 – 4,53 ppm e dos *CH* aromáticos na faixa de 7,62 - 7,22 ppm referente ao grupo benzil. A etapa de per-*O*-acetilação foi realizada em sequência para caracterização do produto, permitindo a obtenção do composto per-*O*-acetilado **43**, porém, como uma mistura que ainda necessita de purificação para caracterização completa por RMN. O ácido benziloxiacético será utilizado para estudo das melhores condições reacionais para condensação (Esquema 4.19).

Esquema 4.20 – Reações realizadas com o ácido benziloxiacético (**41**).

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Apesar dos produtos de interesse descritos - **1**, **2** e **3** - apresentarem certa simplicidade estrutural, os requisitos estruturais destes produtos envolvendo a formação de glicosídeos na configuração β e adição do flúor próximo a última etapa sintética tornaram o trabalho complexo, exigindo o planejamento sintético com rotas alternativas.

A síntese do composto **1**, planejada na rota descrita no Esquema 4.1, foi realizada até o intermediário **9**, no entanto, tanto a purificação do composto **9**, quanto a sequencial reação de acoplamento de **9** com o ácido bromoacético, sem purificação prévia, não permitiu a obtenção do intermediário **10**, penúltimo intermediário para a obtenção do composto **1**. Contudo, novas tentativas para viabilizar essa rota ainda serão exploradas, como a extração do produto **9** com EDTA para remoção do zinco residual e padronização da etapa de formação da função amida **10**, empregando outros agentes de condensação e derivados de ácidos.

Considerando a estratégia sintética empregada para a obtenção dos derivados glicoaminoácidos **2** e **3** (Esquema 4.7), foram encontrados problemas de baixo rendimento (15%) na etapa correspondente à proteção das hidroxilas, com grupos benzil, do intermediário **13**, para síntese do doador glicosídico tricloroacetimidato desejado **16**. Logo, foi planejada a síntese do doador tioglicosídico per-*O*-benzilado **28**, com o acréscimo de uma etapa sintética, o qual permitiu a obtenção adicional do doador tioglicosídico per-*O*-acetilado **26**, e também a obtenção do doador glicosídico tricloroacetimidato **16**, após remoção do grupo tiotoluol e adição de tricloroacetimidato à glicopiranosose **15**.

Embora tenha sido empregado três diferentes doadores glicosídicos como alternativa para a síntese do intermediário glicoaminoácido **19**, eles não conduziram à obtenção dos glicoaminoácidos desejados.

Diante das dificuldades encontradas nas duas rotas sintéticas realizadas, foram propostas novas estratégias de síntese, Esquemas 4.18 e 4.19, as quais demonstram ser bastante promissoras para a síntese das moléculas de interesse **1**, **2** e **3**, visto que exploram doadores glicosídicos de cloreto, e a utilização do promotor, ou catalisador, brometo de mercúrio, o qual tem demonstrado bons resultados na obtenção de glicoaminoácido na configuração β em trabalhos realizados no laboratório de pesquisa.

6 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANSELME, J. P.; FISCHER, W. The reaction of anions of primary amines and hydrazones with *p*-toluenesulfonyl azide. **Tetrahedron**, v. 25, n. 4, p. 855-859, 1969.
- ALPER, P. B.; HUNG, S.-C.; WONG, C.H. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. **Tetrahedron Lett.**, v. 37, n. 34, p. 6029-6032, Aug. 1996.
- BANERJEE, S. R.; BABICH, J. W.; ZUBIETA, J. A new bifunctional amino acid chelator targeting the glucose transporter. **Inorg. Chim. Acta**, v. 359, n. 5, p. 1603-1612, Mar. 2006.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 69, n. 3, p. 89-95, Mar 2001.
- BORNAGHI, L. F.; POULSEN, S. A. Microwave-accelerated Fischer glycosylation. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, n. 20, p. 3485-3488, 2005.
- CALDWELL, S. A.; JACKSON, S. R.; SHAHRIARI, K. S.; LYNCH, T. P.; SETHI, G.; WALKER, S.; VOSSELLER, K.; REGINATO, M. J. Nutrient sensor *O*-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. **Oncogene**, v. 29, n. 19, p. 2831-2842, May 2010.
- CAMPO, V. L. et al. Carbohydrates and glycoproteins: Cellular recognition and drug design. In: Taft C. A. (Ed.). **New developments in medicinal chemistry**. Brazil: Bentham Science Publishers Ltd, 2010. p. 133-151.
- CAMPO, V. L. **Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento de fármacos inibidores de “trans-sialidade de *Trypanosoma cruzi*”**. 2007. 200f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- CARSON, J. F. *N*-(2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl)-L-amino acids. **Synthesis**, n. 4, p. 268-270, 1981.
- CARVALHO, I.; SCHEUERL, S. L.; RAVINDRANATHAN KARTHA, K. P.; FIELD, R. A. Practical synthesis of the 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucosides of Fmoc-serine and Fmoc-threonine and their benzyl esters. **Carbohydr. Res.**, v. 338, n. 10, p. 1039-1043, May 2003.
- CARVALHO, I.; HAINES, A. H. Síntese de aminoglicosídeos, precursores de pseudo-dissacarídeos potencialmente ativos. **Química Nova**, v. 23, p. 37-41, 2000.
- _____. *N*-Linked carba-disaccharides as potential inhibitors of glucosidases I and II. **J.Chem. Soc. Perkin Trans. 1.**, v. 0, n. 13, p. 1795-1800, 1999.
- CHENG, X.; HART, G. W. Glycosylation of the murine estrogen receptor- α . **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 75, n. 2-3, p. 147-158, Dec. 2000.

CHIBBA, A.; POLOCZEK, J.; LITTLE, D. J.; HOWELL, P. L.; NITZ, M. Synthesis and evaluation of inhibitors of *E. coli* PgaB, a polysaccharide de-*N*-acetylase involved in biofilm formation. **Org. Biomol. Chem.**, v. 10, n. 35, p. 7103-7107, Sep. 2012.

CHOU, T. Y.; DANG, C. V.; HART, G. W. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, n. 10, p. 4417-4421, May 1995.

COLE, R. N.; HART, G. W. Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: *O*-linked *N*-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. **J. Neurochem.**, v. 73, n. 1, p. 418-428, Jul. 1999.

COENEN, H. H.; ELSINGA, P. H.; IWATA, R.; KILBOURN, M. R.; PILLAI, M. R.; RAJAN, M. G.; WAGNER, JR. H. N.; ZAKNUN, J. J. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [¹⁸F]FDG for use in oncology and neurosciences. **Nucl. Med. Biol.**, v. 37, n. 7, p. 727-740, Oct. 2010.

DEMCHENKO, A. V. General Aspects of the Glycosidic Bond Formation. In: _____. (Ed.). **Handbook of Chemical Glycosylation**. German: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. p.1-27.

DE NISCO, M.; PEDATELLA, S.; BEKTAS, S.; NUCCI, A.; CAPUTO, R.. D-Glucosamine in a chimeric prolinamide organocatalyst for direct asymmetric aldol addition. **Carbohydr. Res.**, v. 356, p. 273-277, Jul. 2012.

DONG, D. L.; XU, Z. S.; CHEVRIER, M. R.; COTTER, R. J.; CLEVELAND, D. W.; HART, G. W. Glycosylation of mammalian neurofilaments. localization of multiple *O*-linked *N*-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 22, p. 16679-16687, Aug. 1993.

DONG, D. L.; HART, G. W. Purification and characterization of an *O*-GlcNAc selective *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 30, p. 19321-19330, Jul. 1994.

DONG, D. L.; XU, Z. S.; HART, G. W.; CLEVELAND, D. W. Cytoplasmic *O*-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 34, p. 20845-20852, Aug. 1996.

ESKO, J. D.; SELLECK, S. B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 435-471, 2002.

EDWARD, J. T. Stability of glycosides to acid hydrolysis: a conformational analysis, **Chem.Ind.**, p. 1102-1104, 1955.

GAO, F.; YAN, X.; SHAKYA, T.; BAETTIG, O. M.; AIT-MOHAND-BRUNET, S.; BERGHUIS, A. M.; WRIGHT, G. D.; AUCLAIR, K. Synthesis and structure-activity relationships of truncated bisubstrate inhibitors of aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferases. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 17, p. 5273-5281, Aug. 2006.

GLASER, M.; ARSTAD, E. "Click labeling" with 2-[¹⁸F]fluoroethylazide for positron emission tomography. **Bioconjug. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 989-993, May-Jun. 2007.

GU, Y.; MI, W.; GE, Y.; LIU, H.; FAN, Q.; HAN, C.; YANG, J.; HAN, F.; LU, X.; YU, W. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. **Cancer Res.**, v. 70, n. 15, p. 6344-6351, Aug. 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of *O*-linked β -*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, p. 1017-1022, 2007.

HOUSLEY, M. P.; RODGERS, J. T.; UDESHI, N. D.; KELLY, T. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; PUIGSERVER, P; HART, G. W. *O*-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 24, p. 16283-16292, Jun. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic *O*-glycosylation. **Carbohydr. Res.**, v. 341, n. 10, p. 1266-1281, Jul. 2006.

JIA, Y.; MA, N.; LIU, Z.; BOIS-CHOUSSEY, M.; GONZALEZ-ZAMORA, E.; MALABARBA, A.; BRUNATI, C.; ZHU, J. Design and synthesis of simple macrocycles active against vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Chemistry**, v. 12, n. 20, p. 5334-5351, Jul. 2006.

JIANG, M. S.; HART, G. W. A subpopulation of estrogen receptors are modified by *O*-linked *N*-acetylglucosamine. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 4, p. 2421-2428, Jan. 1997.

KALIKANDA, J.; LI, Z. Study of the stereoselectivity of 2-azido-2-deoxygalactosyl donors: remote protecting group effects and temperature dependency. **J. Org. Chem.**, v. 76, n. 13, p. 5207-5218, Jul. 2011.

KANG, E. S.; HAN, D.; PARK, J.; KWAK, T. K.; OH, M. A.; LEE, S. A.; CHOI, S.; PARK, Z. Y.; KIM, Y.; LEE, J. W. *O*-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. **Exp. Cell Res.**, v. 314, n. 11-12, p. 2238-2248, Jul. 2008.

KAWAUCHI, K.; ARAKI, K.; TOBIUME, K.; TANAKA, N. Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK β through *O*-linked β -*N*-acetyl glucosamine modification. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 106, n. 9, p. 3431-3436, Mar., 2009.

KEARSE, K. P.; HART, G. W. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, n. 5, p. 1701-5, Mar. 1991.

KIM, E. J. Chemical Arsenal for the Study of *O*-GlcNAc. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 1987-2022, 2011.

KIM, E. J.; KANG, D. O.; LOVE, D. C.; HANOVER, J. A. An *O*-GlcNAcase-specific inhibitor and substrate engineered by the extension of the *N*-acetyl moiety. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 13, p. 4234-4235, Apr. 2006a.

KIM, E. J.; PERREIRA, M.; THOMAS, C. J.; HANOVER, J. A. An *O*-GlcNAcase-specific inhibitor and substrate engineered by the extension of the *N*-acetyl moiety. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 13, p. 4234-4235, Apr. 2006b.

KISO, M.; ANDERSON, L. Protected glycosides and disaccharides of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose by ferric chloride-catalyzed coupling. **Carbohydr. Res.**, v. 136, p. 309-323, Feb. 1985.

LAUGHLIN, S. T.; AGARD, N. J.; BASKIN, J. M.; CARRICO, I. S.; CHANG, P. V.; GANGULI, A. S.; HANGAUER, M. J.; LO, A.; PRESCHER, J. A.; BERTOZZI, C. R. Metabolic labeling of glycans with azido sugars for visualization and glycoproteomics. **Methods Enzymol.**, v. 415, p. 230-250, 2006.

LI, T.; GUO, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LI, J.; ZHANG, W.; LIN, J.; ZHAO, W.; WANG, P. G. Structure-activity relationships in a series of C2-substituted gluco-configured tetrahydroimidazopyridines as β -glucosidase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, n. 7, p. 2136-2144, Apr. 2011.

LI, X.-G.; DOMARKAS, J.; O'HAGAN, D. Fluorinase mediated chemoenzymatic synthesis of [^{18}F]-fluoroacetate. **Chem. Commun.**, v. 46, n. 41, p. 7819-7821, 2010.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; HARDY, D. M.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. *O*-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, p. R236-250, 2011.

LIN, H.; WALSH, C. T. A chemoenzymatic approach to glycopeptide antibiotics. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, n. 43, p. 13998-14003, Jan. 2004.

LUO, Y.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid-*N*-hydroxysuccinimide: a useful intermediate for bioconjugation. **Bioconjug. Chem.**, v. 12, n. 6, p. 1085-1088, Nov-Dec. 2001.

LYNCH, T. P.; FERRER, C. M.; JACKSON, S. R.; SHAHRIARI, K. S.; VOSSELLER, K.; REGINATO, M. J.. Critical role of *O*-Linked β -*N*-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 14, p. 11070-11081, Mar. 2012.

MA, Z.; VOCADLO, D. J.; VOSSELLER, K. Hyper-*O*-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kappaB activity in pancreatic cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 21, p. 15121-15130, May 2013.

MACAULEY, M. S.; WHITWORTH, G. E.; DEBOWSKI, A. W.; CHIN, D.; VOCADLO, D. J. *O*-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 27, p. 25313-25322, Jul. 2005.

MACCIONI, H. J.; GIRAUDO, C. G.; DANIOTTI, J. L. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. **Neurochem. Res.**, v. 27, n. 7-8, p. 629-636, Aug. 2002.

MACHADO, A. C. B.; PLEITEZ, V.; TIJERO, M. C. Usando a antimatéria na medicina moderna. **Rev. Bras.Ens.Fís.**, v. 28, p. 407-416, 2006.

MADHUSUDAN, S. K.; AGNIHOTRI, G.; NEGI, D. S.; MISRA, A. K. Direct one-pot conversion of acylated carbohydrates into their alkylated derivatives under heterogeneous reaction conditions using solid NaOH and a phase transfer catalyst. **Carbohydr. Res.**, v. 340, n. 7, p. 1373-1377, May 2005.

MARTINEZ, M. E.; KIYONO, Y.; NORIKI, S.; INAI, K.; MANDAP, K. S.; KOBAYASHI, M.; MORI, T.; TOKUNAGA, Y.; TIWARI, V. N.; OKAZAWA, H.; FUJIBAYASHI, Y.; IDO, T. New radiosynthesis of 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoroacetamido-D-glucopyranose and its evaluation as a bacterial infections imaging agent. **Nucl. Med. Biol.**, v. 38, n. 6, p. 807-817, Aug. 2011.

MI, W.; GU, Y.; HAN, C.; LIU, H.; FAN, Q.; ZHANG, X.; CONG, Q.; YU, W. *O*-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1812, n. 4, p. 514-519, Apr. 2011.

MILLER, P. W.; LONG, N. J.; VILAR, R.; GEE, A. D. Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N radiolabels for positron emission tomography. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 47, n. 47, p. 8998-9033, 2008.

MONG, K.-K. T.; YEN, Y.-F.; HUNG, W.-C.; LAI, Y.-H.; CHEN, J.-H. Application of 2-azido-2-deoxythioglycosides for β -glycoside formation and oligosaccharide synthesis. **Eur.J.Org.Chem.**, v. 2012, n. 15, p. 3009-3017, 2012.

MYDOCK, L. K.; DEMCHENKO, A. V. Mechanism of chemical *O*-glycosylation: from early studies to recent discoveries. **Org. Biomol. Chem.**, v. 8, n. 3, p. 497-510, Feb. 2010.

NEUBERGER, A.; RIVERS, R. P. Preparation and configurative relationships of methylglucosaminides. **J. Chem. Soc.**, p. 122-126, 1939.

NGUYEN, D. L.; SEYER, R.; HEITZ, A.; CASTRO, B. Renin substrates. Part 1. Liquid-phase synthesis of the equine sequence with benzotriazolyl oxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). **J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1**, v. 0, n. 0, p. 1025-1031, 1985.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C. H.; KOELLER, K. M.; WONG, C. H. The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 36, p. 10773-10778, Sep. 2002.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-867, Sep. 2006.

PAN, P. W.; ZHANG, Q.; HOU, J.; LIU, Z.; BAI, F.; CAO, M. R.; SUN, T.; BAI, G. Cell surface glycoprotein profiling of cancer cells based on bioorthogonal chemistry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 403, n. 6, p. 1661-1670, Jun. 2012.

PLATTNER, C.; HOFENER, M.; SEWALD, N. One-pot azidochlorination of glycals. **Org. Lett.**, v. 13, n. 4, p. 545-547, Feb. 2011.

PARK, S. Y.; KIM, H. S.; KIM, N. H.; JI, S.; CHA, S. Y.; KANG, J. G.; OTA, I.; SHIMADA, K.; KONISHI, N.; NAM, H. W.; HONG, S. W.; WON HO, Y.; ROTH, J.; YOOK, J. I.; CHO, J. W. Snail1 is stabilized by *O*-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. **EMBO J.**, v. 29, n. 22, p. 3787-3796, 2010.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**, 2. ed., EUA: Pergamon Press Ltd., 1980.

SAXON, E.; BERTOZZI, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 2007-2010, Mar. 2000.

SCHACHTER, H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of *N*- and *O*-glycan branches. **Glycoconj. J.**, v. 17, n. 7-9, p. 465-483, Jul-Sep. 2000.

SCHLYER, D. J. Production of Radionuclides in Accelerators. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. (Ed.). **Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications**. England, John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p.1-70.

SCHMIDT, R. R.; MICHEL, J. Direct *O*-glycosyl trichloroacetimidate formation, nucleophilicity of the anomeric oxygen atom. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 8, p. 821-824, 1984.

SLAWSON, C.; HART, G. W. *O*-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 9, p. 678-684, Sep. 2011.

SLAWSON, C.; PIDALA, J.; POTTER, R. Increased *N*-acetyl- β -glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in *N*-acetylglucosamine containing proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1537, n. 2, p. 147-157, Sep. 2001.

SHI, Y.; TOMIC, J.; WEN, F.; SHAHA, S.; BAHLO, A.; HARRISON, R.; DENNIS, J. W.; WILLIAMS, R.; GROSS, B. J.; WALKER, S.; ZUCCOLO, J.; DEANS, J. P.; HART, G. W.; SPANER, D. E.. Aberrant *O*-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 24, n. 9, p. 1588-1598, Sep. 2010.

SUBRAMANIAN, V.; MOUMÉ-PYMBOCK, M.; HU, T.; CRICH, D. Protecting group-free glycoligation by the desulfurative rearrangement of allylic disulfides as a means of assembly of oligosaccharide mimetics. **J. Org. Chem.**, v. 76, n. 10, p. 3691-3709, 2011.

TADA, M.; OIKAWA, A.; IWATA, R.; FUJIWARA, T.; KUBOTA, K.; MATSUZAWA, T.; SUGIYAMA, H.; IDO, T.; ISHIWATA, K.; SATO, T. An efficient, one-pot synthesis of 2-deoxy-2- ^{18}F fluoroacetamido-D-glucopyranose (*N*- ^{18}F fluoroacetyl-D-glucosamine), potential diagnostic imaging agent. **J. Labelled Compd. Radiopharm.**, v. 27, n. 11, p. 1317-1324, 1989.

TANG, G.; TANG, X.; WANG, M.; LI, B.; LIANG, M.; WANG, Q. A simple and rapid automated radiosynthesis of [^{18}F]fluoroacetate. **J. Labelled Compd. Radiopharm.**, v. 51, n. 7, p. 297-301, 2008.

TOLEMAN, C.; PATERSON A. J.; WHISENHUNT T. R.; KUDLOW J. E. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable *O*-GlcNAcase and HAT activities. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 53665-53673, 2004.

UMEZAWA, S.; TSUCHIYA, T.; TATSUTA, K. Studies of Aminosugars. XI. Configurational Studies of Aminosugar Glycosides and Aminocyclitols by a Copper Complex Method, **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 39, n. 6, p.1235-1243, 1966.

VALLINAYAGAM, R.; SCHMITT, F.; BARGE, J.; WAGNIERES, G.; WENGER, V.; NEIER, R.; JULLERAT-JEANNERET, L. Glycoside esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of cancer. **Bioconjug. Chem.**, v. 19, n. 4, p. 821-839, Apr. 2008.

van WELL, R. M.; KARKKAINEN, T. S.; KARTHA, K. P.; FIELD, R. A. Contrasting reactivity of thioglucoside and selenoglucoside donors towards promoters: implications for glycosylation stereocontrol. **Carbohydr. Res.**, v. 341, n. 10, p. 1391-1397, Jul. 2006.

WALGREN, J. L.; VINCENT, T. S.; SCHEY, K. L.; BUSE, M. G. High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 284, n. 2, p. E424-434, Feb. 2003.

WEISSLEDER, R.; ROSS, B. D.; REHEMTULLA, A.; GAMBHIR, S. S. (Ed.). **Molecular Imaging: Principles and Practice**. [United States]: PMPH-Usa, 2010.

WERZ, D. B.; RANZINGER, R.; HERGET, S., ADIBEKIAN, A.; VON DER LIETH, C. W.; SEEBERGER, P. H.. Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates ("glycospace") by statistical databank analysis. **ACS Chem. Biol.**, v. 2, n. 10, p. 685-691, Oct. 2007.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

WINDHOLZ, T. B.; ARISON, B.; BROWN, R. D.; PATCHETT, A. A. An aromatic C-ring analog of 18-norestrone. **Tetrahedron Lett.**, v. 34, p. 3331-3332, Aug. 1967.

WITTE, M. D.; FLOREA, B. I.; VERDOES, M.; ADEYANJU, O.; Van Der MAREL, G. A.; OVERKLEEF, H. S. *O*-GlcNAc peptide epoxyketones are recognized by mammalian proteasomes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 34, p. 12064-12065, Nov. 2009.

XU, Y.; OGUNSINA, M.; SAMADDER, P.; ARTHUR, G.; SCHWEIZER, F. Structure-activity relationships of glucosamine-derived glycerolipids: the role of the anomeric linkage, the cationic charge and the glycerol moiety on the antitumor activity. **ChemMedChem**, v. 8, n. 3, p. 511-520, Mar. 2013.

YAN, A.; LENNARZ, W. J. Unraveling the mechanism of protein *N*-glycosylation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 5, p. 3121-3124, Feb 2005.

YANG, W. H.; KIM, J. E.; NAM, H. W.; JU, J. W.; KIM, H. S.; KIM, Y. S.; CHO, J. W. Modification of p53 with *O*-linked *N*-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. **Nat. Cell Biol.**, v. 8, n. 10, p. 1074-1083, 2006.

YANG, X.; SU, K.; ROOS, M. D.; CHANG, Q.; PATERSON, A. J.; KUDLOW, J. E. *O*-linkage of *N*-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 12, p. 6611-6616, Jun. 2001.

YEHEZKEL, G.; COHEN, L.; KLIGER, A.; MANOR, E.; KHALAILA, I. *O*-linked beta-*N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 34, p. 28755-28769, Aug. 2012.

ZHU, Q.; ZHOU, L.; YANG, Z.; LAI, M.; XIE, H.; WU, L.; XING, C.; ZHANG, F.; ZHENG, S. *O*-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. **Med. Oncol.**, v. 29, n. 2, p. 985-993, Jun. 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RMN ^1H (300MHz, CD_3OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-D-glicopiranoose (**5**)

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- α -D-glicopiranoose (5)

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,15	1	d	$J_{1,2,3,4}$
H-2	3,59	1	dd	$J_{1,2} 3,4, J_{2,3} 10,6$
H-3; H-5	3,76 – 3,66	2	m	-
H-4	3,42 – 3,34	1	m	-
H-6a, H-6b	3,86 – 3,77	2	m	-
CH_2CCl_3 (7a)	4,86	1	d	$J 12,1 \text{ Hz}$
CH_2CCl_3 (7b)	4,73	1	d	$J 12,1 \text{ Hz}$

APÊNDICE B – RMN ^1H (300MHz, CD_3OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- α -D-glicopiranosídeo de metila (6)

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- α -D-glicopiranosídeo de metila (6)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,70	1	d	J 2,2
H-2, H-3	3,64-3,60	2	m	-
H-4	3,36 – 3,33	1	m	-
H-5	3,59-3,49	1	m	-
H-6a	3,68	1	dd	$J_{6a,5}$ 5,6; $J_{6a,6b}$ 11,8
H-6b	3,82	1	dd	$J_{6b,5}$ 2,2; $J_{6a,6b}$ 11,8
CH_2CCl_3 (7a)	4,84	1	d	J 12,1
CH_2CCl_3 (7b)	4,71	1	d	J 12,1
CH_3 (8)	3,38	3	s	-

APÊNDICE C – RMN ^1H (300MHz, CD_3OD) 2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- β -D-glicopiranosídeo de metila (7)

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- β -D-glicopiranosídeo de metila (7)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,32	1	d	$J_{1,2}$ 8,20
H-2, H-3, H-4	3,48-3,36	3	m	-
H-5	3,30-3,25	1	m	-
H-6a	3,71	1	dd	$J_{6a,5}$ 5,74; $J_{6a,6b}$ 11, 9
H-6b	3,91	1	dd	$J_{6b,5}$ 1,83; $J_{6a,6b}$ 11,9
$\underline{CH_2}CCl_3$ (7a)	4,80	1	d	J 12,1
$\underline{CH_2}CCl_3$ (7b)	4,72	1	d	
CH_3 (8)	3,50	3	s	-

APÊNDICE D – RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi- 2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino- β - D glicopiranosídeo de metila (**8**)

2-desoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-amino-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β - D glicopiranosídeo de metila (8)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,48	1	d	$J_{1,2}$ 8,3
H-2	3,60-3,51	1	m	-
H-3	5,04 - 4,98	1	m	-
H-4	5,26-5,20	1	m	-
H-5	3,67-3,61	1	m	-
H-6a	4,08	1	dd	2,3 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz
H-6b	4,23	1	dd	$J_{5,6b}$ 4,7 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3
$\underline{\text{CH}_2}\text{CCl}_3$	4,74		d	J 12,0
$\underline{\text{CH}_2}\text{CCl}_3$	4,58	1	d	J 12,0
OCH_3	3,45	3	s	-
$3\times\text{CH}_3\text{CO}$	2,05-1,94	9	3x s	-

APÊNDICE E – IV-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (**13**)

APÊNDICE F – RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 1,3,4,6-tetra-O-benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (**14**)

1,3,4,6-tetra-*O*-benzil-2-azido-2-desoxy-D-glicopiranoose (14)

1,3,4,6-tetra-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (14)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,26	1	d	$J_{1,2}$ 8,0
H-2	3,47-3,40	1	m	-
H-3; H-5	3,38-3,30	2	m	-
H-4	3,59-3,53	1	m	-
H-6a; H-6b	3,71-3,61	2	m	-
CH_2 arom.	4,90-4,44	8	m	-
CH arom.	7,35-7,05	20	m	-

APÊNDICE G – RMN 1H (400MHz, CDCl₃) 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (**25**)

1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose (25)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,56	1	d	$J_{1,2}$ 8,6
H-2	3,71-3,65	1	m	-
H-3; H-4	5,13 - 5,02	2	m	-
H-5	3,81	1	ddd	$J_{5,4}$ 9,7; $J_{5,6a}$ 4,4; $J_{5,6b}$ 2,1
H-6a	4,31	1	dd	$J_{5,6a}$ 4,4; $J_{6a,6b}$ 12,5 Hz
H-6b	4,09	1	dd	$J_{5,6b}$ 2,1 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,5
CH_3CO	2,22-2,02	12	4x s	-

IV - 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranoose

APÊNDICE H – RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (**26**)

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (26 *a*)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,57	1	d	$J_{1,2}$ 5,6
H-2	3,71-3,65	1	dd	$J_{1,2}$ 5,6; $J_{2,3}$ 10,6
H-3	5,34	1	dd	$J_{3,4}$ 9,3; $J_{2,3}$ 10,4;
H-4	5,10-5,03	1	m	-
H-5	3,81	1	ddd	$J_{5,4}$ 10,2; $J_{5,6a}$ 5,1; $J_{5,6b}$ 2,4
H-6a	4,29	1	dd	$J_{5,6a}$ 5,1; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz
H-6b	4,09	1	dd	$J_{5,6b}$ 2,2 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,4
CH_3CO	2,13-2,00	9	3x s	-
CH arom.	7,2-7,1	4	m	-
CH_3Ph	2,34	3	s	-

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-1-tio- β -D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (26 β)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,43	1	d	$J_{1,2}$ 10,1
H-2	3,71-3,65	1	t	$J_{1,2} = J_{2,3}$ 9,9
H-3	5,11-5,00	1	m	-
H-4	4,91	1	m	$J_{3,4} = J_{4,5}$ 9,8
H-5	3,68	1	ddd	$J_{5,4}$ 10,1; $J_{5,6a}$ 4,7; $J_{5,6b}$ 2,4
H-6a	4,29	1	dd	$J_{5,6a}$ 4,7; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz
H-6b	4,09	1	dd	$J_{5,6b}$ 2,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3
CH_3CO	2,13-2,00	9	3x s	-
CH arom.	7,52-7,33	4	m	-
CH_3Ph	2,38	3	s	-

APÊNDICE I - RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-1-tio-D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (**28**)

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-1-tio- β -D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (28)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,53	1	d	$J_{1,2}$ 10,1
H-2	3,32 – 3,27	1	m	-
H-3	3,61 – 3,55	1	m	-
H-4	3,50	1		J 9,1
H-5	3,48 – 3,42	1	m	-
H-6a; H-6b	3,78 – 3,74	1	m	-
CH_2 arom.	4,94-4,41	6	m	-
CH arom.	7,52 – 7,01	19	m	-
CH_3Ph	2,31	3	s	-

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi-1-tio- α -D-glicopiranosídeo de 4-metilfenila (28)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,53	1	d	$J_{1,2}$ 5,3
H-2	3,93	1	dd	$J_{1,2}$ 5,36; $J_{2,3}$ 10,1
H-3; H-4	3,86 – 3,78	2	m	-
H-5	4,41 – 4,36	m	-	-
H-6a;	3,64	1	dd	$J_{5,6b}$ 1,9; $J_{6a,6b}$ 10,8
H-6b	3,78 – 3,74	1	m	-
CH_2 arom.	4,94-4,41	6	m	-
CH arom.	7,52 – 7,01	19	m	-
CH_3Ph	2,31	3	s	-

APÊNDICE J – RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) 3,4,6-tri-O-benzil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosose (**15**)

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxy-D-glicopiranoose (15)

3,4,6-tri-*O*-benzil-2-azido-2-desoxi- α -D-glicopiranoose (15)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1 α	5,25	1	d	$J_{1,2}$ 5,7
CH_2 arom.	4,89 – 4,37	6	m	-
H-3; H-5	4,07 – 3,89	2	m	-
H-2, H-4, H-6ab	3,67 – 3,35	4	m	-
CH arom.	7,35 – 7,02	15	m	-

APÊNDICE K – RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzil-2-desoxi-1-*O*-(2,2,2-tricloroacetimidoil)- α -D-glicopiranoose (**16**)

2-Azido-3,4,6-tri-O-benzil-2-desoxi-1-O-(2,2,2-tricloroacetimidoil)- α -D-glicopiranoose (16)

Número	δ 1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,47	1	d	$J_{1,2}$ 3,5
H-2, H-6b	3,75-3,67	2	m	-
H-3, H-4, H-5	4,10-3,88	3	m	-
H-6a	3,84	1	dd	$J_{5,6a}$ 3,0; $J_{6a,6b}$ 11,0 Hz
NH	8,74	1	s	
CH_2 arom.	5,00-4,47	6	-	-

APÊNDICE L – RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico (**17**)

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-serina benzílico (17)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
<i>CH</i> Fmoc arom.	7,77	2	d	<i>J</i> 7,5
<i>CH</i> Fmoc arom.	3,60	2	d	<i>J</i> 7,4
<i>CH</i> Fmoc arom.; <i>CH</i> benzil arom.	7,44 – 7,25	9	m	-
<i>NH</i>	5,73	1	d	<i>J</i> 7,4
<i>CH</i> ₂ benzil	5,23	2	s	-
<i>CH</i> Ser	4.53 – 4.46	1	m	-
<i>CH</i> ₂ Fmoc	4,47 – 4,39	2	m	-
<i>CH</i> Fmoc	4,21	1	t	<i>J</i> 6,8
<i>CH</i> ₂ Ser	4,09– 3,89	2	ddl	-
<i>OH</i>	2,20 – 1,98		sl	-

APÊNDICE M – RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina benzílico (**18**)

Éster *N*-(9-Fluorenilmetóxicarbonil)-L-treonina benzílico (18)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
<i>CH</i> Fmoc arom.	7,77	2	d	<i>J</i> 7,5
<i>CH</i> Fmoc arom.	7,60	2	d	<i>J</i> 7,4
<i>CH</i> Fmoc arom; <i>CH</i> benzil arom.	7,48 – 7,24	9	m	-
<i>NH</i>	5,60	1	d	<i>J</i> 8,8
<i>CH</i> ₂ benzil	5,22	1	m	-
α - <i>CH</i> Thr, β - <i>CH</i> - Thr, <i>CH</i> ₂ Fmoc	4,50 – 4,31	4	m	-
<i>CH</i> Fmoc	4,23	1	t	<i>J</i> 7,0
<i>OH</i>	1,91	1	ddl	-
<i>CH</i> ₃ Thr	1,25	3	t	<i>J</i> 7,7

APÊNDICE N – RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) 3,4,6-tri-O-benzil-D-glical (**30**)

3,4,6-tri-O-benzil-D-glicol (30)

Número	δ ^1H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	6,36	1	dd	$J_{1,2}$ 6,1; $J_{1,3}$ 1,2
H-2,	4,81	1	dd	$J_{1,2}$ 6,1; $J_{2,3}$ 2,7
H-3	4,15	1	ddd	$J_{3,4}$ 5,8, $J_{3,2}$ 2,4, $J_{3,1}$ 1,4
H-4	3,80	1	dd	$J_{3,4}$ 6,2 Hz; $J_{4,5}$ 8,7
H-5	4,00	1	ddd	$J_{4,5}$ 8,2; $J_{5,6b}$ 5,0; $J_{5,6a}$ 2,9
H-6a	3,70	1	dd	$J_{6a,6b}$ 10,7, $J_{5,6a}$ 2,9
H-6b	3,75	1	dd	$J_{6a,6b}$ 10,7; $J_{5,6b}$ 5,0
CH_2 arom.	4,79-4,46	6	m	-
CH arom.	7,31 – 7,16	15	m	-